

DISERTAČNÍ PRÁCE

**Metabolismus, transport
a protinádorové účinky
klasických a nových taxanů**

Mgr. Radka Václavíková

Školitel: MUDr. Ivan Gut, DrSc.

Odborný konsultant: Doc. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Katedra Biochemie

Přírodovědecká fakulta University Karlovy

Odborná Skupina Biotransformací

Státní zdravotní ústav Praha



Praha 2006

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda vyjádřila svůj dík všem lidem, kteří přispěli k realizaci této práce. V první řadě bych ráda poděkovala mému školiteli MUDr. Ivanu Gutovi DrSc. za příležitost pracovat pod jeho laskavým vedením po celou dobu mého postgraduálního studia. Současně bych ráda poděkovala všem dalším členům laboratoří Odborné Skupiny Biotransformací SZÚ za jejich odbornou pomoc a vytvoření přátelského pracovního prostředí. Můj dík patří rovněž paní Doc. RNDr. Marii Stiborové DrSc. z Přírodovědecké fakulty University Karlovy za její odborné rady a neocenitelnou pomoc během mého studia.

Dále bych ráda poděkovala:

- Prof. Iwao Ojimovi (University of New York at Stony Brook, N.Y., USA) za syntézu a poskytnutí série SB-T taxanů, které jsou novými syntetickými analogy známých protinádorových léčiv taxanů.
- Ing. Marii Ehrlichové, Mgr. Jaroslavu Truksovi PhD. a Doc. Janu Kovářovi z laboratoře regulace buněčného růstu Ústavu Molekulární genetiky AV ČR v Praze Krči za jejich spolupráci při sledování cytotoxicity a transportu taxanů v sensitivních a resistantních buněčných liniích rakoviny prsu.
- Dr. Petru Šimkovi z Entomologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích za identifikaci všech metabolitů klasických a nových taxanů pomocí hmotnostní spektroskopie.
- Ahcenu Boumendjelovi PhD (Department de Pharmacochimie Moléculaire, Faculte de Pharmacie de Grenoble, Meylan, Francie) za syntézu a poskytnutí série derivátů flavonoidů pro sledování jejich vlivu na metabolismus a transport taxanů.
- mým rodičům a celé rodině za jejich podporu
- všem mým přátelům

Zvláštní dík pak patří mému příteli Petru Neuschlovi za jeho morální podporu a trpělivost během celého mého studia.

Tato práce byla podporována granty Ministerstva zdravotnictví České Republiky (NL/7567-3, NL-6517-3 a 1A/8248) a grantem Grantové agentury AV ČR (305/04/03).

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| Seznam použitých zkratk a symbolů..... | 6 |
| 1. ÚVOD A PŘEHLED LITERATURY..... | 8 |
| 1.1. Nádorová onemocnění a jejich terapie..... | 9 |
| 1.1.1. Rozvoj a příčiny nádorových onemocnění..... | 10 |
| 1.1.2. Klasifikace nádorových onemocnění..... | 11 |
| 1.1.3. Možnosti terapie nádorových onemocnění..... | 12 |
| 1.1.4. Využití cytostatik v chemoterapeutické léčbě..... | 13 |
| 1.2. Taxany..... | 14 |
| 1.2.1. Mechanismus účinku taxanů..... | 15 |
| 1.2.2. Metabolismus taxanů za účasti cytochromů P450..... | 16 |
| 1.2.2.1. Cytochromy P450..... | 17 |
| 1.2.2.2. Funkce cytochromu P450 v MFO systému..... | 18 |
| 1.2.2.3. Formy cytochromů P450..... | 19 |
| 1.2.3. Metabolismus paclitaxelu..... | 21 |
| 1.2.4. Metabolismus docetaxelu..... | 22 |
| 1.2.5. Využití klasických taxanů v protinádorové terapii..... | 24 |
| 1.2.6. Nové deriváty taxanů..... | 25 |
| 1.3. Fenolické antioxidanty..... | 28 |
| 1.3.1. Rozdělení a výskyt přírodních fenolických antioxidantů..... | 28 |
| 1.3.2. Vlastnosti a účinky přírodních fenolických antioxidantů..... | 31 |
| 1.3.3. Syntetické deriváty flavonoidů..... | 32 |
| 1.4. Resistence nádorů..... | 34 |
| 1.4.1. Studium resistance nádorů vůči chemoterapeutikům..... | 34 |
| 1.4.2. Resistence nádorů vůči taxanům a možnosti jejího potlačení..... | 38 |
| 2. CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE..... | 41 |
| 3. MATERIÁL A METODY..... | 43 |
| 3.1. Příprava a charakterizace experimentálních preparátů..... | 43 |
| 3.2. Studium metabolismu taxanů jednotlivými enzymovými preparáty..... | 44 |
| 3.3. Studium vlivu fenolických antioxidantů na metabolismus klasických taxanů..... | 45 |
| 3.4. Studium transportu taxanů v lidských buněčných liniích rakoviny prsu..... | 46 |
| 3.5. Sledování účinků klasických taxanů <i>in vivo</i> v organismu potkana s implantovanými T-buněčnými lymfomy..... | 48 |

| | |
|---|-----------|
| 3.6. Zpracování výsledků..... | 50 |
| 4. VÝSLEDKY A DISKUSE..... | 51 |
| 4.1. Studium metabolismu taxanů <i>in vitro</i> | 51 |
| 4.1.1. Metabolismus paclitaxelu <i>in vitro</i> živočišnými cytochromy P450..... | 51 |
| 4.1.2. Metabolismus docetaxelu <i>in vitro</i> živočišnými cytochromy P450..... | 55 |
| 4.1.3. Metabolismus analogů taxanů <i>in vitro</i> živočišnými cytochromy P450..... | 56 |
| 4.1.4. Enzymatická kinetika metabolismu klasických a nových taxanů <i>in vitro</i> | 63 |
| 4.2. Vliv fenolických antioxidantů na metabolismus klasických taxanů..... | 65 |
| 4.2.1. Vliv fenolických antioxidantů na metabolismus paclitaxelu v lidských a potkaních jaterních mikrosomech | 65 |
| 4.2.2. Vliv fenolických antioxidantů na metabolismus docetaxelu v lidských jaterních mikrosomech..... | 67 |
| 4.3. Studium transportu taxanů v lidských buněčných liniích rakoviny prsu..... | 68 |
| 4.3.1. Cytotoxicita a transport klasických a nových taxanů v sensitivních a resistantních buněčných liniích rakoviny prsu..... | 69 |
| 4.3.2. Vliv Verapamilu a nových taxanů na transport [¹⁴ C]paclitaxelu v lidských buněčných liniích rakoviny prsu..... | 72 |
| 4.3.3. Vliv fenolických antioxidantů a jejich syntetických derivátů na transport [¹⁴ C]paclitaxelu v lidských buněčných liniích rakoviny prsu..... | 74 |
| 4.4. <i>In vivo</i> účinky klasických taxanů na T-buněčné lymfomy v modelovém organismu potkana..... | 77 |
| 4.4.1. Sledování hladiny taxanů a jejich metabolitů v krvi potkanů po i.p. podání v organismu potkana..... | 78 |
| 4.4.2. Studium vlivu taxanů na rozvoj T-buněčných lymfomů <i>in vivo</i> v modelovém organismu potkana..... | 79 |
| 4. ZÁVĚR..... | 82 |
| Seznam použité literatury..... | 86 |
| 5. PŘÍLOHY – SEZNAM PUBLIKACÍ..... | 92 |

PŘÍLOHY

Příloha I: Václavíková R., Horský S., Šimek P. and Gut I.: Paclitaxel metabolism in rat and human liver microsomes is inhibited by phenolic antioxidants. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **368**: 200-209, 2003.

Příloha II: Václavíková R., Horský S. and Gut I.: New in vitro metabolites of paclitaxel in humans, rats, minipigs and regular pigs and CYP involved in their formation. In: *Cytochrome P450, Biochemistry, Biophysics and Drug Metabolism* (Anzenbacher P. and Hudeček J., eds.), pp. Monduzzi Editore, Bologna, 2003.

Příloha III: Václavíková R., Souček P., Svobodová L., Anzenbacher P., Šimek P., F.P. Guengerich and Gut I.: Different in vitro metabolism of paclitaxel and docetaxel in humans, rats, pigs and minipigs. *Drug Metab Dispos* **32**: 666-674, 2004.

Příloha IV: Ehrlichová M., Václavíková R., Ojima I., Pepe A., Kuznetsova LV., Chen J., Truksa J., Kovář J. and Gut I.: Transport and cytotoxicity of paclitaxel, docetaxel and novel taxanes in human breast cancer cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **372(1)**: 95-105, 2005.

Příloha V: Gut I., Ojima I., Václavíková R., Šimek P., Horský S., Linhart I., Souček P., Kondrová E.: Metabolism of new generation taxanes in human, pig, minipig and rat liver microsomes. Předloženo k recenzi v *Xenobiotica*.

Publikace VI: Václavíková R., Boumendjel A., Ehrlichová M., Kovář J. and Gut I.: Modulation of Paclitaxel Transport by Flavonoid Derivatives in Human Breast Cancer Cells. Is there a Correlation Between Binding Affinity to NBD of P-gp and Modulation of Transport? *Bioorg Med Chem* Mar 1: [Epub ahead of print], 2006.

Příloha VII: Otová B., Václavíková R., Ehrlichová M., Horský S., Souček P., Šimek P. and Gut I.: Antitumor Efficiency and Pharmacokinetics of Paclitaxel and Docetaxel upon Repeated Administration in Rats. Předloženo k recenzi v *Eur J Pharm Sci*.

Příloha VIII: Ehrlichová M, Koc M., Truksa J., Naďová Z., Václavíková R. and Kovář J.: Cell death induced by taxanes in breast cancer cells: cytochrome C is released in resistant but not in sensitive cells. *Anticancer Res* **25(6B)**: 4215-4224, 2005.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

| | |
|------------------|--|
| ABC | transportní proteiny rodiny ABC vázající ATP (ATP binding cassette proteins) |
| ACN | acetonitril |
| ATP | adenosintrifosfát |
| Bcl-2 | antiapoptotický gen |
| C2-OHPCT | C2-hydroxypaclitaxel |
| C3'-OHPCT | C3'-hydroxypaclitaxel |
| cDNA | komplementární DNA |
| CSW | Chromatography Station for Windows |
| CYP | cytochrom P450 |
| di-OHPCT | dihydroxypaclitaxel |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| ECL | zvýšená chemiluminiscence (enhanced chemiluminiscence) |
| EDTA | kyselina ethylendiamintetraoctová |
| ER | endoplasmatické retikulum |
| FBS | fetální bovinní sérum (fetal bovine serum) |
| GIT | gastrointestinální trakt |
| HPLC | vysokotlaká kapalinová chromatografie (high-pressure liquid chromatography) |
| IC ₅₀ | koncentrace inhibitoru způsobující padesátiprocentní snížení aktivity |
| i.p. | intraperitoneální aplikace |
| i.v. | intravenosní aplikace |
| K _i | inhibiční konstanta |
| K _m | Michaelisova konstanta |
| LDL | lipidy s nízkou hustotou |
| LRP | protein resistance plicní tkáně (lung resistance-related protein) |
| M | mol/l |
| M1 – M11 | metabolity SB-T-taxanů eluující při HPLC jako 1., 2. až 11. v pořadí |
| MDR | mnohočetná léková resistance (multidrug resistance) |
| MDR1 | gen mnohočetné lékové resistance kódující P-glykoprotein (multidrug resistance gene 1) |
| MFO | monooxygenasový systém se smíšenou funkcí (mixed function oxidases) |
| Milli-Q | voda prvního stupně kvality získaná přečištěním destilované vody |
| mRNA | mediátorová RNA |

| | |
|---------------------------|--|
| MRP | protein mnohočetné lékové resistance (multidrug resistance protein) |
| MS | hmotnostní spektrometrie |
| MTT | (3-4,5-dimethylazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium |
| NAD ⁺ (NADH) | nikotinamidadeninukleotid oxidovaný (redukovaný) |
| NADP ⁺ (NADPH) | nikotinamidadeninukleotidfosfát oxidovaný (redukovaný) |
| NADPH-GS | NADPH – generující systém |
| NBD2 | nukleotid vázající doména 2 (nucleotide binding domain 2) |
| NS | nízkospinový stav |
| OHDTX | hydroxydocetaxel |
| OHPCT | hydroxypaclitaxel s neznámou polohou OH skupiny |
| 6 α -OHPCT | 6alfa-hydroxypaclitaxel |
| ORL | otorhinolaryngologie |
| p | hladiny významnosti statistického testu |
| PAH | polycyklické aromatické uhlovodíky |
| PBS | sodný fosfátový pufr s obsahem NaCl – izotonický roztok (Phosphate Buffer with Salt) |
| PCN | pregnenolon-16 α -karbonitril |
| PCR | polymerázová řetězová reakce |
| P-gp | P-glykoprotein |
| RED | NADPH:CYP reductasa |
| RH | substrát cytochromu P450 |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| ROH | hydroxylovaný produkt |
| RPM | počet otáček za minutu |
| rRNA | ribosomální RNA |
| SB-T-taxany | Stony-Brook-taxany (syntetické analogy klasických taxanů) |
| SDS | dodecylfosfát sodný |
| SH | sulfhydrylová skupina |
| SZÚ | Státní zdravotní ústav |
| THF | tetrahydrofuran |
| t _R | retenční čas |
| TRIS | tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| VS | vysokospinový stav |
| v _{max} | maximální rychlost enzymové reakce |
| XOOH | peroxosloučenina |
| λ | vlnová délka |

1. ÚVOD A PŘEHLED LITERATURY

Nádorová onemocnění patří v současné době mezi nejzávažnější onemocnění a časté příčiny úmrtí v lidské populaci. Většina případů vzniku rakoviny je dána kombinací faktorů genetických a faktorů životního prostředí jako je nevhodný životní styl, složení potravy a kontaminující složky životního prostředí. Všechny tyto faktory oslabují lidský imunitní systém, který pak není schopen dostatečně fungovat a dochází k rozvoji nádorových onemocnění.

Léčba nádorových onemocnění kombinuje chirurgické zákroky, radioterapii a chemoterapeutickou léčbu. Chemoterapie je založena na podávání cytostatik, tedy látek, které jsou schopny usmrtit nádorové buňky. Jejich použití je ale často v terapeuticky účinných dávkách doprovázeno řadou závažných nežádoucích účinků plynoucích z poškození zdravých lidských tkání a orgánů neboť chemoterapie poškozuje i normální buňky, zejména rychle se dělící jako jsou buňky kostní dřeně, sliznic apod. Stále častější překážkou úspěšné chemoterapie je navíc rozvoj resistance nádorů vůči konvenčním cytostatikům vedoucí k selhání léčby.

Proto je v současné době věnována velká pozornost hledání zcela nových léčiv nebo účinnějších derivátů známých cytostatik, které by měly vyšší farmakologickou účinnost, méně nežádoucích účinků a co nejširší spektrum terapeutického použití zejména v léčbě resistantních nádorů. Zároveň jsou hledány možnosti jak zvýšit účinnost konvenčních cytostatik ovlivněním procesů probíhajících po vstupu cytostatik do organismu jako je jejich distribuce a biotransformace.

Významnou skupinou vysoce účinných protinádorových léčiv jsou taxany, které jsou v klinické praxi hojně používány. Bohužel metabolismus taxanů vede k jejich farmakologické inaktivaci a proto detailní poznání tohoto procesu a možnosti zpomalení metabolických přeměn taxanů by mohly zvýšit jejich terapeutickou účinnost, snížit nežádoucí účinky a přispět tak k účinnější protinádorové léčbě všude tam, kde jsou taxany využívány. Jako další problém související s terapií taxanů se v nedávné době ukázal rozvoj resistance řady nádorů vůči těmto léčivům. Snížení resistance vůči klasickým taxanům nebo nalezení nových derivátů taxanů účinných v terapii resistantních nádorů by umožnilo úspěšně aplikovat chemoterapeutickou léčbu taxany i tam, kde dosud selhává.

1.1 Nádorová onemocnění a jejich terapie

Nádorové onemocnění lze charakterizovat jako neregulovaný růst buněk s autonomní povahou buněčné proliferace spojený s poruchou kontrolních mechanismů a s alterací buněčné diferenciace. Nekontrolovaný růst vede u solidních nádorů ke zvětšení postižené tkáně, která může stlačovat okolní struktury nebo vést k postupné invazi do okolních struktur a k metastasování.^[64] Česká republika drží evropské prvenství v počtu nemocných rakovinou konečníku a ledvin. Mezi nejčastější nádorová onemocnění v Evropě - patří rakovina kůže, prsu a plic. U žen je nejčastějším nádorovým onemocněním rakovina prsu. Tvoří 22% všech diagnostikovaných typů rakoviny v ženské populaci.^[137] V ČR se vyskytne kolem 5000 nových případů ročně a toto onemocnění ročně připadne na 95 ze 100.000 žen.^[94,149] V mužské populaci je pak nejčastějším typem nádorových onemocnění rakovina plic.

Dnes pohlížíme na zhoubné nádory jako na **genetické onemocnění**, které vzniká následkem patologických změn v molekule DNA. Od ostatních genetických chorob se liší tím, že mutace způsobující rakovinu jsou převážně somatické. V současné době se všeobecně přijímá teorie mechanismu buněčné transformace, kde rozhodující úlohu hraje aktivace onkogenů a inaktivace tumor supresorových genů na základě genetických změn.^[3] Jako **onkogeny** označujeme geny, které prostřednictvím svých proteinových produktů působí transformaci normálního buněčného fenotypu v nádorový. Jde o patologicky alterované varianty normálních buněčných genů. Produkují proteiny, které si sice zachovávají svou základní funkci, ale buď jsou produkovány v nadměrném množství nebo jsou kvalitativně odlišné a mají zvýšenou aktivitu. Naopak geny potlačující nádor tzv. **tumor supresorové geny** prostřednictvím svých proteinových produktů omezují buněčnou transformaci a proliferaci. Mají tedy opačný účinek než onkogeny a ztráta jejich funkce, která je důsledkem mutací příslušného genu usnadňuje buněčnou transformaci. Bylo identifikováno přes 50 onkogenů např. geny Rb-1 (retinoblastoma 1), p53 (gen proteinu 53), WT-1 (Wilms' tumor suppressor gene), APC (adenomatous polyposis coli gene), BRCA-1/2 (breast cancer 1/2 genes), p16 (gen proteinu 16), VHL (Von Hippel-Lindau syndrome suppressor gene), DCC (tumor suppressor gene Deleted in Colorectal Cancer), PTEN (phosphatase and tensin homolog) či gen pro E-cadherin. Ve všech buňkách zároveň existují kontrolní mechanismy, kterými se opravují chyby vznikající v průběhu replikace. Systém opravných mechanismů je zajišťován produkty **reparačních genů** a jejich porucha usnadňuje maligní transformaci.^[64]

Obvykle je ovšem potřeba pěti nebo šesti nezávislých mutací, které se musí odehrát v jediné buňce, aby získala karcinogenní genotyp. Mutace vedoucí ke vzniku nádorů se neobjevují najednou, ale postupně se hromadí v průběhu mnoha let. Někteří jedinci mají vrozenou zárodečnou mutaci v tumor supresorovém genu nebo protoonkogenu a množství dalších mutací potřebných pro rozvoj rakoviny je u nich menší, což souvisí s vyšší frekvencí a časnějším věkem možného vzniku nádorového onemocnění u takto postižených jedinců.^[3]

1.1.1. Rozvoj a příčiny nádorových onemocnění

Celý proces vzniku nádorů tedy kancerogeneze probíhá v několika relativně dobře charakterizovaných etapách. Zahájení procesu (*iniciace*) nastává účinkem zevních a vnitřních faktorů. Dojde sice ke genetické poruše, ale ta může zůstat bez funkčních důsledků po řadu let. Teprve spoluúčastí dalších podnětů dochází k následnému vývoji (*promoce*), při které se objevují poruchy diferenciací. V tomto období existuje ještě možnost zastavení tohoto abnormálního vývoje. V opačném případě proces pokračuje, mění se zásadním způsobem fenotyp buněk a vzniká maligní klon (*stadium konverse či transformace*). Transformované buňky ztrácejí schopnost odpovědi na regulační mechanismy, dochází k lokálnímu růstu nádoru (*stadium progrese*) a posléze k šíření nádoru mimo prvotní ložisko (*stadium metastasování*).

Spouštěcím mechanismem celého procesu mohou být nejrůznější karcinogenní faktory, jejichž společnou vlastností je působení genetických změn, na jejichž podkladě dochází k aktivaci onkogenů nebo inaktivaci antionkogenů. Faktory zevního prostředí, které se podílejí na vzniku nádorů lze dle jejich povahy rozdělit na *faktory fyzikální, chemické a biologické*. Za nejvýznamnější z fyzikálních faktorů se považuje záření (ionizující, ultrafialové, Rentgenovo záření). Z dalších fyzikálních faktorů prokázaly karcinogenní účinek působení azbestových vláken, lokální tepelné změny či chronické dráždění. Mezi prokázané chemické karcinogeny ze zevního prostředí patří těžké kovy (Cd, Be, Co, Ce, Ni, Co^{VI+}), arsen, polycyklické aromatické uhlovodíky (benzo(a)pyren, methylcholatrien aj.) obsažené v dehtu, tabákovém kouři nebo v průmyslových exhalacích. Z dalších chemických sloučenin řadíme do karcinogenů aromatické aminy (2-naftylamin, benzidin), nitrosaminy, benzen, chlorované uhlovodíky, hydraziny a triaziny, dále pak různé léky a některé přírodní látky jako aflatoxin B₁, aktinomycin D či diestery forbolu. Většina chemických karcinogenů se přímo či svými metabolity váže na DNA a vytváří kovalentní adukty, méně častěji dochází k apurinaci

a apyrimidinaci DNA, příčnému propojení (cross-linking), vzniku cyklických aduktů, interkalátů nebo pyrimidinových dimerů. Vedle přímého genotoxického účinku mohou chemické kancerogeny poškodit genetický materiál také nepřímo (např. účinkem kyslíkových radikálů vznikajících jejich působením). Mezi biologické faktory kancerogeneze patří především RNA a DNA viry; herpesviry (virus Epsteina-Barrové), papilomaviry, hepadnaviry a v omezeném měřítku některé bakteriální a parazitární infekce. Od karcinogenů je třeba odlišit pomocné faktory (**kokarcinogeny, promotory**), které mají schopnost již existující genetické změny prohloubit, nikoli je samostatně vyvolat.^[64]

1.1.2. Klasifikace nádorových onemocnění

Klasifikace nádorů vychází z jejich histologické skladby, anatomické lokalizace, biologické povahy a histogeneze. Z histologického hlediska rozlišujeme nádory na *diferencované, méně diferencované, popř. anaplastické*. Podle biologického chování se nádory dělí na *benigní (nezhoubné) a maligní (zhoubné)*. Nezhoubné nádory vyrůstají z děložní svaloviny, tukové či vazivové tkáně. Mohou se vyskytovat v různých místech těla, včetně ženských prsů (má je asi 50% žen), a různých velikostech. Nejsou-li krvácivé nebo příliš nenarůstají není nutné a ani vhodné je operovat (každý chirurgický zákrok snižuje imunitu a následná jizva vytváří hráz v lymfatickém systému). Nezhoubné nádory nevytváří metastasy (druhotné nádory v dalších částech těla) a nikdy se nemohou rozvinout v rakovinu. Typickým znakem zhoubnosti je tvoření druhotných nádorů – metastas v důležitých orgánech (játra, plíce, kosti, mozek). Postihují buď celé tělo (tzv. generalisace) – tyto jsou jen velmi těžko léčitelné, nebo jsou ojedinelé (např. v uzlinách nebo játrech). Konečně histogenetická klasifikace přihlíží k původu nádorů dle základních typů tkání. Tak rozeznáváme nádory **epitelové, mezenchymové, neuroektodermové, germinální a smíšené**. Epitelové nádory mohou být benigní (papilom, adenom) nebo maligní (karcinom). Mezenchymové nádory se třídí podle výchozí tkáně na benigní (fibrom, myxom, lipom, hemangion, leiomyom, rabdomyom, chondrom, osteom a synovialom). Maligní pojivové nádory nazýváme sarkomy. Nádorová onemocnění krvetvorné tkáně vycházejí z krevních buněk různých vývojových řad. Zjednodušeně je lze rozdělit na leukémie difúzně infiltrující orgány a na maligní leukémie. Do neuroektodermových nádorů řadíme jednak nádory centrálního nervového systému a periferních nervů, jednak nádory z névových buněk. Germinální nádory jsou nádory ze zárodečných buněk. Histologicky mohou být značně heterogenní (např. embryonální

karcinom, nádor ze žloutkového váčku, choriokarcinom a teratomy). Poslední skupinou jsou smíšené nádory, které se skládají z různých mezenchymových složek, epitelových a neuroektodermových tkání různé vyžralosti a biologické povahy vyskytující se v dané oblasti.^[64]

1.1.3. Možnosti terapie nádorových onemocnění

Ve většině případů nestačí k léčbě nádorových onemocnění jen jediná léčebná metoda, ale je nutný komplexní přístup **kombinující chirurgickou léčbu s radioterapií a užíváním chemoterapeutik**. **Chirurgie** se využívá jednak k diagnostickým účelům a jednak je tzv. paliativní chirurgie důležitou součástí komplexní léčby. Jde o operační odstranění primárního nádoru, kterým se minimalizuje množství nádorových buněk, zabrání se komplikacím bezprostředně ohrožujícím život a dochází zpravidla ke zlepšení kvality života nemocného. Ve zvláštních případech se rovněž uskutečňuje chirurgická léčba metastas za předpokladu, že nejsou přítomny metastasy v různých dalších orgánech. Z moderních chirurgických přístupů se využívá působení laseru (např. u karcinomu jícnu, hrtanu, bronchogenního karcinomu) a kryochirurgie. **Radioterapie** využívá pro léčbu nádorů letálních účinků různých druhů ionizujícího záření. Je to záření korpuskulární (částicové) a elektromagnetické (fotonové), přičemž nejčastěji se používá elektromagnetické záření X (rentgenové, brzdné) o různém napětovém rozsahu. V časných stádiích má léčba zářením kurativní cíl, jehož záměrem je úplná eradikace nádoru, ovšem je také významnou metodou paliativní. Cílovou strukturou pro vznik radiačního poškození je DNA. Interakce záření s DNA probíhá jednak přímo působením fotonů záření poškozujícím řetězce DNA a jednak nepřímo prostřednictvím radikálů biomolekul. Účinek záření se přitom projevuje jak na úrovni molekulární, tak na úrovni buněčné zejména změnou proliferační aktivity a indukci programované smrti buňky (apoptosy). Ozářit však nelze celé tělo, tím by vznikla nemoc z ozáření a proto se ozařuje lokálně s přesně vymezenou dobou tak, aby neodumřel i přirozený organismus, ale i tak je nutné počítat s řadou nežádoucích účinků. **Chemoterapie** je metoda, která využívá k léčbě nádorových onemocnění účinek chemických sloučenin nazývaných cytostatika. Hlavním kritériem pro využití chemoterapie jako léčebné metody je citlivost nádorů k chemoterapeutikům. U zvláště sensitivních onemocnění má chemoterapie **úlohu primární** (léčebnou), dále může mít charakter **adjuvantní** (doplňkový k základní léčebné metodě – chirurgie, radioterapie) případně **neoadjuvantní** (zlepšuje operabilitu nádorů) či **paliativní** (doplňková, udržovací) terapie. U některých typů nádorů se uplatňuje také **imunoterapie**^[53,64]

nebo **hormonální terapie**. K hormonální terapii se používají adrenokortikosteroidy, estrogény, antiestrogény, progesterony a androgeny. Tyto látky se používají v terapii nádorů, kde hormony a jejich exprese hraje důležitou roli v rozvoji nádoru např. tamoxifen je používán jako anti-estrogen v terapii rakoviny prsu, kde je prokázáným rizikovým faktorem prodloužená expozice estrogenům, které stimulují proliferaci prsních buněk a tím zvyšují pravděpodobnost, že se bude dělit buňka s potenciální nádorovou mutací.^[57,88] Při chemoterapii chemickými cytostatiky však dochází nejen k ničení rychle se množících buněk nádorových, ale i k ničení přirozených rychle se množících buněk jako jsou buňky jaterní tkáně, bílé krvinky, červené krvinky, spermie, vajíčka. Pro organismus pacienta je léčba cytostatiky vždy toxická. Například deriváty platiny jsou těžce jedovaté pro ledviny, jiné působí toxicky na nervy, močový měchýř, srdce nebo plíce. Cytostatická léčba působí rovněž velmi nepříznivě na psychiku zejména mladších lidí a způsobuje i další problémy např. drastické snížení imunity.

1.1.4. Využití cytostatik v chemoterapeutické léčbě

Cytostatika jsou základním kamenem chemoterapie nádorových onemocnění. Mezi hlavní zdroje cytostatik patří syntéza nových látek, fermentace plísní s následnou izolací protinádorových antibiotik a extrakce látek přirozeného původu – z rostlin, mořských hub apod. Farmakokinetika cytostatik zahrnuje řadu dílčích pochodů, které spolu velmi úzce souvisí a vzájemně na sebe navazují. Je to resorpce, distribuce cytostatika v organismu, jeho biotransformace a vylučování. Resorpce cytostatika závisí na aplikační cestě (nejúčinnější je parenterální aplikace), formě podání a průniku cytostatika membránami. Průnik cytostatika membránami se může dít různým způsobem: filtrace membránovými póry, pasivní difúze membránami nebo aktivní transport prostřednictvím specifického přenašeče. Ideální situace nastává, pokud je cytostatikum transportováno specificky pouze do transformovaných buněk, v kterých působí, ale v současné době není specifita používaných cytostatik ideální a selektivního účinku je často dosaženo díky rozdílné růstové kinetice normálních a nádorových buněk. V nekontrolovaně proliferující populaci nádorových buněk se počet buněk rychle zvětšuje, ale jejich regenerační čas je ve srovnání s normálními buňkami – v závislosti na pokročilosti onemocnění – prodloužen. Ke stimulaci dělení buněk dochází například po chirurgickém odstranění okolních buněk. Je pak nutné zvolit optimální kombinaci a načasování dávek cytostatik. Jako poměrně úspěšné se jeví použití vysokodávkové terapie, kterou bývají zasaženy i buňky v klidové fázi např. kombinace vysokých dávek cytostatik

s antidotem, následnou transplantací kostní dřeně nebo aplikací hematopoetických růstových faktorů mezi jednotlivými dávkami cytostatik.^[63]

Jednotlivá cytostatika se liší částí buněčného cyklu, ve které působí a mechanismem účinku, který zasahuje nejrozličnější systémy a pochody v buňkách. V současné době je cytotoxický účinek chemoterapeutik vysvětlován několika základními mechanismy:^[63]

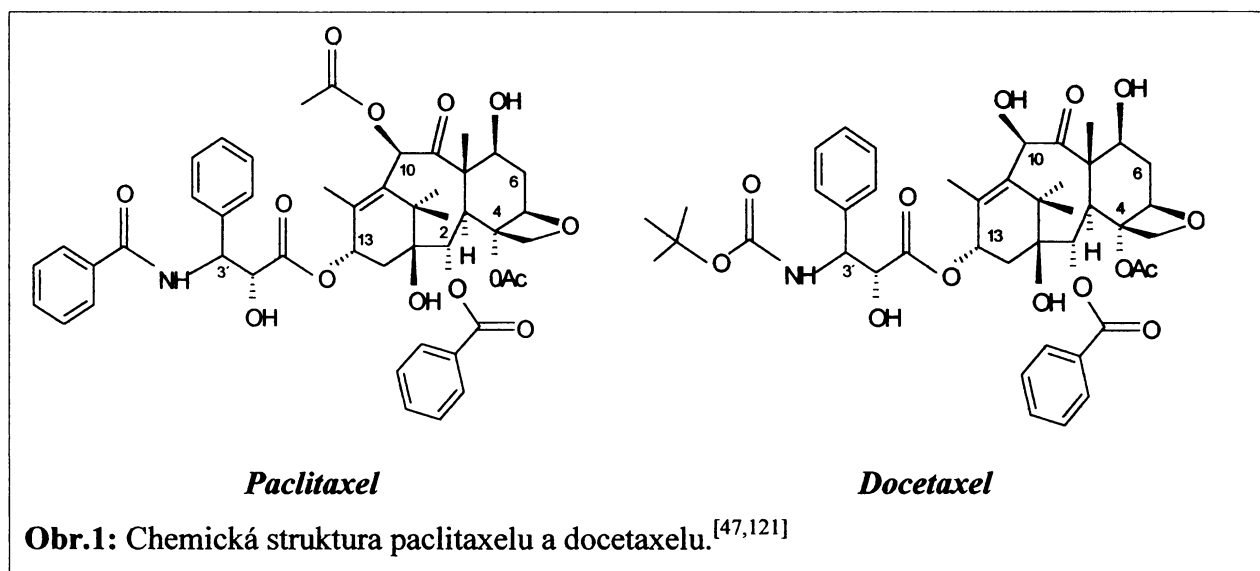
- **Přímé poškození nukleových kyselin** (např. alkylace, interkalace, inhibice topoisomeras, rozštěpení DNA), vedoucí k poruše jejich funkce a následné apoptose. Příklady alkylujících cytostatik jsou cyklofosamid, karmustin, lomustin. Látkami, které se rovněž vážou na DNA a zabraňují syntéze RNA jsou protinádorová antibiotika jako doxorubicin (adriamycin), mitomycin-C či bleomycin.
- **Inhibice klíčových enzymů metabolismu** vedoucí k poškození nukleových kyselin. Tímto způsobem působí tzv. antimetabolity. Léčiva této skupiny zasahují do S fáze buněčného cyklu. Jedná se o analoga metabolitů inhibující dílčí reakce biosyntézy nukleových kyselin (analoga kys. listové, methotrexát) nebo analoga nukleotidů, která jsou inkorporována do nukleových kyselin, což vede k jejich defektní funkci (6-merkaptopurin, 5-fluorouracil) či inhibitory topoisomeras např. camptotheciny (irinotecan, topotecan)^[111].
- **Alterace mikrotubulárního proteinu** vedoucí k zastavení mitosy buněčného cyklu inhibicí tvorby nebo depolymerisací mikrotubulů (vinka-alkaloidy) či naopak tvorbou abnormálních mikrotubulů a inhibicí jejich depolymerisace (taxany). V obou případech je narušena rovnováha mezi volným tubulinem a tubulinem vázaným v mikrotubulech.
- **Porucha syntézy proteinů** - méně často (aminoglykosidy, tetracykliny)
- **Poškození buněčné membrány** - méně často (peniciliny, cefalosporiny)

1.2. Taxany

Taxany představují jednu z nejvýznamnějších skupin protinádorových léčiv s širokým spektrem terapeutického využití. Jejím základem jsou dvě léčiva využívaná v terapeutické praxi **paclitaxel a docetaxel**.^[20]

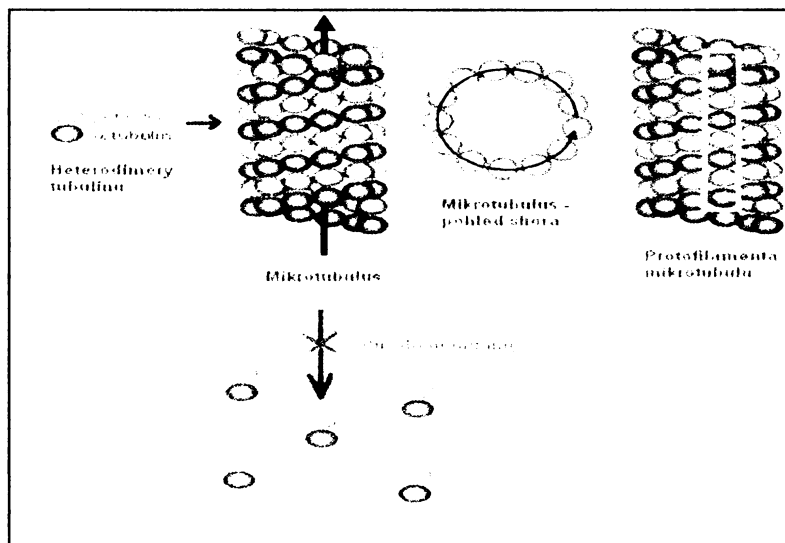
Paclitaxel (TAXOL[®], obr.1) byl poprvé extrahován z kůry Pacifického tisu *Taxus brevifolia* během intenzivního výzkumu přírodních sloučenin jako antineoplasických látek na

konci šedesátých let.^[144] Není produkován přímo tiselem, ale endofytickou houbou *Taxomyces andreanae* parazitující na tisu,^[62] ovšem dnes je připravován semisyntetickou cestou. Docetaxel (TAXOTERE[®], obr.1) je semisyntetickým analogem paclitaxelu, připravovaným z 10-deacetylbaccatinu III, inaktivního prekursoru izolovaného z jehličí Evropského tisu *Taxus baccata*.^[9,144]



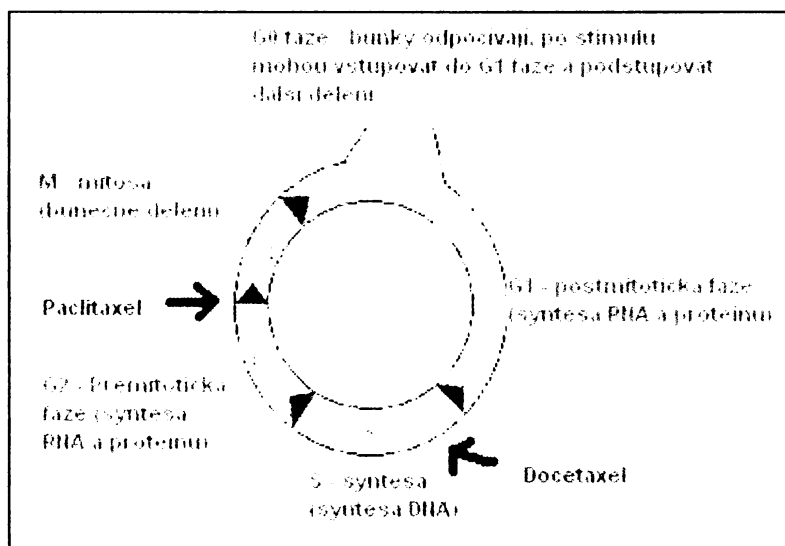
1.2.1. Mechanismus účinku taxanu

Paclitaxel a docetaxel jsou tzv. **mitotické jedy**, to znamená, že působí cytotoxicky v průběhu mitosy buněčného cyklu. Interferují se systémem mikrotubulů a tubulinu v eukaryotických buňkách. Tubulin je bílkovina tvořená podjednotkami α a β a jejich střídavým řazením se formuje do protofilament. Třináct protofilament vytváří dutý válec, mikrotubulus o průměru 20nm. Mikrotubuly hrají klíčovou úlohu pro správnou migraci chromosomů při mitose, dále se podílejí na udržení tvaru buňky, sekreci hormonů, transportu granulí, buněčné motilitě a na přenosu signálů mezi povrchovými membránovými receptory a jádrem.^[13,62] Za normálních podmínek existuje v buňce rovnováha mezi tubulinem volným a vázaným v mikrotubulech.^[13] Taxany svou interakcí s mikrotubuly posouvají rovnováhu mezi tubulinem a mikrotubuly směrem k mikrotubulům.^[9] Urychlují jejich tvorbu, stabilizují již vytvořené mikrotubuly a brání jejich depolymerizaci na volný tubulin čímž narušují rovnováhu mezi tubulinem volným a vázaným v mikrotubulech a tím i průběh mitosy.^[113,131] Působení taxanů v buňkách je znázorněno na obr.2.



V poslední době byly objeveny další sloučeniny vyskytující se v přírodě, které působí na buňky stejným způsobem jako taxany a u kterých se uvažuje o farmakologickém použití. Jsou to epothiliony, eleutherobin a discodermolid.^[19,48,130]

Obr.2: Účinek taxanů na mikrotubulární systém v eukaryotických buňkách.^[152]



Taxany ač jsou si strukturně podobné, mají rozdílné farmakologické vlastnosti a působí v různých fázích buněčného cyklu: *docetaxel* je nejvíce aktivní v *S fázi*, zatímco *paclitaxel* je převážně aktivní v *G₂/M fázi* (obr.3).^[13,29,113,144]

Obr.3: Jednotlivé fáze buněčného cyklu eukaryotických buněk a působení taxanů v konkrétních fázích buněčného cyklu.

Dalším mechanismem účinku taxanů je *indukce programované smrti buňky – apoptosy*. Tlumí totiž expresi onkogenu *bcl-2* a jeho fosforylací inhibují zároveň jeho funkci.^[45,46] Funkcí genu *bcl-2* je kódování membránových proteinů, které inhibují apoptosu.^[13,62] Inaktivace *bcl-2* tak vede k indukci procesu apoptosy.

1.2.2. Metabolismus taxanu za účasti cytochromu P450

Taxany jsou metabolisovány a vylučovány hlavně *hepatobiliární cestou* za účasti významné skupiny biotransformačních enzymů nazývaných *cytochromy P450*. Účinnosti cytochromů P450 v metabolismu léčiv se věnuje značná pozornost a to jak jejich podílu na

tvorbě finálních metabolitů léčiv, tak i na reakcích vedoucích ke zvýšení jejich farmakologické aktivity nebo vyvolávajících toxické účinky. Identifikace isoformů cytochromů P450 metabolizujících jednotlivá léčiva a informace o jejich výskytu u člověka a jiných živočišných druhů je z klinického hlediska nepostradatelná s ohledem na stanovení účinků a toxicity léčiv. Poznání metabolismu léčiv také potenciálně umožňuje zvyšovat nebo modulovat jejich účinek nebo naopak snižovat vedlejší účinky.^[103,132] Rozdílné metabolické profily taxanů jsou dány mezidruhovými, pohlavními a rovněž individuálními rozdíly v expresi a obsahu jednotlivých cytochromů P450. Množství cytochromů v jednotlivých tkáních totiž nelze brát absolutně. Řada významných forem cytochromů P450, které metabolizují xenobiotika, patří k silně inducibilním enzymům tzn., že působením látek zvaných induktory CYP dochází ke zvýšení množství a aktivity enzymu.^[106] Některé CYP lze u zvířat indukovat aplikací xenobiotik jako jsou *polycyklické aromatické uhlovodíky* (3-methylcholanthren, β -naftoflavon, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin), *barbituráty* (fenobarbital), *steroidy* (pregnenolon 16 α -karbonitril, dexamethason), *jednoduché uhlovodíky s aromatickými řetězci* (ethanol, aceton), *hypolipidemická léčiva* (klofibrát) nebo *makrolidová antibiotika*. Indukovat CYP lze i *potravou, alkoholem, kouřením, hladověním* apod.^[21,128] Regulace je velmi komplexní a zahrnuje zvýšení transkripce, stabilizaci mRNA, stabilizaci proteinu i ovlivnění jeho degradace.^[21] Jiné látky se chovají jako *inhibitory funkce P450* a to buď *kompetitivní* (soutěží se substrátem o stejné aktivní místo) nebo *nekompetitivní* (váží se na jiné místo enzymu než substrát CYP). Některé látky *ireversibilně poškozují hem* (tzv. substráty sebevraždy = suicide substrates), nebo se ireversibilně váží na protein P450. Specifické inhibitory CYP lze využít ke studiu podílu určitého P450 na metabolismu různých substrátů či k inhibici jeho katalytické funkce.^[41,90] Inhibicí cytochromů P450 lze ovlivnit rovněž metabolismus taxanů. Z tohoto hlediska jsou významné především selektivní inhibitory CYP3A ovlivňující metabolismus paclitaxelu a docetaxelu a selektivní inhibitory CYP2C8 mající vliv na přeměnu paclitaxelu. Známými inhibitory CYP3A jsou ketokonazol, troleandomycin,^[145] naringenin,^[39] gestogen,^[38] mezi selektivní inhibitory CYP2C8 řadíme sulfafenazol,^[103] kvercetin a kaempferol.^[47]

1.2.2.1 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (EC 1.14.14.1) jsou považovány za nejdůležitější enzymy oxidace a redukce xenobiotik u živočichů a podílejí se také na metabolismu řady látek těla vlastních jako steroidů, mastných kyselin či prostaglandinů. Obecně působí tyto hemoproteiny jako

koncové oxidoreduktasy v enzymatických komplexech *monooxygenas se smíšenou funkcí* (z angl. *mixed-function oxidases*, dále jen *MFO*) přítomných u živočichů i rostlin. V lidském těle se vyskytují především v játrech, nicméně významné jsou i jejich hladiny v plicích, ledvinách, tenkém střevě, kůži, mozku, nadledvinkách, nosní sliznici, varlatech a placentě. V buňkách jsou lokalizovány převážně v membránách hladkého i drsného endoplasmatického retikula (dále jen ER), některé rovněž v membránách mitochondrií jako nezbytné složky MFO systému.^[41,135] Sloučeniny, které jsou substráty takových enzymů, jsou v organismu biotransformovány za vzniku polárnějších produktů, které pak mohou být vyloučeny a nedochází tak k bioakumulaci příslušných xenobiotik. Vedle detoxikace těchto sloučenin může docházet i ke vzniku takových derivátů, které jsou biologicky aktivnější; fyziologicky i farmakologicky působí příznivě, jiné mohou být toxické, mutagenní či karcinogenní.^[41,103,132]

1.2.2.2. Funkce cytochromu P450 v MFO systému

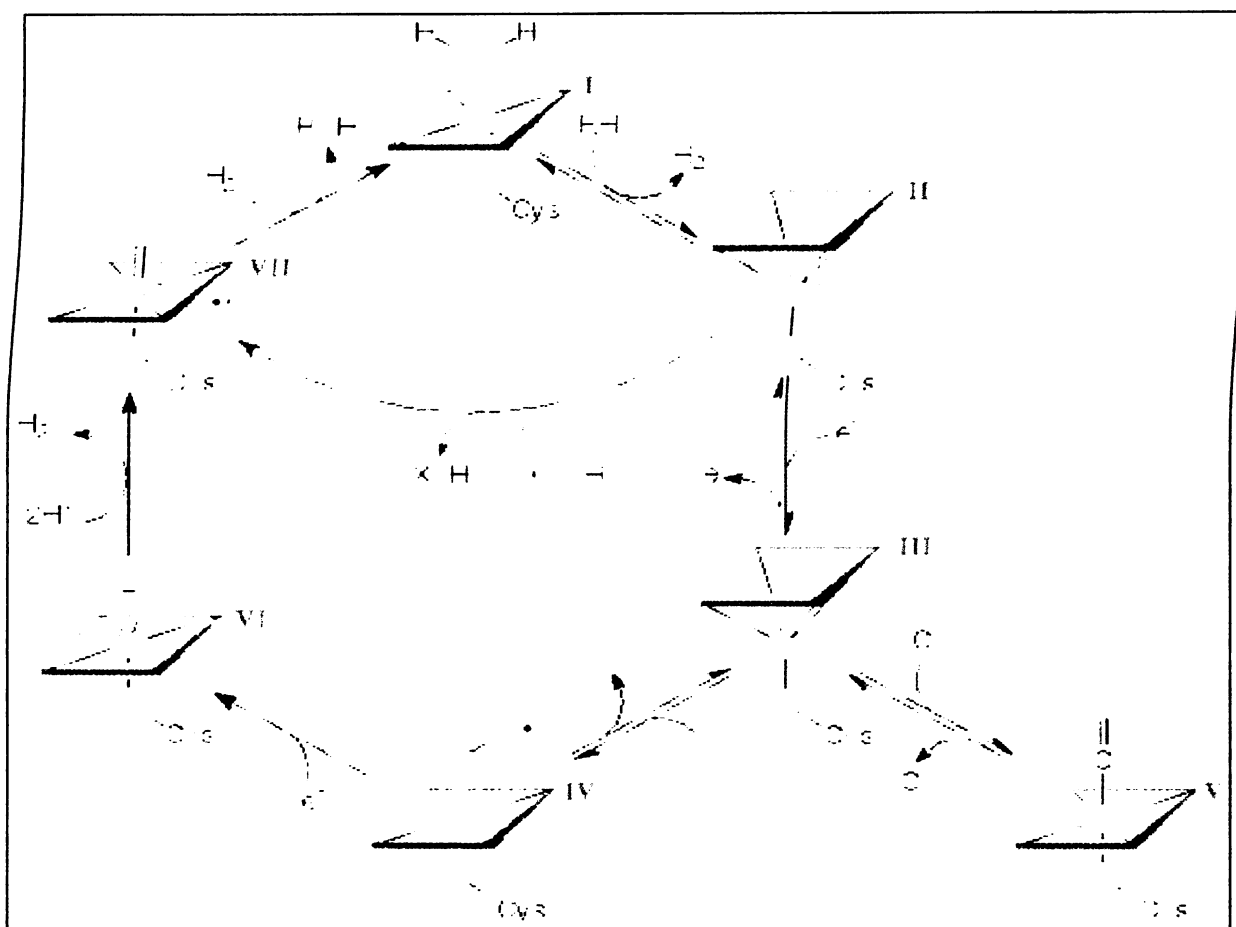
Cytochrom P450 plní jako základní složka enzymatických komplexů *monooxygenas se smíšenou funkcí* vlastní oxidasovou funkci MFO systému tím, že zprostředkovává vazbu molekulárního kyslíku, jeho aktivaci a zabudování jednoho atomu kyslíku do molekuly substrátu, přičemž druhý atom kyslíku je redukován na vodu. Obecný mechanismus *monooxygenasové* reakce lze shrnout Masonovou rovnicí :



Kde RH představuje substrát oxidovaný MFO systémem.^[131]

Cytochrom P450 se skládá z apoproteinové složky a prostetické skupiny, kterou je hem typu b navázaný koordinačně kovalentní vazbou atomu železa (ve svém centru) na sulfhydrylovou skupinu (SH) aminokyseliny cysteinu v primární struktuře apoproteinu P450.^[86] Dalšími složkami MFO systému jsou *NADPH-P450 reduktasa (EC 1.6.2.4.)* dodávající elektrony potřebné k redukci a frakce membránových lipidů. Fosfolipidy MFO, které nejsou nezbytně nutné pro vazbu substrátu interagují zčásti specificky s P450 (způsobují posun rovnováhy směrem k vysokospinové formě (VS) a konformační změny zvyšující afinitu P450 k substrátu). Zároveň stimulují tvorbu funkčně aktivního komplexu tím, že vytváří vesikulární útvary, které usnadňují interakce P450-reduktasy a jsou zásobárnou substrátů pro P450.^[41] Fakultativními složkami jsou pak *cytochrom b₅ a cytochrom b₅ reduktasa (EC 1.6.2.2.)*.^[133]

Ve schématu (obr.4) je shrnut obecný mechanismus reakčního cyklu cytochromu P450 v MFO systému.



Obr. 4: Reakční cyklus cytochromu P450 (RH – substrát, ROH – hydroxylovaný produkt, XOOH – peroxosloučenina)

1.2.2.3. Formy cytochromů P450

Cytochromy P450 tvoří tzv. superrodinu hemoproteinů typu b s identickou prostetickou skupinou i mechanismem katalýzy, ale různou strukturou apoproteinové části, která je zodpovědná za rozdíly v substrátové specifitě.^[128] Tyto různé formy (isoformy) jsou řazeny na základě podobnosti aminokyselinové sekvence do genetických rodin (sekvenční homologie větší než 40%) a podrodin (homologie větší než 55%).^[153] V současnosti bylo již popsáno na 500 isoenzymů P450, které náleží do 74 rodin, 14 z nich jsou rodiny savčích cytochromů P450. Těchto 14 rodin obsahuje 26 podrodin, z nich 20 bylo nalezeno v lidském genomu. Rodiny cytochromů P450 jsou označovány prvním číslem za zkratkou P450. Následuje velké písmeno označující podrodinu. Jednotlivé isoenzymy jsou pak označeny číslem za písmenem podrodiny. Pro zjednodušení Nebert a spol.^[89] navrhli označení forem P450 zkratkou **CYP**

(**cytochrom P450**), za níž pak následuje označení rodu a podrodu podle výše uvedených kritérií.^[36,89,93,132] Jednotlivé isoformy P450 mohou být rozpoznány na základě jejich struktury, substrátové specifity nebo reakcemi s různými typy induktorů.^[35] Mezi lidmi a jinými živočišnými druhy existují genetické a indukci vyvolané rozdíly jejich exprese. Například některé formy CYP potkanů používaných jako nejběžnějších experimentálních zvířat nejsou přítomny u člověka a naopak i ortologní (analogické) formy potkaních a lidských forem mají přes řadu katalytických podobností výrazné rozdíly.^[90] Z tohoto pohledu jsou perspektivními experimentálními modely pro farmakologické a toxikologické studie bez potřeby indukce biotransformačních enzymů miniprasata a prasata,^[68] jejichž enzymatická výbava je velmi podobná lidské. Např. pro nejvýznamnější lidský CYP3A4 byla nalezena ortologní forma CYP3A29 u prasat^[60] i miniprasat.^[5] Orgány a tkáně z transgenních jedinců obou zmiňovaných živočišných druhů jsou navíc potenciálními kandidáty pro využití v humánní terapii hlavně xenotransplantacích.^[23] Z těchto důvodů je jejich využití jako experimentálního modelu studia metabolismu xenobiotik tolik aktuální. V předkládané práci byla věnována pozornost cytochromům P450 podílejícím se na metabolismu taxanů. Jedná se o podrodu CYP 3A u lidí, potkanů, prasat i miniprasat a cytochrom P450 2C8, který je přítomen pouze u lidí a prokazatelně se účastní metabolismu paclitaxelu.

Členy podrodiny lidských **CYP3A** jsou **CYP3A4**, **CYP3A5** a **CYP3A7**. Celá podrodina je velmi důležitá v katalýze metabolismu různých léčiv, karcinogenů a endogenních substrátů. Jsou nejrozšířenějšími formami CYP (20 – 60%) v játrech a jsou i v jiných tkáních. Mezi substráty CYP 3A4 patří testosteron, progesteron a androstenedion.^[148] Z léčiv to jsou quinidin, nifedipin, lidokain, erythromycin, troleandomycin, roxithromycin, cyklosporin, warfarin, triazolam, midazolam, diazepam atd. a dále mnoho prokarcinogenů např. aflatoxin B₁.^[8,35,103,106]

CYP2C podrodiny jsou u člověka hojně zastoupeny a mají širokou substrátovou specifitu. V metabolismu a účinnosti řady léčiv hrají velmi významnou roli. Je pro ně totiž typický výrazný genetický polymorfismus, který způsobuje, že u určitých skupin lidské populace je zcela zabráněno chemoterapeutickému účinku některých léčiv, které jsou na cytochomech P450 podrodiny 2C metabolicky závislé. U lidí byly identifikovány čtyři formy tohoto enzymu (**2C8**, **2C9**, **2C18** a **2C19**). Jsou exprimovány výlučně v játrech. O metabolické úloze samotného CYP2C8 je známo poměrně málo. Substrátem pro tento CYP je například paclitaxel a také tolbutamid a benzfetamin, které jsou substráty rovněž pro CYP2C9. CYP2C8 má také svou roli v metabolismu endogenních látek jako retinol a retinová kyselina.^[40,147]

1.2.3. Metabolismus paclitaxelu

Metabolismus paclitaxelu probíhá **v játrech** a spočívá v oxidačních reakcích, původní léčivo a metabolity se vylučují žlučí a zažívacím traktem,^[81] pro což svědčí i to, že paclitaxel byl objeven u pacientů v plasmě, moči a žluči, zatímco jeho metabolity pouze ve žluči.^[41,42] Hlavními pozicemi molekuly paclitaxelu, kde probíhají metabolické přeměny **za účasti CYP** jsou *para*-pozice C-3'-fenylu, *meta*-pozice C-2 benzoátu, polohy C-6 a C-10.^[98,99]

U lidí je v *in vitro* podmínkách s lidskými jaterními mikrosomy základní biotransformační reakcí oxidace v C6 pozici na taxanovém kruhu za vzniku hlavního lidského metabolitu **6 α -hydroxypaclitaxelu (6 α -OHPCT)**. Další metabolit odpovídá hydroxylaci v *para* pozici na C3' postranního řetězce, přičemž množství 6 α -hydroxypaclitaxelu výrazně převyšuje **C3'-hydroxypaclitaxel (C3'-OHPCT)**.^[24,113] V *in vivo* podmínkách byly objeveny ve žluči pacientů oba monohydroxylované metabolity detegované *in vitro*, dále **dihydroxypaclitaxel**^[81,82,84] a navíc 7 minoritních metabolitů, z nichž 3 byly identifikovány jako **10-deacetylpaclitaxel, 10-deacetylbaecatin III a baecatin III**. V pokusech s cDNA exprimovanými lidskými CYP^[113] bylo zjištěno, že tvorbu C3'-hydroxypaclitaxelu katalyzuje **CYP3A4**, tvorbu 6 α -hydroxypaclitaxelu katalyzuje **CYP2C8**. Velké individuální rozdíly v metabolismu paclitaxelu u lidí jsou dány interindividuálními rozdíly v expresi CYP2C8 a CYP3A4 proteinů v játrech a rovněž genetickým polymorfismem CYP2C8.^[134] Metabolismus paclitaxelu je zároveň jeho detoxikací a metabolity jsou mnohem méně cytotoxické než původní léčivo.^[47,61]

Přeměna paclitaxelu se liší u lidí, potkanů a dalších živočišných druhů. U **potkanů** byly v *in vitro* podmínkách detegovány dvě fenolické sloučeniny odpovídající **C3'-OHPCT a C2'-hydroxypaclitaxelu(C2-OHPCT)** a dvě neznámé fenolické sloučeniny.^[56] V *in vivo* podmínkách bylo objeveno ve žluči potkanů kromě paclitaxelu 9 jeho metabolitů, z nichž byly identifikovány **C3'-OHPCT a C2-OHPCT** a minoritní **baecatin III**. Tvorby metabolitů se účastní CYP3A1/2.^[4] 6 α -OHPCT vznikající u lidí nebyl v krysí žluči vůbec nalezen.^[84] U jiných experimentálních zvířat byl detegován vždy C3'-OHPCT, 6 α -OHPCT vznikal také u morčat, kde se tvořil navíc ještě jeden neznámý metabolit a u psů, kde vznikaly navíc dva metabolity s neznámou strukturou. Opice tvoří stejné metabolity jako člověk.^[26]

1.2.4. Metabolismus docetaxelu

Docetaxel se nardožil od paclitaxelu přeměňuje stejným způsobem u lidí a jiných živočišných druhů (myš, potkan, králík, pes).^[9,29,83] Metabolismus probíhá výlučně **v játrech** a metabolity jsou vylučovány přes žluč do výkalů, kde představují až 75% původního léčiva. Pouze méně než 10% bylo objeveno ve výkalech jako nezměněný docetaxel. Ačkoli je docetaxel strukturně velmi podobný paclitaxelu, metabolismus probíhá odlišným způsobem.^[121,131] Hlavní metabolickou cestou jsou postupné oxidace terc-butyl esterové skupiny na postranním řetězci. Docetaxel je oxidován na primární alkohol **hydroxydocetaxel (OHDTX)** a následně oxidován přes nestálý aldehyd na dva diastereomerické **hydroxyoxazolidinony A a B**. Jinou oxidační cestou hydroxydocetaxel poskytuje přes odpovídající karboxylovou kyselinu **oxazolidindion**.^[83,121,131]

Dalšími metabolickými cestami docetaxelu jsou **7-epimerizace** na diastereomer docetaxelu, který podléhá stejným metabolickým přeměnám jako docetaxel. V *in vitro* podmínkách s cDNA exprimovanými CYP 3A4 a lidskými jaterními mikrosomy Shou M. a kol.^[121] detegoval čtyři metabolity, přičemž hydroxydocetaxel byl hlavním metabolitem, minoritními byly oxazolidinony. Vznikal také 7-epimer docetaxelu a to i pokud nebyl do inkubační směsi přidán NADPH generující systém. V *in vivo* podmínkách byly v lidských výkalech detegovány stejné metabolity jako *in vitro*, kromě 7-epimeru, zato oxazolidindion vznikl jako hlavní metabolit, hydroxydocetaxel a oxazolidinony byly pouze minoritními produkty.^[131] Metabolismu docetaxelu se účastní cytochromy P450, z nichž nejaktivnější byly **CYP3A4 a 3A5** zejména zahrnuté v přeměně docetaxelu na hydroxydocetaxel, následné oxidace jsou katalyzovány především CYP3A4 a částečně 3A5. Epimer docetaxelu je také metabolizován oběma CYP podrodiny 3A. Modifikace postranního řetězce docetaxelu v C2, C4 a C13 pozicích významně redukuje cytotoxicitu docetaxelu. Na druhé straně průměrná účinnost 7-epimeru byla *in vitro* a *in vivo* srovnatelná s docetaxelem.^[9,121,131]

Kompletní *in vitro* charakterizace metabolismu substrátů jakými jsou taxany zahrnuje určení kvalitativního profilu a kvantitativních parametrů. To představuje identifikaci cytochromů P450 účastnících se metabolických reakcí a detailní identifikaci produktů přeměny. **Kvantitativní parametry** všeobecně zahrnují stanovení **maximální rychlosti metabolismu (V_{max})** a **Michaelisovy konstanty (K_m)**, jejichž znalost je důležitá pro odhad intracelulárních koncentrací substrátů a produktů. Z praktického hlediska slouží ke zjištění optimálních podmínek pro kvantitativní stanovení aktivity enzymů *in vitro* nebo k odhalení

mechanismu účinku mnohých léčiv.^[74] V následující *tabulce 1* jsou uvedeny kinetické parametry přeměny paclitaxelu a docetaxelu cytochromy P450 tak, jak byly nalezeny v literatuře.

Tabulka 1: Kinetické parametry metabolismu taxanů u lidí v podmínkách *in vitro*.

| Preparát | Konc. CYP | Sledovaná tvorba metabolitu | | | | Citace | |
|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------|-------|
| | | C3'-OHPCT | | 6α-OHPCT | | | |
| | | K_m | V_{max} | K_m | V_{max} | | |
| | | μM | pmol/mgP/min | μM | pmol/mgP/min | | |
| PACLITAXEL | Lidské jaterní mikrosomy | 0.3 nmol CYP/ml | 15 | 5.3 ± 1.4 | 15 | 120 ± 30 | [24] |
| | Lidské jaterní mikrosomy | 1mg proteinu/ml | | | 16 – 21 | 830-930 | [47] |
| | Lidské jaterní mikrosomy | 0.18 nmol CYP/ml | | | 4.0 ± 1.0 | 870 ± 60 | |
| | cDNA exprimovaný CYP 2C8 | 10 pmol CYP/ inkubaci | | | 5.4 ± 1.0 | 10.4 | [113] |
| | Lidské jaterní mikrosomy | | | | 18 | 19.3 | [65] |
| | Lidské jaterní mikrosomy | 1mg proteinu/ml | 3.3 | 16.0 | 12.1 | 32.0 | [134] |
| DOCETAXEL | Lidské jaterní mikrosomy | 20 – 100 pmol CYP/ml | Hydroxydocetaxel | | | | |
| | | | K_m | V_{max} | | | |
| | | | μM | pmol/mgP/min | | | |
| | | | 0.91 ± 0.14 | 1.17 ± 0.08 | | | |
| | | | | pro CYP 3A4 | | | [121] |
| Lidské jaterní mikrosomy | | 2.1 ± 0.3 | 2.6 ± 0.6 | | | [117] | |
| Lidské jaterní mikrosomy | | 10 | 80 - 120 | | | [18] | |
| Lidské jaterní mikrosomy | | 1.1 | 9.2 | | | [75] | |

1.2.5. Využití klasických taxanu v protinádorové terapii

Paclitaxel byl poprvé použit v roce 1992 v léčbě rakoviny vaječníků.^[6] V roce 1994 byl schválen pro využití v terapii rakoviny prsu a dnes je také využíván v terapii karcinomu plic a Kaposiho sarkomu.^[47,62,113,155] Prověruje se účinnost paclitaxelu u karcinomu esofagu a nádoru ORL oblasti, prostaty a krčku.^[101] Paclitaxel je podáván intravenosní (i.v.) cestou v dávkách 135mg/m² v tříhodinové infúzi. Podávání paclitaxelu je spojeno s celou řadou nežádoucích účinků zejména **alopecie** (ztráta vlasů) nastupující po podání paclitaxelu u všech nemocných a **neutropenie** (snížení hladiny neutrofilních bílých krvinek v krevním obrazu). Dále to jsou **gastrointestinální potíže**, **myelosuprese**, která má za následek neutropenii a také vysoká **četnost hypersensitivních reakcí**, která byla během podávání paclitaxelu snížena změnou režimu, podáváním paclitaxelu v dlouhodobých infúzích a profylaktickým podáváním kortikoidů a blokátorů histaminových receptorů (H₁ a H₂). Při dodržení doporučených postupů se četnost těchto nepříjemných hypersensitivních reakcí snížila na 5 – 10%. Vedlejší účinek **kardiovaskulární toxicita** se projevuje poruchami srdečního rytmu, **neurotoxicita** zase sensorickými poruchami, ale v dávkách pod 200mg/m² zpravidla neurotoxicita nebývá závažná. Tyto příznaky byly nejčastěji popsány při použití kombinace paclitaxelu s cisplatinou a u nemocných s diabetem. Jsou výraznější při konzumaci alkoholu.^[62,144,155]

Docetaxel se používá v **terapii rakoviny prsu** i dalších nádorových onemocnění, kde se ukázal klinicky účinný např. **bronchogenní karcinom**, **karcinom ovaria** aj. Prověřována je jeho indikace u karcinomu pankreatu, žaludku, sarkomů měkkých tkání a maligního melanomu. Dávkování docetaxelu je obvykle 100mg/m² v jednodinové infúzi. Nežádoucími účinky jsou **alopecie a neutropenie**, **gastrointestinální toxicita**, **myelotoxicita**, která je závažným nežádoucím účinkem a **retence tekutin** projevující se periferními edémy nebo výpotky. Docetaxel však nezpůsobuje závažné hypersensitivní reakce tak často jako paclitaxel a lze jim zamezit premedikací dexamethasonem.^[62,104,114,144]

Jak již bylo uvedeno, **taxany jsou často v terapiích kombinovány** s dalšími protinádorovými látkami a k prevenci nežádoucích účinků jsou současně podávány **kortikoidy a antihistaminika**.^[62,121,140] Účinnost docetaxelu se mírně snižuje v kombinaci s cisplatinou a doxorubicinem, naopak stoupá v kombinacích s etoposidem, cyklofosfamidem, 5-fluorouracilem a methotrexátem. Premedikace dexamethasonem nemá vliv na účinky docetaxelu, stejně jako další léčiva mitomycin C, vinkristin a navelbin.^[9] Pro snížení

neutropenie je podáván faktor G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) před samotnou léčbou i během ní.^[10]

Účinnost taxanů může být významně ovlivněna současným působením *induktorů* či *inhibitorů enzymů* účastnících se metabolismu taxanů. Při současném podávání barbiturátů byla významně stimulována hydroxylace postranních řetězců paclitaxelu a docetaxelu.^[81] Steroidy a benzodiazepiny stimulovaly tvorbu metabolitů C3'-hydroxypaclitaxelu, méně 6 α -hydroxypaclitaxelu.^[24] Inhibitory tvorby obou metabolitů paclitaxelu v lidském organismu byly především ketokonazol, felodipin, gestoden, α -naftoflavon, mikonazol, terfenadin a testosteron.^[47,84] Selektivními inhibitory tvorby C3'-hydroxypaclitaxelu byly substráty CYP 3A jako je troleandomycin, ofenadrin, erythromycin a cyklosporin. Tvorbu 6 α -hydroxypaclitaxelu inhibovaly naringenin, kvercetin, kaempferol, diazepam, retinová kyselina a mírně tolbutamid.^[24,47,113] Mefenytin, hexobarbital a sulfafenazol ovšem tvorbu 6 α -hydroxypaclitaxelu neovlivňují, ačkoli jsou běžnými inhibitory podrodiny CYP 2C.^[113] Cimetidin, ranitidin, dexamethason a difenylhydramin metabolismus taxanů neovlivňují,^[56] mírně inhibují vinka-alkaloidy a antracykliny.^[24,85]

Jednou z nejvýznamnějších překážek v úspěšné terapii nádorových onemocnění, kde jsou využívány taxany je rozvoj resistance nádorů vůči těmto léčivům obecně nazývaný *mnohočetná léková resistance (multidrug resistance, MDR)*.^[37,145] Proto je v současné době věnována velká pozornost vývoji nových látek na bázi taxanů, které by měli méně nežádoucích účinků, lepší farmakologické vlastnosti a zejména vyšší protinádorovou aktivitu zvláště u resistantních nádorů.

1.2.6 Nové deriváty taxanu

Na základě rozsáhlých strukturně-aktivitních studií byla syntetizována řada nových derivátů klasických taxanů paclitaxelu a docetaxelu. Některé z těchto derivátů jsou z hlediska biologické aktivity významně účinnější než klasické taxany v různých typech nádorových buněčných liniích a to zejména resistantních. Resistentní buněčné linie vykazují genotyp MDR daný zvýšenou expresí membránového transportéru P-glykoproteinu a některých dalších ABC transportních proteinů (více viz. kap. 1.4). Analogy klasických taxanů účinné v resistantních liniích se zdají být perspektivními pro další studium a jejich potenciální využití v terapii resistantních nádorů.

Významné skupiny nových taxanových analogů:

- **Taxany druhé generace** (deriváty syntetizované z prekursoru paclitaxelu 10-deacetylbaicatinu III): Tyto deriváty působí velmi silně cytotoxicky proti resistantním nádorovým buněčným liniím exprimujících genotyp MDR.^[78]

Zástupci:

SB-T-1103, SB-T-1214 a SB-T-1216 - velmi účinné v resistantních buněčných liniích rakoviny prsu.^[96]

SB-T-101187, SB-T-1213 a SB-T-1250 - působí cytotoxicky a zároveň inhibují P-glykoproteinovou effluxní pumpu.^[32]

Per-orálně dostupné taxany druhé generace:

SB-T-1213 - 135x aktivnější než paclitaxel v MCF-7-R resistantních buněčných liniích rakoviny prsu, inhibuje transportní funkci P-gp effluxní pumpy.^[32,59]

Ortaxel (IDN-5109, BAY 59-8862) - v současné době ve druhé fázi klinického testování, významně účinnější než paclitaxel v inhibici růstu P-gp-exprimujících nádorů a buněčných liniích.^[96,97] Ortaxel není na rozdíl od paclitaxelu substrátem P-gp a není jím tedy předčasně z nádorových buněk vylučován. Navíc tento derivát je schopný inhibovat nádorový růst po perorálním podání u myši na rozdíl od paclitaxelu, který perorálně není účinný vzhledem k tomu, že je vylučován díky expresi P-gp v tenkém střevě do střevního obsahu. Také vedlejší účinky jako neurotoxicita a další účinky jsou u ortaxelu redukovány.^[110] Tento taxanový analog může být díky své aktivitě vhodnou alternativou pro terapii nádorů resistantních vůči paclitaxelu a může rozšířit spektrum využití taxanů např. v terapii nádorů střev.^[141]

Ortaxel i SB-T-1213 indukují zvýšenou polymerizaci mikrotubulů a tvorbu neobvyklých mikrotubulů např. otevřených vláken mikrotubulů nebo mikrotubulů s protofilamenty navíc. Jejich působení na systém mikrotubulů je silnější než v případě paclitaxelu a pravděpodobně jde o jiný typ interakce s mikrotubuly než u paclitaxelu, protože dochází k jiným konfirmačním změnám mikrotubulů po vazbě těchto nových taxanů, ovšem mechanismus tohoto působení ještě není plně objasněn.^[59]

- **Fluorotaxany:** syntetizovány jsou inkorporací fluoru do molekuly taxanu. Vznikají tak deriváty, kde jsou C-H vazby v místech podléhajících obvykle hydroxylaci při

metabolismu (*para*-poloha C-3' fenylu, *meta*-poloha C-2 benzoátu, C-6 methylen) nahrazeny vazbou C-F, která zabraňuje ataku CYP během metabolismu. Nedochozí tak k metabolické inaktivaci typické pro klasické taxany.

Zástupci:

3'-(4-fluorophenyl)paclitaxel a 2-(3-fluorobenzoyl)paclitaxel – nepodléhají hydroxylaci v poloze C-3' a jsou tak účinnější než paclitaxel

2-(3-fluorobenzoyl)docetaxel naopak podléhal obvyklé hydroxylaci během metabolismu.

3'-CF₃-taxany - mnohonásobně účinnější než klasické taxany v resistantních nádorových liniích MCF-R, LCC6-MDR (buněčné linie rakoviny prsu) a H-460 (buněčná linie rakoviny vaječníků).^[101]

- **Imunokonjugáty taxanů;** Existence specifických antigenů na povrchu nádorových buněk nabízí možnost využití protilátek selektivně rozpoznávajících maligní tkáň od zdravé tkáně. Toto zjištění vedlo k syntéze konjugátů taxanů s monoklonálními protilátkami se silnou vazebnou afinitou k nádorově specifickým antigenům. Nicméně tyto deriváty nebyly v obvyklých dávkách taxanů účinné *in vivo*. V současné době jsou syntetizovány a sledovány konjugáty, které jsou vázány na protilátku přes disulfidový můstek. Celý konjugát se po vazbě protilátky k nádorovému antigenu dostává endocytosou do nitra buněk, kde je disulfid štěpen intracelulárním glutathionem a umožňuje uvolnění aktivní formy taxanu.^[101]
- **Deriváty taxanů bez postranního C-13 řetězce:** Těmto derivátům byl odstraněn celý postranní řetězec v poloze C-13 taxanového kruhu a zůstala jen baccatinová základní struktura. Díky tomu deriváty sice nejsou cytotoxické, ale jsou schopné modulovat funkci P-gp.

Zástupci:

tRA96023 – není cytotoxický, ale snižuje resistenci vůči chemoterapeutikům např. taxanům a antracyklinům způsobenou právě nadměrnou expresí P-gp.^[79]

tRA 98006 moduluje vylučování mitoxantronu z resistantních buněčných liniích exprimujících P-gp, MRP-1 a BCRP a rovněž není sám cytotoxickou látkou.^[17]

Ne všechny deriváty klasických taxanů vedou ke zvýšení protinádorových účinků;

- **Cyklohexylové analogy** docetaxelu a paclitaxelu: Všechny cyklohexylové deriváty byly syntetizovány modifikací paclitaxelu a docetaxelu v polohách C-2 a C-3' postranního řetězce C-13 a to konkrétně zavedením fenylu nebo aromatického uhlovodíkového zbytku. Jelikož protinádorová aktivita těchto derivátů není větší než klasických taxanů, nejsou substituce ve zmíněných polohách nezbytné pro silnou vazbu taxanů na jejich tubulinový receptor.^[95]

1.3 Fenolické antioxidanty

V přírodě se vyskytuje velké množství fenolických sloučenin. Na lidský organismus mají silné, často příznivé biologické účinky a proto stojí ve středu zájmu perspektivního využití ve výživě a farmakoterapii. Syntetizovány jsou v rostlinách z fenylyalaninu za účasti kondenzačních reakcí. V současné době je známo více než 8000 látek se strukturou flavonoidů.^[109]

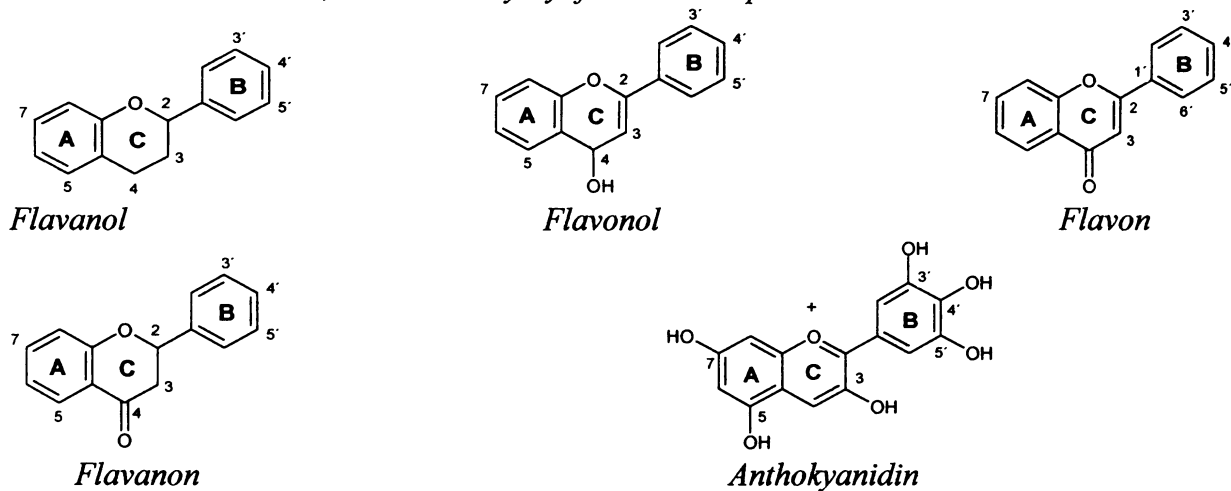
1.3.1. Rozdělení a výskyt přírodních fenolických antioxidantů

Chemicky jsou fenolické antioxidanty aromatické sloučeniny s jednou či více hydroxyskupinami přímo na kruhové struktuře.^[127] Dělíme je na flavonoidy a non-flavonoidy, kam patří dvě odlišné skupiny sloučenin trihydroxystilbeny a deriváty kyselin.^[76,127] Přehled nejznámějších zástupců fenolických antioxidantů, jejich struktura a výskyt v přírodě jsou uvedeny v *tabulce 2A-B*.

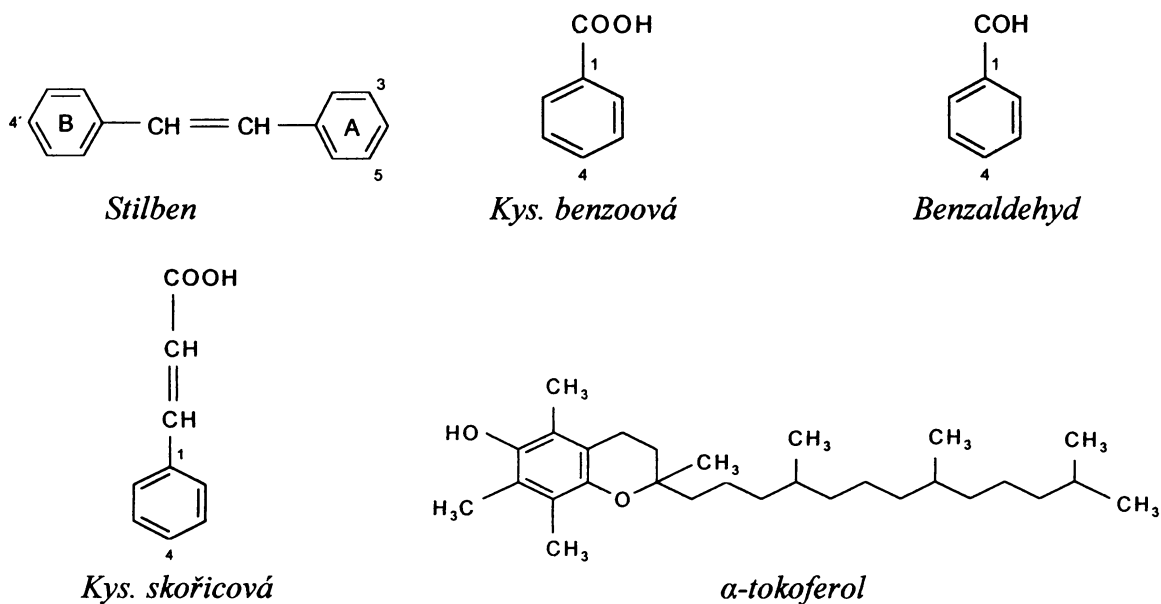
Flavonoidy jsou charakterizovány jako molekuly mající dva fenyls spojené pyranovou kruhovou strukturou. Existují volné či konjugované s dalšími flavonoidy, cukry (glykosidy), non-flavonoidy (acylderiváty) a kombinacemi těchto sloučenin.^[127] Flavonoidy nalezneme v zelenině (např. česnek a cibule), dále v ovoci hlavně jablkách a nápojích jako je čaj, víno a pivo.^[30,50,76] Celkový příjem flavonoidů dle Hertoga a kol^[50] představuje 23 mg flavonoidů/den u dospělého člověka, přičemž převládajícím flavonoidem v potravě je kvercetin. Významným zdrojem veškerých fenolických antioxidantů je víno a to zejména červené, kde je koncentrace fenolických antioxidantů mnohem vyšší než ve víně bílém.^[127] Výrazně nižší koncentrace v bílých vínech je důsledkem odstranění slupek a jader z moštu před fermentací bílých vín, minimalizující vstup fenolických a lipidických složek. Fenolické

antioxidanty mají ve víně vliv na vzhled, chuťové vjemy, vůni a antimikrobiální vlastnosti vín.^[76] V červeném víně tvoří flavonoidy > 85% celkového obsahu fenolů ≥ 1000 mg/L.^[1]

Tabulka 2A: Rozdělení, struktura a výskyt flavonoidů v potravě.^[52,76,114]



| Třída | Zástupce | Chemický název | Výskyt v potravě |
|-----------------------|----------------------|--|--|
| flavonoly | Fisetin | 3,7,3',4' - tetrahydroxyflavon | Brokolice, kapusta, křen, grapefruit, černý čaj, cibule, slupka jablek, olivy, červené víno, pórek, hlávkový salát, brusinky, fazole |
| | Galangin | 3,5,7-trihydroxyflavon | |
| | Kaempferol | 3,5,7,4'-tetrahydroxyflavon | |
| | Kvercetin | 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavon | |
| | Morin | 3,5,7,2',4'-pentahydroxyflavon | |
| | Myricetin | 3,5,7,3',4',5'-hexahydroxyflavon | |
| | Isorhamnetin | 3,5,7,4'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavon | |
| | Rhamnetin | 3,5,3',4'-tetrahydroxy-7-methoxyflavon | |
| | Rutin | 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavon-3-rutinosid | |
| flavanony | Eriodictyol | 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavanon | Slupka a dužina citrusových plodů |
| | Hesperetin | 5,7,3'trihydroxy-4'-methoxyflavanon | |
| | Hesperidin | 5,7,3'trihydroxy-4'-methoxyflavanon-7-rhamnoglukosid | |
| | Naringenin | 5,7,4'-trihydroxyflavanon | |
| | Naringin | 5,7,4'-trihydroxyflavanon-7-rhamnoglukosid | |
| flavony | Apigenin | 5,7,4'-trihydroxyflavon | Celer, petržel, paprika, mrkev, slupky ovoce |
| | Chrysin | 5,7-dihydroxyflavon | |
| | Luteolin | 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavon | |
| | Nobiletin | 5,6,7,8,4',5'-hexamethoxyflavon | |
| | Tangeretin | 5,6,7,8,4'-pentamethoxyflavon | |
| flavanoly | Gallokatechin | 3,5,7,3',4'-flavanpentol cis-forma (+)-katechinu | Zelený a černý čaj, červené víno, jablka |
| | (+)-katechin | | |
| | (-)-epikatechin | | |
| | Taxifolin | | |
| | Kondenzované tanniny | | |
| anthokyanidiny | Kyanidin | 3'-anthokyanidin | Grapefruit, víno, třešně, jahody, maliny a jiné červené ovoce |

Tabulka 2B: Rozdělení, struktura a výskyt non-flavonoidů v potravě. [52,76,114]

| Třída | Zástupce | Chemický název | Výskyt v potravě |
|--------------------------------|------------------------|--|---|
| NON-FLAVONOIDY | | | |
| stilbeny | Astringin | 3,5,3',4'-tetrahydroxystilben-3-O-β-glukopyranosid | Podzemnice olejná, některé druhy ovoce a zeleniny |
| | Piceid | 3,5,4'-trihydroxystilben-3-O-β-glukopyranosid | |
| | Piceatannol | 3,5,3',4'-tetrahydroxystilben | |
| | Polydatin | 4,3',5'-trihydroxystilben-3-O-β-D-glukopyranosid | |
| | Pterostilben | 3,5,-dimethoxy-4'-hydroxystilben | |
| | Rhapontigenin | 4'-methoxy-3,5,5'-trihydroxystilben | |
| | Rhaponticin | 4'-methoxy-3,5,5'-trihydroxystilben-5-O-β-glukopyranosid | |
| deriváty kys. benzoové | Resveratrol | 3,5,4'-trihydroxystilben | |
| | Oxyresveratrol | 3,5,2',4'-tetrahydroxystilben | |
| | Resveratrolosid | 3,5,4'-trihydroxystilben-4'-O-β-glukopyranosid | |
| Deriváty kyselin | | | |
| deriváty kys. benzoové | Gallová | 3,4,5-trihydroxybenzoová kys. | |
| | Vanilková | 4-hydroxy-3-methoxybenzoová kys. | |
| | Gentisová | 2,5-dihydroxybenzoová kys. | |
| deriváty benzaldehydu | Vanilin | 3-methoxy-4-hydroxybenzaldehyd | Obilí, rýže, rajčata, špenát, kapusta, bílé víno, olivy, káva, jablka, švestky, broskve, meruňky, borůvky, hrušky |
| | Aldehyd kys. syringové | Aldehyd 3,5-dimethyletheru kys. gallové | |
| deriváty kys. skořicové | Kávová | 3,4-dihydroxyskořicová kys. | |
| | p-kumarová | 4-hydroxyskořicová kys. | |
| α-tokoferol | Ferulová | 4-hydroxy-3-methoxyskořicová kys. 3,4,-dihydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyldecyl)-2H-1-benzopyranol-6-ol | |

Non-flavonoidy jsou strukturně jednodušší než flavonoidy a zahrnují stilbeny a deriváty kyselin. Jde o řadu sloučenin, které se liší množstvím a polohou hydroxylových skupin. Deriváty kys. skořicové jsou běžně esterifikovány cukry, organickými kyselinami nebo různými alkoholy. Nezbytným strukturním skeletem stilbenů jsou dva aromatické kruhy spojené methylenovým můstkem. Non-flavonoidy se stejně jako flavonoidy vyskytují ve víně, kde jsou primárně uloženy ve vakuolách hroznů a odtud pak snadno extrahovány jejich rozdrčením. Nejvýznamnějším non-flavonoidem je stilben resveratrol, který se nalézá ve formě *cis* a *trans* v některých druzích ovoce a zeleniny. Jedním z nejbohatších zdrojů je rdesno (*Polygonum cuspidatum*), vinná réva (*Vitis viniferum*) či podzemnice olejná (*Arachis hypogea*). Z kvetoucích rostlin pak můžeme resveratrol nalézt ve dvou druzích lilii (*Veratrum grandiflorum* a *Veratrum formosanum*) a některých dalších druzích rostlin.^[126,127]

1.3.2. Vlastnosti a účinky přírodních fenolických antioxidantů

Jednotlivé fenolické antioxidanty se liší svými fyzikálními vlastnostmi zejména rozpustností, která je významným faktorem pro jejich využití. Obecně jsou fenolické antioxidanty špatně rozpustné ve vodě. Zpravidla je třeba vyšších teplot pro jejich úspěšné rozpuštění.

Fenolické antioxidanty hrají nezastupitelnou roli v lidské výživě. Nejuniverzálnější vlastností je jejich **antioxidační působení** projevující se vychytáváním volných radikálů a v blokování oxidace buněčných i nebuněčných složek jako jsou membrány a lipidy s nízkou hustotou (Low density lipoproteins, LDL).^[127] Určité fenolické antioxidanty brání či snižují shlukování krevních destiček ovlivněním rovnováhy mezi syntézou tromboxanů a prostacyklinů, ovlivňují průtok krve arteriálním systémem, působí příznivě na progresi i regresi aterosklerosy a svými antioxidačními účinky působí proti dalším procesům souvisejícím s tvorbou reaktivních forem kyslíku a peroxidací lipidů v plasmě a membránách.^[76,127] Antioxidační účinky fenolických antioxidantů řadí flavonoidy mezi látky důležité pro prevenci nemocí spojených s oxidativním poškozením membrán, proteinů a DNA.^[31] K významným účinkům fenolických antioxidantů patří i jejich **protinádorové působení**, přičemž jejich vliv na rovnováhu aktivace a inaktivace karcinogenů se projevuje ve dvou směrech.^[123] i) **inhibice CYP** (ovšem byla popsána i stimulace); ii) **indukce detoxikačních enzymů** (glutathiontransferasy, glukuronyltransferasy apod.) Inhibice některých enzymových aktivit zahrnutých v procesu aktivace karcinogenů či stimulace

dalších enzymů procesu detoxikace byla považována za důležitou v chemické prevenci rozvoje rakoviny. Tyto účinky se ale často liší ve studiích prováděných *in vitro* a *in vivo*.^[124] Schopnost fenolických antioxidantů ovlivňovat enzymatickou aktivitu některých CYP je intenzivně sledována a byla využita v předkládané práci pro studium vlivu vybraných fenolických antioxidantů *in vitro* na aktivitu podrodiny lidských a potkaních CYP3A enzymů a CYP2C8 účastnících se metabolismu taxanů. V tabulce 3 je znázorněno inhibiční působení různých fenolických antioxidantů na CYP u potkanů a lidí v podmínkách *in vitro* tak, jak byly nalezeny v literatuře.

Tabulka 3: Příklady působení fenolických antioxidantů jako inhibitorů aktivity CYP v *in vitro* podmínkách v potkaním a lidském organismu.

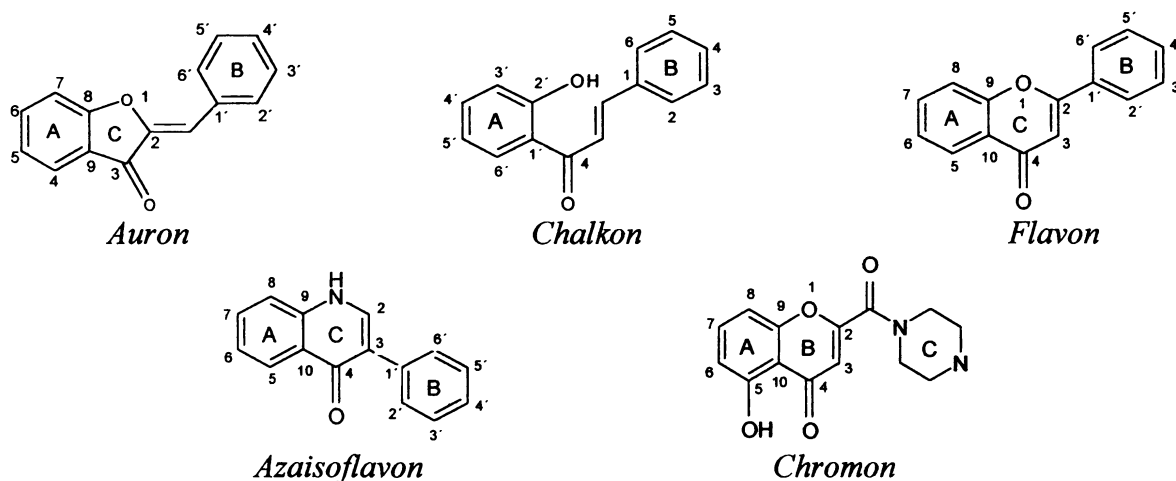
| Fenolický antioxidant | Inhibovaný CYP | IC ₅₀ (μM) | K _i (μM) | Typ inhibice | Citace |
|----------------------------|--|--------------------------|------------------------|--------------------------------|-------------|
| Apigenin | Potkaní CYP1A1/2 | 6.0 | 1.12 | smíšený | [85] |
| Chrysin | | 0.8 | 0.17 | smíšený | |
| Fisetin | | 9.0 | 1.15 | smíšený | |
| Morin | | 18.5 | 4.5 | smíšený | |
| Myricetin | | 15.0 | 2.0 | smíšený | |
| Hesperetin | | 68.0 | 4.27 | smíšený | |
| Kaempferol | Potkaní CYP1A1/2 Lidský CYP2C8 | 4.0 9.0 | 1.8 | smíšený | [47,85] |
| Kvercetin | Potkaní CYP1A1/2 Lidský CYP1A2 Lidský CYP2C8 | 15.0 9.0 | 2.0 | smíšený | [47,85,136] |
| Naringenin | Potkaní CYP1A1/2 Lidský CYP1A2 Lidský CYP2C8 | 58.0 | 2.4 7-29 | smíšený kompetitivní | [34,47,85] |
| Xanthohumol | Lidský CYP1A1 Lidský CYP1B1 | | 50 nM | nekompetitivní kompetitivní | [49] |
| Resveratrol | Lidský CYP1A2 | | | smíšený | [49] |
| Flavon | | CYP1A1 0.14 | CYP1A2 0.066 | | |
| 3-hydroxyflavon | Potkaní CYP1A1/2 | < 0.1 | < 0.3 | | [150] |
| 5-hydroxyflavon | | < 0.1 | < 0.3 | | |
| 7-hydroxyflavon | | < 0.1 | < 0.3 | | |
| 3,7-dihydroxyflavon | | < 0.1 | < 0.3 | | |
| Galangin | | | | | |

1.3.3. Syntetické deriváty flavonoidu

Díky pozitivnímu působení přírodních fenolických antioxidantů na lidské zdraví byla v poslední době syntetizována řada jejich derivátů vycházejících zejména z třídy flavonoidů. V předkládané práci byly zvoleny pro studium vlivu derivátů flavonoidů na transport taxanů v sensitivních a resistantních buněčných liniích rakoviny prsu syntetické deriváty odvozené od flavonů, chalconů, auronů, chromonů a azaisoflavonů. Právě tyto deriváty flavonoidů byly vybrány, protože se jedná o slibné modulátory P-gp zprostředkovaného transportu léčiv.

Společná je pro všechny zástupce vazba k cytosolární NBD2 doméně P-gp, díky které jsou tyto látky schopné zvrátit resistenci nádorových buněk vůči cytostatikům.^[11,14-16] Struktura sledovaných syntetických derivátů flavonoidů a jejich vazebná afinita k NBD2 doméně P-gp je uvedena v tabulce 4.

Tabulka 4: Struktura sledovaných derivátů flavonoidů a vazebná afinita k cytosolární NBD2 doméně P-gp.^[11,14-16]



| Třída/název | Substituenty | K_D (μM) ^a |
|----------------------|---|--------------------------------------|
| Aurony | | |
| CB-285 | 4,6-OMe; 4'-Cl | 0.99 ± 0.2 |
| CB-284 | 4,6-OMe; 4'-Br | 0.82 ± 0.08 |
| CB-287 | 4,6,3',4',6'-OMe | 92 ± 43 |
| ML-50 | 4-OH; 6-OMe | 1.32 ± 0.33 |
| ND-285 | 4-OH; 6-OMe; 4'-Cl | 0.46 ± 0.08 |
| ML-30 | 4-OH; 6-OMe; 4'-CH ₂ CH ₃ | 10 ± 0.15 |
| A-55B | 4-OH; 6-OMe; 7-I; 4'-CN | ND |
| Chalkony | | |
| FBB-14 | 4-I; 2',4',6'-OH | 0.25 ± 0.06 |
| Flavony | | |
| CB-436 | 3-OMe; 5,7-OH; 4'-Br | > 100 |
| Flavonoly | | |
| Kaempferid | 3,5,7-OH; 4'-OMe | 5.0 ± 0.2 |
| AB-2DE | 3,5,7-OH; 4'-I | 1.06 ± 0.08 |
| Chromony | | |
| MH-11 ^b | 2-CO-N(CH ₂) ₅ -N-CH ₃ ; 5-OH | > 100 |
| Azaisoflavony | | |
| A-12 ^b | 3-phenyl; 5,7-OH | > 100 |

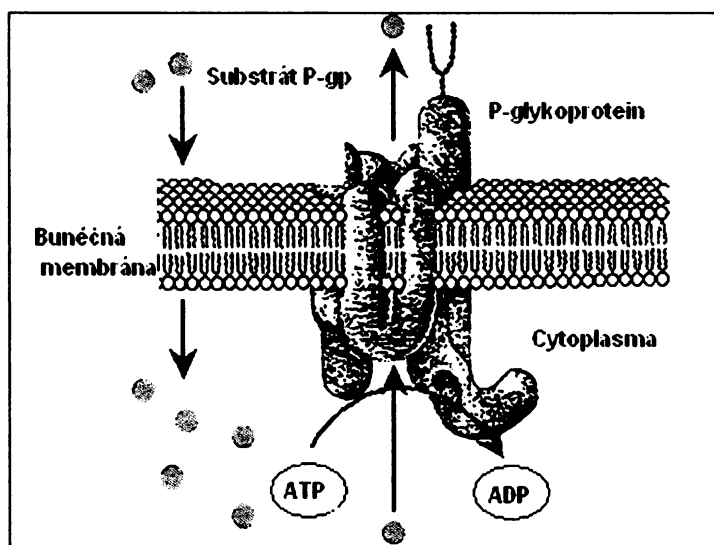
^aDisociační konstanta vazby k P-gp; ^bMH-11 a A-12 (1 μM) zvyšovaly akumulaci rhodaminu-123 v K562R resistantních buněčných liniích 5-krát a 2-krát více než inhibitor P-gp první generace cyklosporin A.^[44]

1.4 Resistance nádorů

1.4.1. Studium resistance nádoru vůči chemoterapeutikům

Resistance maligních nádorů vůči chemoterapeutikům je v současné době jedním ze zásadních problémů a překážek v úspěšné chemoterapii nádorových onemocnění.^[37] Resistance přitom nevzniká jen na jedno léčivo, ale zpravidla na celou skupinu léčiv, které se liší strukturou i mechanismem účinku a díky tomu se tento fenomén nazývá **mnohočetná léková resistance neboli multidrug resistance (MDR)**.^[145] Mezi léčiva, na která vzniká resistance patří antracyklíny (doxorubicin, daunomycin), vinka-alkaloidy, actinomycin D, valinomycin, gramicidin D, puromycin a také taxany (paclitaxel a docetaxel).^[51] MDR genotyp maligních buněk může být vrozený nebo získaný po působení protinádorových léčiv.^[125]

Jedním ze základních mechanismů vzniku MDR je transportní funkce některých transmembránových transportních proteinů ze skupiny tzv. **ABC-transportních proteinů (ATP binding cassette proteins)**. Tyto proteiny způsobují předčasné a velmi účinné vylučování (efflux) protinádorových léčiv z nádorových buněk, kde jich pak nejsou dostatečné koncentrace pro cytotoxický účinek.^[69] V současné době je známo 49 lidských ABC-transportních proteinů, které jsou rozděleny na základě sekvenční homologie do sedmi podrodin; ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF a ABCG (až 80% sekvenční homologie mezi některými členy jednotlivých podrodin např. ABCB)^[154]. Přehled všech podrodin lidských ABC transportních proteinů a jejich nejvýznamnějších zástupců je uveden



v tabulce 5. Pro rozvoj resistance jsou významné zejména **P-glykoprotein (P-gp)**, MRP protein (multidrug resistance associated protein) a cMOAT (canalicular multiple organic anion transporter). P-gp je transmembránový glykoprotein o velikosti 170kDa tvořený 1280 aminokyselinami. Jde o ATP-řízenou effluxní pumpu, která **Obr.5:**

Umístění P-glykoproteinu v buněčné membráně a jeho transportní funkce.

využívá pro svou transportní funkci energii z hydrolyzy ATP.^[151] Transportní funkce P-gp je znázorněna na *obr. 5*. Je exprimován v játrech, ledvinách, střevech, mozku, děloze, varlatech a placentě.^[54,67] Z toho vyplývá i jeho fyziologická funkce, kterou je především řízení absorpce, distribuce a exkrece celé řady xenobiotik a klinicky významných léčiv. Brání také průniku xenobiotik do mozku či reprodukčních orgánů.^[136,142] Vysoká exprese P-gp v nádorových buňkách např. nádorů prsu, slinivky, střev, jater, ledvin, vaječnicků, nemalobuněčného karcinomu plic či v leukemických buňkách ovšem vede k rozvoji rezistence nádorů díky předčasné a nadměrné exkreci léčiv do extracelulárního prostoru.^[37,67] Mezi substráty P-gp řadíme tato protinádorová léčiva; vinka-alkaloidy (vincristin, vinblastin), antracyklíny (doxorubicin, daunorubicin), epipodophylotoxiny (etoposid, teniposid), taxany (paclitaxel, docetaxel), kolchicin a actinomycin D.^[71,66,67]

Za další možné mechanismy přispívající k rozvoji MDR se považují inhibice apoptosy zvýšenou expresí Bcl-2 nebo Bcl-X_L proteinů, mutace tumor-supresorového genu p53, změna v expresi a aktivitě topoisomerasy II, zvýšená hladina glutathionu, zvýšená aktivita glutathion-S-transferasy a změny v reparaci DNA.^[12,55,111,116,119] Vývoj nových léčiv, na která by rezistence nevznikala či použití modulátorů ABC-transportních proteinů účastnících se vzniku MDR je v poslední době intenzivně studován.

Tabulka 5: Přehled lidských ABC membránových transportérů a jejich funkcí. [156]

| Symbol | Název | Lokalizace | Tkáňová exprese | Biologická funkce |
|---------------------------|---|--------------|--|--|
| ABC A (ABC1) podrodina | | | | |
| ABCA1 | ABCA1, TGD, HDLDT1, CERP | 9q22-q31 | většina tkání | Regulace buněčného cholesterolu a homeostasa fosfolipidů |
| ABCA2 | ABCA2 | 9q34 | mozek, ledviny, plíce, srdce | |
| ABCA3 | ABCA3, ABC-C | 16p13.3 | plíce a další tkáně | |
| ABCA4 | ABCR, RP19, ABC10, FFM, STGD1, STGD, RIM, RMP | 1p22 | retina, buňky fotoreceptorů | Zprostředkování transportu molekul přes buněčnou membránu fotoreceptorů |
| ABCA5 | ABCA5 | 17q21-q24 | svaly, srdce, varlata | |
| ABCA6 | ABCA6 | 17q21 | játra | |
| ABCA7 | ABCA7, ABCX | 19p13.3 | leukocyty, thymus, kostní dřeň | Homeostasa lipidů v buňkách imunitního systému |
| ABCA8 | ABCA8 | 17q24 | vaječníky | |
| ABCA9 | ABCA9 | 17q24 | srdce | |
| ABCA10 | ABCA10 | 17q24 | svaly, srdce | |
| ABCA12 | ABCA12 | 2q35 | žaludek | |
| ABCA13 | ABCA13 | 7p11-q11 | trachea, varlata, kostní dřeň | Účast v transportu cholesterolu |
| ABC B (MDR/TP) podrodina | | | | |
| ABCB1 | MDR1, PGY1, P-GR, GPI70 | 7q21 | většina tkání, zvláště ty s funkční bariérou jako játra, mozek, ledviny, střeva a placenta | Efluxní pumpa pro řadu xenobiotik, vysoká exprese zodpovědná za rozvoj resistance vůči cytostatikům |
| ABCB2 | TAP1, PSF1, RING4, ABC17, APT1, D6S114E | 6p21.3 | většina tkání | Transport peptidů |
| ABCB3 | TAP2, PSF2, RING11, D6S217E | 6p21.3 | většina tkání | Transport peptidů |
| ABCB4 | MDR3, PGY3, PFIC-3, ABC21 | 7q21 | hepatocyty | Biliární sekrece fosfatidylcholinu z hepatocytů |
| ABCB5 | ABCB5 | 7p14 | mitochondrie buněk | Účast na transportu železa |
| ABCB6 | ABCB6, ABC14, UMAT, MTABC3 | 2q33-q36 | mitochondrie buněk | Transport hemu z mitochondrií do cytosolu |
| ABCB7 | ABCB7, ATMIP, ASAT | Xq13.1-q13.3 | mitochondrie buněk | transport hemu z mitochondrií do cytosolu, transport fosfolipidů v buňkách |
| ABCB8 | M-ABC1 | 7q35-q36 | mitochondrie buněk | |
| ABCB9 | ABCB9, TAPL | 12q24 | srdce, mozek, lysosomy | |
| ABCB10 | ABCB10, M-ABC2, MTABC2 | 1q42 | mitochondrie buněk | |
| ABCB11 | BSEP, SPGP, PFIC2, PGY4, ABC16 | 2q24 | hepatocyty | Aktivní transport žlučových solí |
| ABC C (CFR/MRP) podrodina | | | | |
| ABCC1 | MRP1, MRP, ABCC, GS-X, ABC29 | 16p13.1 | mnoho tkání zejména plíce, varlata | Multispecifický transportér, substráty jsou glutathion, cysteiny, leukotrieny, aflatoxin B1, glukuronidy, sulfátové konjugáty ster. hormonů a žlučových solí, některá léčiva |
| ABCC2 | MRP2, cMOAT | 10q24 | játra, střeva, ledviny | Biliární transport xenobiotik např. vinblastin |

| Symbol | Název | Lokalizace | Ikáňová exprese ABC C (CFTR-MRP) podrodina | Biologická funkce |
|-------------------------|---------------------------|--------------|---|---|
| ABCC3 | MRP3 | 17q21.3 | játra, střeva, ledviny | Biliární a střevní exkrece organických aniontů |
| ABCC4 | MRP4 | 13q32 | většina tkání | Transport cyklických nukleotidů, nuleosidových monofosfátových analogů a prostaglandinů |
| ABCC5 | MRP5 | 3q27 | většina tkání zejména játra | Transport cyklických nukleotidů, nuleosidových monofosfátových analogů |
| ABCC6 | MRP6 | 16p13.1 | ledviny, hepatocyty | Transport peptidů a glutathionových konjugátů |
| ABCC7 | CFTR | 7q31.2 | plicе, střeva, cholangiocyty | Chloridový kanál |
| ABCC8 | SUR1 | 11p15.1 | slinivka | Modulátor ATO sensitivních draselných kanálů |
| ABCC9 | SUR2 | 12p12.1 | srdce a kosterní svalstvo, nízké hladiny ve všech ostatních tkáních | Draselný kanál |
| ABCC10 | ABCC10, MRP8 | 6p21 | nízké hladiny ve všech tkáních | Transport estradiol(2)17-β-glukuronidu |
| ABCC11 | ABCC11, MRP8 | 16q12.1 | všechny tkáně hl. játra a prsní tkáň | |
| ABCC12 | ABCC12 | 16q12 | nízké hladiny ve všech tkáních | |
| ABCC13 | ABCC13 | 21q11.2 | kostní dřev a periferní leukocyty, vysoká exprese v játrech plodu | |
| ABC D (ATD) podrodina | | | | |
| ABCD1 | ALD, ALDP | Xq28 | peroxisomy | Peroxisomální import mastných kyselin |
| ABCD2 | ALDL1, ALDR | 12q11 | peroxisomy | Peroxisomální import mastných kyselin |
| ABCD3 | PXMP1, PMP70 | 1p21-22 | peroxisomy | Peroxisomální import mastných kyselin |
| ABCD4 | PXMP1L, P70R | 14q24.3 | peroxisomy | Peroxisomální import mastných kyselin |
| ABC E (OABP) podrodina | | | | |
| ABCE1 | OABP, RNASEL1 | 4q31 | vaječníky, varlata | inhibitor RNas |
| ABC F (GCN2) podrodina | | | | |
| ABCF1 | ABC50 | 6p21.33 | všechny tkáně | Úloha ve zvýšení proteosyntézy při zánětlivých procesech |
| ABCF2 | ABCF2 | 7q35-q36 | všechny tkáně | |
| ABCF3 | ABCF3 | 3q25.1-q25.2 | všechny tkáně | |
| ABC G, (bíla) podrodina | | | | |
| ABCG1 | Bílý, ABCG1, ABC8 | 21q22.3 | mozek, plíce | Vylučování cholesterolu |
| ABCG2 | ABCG2, BCRP1, MXR1, ABCP | 4q22 | placenta, srdce, játra, střeva | Transport xenobiotik, steroidů, organických aniontů, úloha v rozvoji resistance vůči mitoxantronu a antracyklinům |
| ABCG3 | ABCG3 | 8p12 | | |
| ABCG4 | ABCG4, Bílý 2 | 11q23.3 | makrofágy, mozek, oko | |
| ABCG5 | ABCG5, bílý 3, Sterolim 1 | 2p21 | játra, tenké střevo | Transport a exkrece sterolů |
| ABCG8 | ABCG8, bílý 4, Sterolim 2 | 2p21 | játra, tenké střevo | Transport a exkrece sterolů |

1.4.2. Resistence nádorů vůči taxanům a možnosti jejího potlačení

Využití taxanů jako protinádorových léčiv je často limitováno rozvojem resistance nádorových buněk vůči těmto cytostatikům.^[27] Nádorové buňky přitom získávají resistenci proti taxanům různými mechanismy; i) existence resistantních isomerů mikrotubulů či mutace β -tubulinové podjednotky mikrotubulů v blízkosti vazebného místa pro paclitaxel,^[100,122] ii) vysoká exprese ABC membránových transportních proteinů zejména P-gp kódovaného genem MDR-1 a dále MRP-1 proteinu či BCRP proteinu.^[72,107] Zvláště v terapii rakoviny prsu, kde jsou taxany a také vinblastin obvykle používány, dochází často k rozvoji resistance vůči těmto léčivům, které jsou substráty P-gp.^[7] Také Mechetner a kol^[77] našel významnou korelaci mezi zvýšenou expresí P-gp a resistencí vůči taxanům a doxorubicinu u pacientů s rakovinou prsu. K resistenci nádorů prsu přispívá ovšem také vysoká exprese proteinů BCRP, MXR, ABCP a ABCG2. BCRP neboli Breast Cancer Resistance Protein je také znám jako placentární ABC transportér, který způsobuje resistenci vůči flavopiridolu, mitoxantronu, daunorubicinu a inhibitorům topoisomerasy I.^[80,87]

Látky ovlivňující transportní funkci P-gp lze terapeuticky využít pro zvýšení koncentrace léčiv v nádorech. V současné době byla popsána řada modulátorů P-gp a jejich množství stále roste. **Modulátory P-gp** rozdělujeme na modulátory I. a II. generace a ostatní modulátory (*Tabulka 6*). **Modulátory I. generace** účinně inhibují transportní funkci P-gp a jsou využívány v klinické praxi. Nejznámějšími modulátory P-gp I. generace jsou cyklosporin A a verapamil. Obě tyto látky jsou substráty P-gp a proto působí mechanismem kompetitivní inhibice. Bohužel použití těchto látek je často doprovázeno řadou závažných nežádoucích účinků v koncentracích, které jsou pro léčbu využívány.^[70,108] Např. cyclosporin A má v dávkách potřebných pro potlačení resistance závažné imunosupresivní a neurotoxické účinky.^[33] Na základě modulátorů I. generace jsou vyvíjeny **modulátory P-gp II. generace**, které mají větší vazebnou specifitu k P-gp a jsou tedy silnějšími inhibitory jeho funkce. Zároveň jsou u nich redukovány závažné nežádoucí účinky typické pro modulátory I. generace.^[125] Typickým zástupcem inhibitorů P-gp II. generace je derivát cyclosporinu PSC-833, který je v druhé fázi klinických testů. Tato látka nemá nežádoucí imunosupresivní a neurotoxické účinky typické pro cyklosporin A. V kombinaci s paclitaxelem PSC-833 zvyšuje hladiny paclitaxelu i 6 α -OHPCT v plasmě. To je dáno pravděpodobně inhibicí CYP3A4 potlačující tvorbu C3'-OHPCT a zabraňující dalšímu metabolismu OHPCT. PSC-833 rovněž může snižovat vylučování do střevního obsahu a tím zvyšovat absorpci paclitaxelu a jeho metabolitů ze střeva prostřednictvím inhibice P-gp ve střevní sliznici při entero-hepatární

cirkulaci.^[33,61] PSC 833 je asi 10x účinnější než cyklosporin A nebo verapamil a působí jiným mechanismem účinku. Není totiž substrátem P-gp a proto působí jako nekompetitivní inhibitor P-gp vazbou na jiné místo P-gp než transportovaný substrát. V současnosti probíhá III. fáze klinického testování využití tohoto inhibitoru v terapii akutní myeloidní leukémie, karcinomů vaječníků či myelomu. Dexniguldipin účinkuje velmi silně *in vitro*, ovšem zůstává zde nežádoucí účinek bradykardie. GF120918 je nyní v I. fázi klinických testů.^[125]

Vývoj dalších nových účinných modulátorů transportní funkce je velmi aktuální. Některé přírodní flavonoidy a resveratrol díky svým účinkům lze považovat za vhodné potenciální modulátory P-gp. Tyto látky se vyskytují jako běžná složka potravy, váží se k P-gp a zároveň mají protinádorové účinky. Flavonoidy představují novou třídu tzv. bifunkčních modulátorů, které překrývají ATP-vazebné místo na P-gp a hydrofobní oblast interagující se steroidní částí substrátů v cytosolární doméně P-gp.^[22] V literatuře byla nalezena řada údajů o působení flavonoidů na transportní funkci P-gp. Flavonoidy kaemferol, galangin, kvercetin a genistein modulují transport léčiv v MDR exprimujících nádorových buňkách, přičemž se váží k NBD2 cytosolární doméně P-gp. Pouze flavonoidy s touto vlastností jsou přitom schopné zvýšit akumulaci léčiv.^[22,108] Kvercetin a jeho methoxylované deriváty např. inhibovaly vazbu k P-gp a vylučování P-gp substrátu rhodaminu-123 a zvyšovaly tak sensitivitu MCF-7 buněk rakoviny prsu vůči adriamycinu.^[120] Z dalších antioxidantů, fenolické látky v zeleném čaji hlavně (-)-epigallokatechin gallát inhibovaly vazbu a vylučování dvou substrátů P-gp, rhodaminu 123 a [³H]-vinblastinu v CH^RC5 resistantních buňkách vaječníků křečka a lidských Caco-2 buňkách.^[58] Na druhé straně kvercetin, kaempferol a galangin zvyšovaly exkreci adriamycinu v HCT-15 střevních buňkách stimulací transportní funkce P-gp.^[25] Na základě nalezených protichůdných výsledků působení přírodních fenolických antioxidantů jsou syntetizovány různé syntetické deriváty flavonoidů, které se váží silně k NBD2 doméně P-gp a jsou potenciálními modulátory P-gp s možným využitím v potlačení rozvoje resistance nádorů. V předkládané práci byl sledován vliv třinácti zástupců syntetických derivátů flavonoidů na transport [¹⁴C]-paclitaxelu v sensitivních a resistantních lidských buňkách rakoviny prsu.

Dalšími možnostmi jak ovlivnit funkci P-gp je využití **anti-P-gp protilátek**. Dnes je známa monoklonální protilátka MRK-16, která se váže k P-gp a působí jako jeho nekompetitivní inhibitor. Celosvětový výzkum se také zaměřuje přímo na ovlivnění exprese MDR1 genu a tím i následné exprese P-gp použitím **antisense MDR1 oligonukleotidů**. V *in vitro* studiích na myších 3T3 fibroblastech antisense MDR1 oligonukleotid snižoval expresi P-gp a zvyšoval

intracelulární akumulaci léčiva.^[2] Modulátory P-gp ovšem nemusí ovlivňovat jen transport léčiv, ale rovněž jejich farmakokinetiku ovlivněním exkrece z jater, ledvin či střev, kde se vyskytuje P-gp a mohou také ovlivnit další transportéry léčiv nebo metabolické cesty možnou interakcí s enzymy metabolismu např. CYP3A4.^[125] Specifitu konkrétních modulátorů k P-gp a možnosti jejich interakce s dalšími léčivy či enzymy metabolických drah je nutné při studiu nových potenciálně farmakologicky využitelných modulátorů P-gp brát v úvahu a detailně stanovit.

Tabulka 6: Přehled modulátorů transportní funkce P-gp.^[125]

| Typ modulátoru | Modulátory P-gp | |
|------------------------------|---|--|
| | Skupina | Zástupci |
| Modulátory P-gp I. generace | <i>Blokátory kalciových kanálů</i> | Verapamil Nifedipin Bepridil Nicardipin |
| | <i>Kardiovaskulární léčiva</i> | Amiodaron Dipyridamol Quinidin |
| | <i>Antimalarika</i> | Chinin Chinacrin Cinchonin |
| | <i>Antibiotika</i> | Cefoperazon Cefriaxon Erythromycin |
| | <i>Cyklosporiny</i> | Cyklosporin A |
| | <i>Fenothiaziny</i> | Trifluoperazin Fluphenazin |
| | <i>Hormony</i> | Tamoxifen Metabolity tamoxifenu: N-desmethyramoxifen a 4- hydroxytamoxifen ^a Toremifen Progesteron |
| | <i>Ostatní</i> | Terfenadin Kremophor Benzquinamid Estramustin FK 506 PSC 833 |
| Modulátory P-gp II. generace | <i>Deriváty cyklosporinu</i> | Dexniguldipin, Dexverapamil |
| | <i>Blokátory kalciových kanálů</i> | S9788, GF120918, SR33557, Rapamycin |
| Jiné modulátory | <i>Ostatní</i> | Kvercetin a jeho methoxylované deriváty Kaempferol Galangin (-)-epigallokatechin gallát Genistein |
| | <i>Fenolické antioxidanty a jejich deriváty</i> | Syntetické deriváty flavonoidů |
| | <i>Protilátky</i> | Monoklonální protilátka MRK-16 |
| | <i>Oligonukleotidy</i> | Antisense MDR-1 oligonukleotidy |

2. CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem této studie bylo rozšíření současných znalostí v oblasti metabolismu a transportu protinádorových léčiv ze skupiny taxanů paclitaxelu a docetaxelu. Dalším cílem bylo poznání metabolických cest a transportu nových syntetických analogů na bázi taxanů SB-T-1103, SB-T-1214 a SB-T-1216 jako potenciálních léčiv využitelných v terapii resistantních nádorů. Současně byly hledány možnosti ovlivnění sledovaných procesů metabolismu a transportu fenolickými antioxidanty s cílem zvýšit účinnost taxanů. Posledním cílem této práce bylo studium *in vivo* účinků taxanů na T-buněčné lymfomy v modelovém organismu potkana.

V rámci práce byly řešeny následující problematiky:

a) Metabolismus taxanů in vitro

- Detailní studium metabolismu klasických a nových taxanů jejich interakcemi s cytochromy P450 v rámci jaterních mikrosomálních frakcích. Znalost všech metabolických přeměn taxanů je velmi důležitá z hlediska jejich účinků neboť metabolismus taxanů vede k inaktivaci původních léčiv a jejich vyloučení z organismu.
- Studium metabolismu klasických i nových taxanů v sérii cDNA exprimovaných lidských CYP (CYP1A2, 1B1, 2A6, 2C9, 2E1 a 3A4) pro identifikaci konkrétních isoformů cytochromů P450 zodpovědných za biotransformaci taxanů.
- Stanovení mezidruhových rozdílů metabolismu klasických a nových taxanů v izolovaných jaterních mikrosomálních frakcích člověka, potkana, prasete a miniprasete. Účelem této části studie bylo zjistit, jaké jsou rozdíly v metabolismu taxanů v různých živočišných druzích s ohledem na výběr nejvhodnějšího experimentálního modelu zvláště prasečích a miniprasečích jaterních mikrosomálních frakcí díky jejich enzymatické výbavě, která je velice blízká lidem.
- Stanovení parametrů enzymatické kinetiky metabolismu klasických a nových taxanů v jaterních mikrosomálních frakcích – určení K_m a V_{max} oxidací taxanů

- Studium působení fenolických antioxidantů na metabolismus klasických taxanů v izolovaných jaterních mikrosomálních frakcích člověka a potkana z hlediska možné inhibice metabolismu taxanů, která by vedla ke zvýšení jejich účinků.

b) Transport taxanů v lidských sensitivních a resistantních buněčných liniích rakoviny prsu

- Studium transportu neradioaktivních forem klasických a nových taxanů a ^{14}C -značeného paclitaxelu lidskými buněčnými liniemi rakoviny prsu. Účelem této části studie bylo stanovení rozdílu v transportu klasických a nových taxanů v sensitivních a v adriamycin-resistantních buněčných liniích rakoviny prsu.
- Stanovení vlivu verapamilu, syntetických analogů taxanů a dále vybraných přírodních a syntetických fenolických antioxidantů na transport ^{14}C -značeného paclitaxelu v buněčných liniích rakoviny prsu s cílem modulovat transport ^{14}C -značeného paclitaxelu zejména v resistantních nádorových buňkách.

c) In vivo účinky paclitaxelu a docetaxelu na T-buněčné lymfomy v modelovém organismu potkana

- Studium účinků různých dávkových schémat paclitaxelu, docetaxelu a jejich kombinací na rozvoj T-buněčných lymfomů v organismu laboratorního potkana. Cílem této studie bylo stanovení rozdílů v účinnosti paclitaxelu a docetaxelu na T-buněčné lymfomy a zjištění, zda kombinace obou léčiv nepovedou k indukci jejich cytotoxického působení.

3. MATERIÁL A METODY

Veškeré použité chemikálie, metody a postupy jsou detailně popsány v příložených publikacích a rukopisech.

3.1 Příprava a charakterizace experimentálních preparátů

Experimentální preparáty použité ke studiu metabolismu taxanů:

Ke studiu metabolismu klasických a nových taxanů byly použity izolované jaterní mikrosomální frakce různých experimentálních druhů. Údaje o premedikaci zvířat, izolaci mikrosomálních frakcí a charakteru jednotlivých preparátů shrnuje *tabulka 7*.

Tabulka 7: Použité experimentální preparáty různých živočišných druhů, premedikace zvířat a charakteristika preparátů z hlediska specifického obsahu cytochromu P450.

| Experimentální preparát | Zdroj preparátu | Premedikace experimentálních zvířat | Specifický obsah CYP ^a |
|--|---|---|---|
| Kontrolní potkaní mikrosomy (N^c=5) | Potkaní kmene Wistar (váha 280-300g), aklimatizace 23 dní před zabitím ve zvěřinci SZÚ, strava a voda <i>ad libitum</i> | Bez premedikace | 0.39 |
| Potkaní mikrosomy s indukcí CYP2E1(N = 5) | | Benzen – inhalace benzenu (4mg/ml) 20 hodin denně po dobu 3 dnů v inhalační aparatuře. Usmrcení ihned. | |
| Potkaní mikrosomy s indukcí CYP3A1/2 (N = 5) | | Pregnenolon-16 α -karbonitril (PCN) – aplikace <i>per os</i> sondou do žaludku v DMSO (25 mg PCN/2.5 ml DMSO/kg) po dobu 3 dnů v 12ti hodinových intervalech. Usmrcení 16hod po poslední aplikaci. | 0.95-1.16 |
| Miniprasečí mikrosomy (N = 2) | Samci bílé varianty Goettingen miniprasat, stáří 6 měsíců, váha 22 – 31 kg | Bez premedikace | 0.23 |
| Prasečí mikrosomy (N = 3) | Samci prasat | Bez premedikace | 0.36-0.50 |
| Lidské mikrosomy (N = 10) | Náhodní dárci | Bez premedikace | 0.13-0.31 |
| cDNA exprimované bicistronické systémy CYP-NPR^d: CYP1A2, 1B1, 2A6, 2C9, 2E1, 3A4 | Membrány izolované z <i>E.coli</i> transformovaných expresními vektory CYP-NPR ^d získaných od prof. P.F. Guengeriche (Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee, USA) | Bez premedikace | ^b CYP1A2: 6.83 CYP1B1: 3.71 CYP2C9: 3.45 CYP2A6: 2.12 CYP2E1: 9.56 CYP3A4: 3.08 |

^aPoměr koncentrace CYP a bílkoviny v daném preparátu; nmol CYP/mg proteinu. ^bnmol CYP/ml, ^cN = počet jedinců daného experimentálního druhu, ^dNPR =NADPH-CYP reduktasa

K izolaci mikrosomálních frakcí byli použiti; **samci potkanů** kmene WISTAR SPF - zakoupení od firmy VELAZ (Praha, ČR) a držení před zabitím ve zvířetníku SZÚ Praha. **Lidské vzorky jater** pocházeli od náhodných dárců. Jednalo se o vzorky získané od 10 mužů ve věku 16 – 42 let, kteří zemřeli na následky dopravních nehod či střelných poranění. **Játra miniprasat** byla získána darem prof. RNDr. Pavla Anzenbachera, DrSc. (Palackého Universita, Olomouc). **Játra prasat** byla získána z jatek (Český brod, ČR) a z Výzkumného ústavu živočišné výroby (Praha – Uhřetěves, ČR). Mikrosomální frakce byly připraveny z jater všech použitých druhů metodou diferenciální centrifugace.^[41-43, 91] Izolované mikrosomální frakce i jednotlivé exprimované CYP byly uskladněny v 0.5 – 1.0 ml alikvotech při -80°C. Koncentrace mikrosomálního proteinu byla měřena podle Lowryho^[73] s hovězím sérovým albuminem jako standardem. Koncentrace cytochromu P450 byla měřena spektrofotometricky podle Omury a Sata^[102] s použitím molárního absorpčního koeficientu 0.091 cm⁻¹.μmol⁻¹.l⁻¹.

3.2 Studium metabolismu taxanů jednotlivými enzymovými preparáty

Inkubace:

Složení inkubačních směsí (1ml): 150mM KCl/50mM Tris-HCl pufr (pH = 7.4), *enzymový preparát* o koncentraci 1mg/ml mikrosomálního proteinu nebo 150 pmol/ml cDNA exprimovaného CYP (CYP1A2, 1B1, 2A6, 2E1, 2C9 a 3A4) s NADPH-CYP reduktasou, *substrát* paclitaxel (2.5 – 25μM), docetaxel (2 - 25μM) nebo nové taxany SB-T-1214, SB-T-1216 a SB-T-1103 (2.5-50μM). Reakce byla započata přidáním 100μL NADPH-generujícího systému (1mM NADP⁺, 10mM glukosa-6-fosfát, 10mM MgCl₂ a 0.5 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa) a probíhala za třepání 30 min při 37°C. Roztoky taxanů byly přidávány do inkubační směsi ve formě 10mM roztoku taxanu v methanolu. Maximální koncentrace organického rozpouštědla ve finální inkubační směsi byla ≤ 0.5%, v/v, která neovlivňovala přeměnu substrátu. Kontrolní vzorky neobsahovaly NADPH-generující systém. Inkubace byla ukončena zchlazením a okamžitou extrakcí organické fáze 2 x 3.5 ml ethylacetátu. Ethylacetátové extrakty byly odpařeny pod proudem dusíku a uloženy při -80°C do analýzy HPLC.

HPLC analýza:

Odparky ethylacetátových extraktů byly rozpuštěny v 200μl mobilní fáze a analyzovány za isokratických podmínek pomocí HPLC na přístroji Agilent Serie 1100 s automatickým

dávkovačem. Podmínky HPLC použité pro analýzu a detekci metabolitů jednotlivých taxanů jsou shrnuty v *tabulce 8*.

Tabulka 8: Podmínky HPLC analýzy metabolitů taxanů

| Taxan | Kolona | Mobilní fáze | Průtok a detekce | Standardy |
|--|---|---|----------------------|--|
| Paclitaxel | Macherey-Nagel Nucleosil 100-5 C18 (5 μm, 4x250 mm) | Methanol:H ₂ O (65:35, v/v) | 1.2 ml/min 232 nm | C3'-hydroxypaclitaxel 6α-hydroxypaclitaxel |
| Docetaxel | Macherey-Nagel Nucleosil 100-5 C18 (5 μm, 4x250 mm) | Acetonitril:Methanol: Tetrahydrofuran:H ₂ O (21:35:2:42) | 1.0 ml/min 230 nm | Hydroxydocetaxel 2stereomerní hydroxyoxazolidinony oxazolidindion 7-epidocetaxel |
| Nové taxany(SBT-1103, SBT-1214, SBT-1216) | Macherey-Nagel Nucleosil 100-5 C18 (5 μm, 4x250 mm) | Methanol:H ₂ O (70:30, v/v) | 1.0 ml/min 230 nm | * |

*Standardy metabolitů nových taxanů nejsou dostupné vzhledem k tomu, že metabolismus těchto taxanových analogů dosud nebyl nikde sledován. Proto byla tvorba metabolitů kvantifikována s využitím samotných nových taxanů jako standardů díky jejich podobnému absorpčnímu koeficientu při 230nm. Stejného postupu bylo využito pro kvantifikaci minoritních a nových metabolitů detekovaných při studiu metabolismu klasických taxanů.

Data byla analyzována s využitím CSW softwaru (Chromatography Station for Windows verze 1.7, DataApex, ČR). Metabolity byly identifikovány a kvantifikovány na základě hmotnostní spektroskopie a porovnáním s autentickými standardy.

Identifikace metabolitů MS/MS analýzou (měřeno na pracovišti RNDr. Petra Šimka v Entomologickém ústavu AV ČR v Českých Budějovicích):

Definované HPLC frakce metabolitů paclitaxelu, docetaxelu, SB-T-1103, SB-T-1214 a SB-T-1216 byly sbírány a vysušeny pod proudem dusíku. Vzorby byly před MS analýzou rozpuštěny ve 125μl směsi 10mM mravenčanu amonného a methanolu (1:1). Podmínky MS analýzy byly následující: kolona Synergi Hydro-RP, 85x2mm, 4μm, teplota kolony 35°C, mobilní fáze methanol:H₂O (70:30) s 10mM mravenčanem amonným, průtoková rychlost 200μl/min na LCQ hmotnostním spektrometru (ThermoFinnigan, USA).

3.3 Studium vlivu fenolických antioxidantů na metabolismus klasických taxanu

Byl sledován *vliv devíti přírodních fenolických antioxidantů na metabolismus paclitaxelu a docetaxelu* v PCN-indukovaných mikrosomech potkana a v lidských jaterních

mikrosomech. Konkrétní sledované fenolické antioxidanty a jejich koncentrace jsou shrnuty v *tabulce 9*. Byly měřeny vznikající množství metabolitů taxanů dle postupů uvedených v kapitole 3.2, bez a s přidavkem fenolických antioxidantů v inkubačních směsích (5 – 40 μ M). Koncentrace fenolických antioxidantů byly voleny s ohledem na jejich rozpustnost, farmakologicky dosažitelnou hladinu a jejich účinnost. Tam, kde se ukázala významná inhibice metabolismu 10 μ M paclitaxelu a docetaxelu, byly dále stanoveny IC₅₀ pro jednotlivé fenolické antioxidanty a sledována enzymatická kinetika této inhibice určením inhibičních konstant (K_i) a typu inhibice při stoupající koncentraci taxanů (2.5 - 20 μ M) i fenolických antioxidantů (5 – 40 μ M). K inhibičním experimentům byl použit rovněž známý specifický inhibitor CYP3A podrodiny troleandomycin, který byl stejně jako fenolické antioxidanty přidáván do inkubačních směsí v koncentracích 30, 60 a 100 μ M.

Tabulka 9: Přehled sledovaných fenolických antioxidantů na metabolismus paclitaxelu a docetaxelu v PCN-indukovaných jaterních mikrosomech potkana a v lidských jaterních mikrosomech.

| Třída fenolických antioxidantů | Testovaný zástupce | Systematický název | Použité koncentrace fenolických antioxidantů (μ M) |
|-----------------------------------|--------------------|-----------------------------------|---|
| FLAVONOIDY | | | |
| Flavanoly | (+)-katechin | 3,5,7,3',4'-flavanpentol | 30 ^a |
| | (-)-epikatechin | cis-3,5,7,3',4'-flavanpentol | 30 ^a |
| Flavonoly | fisetin | 3,7,3',4'-tetrahydroxyflavon | 10,20,40 |
| | morin | 3,5,7,2',4'-pentahydroxyflavon | 5, 15, 20 |
| | myricetin | 3,5,7,3',4',5'-hexahydroxyflavon | 5, 10, 20, 30 |
| | kvercetin | 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavon | 5, 10, 20, 30 |
| Flavanony | naringenin | 5,7,4'-trihydroxyflavon | 10, 20, 30, 40 |
| NON-FLAVONOIDY | | | |
| Stilbeny | resveratrol | 3,5,4'-trihydroxystilben | 5, 15, 20, 30 |
| Deriváty kyseliny benzoové | kyselina gallová | 3,4,5-trihydroxybenzoová kyselina | 30 ^a |

^afenolické antioxidanty, jejichž účinek se neprojevil ani v 30 μ M koncentraci a proto nebyl dále jejich vliv sledován

3.4 Studium transportu taxanu v lidských buněčných liniích rakoviny prsu

Transport klasických i nových taxanů byl sledován na pracovišti Laboratoře regulace buněčného růstu (ÚMG AV ČR, Praha-Krč) v lidské sensitivní (MDA-MB-435) buněčné linii rakoviny prsu a linii (NCI/ADR-RES) resistantní vůči doxorubicinu (adriamycinu), která

vykazovala resistenci rovněž vůči taxanům. Tyto buněčné linie se liší expresí některých ABC transportních proteinů zejména P-gp, která byla stanovena na úrovni mRNA na pracovišti Laboratoře regulace buněčného růstu ÚMG AV ČR metodou RT-PCR tedy kvantitativní PCR po reversní transkripci. Imunohistochemicky byla na úrovni proteinu sledována exprese P-gp metodou Western blot s následnou chemiluminiscenční detekcí P-gp pomocí Pierce ECL Western Blotting Chemiluminescence Substrate (Genetica, ČR).

Inkubace taxanů s lidskými buněčnými liniemi rakoviny prsu

Buněčné linie byly inkubovány v intervalech 15 – 240 min s RPMI médiem obsahujícím paclitaxel (1-5 μ M), docetaxel (1-4 μ M), SB-T-taxany (1-5 μ M) nebo radioaktivně značený [14 C]paclitaxel (0.02 – 0.5 μ M). Taxany byly rozpuštěny v DMSO (maximální koncentrace organického rozpouštědla v inkubační směsi byla 0.1%, v/v). Po inkubaci bylo medium odebráno, buňky promyty ledovým PBS a uvolněny 2x400 ml trypsinu a EDTA. K uvolněným buňkám byl přidán před měřením 10% SDS pro lýzu buněk a k uvolnění léčiva.

Sledování akumulace taxanů pomocí HPLC

Taxany byly extrahovány z dvakrát promytých a pak uvolněných buněk 2x3.5 ml ethylacetátu, extrakty byly odpařeny do sucha pod proudem dusíku a jejich akumulace byla analyzována za stejných podmínek HPLC jako při sledování metabolismu taxanů (*viz. tabulka 8*). Jako standardy byly použity vzorky taxanů (1 μ M) v RPMI médiu s 10% FBS.

Sledování transportu [14 C]paclitaxelu buněčnými liniemi rakoviny prsu

K měření transportu v buněčných liniích rakoviny prsu byl použit paclitaxel v radioaktivně značené formě jako [14 C]paclitaxel. Při stanovení množství akumulovaného paclitaxelu byl k uvolněným buňkám po jejich inkubaci s [14 C]paclitaxelem a následném promytí přidán kapalný scintilátor Bray a následně byla měřena kapalná scintilace. V případě sledování vylučování [14 C]paclitaxelu ze sensitivních i resistantních buněk byl nejprve [14 C]paclitaxel inkubován 120min s buňkami, poté odebrán a nahrazen čerstvým médiem. Buňky byly promyty a uvolněny po 10 – 90min intervalu trvání effluxu stejným způsobem jako v případě sledování akumulace léčiva.

Sledování vlivu vybraných přírodních fenolických antioxidantů a syntetických derivátů flavonoidů na transport [14 C]paclitaxelu buněčnými liniemi rakoviny prsu

Dva vybrané přírodní antioxidanty a 13 syntetických derivátů antioxidantů zvolených na základě jejich schopnosti modulovat P-gp zprostředkovaný transport bylo použito ke studiu

jejich vlivu na transport [^{14}C]paclitaxelu v lidských sensitivních (MDA-MB-435) a resistantních (NCI/ADR-RES) buňkách rakoviny prsu. Vliv antioxidantů byl sledován dle postupů uvedených v kapitole 3.4 bez a s přidavkem fenolických antioxidantů v inkubačních směsích (5 – 40 μM). Jako zástupci přírodních fenolických antioxidantů byly vybrány **kvercetin a resveratrol**, které účinně *in vitro* inhibují metabolismus paclitaxelu. Série syntetických derivátů flavonoidů použitá ke sledování ovlivnění transportu [^{14}C]paclitaxelu buněčnými liniemi byla získána darem Ahcena Boumendjela PhD. (Department de Pharmacochimie Moléculaire, Faculte de Pharmacie de Grenoble (Meylan, France);

- **Deriváty auronu:** CB-284 (4'-bromo-4,6-dimethoxyauron), CB-285 (4'-chloro-4,6-dimethoxyauron), CB-287 (4,6,3',4',6'-pentamethoxyauron), ND-285 (4'-chloro-4-hydroxy-6-methoxyauron), ML-30 (4'-ethyl-4-hydroxy-6-methoxyauron), ML-50 (4-hydroxy-6-methoxyauron), A-55B (4'-kyano-7-iodo-4-hydroxy-6-methoxyauron)
- **Deriváty chalkonu:** FBB-14 (4-iodo-2',4',6'-trihydroxychalkon)
- **Deriváty flavonu:** CB-436 (4'-bromo-3-methoxy-5,7-dihydroxyflavon)
- **Deriváty flavonolu:** kaempferid (4'-methoxy-3,5,7-trihydroxyflavon), AB-2DE (4'-iodo-3,5,7-trihydroxyflavon)
- **Deriváty chromonu:** MH-11 (5-hydroxy-2-karbopyrazol-methyl-chromon)
- **Deriváty azaisoflavonu:** A-12 (3-phenyl-5,7-hydroxy-4-chinolon)

Pro všechny sledované fenolické antioxidanty (10 μM) byla stanovena cytotoxicita v MDA-MB-435 i NCI/ADR-RES buněčných liniích MTT metodou na pracovišti Laboratoře regulace buněčného růstu (ÚMG AV ČR, Praha-Krč).

3.5. Sledování účinku klasických taxanů *in vivo* v organismu potkana s implantovanými T-buněčnými lymfomy

Jako modelový organismus pro sledování nových aplikací cytostatik taxanů byly použity **samice potkanů Sprague-Dawley/Cub s transplantovanými T-buněčnými lymfomy**. Suspenze buněk lymfomů v množství 10⁶ buněk/potkana byly aplikovány subkutánně na pracovišti doc. RNDr. Berty Otové CSc. (Ústav biologie a lékařské genetiky, 1.LF a VFN UK, Praha, ČR). Dále byly **aplikovány taxany paclitaxel a docetaxel v různých dávkových**

schématech a kombinacích a sledovány jejich hladiny v krvi a změny parametrů T-buněčných lymfomů po aplikaci taxanů, jak popisuje *tabulka 10*.

Tabulka 10: *Dávkové schéma taxanů, odběr krve a vzorků pro sledování účinků paclitaxelu a docetaxelu na T-buněčné lymfomy v organismu experimentálního potkana.*

| Sledovaná skupina a počet jedinců ve skupině | Dávkové schéma taxanů | Odběr vzorků a časové intervaly odběru |
|--|--|--|
| Sledování hladin paclitaxelu a docetaxelu v krvi potkanu v různých dávkových schématech | | |
| I.skupina (N = 4) | Paclitaxel 20mg/kg tělesné váhy i.p. | Odběr 200 μ L krve pod narkosou z ocasu v intervalech: 0, 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 300 a 360min ^a |
| II.skupina (N = 4) | Docetaxel 20mg/kg tělesné váhy i.p. | Odběr 200 μ L krve pod narkosou z ocasu v intervalech: 0, 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 300 a 360min ^a |
| III.skupina (N = 4) | Paclitaxel 3x týdně 6mg/kg následováno dávkou 20mg/kg | Odběr 200 μ L krve pod narkosou z ocasu v intervalech: 0, 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 300 a 360min ^a |
| IV.skupina (N = 4) | Docetaxel 3x týdně 6mg/kg následováno dávkou 20mg/kg | Odběr 200 μ L krve pod narkosou z ocasu v intervalech: 0, 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 300 a 360min ^a |
| Vliv opakovaného podání paclitaxelu a docetaxelu na tělesnou váhu, velikost a váhu lymfomu | | |
| I.skupina (N = 5) | Kontrolní skupina | Ve stejný den jako premedikované skupiny byli potkani zváženi a zabiti |
| II.skupina (N = 5) | Paclitaxel i.p. 4 dávky 10, 6, 6 a 6mg/kg v týdenních intervalech | 17 dní po poslední aplikaci byli potkani zváženi, zabiti a zvážené lymfomy byly zmraženy při -80°C |
| III.skupina (N = 5) | Docetaxel i.p. 4 dávky 10, 6, 6 a 6mg/kg v týdenních intervalech | 17 dní po poslední aplikaci byli potkani zváženi, zabiti a zvážené lymfomy byly zmraženy při -80°C |
| IV.skupina (N = 5) | Kombinace dvě dávky docetaxelu 10 a 6mg/kg v týdenním intervalu následováno dvěma dávkami paclitaxelu po 6ti mg/kg | 17 dní po poslední aplikaci byli potkani zváženi, zabiti a zvážené lymfomy byly zmraženy při -80°C |
| V.skupina (N = 5) | Kombinace dvě dávky paclitaxelu 10 a 6mg/kg v týdenním intervalu následováno dvěma dávkami docetaxelu po 6ti mg/kg | 17 dní po poslední aplikaci byli potkani zváženi, zabiti a zvážené lymfomy byly zmraženy při -80°C |
| Vliv opakovaného podání paclitaxelu a docetaxelu na tělesnou váhu, velikost a váhu lymfomu v pěti dávkovém schématu taxanu | | |
| I.skupina (N = 6) | Kontrolní skupina | Ve stejný den jako premedikované skupiny byli potkani zváženi a zabiti |
| II.skupina (N = 6) | Paclitaxel i.p. 5 dávek 10, 6, 6, 6 a 6mg/kg v týdenních intervalech | 1 den po poslední aplikaci byli potkani zváženi, zabiti a zvážené lymfomy byly zmraženy při -80°C |
| III.skupina (N = 6) | Docetaxel i.p. 5 dávek 10, 6, 6, 6 a 6mg/kg v týdenních intervalech | 1 den po poslední aplikaci byli potkani zváženi, zabiti a zvážené lymfomy byly zmraženy při -80°C |

^aK odebrané krvi bylo přidáno 0.5 ml Milli-Q H₂O a 3.5 ml ethylacetátu.

Kromě těchto sledovaných skupin potkanů byli použity další dvě zcela odlišné skupiny potkanů s T-buněčnými lymfomy, kde nebyl aplikován *in vivo* žádný z taxanů. Jednalo se o kontrolní skupinu bez premedikace a skupinu premedikovanou PCN (induktor CYP3A1/2) i.g. v dávce 25 mg/kg v olivovém oleji v 12ti hodinových intervalech během 3dnů. Z těchto zvířat byla po usmrcení izolována játra a připraveny jaterní mikrosomální frakce. Ty byly využity ke studiu metabolismu taxanů *in vitro* dle postupů popsanych v kap.3.2. Dále byly získány nádory a střeva těchto potkanů, ze kterých byly izolovány post-mitochondriální frakce s obsahem plasmatických membrán. V post-mitochondriálních frakcích byla stanovena koncentrace proteinu dle Omura a Sato^[102] a 30μg proteinu/15μL frakce bylo použito pro stanovení exprese P-gp na úrovni proteinu dle postupu uvedeného v kapitole 3.4.

3.6. Zpracování výsledku

Získané výsledky byly statisticky hodnoceny. Veškerá data jsou prezentována jako průměry ± SD (směrodatné odchylky) stanovení. Signifikantní rozdíly vlivu fenolických antioxidantů na metabolismus a transport taxanů byly hodnoceny s využitím oboustranného Studentova t-testu. Za statisticky významné byly považovány výsledky s hodnotou $P < 0.05$ a $P < 0.01$. **Při sledování metabolismu paclitaxelu, docetaxelu a nových taxanů *in vitro*** byly z lineárních závislostí sestrojených metodou lineární regrese z reciprokových Lineweaver-Burkových výnosů rychlosti tvorby metabolitů vypočítány kinetické parametry metabolismu paclitaxelu tedy Michaelisovy konstanty (K_m) a maximální rychlosti reakce (V_{max}) z průsečíků s osami. **Při sledování vlivu fenolických antioxidantů a troleandomycinu na metabolismus taxanů *in vitro*** byly počítány IC_{50} účinně inhibujících antioxidantů a troleandomycinu z poklesu tvorby metabolitů (v % zbývající aktivity) s rostoucí koncentrací antioxidantů a troleandomycinu. Inhibiční konstanta K_i a typ inhibice byly určovány z Dixonových výnosů,^[28] kde se vynáší převrácené hodnoty rychlosti metabolické reakce proti koncentraci inhibitoru a z Lineweaver-Burkových výnosů, kde se vynáší převrácené hodnoty rychlosti metabolické reakce proti převráceným hodnotám koncentrací substrátu.^[139] **Cytotoxicita klasických a nových taxanů v lidských sensitivních a resistantních buněčných liniích rakoviny prsu** byla hodnocena na základě stanovení IC_{50} po 96hod vystavení buněk působení taxanů.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1. Studium metabolismu taxanů *in vitro*

K testování interakcí klasických taxanů (paclitaxel, docetaxel) i nových taxanových analogů (SB-T-1103, SB-T-1214 a SB-T-1216) s cytochromy P450 byly připraveny subcelulární systémy mikrosomů jaterních buněk lidí, miniprasat, prasat a potkanů. V případě potkanů se jednalo o skupinu nepremedikovaných zvířat a skupiny potkanů premedikovaných známými induktory konkrétních isoform cytochromu P450. K indukci CYP3A1/2 byl použit pregnenolon 16 α -karbonitril (PCN), k indukci CYP2E1 benzen. Mikrosomální frakce byly charakterizovány z hlediska koncentrace mikrosomálního proteinu a cytochromu P450. Zvýšení obsahu majoritně indukovaných forem bylo ověřeno pomocí specifických aktivit cytochromů P450 a zvýšením hladin jejich apoproteinů pomocí imunodetekce.^[92]

4.1.1. Metabolismus paclitaxelu *in vitro* živočišnými cytochromy P450

Z literatury jsou známy především mezidruhové rozdíly metabolismu paclitaxelu u lidí a potkanů. Proto byla sledována přeměna paclitaxelu živočišnými cytochromy P450 v podmínkách *in vitro* za použití mikrosomálních frakcí izolovaných z jater člověka, potkana, miniprasete a prasete a cDNA exprimovaných lidských cytochromů P450 (CYP1A2, 1B1, 2A6, 2C9, 2E1 a 3A4). Bylo sledováno, jaké metabolity vznikají po inkubaci paclitaxelu s jaterními mikrosomy a cDNA exprimovanými CYP a které z nich jsou hlavní a které minoritní produkty přeměny paclitaxelu. Vznikající metabolity byly detekovány pomocí HPLC. Všechny významné vznikající metabolity byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie měřené v Entomologickém ústavu AV ČR v Českých Budějovicích RNDr. Petrem Šimkem. Vzhledem k tomu, že hlavní metabolity taxanů *in vitro* a *in vivo* se shodují, podmínky *in vitro* adekvátně reprezentují situaci v živém organismu.

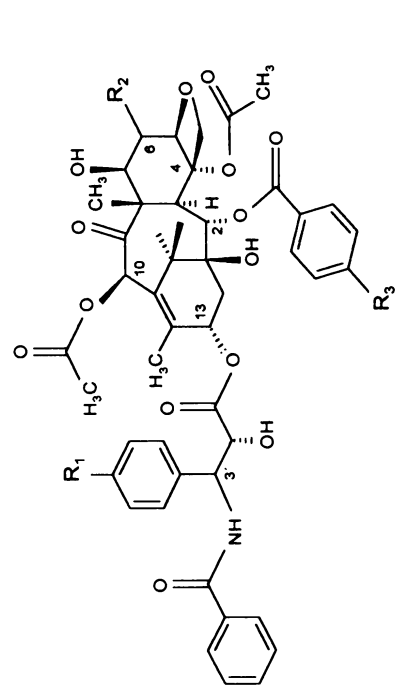
V nepremedikovaných *potkaních mikrosomech* byl jako hlavní metabolit detekován ***C3'-hydroxypaclitaxel (C3'-OHPCT)***, dále ***C2-hydroxypaclitaxel*** a obtížně detekovatelný minoritní metabolit ***di-hydroxypaclitaxel (di-OHPCT)***. C3'-OHPCT byl identifikován porovnáním s autentickým standardem a hmotnostní spektroskopii. C2-OHPCT a di-OHPCT byly identifikovány rovněž MS analýzou a také porovnáním retenčních časů

s literaturou.^[4,143] Kromě těchto metabolitů byl identifikován nový minoritní metabolit charakterizovaný HPLC-MS jako **hydroxypaclitaxel (OHPCT)**. Tento metabolit má velmi podobný, nicméně odlišný eluční retenční čas ($t_R = 80.40 \pm 0.15\%$ eluce paclitaxelu) jako lidský 6 α -hydroxypaclitaxel ($t_R = 79.55 \pm 0.15\%$ eluce paclitaxelu). Metabolity nevznikaly, pokud nebyl přidán do inkubační směsi NADPH generující systém nezbytný pro funkci CYP systému. **Indukce CYP2E1 benzenem** nezvýšila rychlost metabolismu paclitaxelu v mikrosomech potkana, což vylučuje účast CYP2E1 na metabolismu této látky. **Indukce CYP3A1/2 pomocí PCN** naopak významně zvyšovala rychlost metabolismu paclitaxelu v mikrosomech potkana, čímž se potvrdila účast CYP3A podrodiny na jeho přeměně. Tvorba hlavního C3'-OHPCT byla v PCN-indukovaných mikrosomech navýšena 7 – 30x více v různých experimentech, minoritních metabolitů vznikalo rovněž více a to C2-OHPCT 11-45x více, neznámého OHPCT 5-15x více a di-OHPCT 2-13x více než v kontrolních mikrosomech potkana. Charakteristika všech nalezených metabolitů paclitaxelu v jaterních mikrosomech sledovaných experimentálních druhů je uvedena v *tabulce 11*.

Profil metabolismu paclitaxelu v **jaterních mikrosomech prasat a miniprasat** byl stejný, ale lišil se v poměru tvorby jednotlivých metabolitů. V obou typech mikrosomů byl hlavním metabolitem **neznámý OHPCT** čítající 95% z celkového množství metabolitů paclitaxelu. **C3'-OHPCT** byl minoritním metabolitem stejně jako **C2-OHPCT**, který vznikal v jaterních mikrosomech miniprasat, ale ne konvenčních prasat (*Tabulka 11*).

V lidských jaterních mikrosomech byl hlavním metabolitem **6 α -hydroxypaclitaxel (6 α -OHPCT)**, který byl unikátním lidským metabolitem a nevznikal v žádném jiném sledovaném živočišném druhu. Byl identifikován na základě porovnání s autentickým standardem a pomocí hmotnostní spektroskopie. Minoritními metabolity v lidských mikrosomech byly **C3'-OHPCT** a **C2-OHPCT** charakterizované pomocí HPLC-MS (*Tabulka 11*). Chemická struktura všech metabolitů paclitaxelu nalezených v jednotlivých jaterních mikrosomálních frakcích potkanů, miniprasat, prasat a lidí je znázorněna v *obr. 6*.

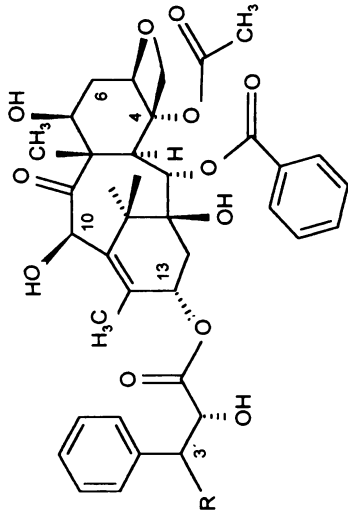
Pro identifikaci cytochromů P450 účastnících se metabolismu paclitaxelu byla sledována přeměna paclitaxelu v sérii lidských cDNA exprimovaných **cytochromů P450 (CYP1A2, 1B1, 2A6, 2C9, 2E1 a 3A4)**. Z celé použité série cytochromů P450 byl aktivní pouze CYP3A4, který metabolisoval paclitaxel na C3'-OHPCT (1.38 ± 0.2 pmol/min/nmol CYP) a C2-OHPCT (0.15 ± 0.1 pmol/min/nmol CYP). Tento výsledek potvrdil významnou úlohu CYP3A4 na metabolismu paclitaxelu v lidském organismu.



Paclitaxel

| Sloučenina | R ₁ | R ₂ | R ₃ |
|-------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| <i>Paclitaxel</i> | H | H | H |
| 6 α -hydroxypaclitaxel | H | OH | H |
| Dihroxypaclitaxel | OH | OH | H |
| C3'-hydroxypaclitaxel | OH | H | H |
| C2-hydroxypaclitaxel | H | H | OH |
| Neznámý hydroxypaclitaxel | ND | ND | ND |

Obr.6: Chemická struktura **paclitaxelu** a jeho metabolitů.
ND = přesná pozice hydroxylové skupiny nelze určit pomocí MS analýzy



Docetaxel

| Sloučenina | K |
|---------------------|--|
| <i>Docetaxel</i> | $\text{---NH---C(=O)---O---C(CH}_3\text{)}_2$ |
| Hydroxydocetaxel | $\text{---NH---C(=O)---O---C(CH}_3\text{)(CH}_2\text{OH)}$ |
| Hydroxyoxazolidinon | |

Obr.7: Chemická struktura **docetaxelu** a jeho metabolitů.
ND = přesná pozice hydroxylové skupiny nelze určit pomocí MS analýzy

Tabulka 11: Metabolity paclitaxelu a docetaxelu v jaterních mikrosomech různých živočišných druhů. Rychlost tvorby metabolitů je vyjádřena v pmol/mg proteinu/min. Uvedená data jsou průměrné hodnoty ± SD (n ≥ 2).

| Metabolit | Charakteristika metabolitů | | | Tvorba a množství metabolitů v jaterních mikrosomech | | | | | | |
|--------------------------|-----------------------------------|--|-----------------|--|------------------------|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| | ^b t _R , min | ^b t _R , % paclitaxel | MM | Popis metabolitů ^c | Potkaní mikrosomy | PCN-indukované mikrosomy potkana | Prasečí mikrosomy Samci | Prasečí mikrosomy Samice | Miniprasečí mikrosomy | Lidské mikrosomy |
| PACLITAXEL | di-OHPCT | 6.15 | 41 | 886.3 | dihydroxypaclitaxel | 1.0±0.5 | 1.9±0.1 | - | - | - |
| | C3'-OHPCT | 7.76 | 51.7 | 870.3 | C3'-hydroxypaclitaxel | <u>3.16±1.5^a</u> | <u>81.5±2.7^a</u> | 0.5±0.1 | 0.3±0.0 | 0.4±0.2 |
| | C2-OHPCT | 9.42 | 62.8 | 870.3 | p-C2-hydroxypaclitaxel | 0.5±0.2 | 18.5±0.3 | - | - | 0.3±0.1 |
| | 6α-OHPCT | 12.06 | 79.55 | 870.3 | 6α-hydroxypaclitaxel | - | - | - | - | <u>81.8±21.2^a</u> |
| Neznámý OHPCT | 12.06 | 80.4 | 870.3 | Hydroxypaclitaxel, poloha OH skupiny neurčena | 1.0±0.2 | 14.4±0.8 | <u>5.9±1.2^a</u> | <u>5.8±0.1^a</u> | <u>13.8±2.5^a</u> | - |
| DOCETAXEL | | | MM ^d | Popis metabolitů ^c | Potkaní mikrosomy | PCN-indukované mikrosomy potkana | Prasečí mikrosomy Samci | Prasečí mikrosomy Samice | Miniprasečí mikrosomy | Lidské mikrosomy |
| | OHDTX | 10.12 | 44.1 | | | | <u>32.0±1.0^a</u> | <u>12.0±2.0^a</u> | <u>21.0±4.0^a</u> | <u>3.5±1.5^a</u> |
| Hydroxyoxazolidinon A | 8.97 | 39.08 | | Hydroxydocetaxel – poloha C3' postranního C13 řetězce docetaxelu | 0.9±0.02 | 213.3±8.2 | - | - | - | 0.7±0.6 |
| Hydroxyoxazolidinon B | 9.65 | 42.05 | | Aldehyd vzniklý oxidací OHDTX Stereoisomer Hydroxyoxazolidinonu B | - | <u>258.7±13.6^a</u> | - | - | - | 0.7±0.1 |

^aHlavní metabolit, ^bt_R = retenční čas (min), ^cstruktury metabolitů jsou znázorněny v metabolických schématech na obr.6 (paclitaxel) a obr.7 (docetaxel), ^dMS analýza neprováděna, metabolity byly identifikovány porovnáním s příslušnými standardy metabolitů

Ke konečnému potvrzení účasti konkrétních cytochromů P450 v metabolismu paclitaxelu u všech sledovaných experimentálních druhů byl sledován vliv *troleandomycinu* (30, 60 a 100 μ M, specifický inhibitor CYP3A) a *fisetinu* (30 μ M, inhibitor CYP2C8) na metabolismus paclitaxelu. Fisetin jednoznačně inhiboval tvorbu α -OHPCT v lidských jaterních mikrosomech, čímž se potvrdila účast CYP2C8 na metabolismu paclitaxelu v lidském organismu. Troleandomycin inhiboval *in vitro* tvorbu C3'-OHPCT a C2-OHPCT u potkanů, prasat, miniprasat i lidí (Příloha č.III). Dále inhiboval také tvorbu di-OHPCT u potkanů a neznámého OHPCT u potkanů, prasat a miniprasat. Tyto výsledky jsou jasným důkazem účasti CYP3A podrodiny na metabolismu paclitaxelu u všech sledovaných živočišných druhů. Velké mezidruhové rozdíly nalezené ve sledovaných experimentálních druzích plynou zejména z významu CYP2C8 v biotransformaci paclitaxelu. Tento cytochrom P450 je významným lidským enzymem, který nemá ortologní formu u žádného ze sledovaných živočišných druhů. Nepřítomnost CYP2C8 je významná zejména u miniprasat a prasat, jejichž enzymatická výbava je jinak velmi blízká člověku a jsou dokonce považovány za potenciální dárce transplantátů pro člověka. Ovšem fakt, že nemají odpovídající formu lidského CYP2C8 může mít zásadní význam pro biotransformaci všech látek, kterých se lidský CYP2C8 účastní.

4.1.2. Metabolismus docetaxelu *in vitro* živočišnými cytochromy P450

Byla sledována přeměna docetaxelu živočišnými cytochromy P450 v podmínkách *in vitro* za použití mikrosomálních frakcí izolovaných z jater člověka, potkana, miniprasete a prasete a cDNA exprimovaných lidských cytochromů P450 (CYP1A2, 1B1, 2A6, 2C9, 2E1 a 3A4). Opět bylo sledováno, jaké metabolity jsou hlavními a jaké minoritními produkty přeměny docetaxelu. Vznikající metabolity byly detekovány pomocí HPLC a charakterizovány pomocí hmotnostní spektrometrie.

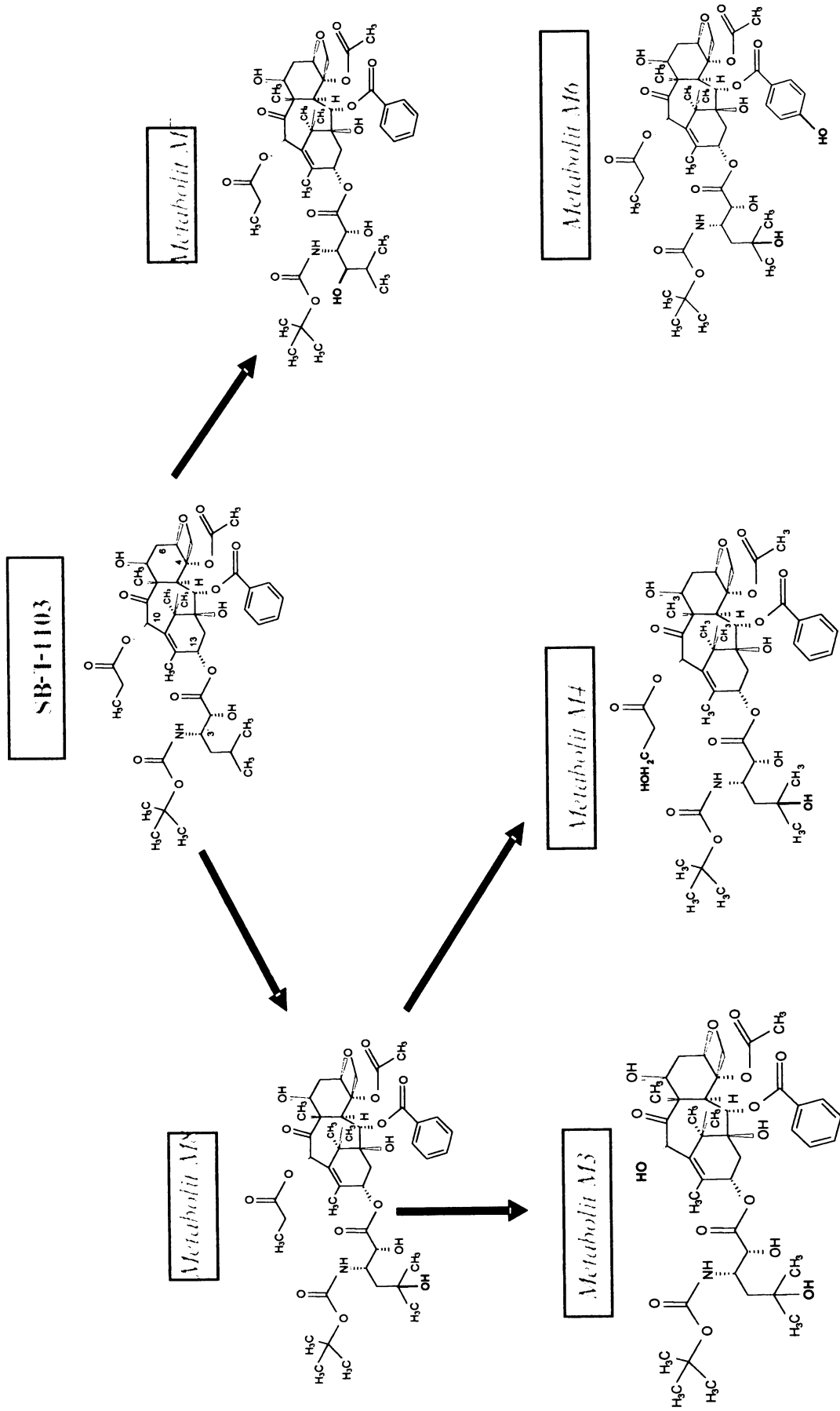
Oproti paclitaxelu byl profil metabolismu docetaxelu shodný ve všech sledovaných živočišných druzích. Hlavním metabolitem byl *hydroxydocetaxel (OHDTX)* následovaný dvěma minoritními metabolity odpovídajícími strukturou *diastereoisomerním hydroxyoxazolidinonům A a B*. Tyto dva minoritní metabolity byly ovšem v mikrosomech potkana, miniprasete a prasete obtížně detekovatelné. Jediný mezidruhový rozdíl v metabolismu docetaxelu byl nalezen v PCN-indukovaných mikrosomech potkana. V těchto mikrosomech byly dominantní oba *diastereoisomerní hydroxyoxazolidinony A a B*. Tento rozdíl lze přičíst indukci CYP3A1/2, který se podílí na metabolismu docetaxelu a ve

velkém množství indukuje rychlejší oxidaci hydroxydocetaxelu na hydroxyoxazolidinony. Protože metabolity byly efektivně tvořeny mikrosomy PCN-premedikovaných potkanů s indukcí CYP3A1/2 a z literatury je známo, že se ho účastní CYP3A podrodina,^[13] nebylo třeba provádět další identifikace konkrétních forem CYP účastnících se metabolismu docetaxelu. Charakteristika všech nalezených metabolitů docetaxelu v jaterních mikrosomech sledovaných experimentálních druhů je uvedena v *tabulce 11*. Chemická struktura metabolitů docetaxelu nalezených v jednotlivých jaterních mikrosomálních frakcích potkanů, miniprasat, prasat a lidí je znázorněna v *obr.7*. Vzhledem k tomu, že metabolismus docetaxelu se mezi jednotlivými druhy nelišil, lze říci, že prasata a miniprasata jsou vhodným experimentálním modelem pro studium metabolismu docetaxelu.

4.1.3. Metabolismus analogu taxanu *in vitro* živočišnými cytochromy P450

Rovněž u nových taxanových analogů SB-T-1103, SB-T-1214 a SB-T-1216, které jsme měli k dispozici, byla sledována přeměna živočišnými cytochromy P450 v podmínkách *in vitro* za použití mikrosomálních frakcí izolovaných z jater člověka, potkana, miniprasete a prasete a cDNA exprimovaných lidských cytochromů P450 (CYP1A2, 1B1, 2A6, 2C9, 2E1 a 3A4). Jelikož metabolismus těchto látek i mezidruhové rozdíly metabolismu byly dosud zcela neznámé, byly všechny metabolity detekované pomocí HPLC vznikající v dostatečném množství charakterizovány pomocí MS analýzy.

SB-T-1103 byl metabolisován na 11 produktů označovaných M1-M11, SB-T-1214 na 9 metabolitů označovaných M1-M9 a SB-T-1216 tvořil 8 metabolitů M1-M8 dle jejich rostoucích retenčních časů. MS analýzou metabolitu M1 taxanu SB-T-1214 byl odhalen jako příměs tohoto metabolitu další velmi minoritní metabolit (M10), takže konečné množství metabolitů SB-T-1214 je deset. Následující metabolická schémata znázorňují celý proces přeměny včetně reanalýz metabolitů SB-T-1103 (*obr.8A*), SB-T-1214 (*obr.8B*) a SB-T-1216 (*obr.8C*) v jednotlivých jaterních mikrosomálních frakcích potkanů, miniprasat, prasat a lidí. Hlavními polohami, kde probíhala oxidace byly C-13 postranní řetězec, C-2 aromatická část a poloha C-10 na taxanovém kruhu. Detailní charakteristiky všech nalezených metabolitů SB-T-1103, SB-T-1214 a SB-T-1216 v jaterních mikrosomech sledovaných experimentálních druhů jsou uvedeny v *tabulkách 12,13 a 14*.

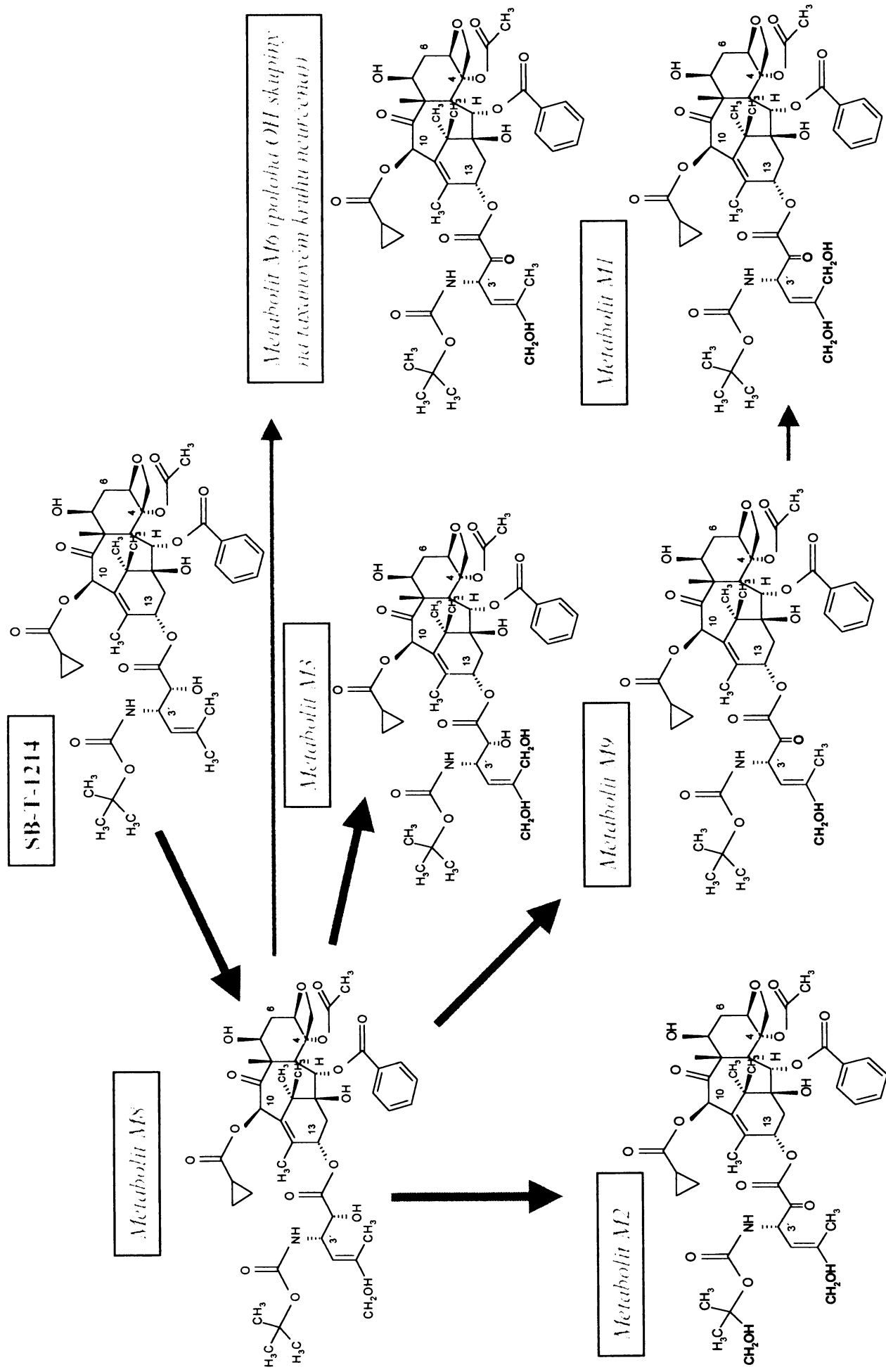


Obr.8A: Strukturální schéma *in vitro* metabolických přeměn syntetického taxanového analogu SB-T-1103.

Tabulka 12: Metabolity SB-T-1103 (MW 843.95) v jaterních mikrosomech různých živočišných druhů. Rychlost tvorby metabolitů je vyjádřena v pmol/mg proteinu/min. Uvedená data jsou průměrné hodnoty ± SD (n = 3).

| Metabolit | Charakteristika metabolitů | | | | Tvorba a množství metabolitů v jaterních mikrosomech | | | | | | |
|------------|----------------------------|-----------------|---------|---|--|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|--|
| | t_R^b , min | t_R^b , % SBT | MM | Popis metabolitů ^c NA = nevýznamné metabolity neanalyzované MS | Potkaní mikrosomy | PCN-indukované mikrosomy potkana | Prasečí mikrosomy | Miniprasečí mikrosomy | Lidské mikrosomy | | |
| M1 | 4.5 | 21 | - | NA | 3.2±0.8 | - | 2.9±1.6 | - | - | | |
| M2 | 5.0 | 23 | - | di-hydroxy-SBT – hydroxylace 2-methylpropanu v poloze C3' na C13 postranním řetězci taxanu, druhá hydroxylace rovněž na C-13 v neznámé poloze | - | 52.6±13.7 | - | - | - | | |
| M3 | 5.3 | 25 | 803/819 | Depropionace v poloze C-10 na taxanovém kruhu + hydroxylace 2-methylpropanu v poloze C3' na C13 postranním řetězci SB-T-1103 | - | 25.9±8.0 | - | - | - | | |
| M4 | 6.9 | 29 | 875 | hydroxylace 2-methylpropanu v poloze C3' na C13 postranním řetězci SB-T-1103 + hydroxylace propionátu v poloze C-10 taxanového kruhu | 1.7±0.0 | 18.9±1.1 | 2.0±0.0 | 4.1±0.7 | - | | |
| M5 | 7.0 | 33 | 859/875 | NA | 6.7±0.0 | - | 1.6±0.5 | 1.9±0.2 | 1.0±0.1 | | |
| M6 | 7.6 | 36 | 875 | hydroxylace 2-methylpropanu v poloze C3' na C13 postranním řetězci SB-T-1103 + hydroxylace v <i>para</i> -poloze C-2 benzylu | 0.8±0.1 | 5.3±0.3 | 0.8±0.0 | 3.2±0.2 | 0.8±0.0 | | |
| M7 | 8.0 | 39 | 859 | hydroxylace 2-methylpropanu v poloze C3' na C13 postranním řetězci SB-T-1103 | 21.7±0.3 | 2.3±1.4 | 3.1±0.31 | - | - | | |
| M8 | 9.0 | 42 | 859 | hydroxylace 2-methylpropanu v poloze C3' na C13 postranním řetězci SB-T-1103 | <u>93.9±2.5^a</u> | <u>101.7±1.4^a</u> | <u>26.3±0.1^a</u> | <u>46.2±3.4^a</u> | <u>19.7±0.1^a</u> | | |
| M9 | 10.0 | 48 | 859 | Oxiace na taxanovém kruhu, přesná poloha neurčena | 6.8±0.0 | - | - | 1.1±0.1 | 3.5±0.1 | | |
| M10 | 13.6 | 66 | - | NA | 2.1±0.1 | - | - | - | - | | |
| M11 | 14.5 | 68 | - | NA | 2.8±0.2 | - | 2.5±0.0 | 7.3±0.0 | 2.1±0.3 | | |

^aHlavní metabolit, ^b t_R = retenční čas (min), ^cstruktury metabolitů jsou znázorněny v metabolickém schématu na obr.8A

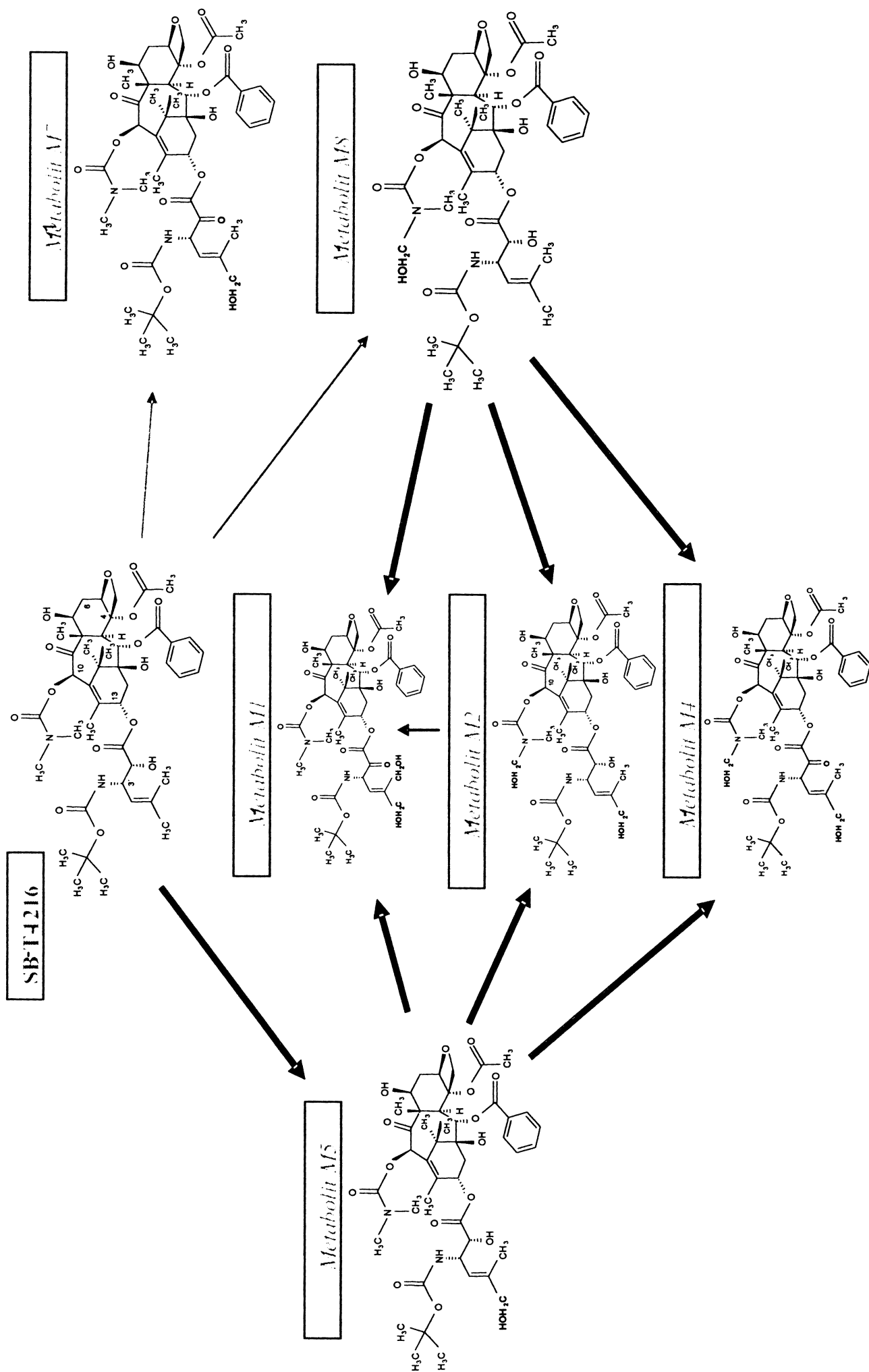


Obr.8B: Strukturální schéma *in vitro* metabolických přeměn syntetického taxanového analogu SB-T-1214.

Tabulka 13: Metabolity SB-T-1214 (MW 853.95) v jaterních mikrosomech různých živočišných druhů. Rychlost tvorby metabolitů je vyjádřena v pmol/mg proteinu/min. Uvedená data jsou průměrné hodnoty ± SD (n = 3).

| Metabolit | | | Charakteristika metabolitu | | | Tvorba a množství metabolitů v jaterních mikrosomech | | | | | |
|---------------|-----------------|------|--|--|----------------------------------|--|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|--|--|
| t_R^b , min | t_R^b , % SBT | MM | Popis metabolitů ^c NA = nevýznamné metabolity neanalyzované MS | Potkaní mikrosomy | PCN-indukované mikrosomy potkana | Prasečí mikrosomy | Miniprasečí mikrosomy | Lidské mikrosomy | | | |
| M1 | 3.6 | 25 | 883 | Aldehyd vzniklý dihydroxylací na 2-methylpropanu v poloze C3' na C13 postranním řetězci SB-T-1214 s dvojnou vazbou kyslíku v C2' poloze Pík M1 obsahuje jako kontaminant další velmi minoritní metabolit hydroxylovaný na taxanovém kruhu (M10) | 32.0±2.7 | <u>352.2±4.4^a</u> | 1.7±0.4 | 2.6±0.6 | 8.2±1.6 | | |
| M2 | 4.5 | 30 | 883 | Isomer metabolitu M1 | - | 6.7±0.6 | 6.0±2.2 | 7.7±2.5 | - | | |
| M3 | 5.0 | 34 | 885 | Dihydroxylace na 2-methylpropanu v poloze C3' na C13 postranním řetězci SB-T-1214 | - | 11.5±0.1 | - | - | - | | |
| M4 | 5.4 | 36.5 | - | NA | 1.1±0.3 | 1.2±0.1 | - | - | - | | |
| M5 | 5.7 | 40 | - | NA | 1.6±0.1 | - | - | - | - | | |
| M6 | 6.3 | 43 | 883 | hydroxylace 2-methylpropanu v poloze C3' na C13 postranním řetězci SB-T-1214 s dvojnou vazbou kyslíku v C2' poloze + hydroxylace na taxanovém kruhu, poloha neurčena | - | 12.6±0.3 | - | - | - | | |
| M7 | 6.7 | 45 | - | NA | - | - | 4.1±0.7 | 5.6±0.4 | 3.7±0.7 | | |
| M8 | 7.7 | 52 | 869 | hydroxylace 2-methylpropanu v poloze C3' na C13 postranním řetězci SB-T-1214 | <u>256.0±8.5^a</u> | 57.4±2.8 | <u>44.7±0.9^a</u> | <u>82.9±3.5^a</u> | <u>224.1±11.5^a</u> | | |
| M9 | 9.5 | 63.5 | 867 | hydroxylace 2-methylpropanu v poloze C3' na C13 postranním řetězci SB-T-1214 s dvojnou vazbou kyslíku v C2' poloze | 40.1±3.0 | 77.9±1.1 | 0.5±0.3 | 1.9±0.1 | 20.6±0.8 | | |

^aHlavní metabolit, ^b t_R = retenční čas (min), ^cstruktury metabolitů jsou znázorněny v metabolickém schématu na obr.8B



Obr.8C: Strukturí schéma *in vitro* metabolických přeměn syntetického taxanového analogu SB-T-1216.

Tabulka 14: Metabolity SB-T-1216 (MW 857) v jaterních mikrosomech různých živočišných druhů. Rychlost tvorby metabolitů je vyjádřena v pmol/mg proteinu/min. Uvedená data jsou průměrné hodnoty ± SD (n = 3).

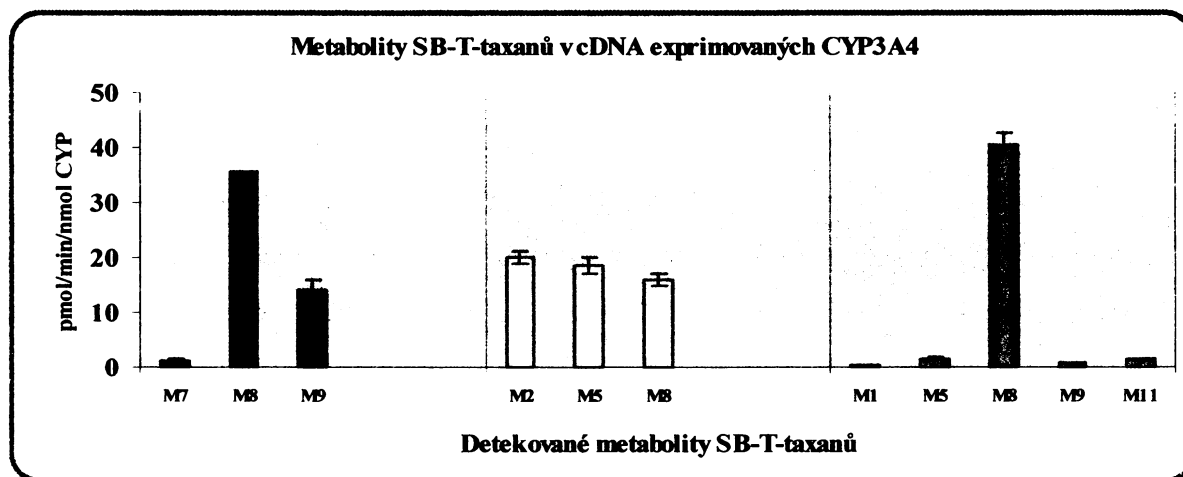
| Metabolit | Charakteristika metabolitu | | | Tvorba a množství metabolitů v jaterních mikrosomech | | | | | | | |
|-----------|----------------------------|-----------------|-----|---|------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|--|
| | t_R^b , min | t_R^b , % SBT | MM | Popis metabolitů ^c NA = nevýznamné metabolity neanalyzované MS | Potkání mikrosomy | PCN-indukované mikrosomy potkana | Prasečí mikrosomy | Miniprasečí mikrosomy | Lidské mikrosomy | | |
| M1 | 3.2 | 24 | 903 | Aldehyd vzniklý dihydroxylací na 2-methylpropanu v poloze C3' na C13 postranním řetězci SB-T-1216 s dvojnou vazbou kyslíku v C2' poloze + hydroxylace methylu v dimethylaminoskupině v poloze C-10 na taxanovém kruhu | 20.8±3.9 | <u>142.1±7.7^a</u> | 3.5±0.3 | 2.6±0.1 | 4.9±3.2 | | |
| M2 | 5.1 | 39 | 887 | Hydroxylace 2-methylpropanu v poloze C3' na C13 postranním řetězci SB-T-1216 + hydroxylace methylu v dimethylaminoskupině v poloze C-10 na taxanovém kruhu | 59.4±2.3 | 6.2±0.1 | 0.8±0.2 | 1.9±0.4 | 7.5±0.4 | | |
| M3 | 5.35 | 41 | - | NA | - | 2.6±0.4 | - | - | - | | |
| M4 | 6.15 | 48 | 885 | Hydroxylace na 2-methylpropanu v poloze C3' na C13 postranním řetězci SB-T-1216 s dvojnou vazbou kyslíku v C2' poloze + hydroxylace methylu v dimethylaminoskupině v poloze C-10 na taxanovém kruhu | - | 55.0±0.6 | - | - | - | | |
| M5 | 6.7 | 51 | 872 | Hydroxylace 2-methylpropanu v poloze C3' na C13 postranním řetězci SB-T-1216. | <u>166.3±1.7^a</u> | - | 22.4±0.7 | 26.9±0.3 | <u>64.8±1.7^a</u> | | |
| M6 | 7.5 | 58 | - | NA | - | 19.0±0.8 | - | - | - | | |
| M7 | 8.25 | 64 | 870 | Hydroxylace na 2-methylpropanu v poloze C3' na C13 postranním řetězci SB-T-1216 s dvojnou vazbou kyslíku v C2' poloze. | 39.7±2.0 | 4.1±0.4 | - | 0.8±0.1 | 6.4±0.9 | | |
| M8 | 9.8 | 76 | 872 | hydroxylace methylu v dimethylaminoskupině v poloze C-10 na taxanovém kruhu | 43.4±1.0 | - | <u>68.0±1.8^a</u> | <u>83.7±0.8^a</u> | 20.2±1.4 | | |

^aHlavní metabolit, ^b t_R = retenční čas (min), ^cstruktury metabolitů jsou znázorněny v metabolickém schématu na obr.8C

Jak je z tabulek č.12-14 patrné, metabolický profil všech tří nových taxanů se lišil od ostatních druhů v PCN-indukovaných mikrosomech potkana. Díky zvýšenému množství a aktivitě CYP3A1/2 ve zmíněných potkaních mikrosomech zde vůbec nevznikaly některé minoritní metabolity a na druhé straně obvyklé majoritní metabolity byly v těchto mikrosomech dále oxidovány. Tyto výsledky svědčí o roli CYP3A podrodiny v metabolismu SB-T-1103, SB-T-1214 a SB-T-1216.

V sérii cDNA exprimovaných lidských CYP1A2, 1B1, 2A6, 2C9, 2E1 a 3A4 se pouze **CYP3A4** účastnil metabolismu nových taxanů (obr.9). Těmito experimenty bylo potvrzeno, že CYP3A4 je významným cytochromem P450 podílejícím se na metabolické přeměně taxanových analogů SB-T-1103, SB-T-1214 a SB-T-1216.

Obr. 9: Tvorba metabolitů SB-T-taxanů cDNA exprimovaným CYP3A4. Výsledky jsou uvedeny jako průměrné hodnoty \pm SD ($n = 3$).



4.1.4. Enzymatická kinetika metabolismu klasických a nových taxanů *in vitro*

Ze sledované přeměny paclitaxelu a docetaxelu byla odhadnuta afinita taxanů k cytochromu P450 stanovením K_m a také určením maximální rychlosti enzymové reakce V_{max} pro hlavní metabolické přeměny paclitaxelu a docetaxelu v jaterních mikrosomálních frakcích potkana, prasete, miniprasete a člověka (Tabulka 15). K_m a V_{max} byly určeny z odpovídajících Lineweaver-Burkových výnosů závislosti převrácených hodnot rychlosti tvorby metabolitů na převrácených hodnotách koncentrace taxanu.

Tabulka 15: Kinetické konstanty majoritních oxidačních reakcí v jaterních mikrosomech člověka, potkana, prasete a miniprasete. Koncentrace paclitaxelu 2.5 – 25 μ M, docetaxelu 2.0 – 25 μ M. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrné hodnoty \pm SD ($n \geq 2$).

| Mikrosomy | Oxidační reakce | CYP ^a | K _m (μM) | V _{max} (pmol/min/mg proteinu) | V _{max} /K _m |
|------------------------|----------------------------|------------------|---------------------|---|----------------------------------|
| PACLITAXEL | | | | | |
| Potkaní | C3'-hydroxylace | CYP3A1/2 | 16.1± 2.4 | 19.7± 11.7 | 1.2 |
| Potkaní PCN-indukované | C3'-hydroxylace | CYP3A1/2 | 24.5± 4.3 | 184.5± 11.1 | 7.5 |
| Miniprasečí | Hydroxylace neznámá poloha | CYP3A29 | 15.0± 2.0 | 29.0 ± 4.0 | 1.9 |
| Prasečí | Hydroxylace neznámá poloha | CYP3A29 | 17.0± 3.0 | 14.0 ± 3.0 | 0.8 |
| Lidské | 6α-hydroxylace | CYP2C8 | 9.3±4.7 | 60.9± 39.7 | 6.5 |
| DOCETAXEL ^b | | | | | |
| Potkaní | Hydroxylace docetaxelu | CYP3A1/2 | 5.6 | 52 | 9.1 |
| Miniprasečí | Hydroxylace docetaxelu | CYP3A29 | 8.1 | 23 | 2.9 |
| Prasečí | Hydroxylace docetaxelu | CYP3A29 | 5.1 | 21 | 4.0 |
| Lidské | Hydroxylace docetaxelu | CYP3A3/4 | 5.4 | 17.4 | 3.2 |

^aCytochromy P450 odpovědné za oxidační reakci, ^bVýsledky jsou vyjádřeny jako průměry dvou nezávislých duplicitních měření

Pro všechny tři nové taxanové analogy SB-T-1103, SB-T-1214 a SB-T-1216 byly stanoveny kinetické parametry v lidských jaterních mikrosomálních frakcích. Kinetické parametry byly určeny metodou nelineární regrese s využitím programu GraphPad Prism verze 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) a porovnány s klasicky určenými konstantami K_m a V_{max} z lineárních transformací (*Tabulka 16*). Výsledky ukazují dobrou shodu stanovených parametrů, ale parametry stanovené lineární regresí jsou zatíženy větší chybou, protože v Lineweaver-Burkově transformaci dat má největší význam oblast nejnižších koncentrací a tak nepřesnosti vyskytující se v nízkých koncentracích mohou značně ovlivnit konečné hodnoty kinetických konstant. Proto se také v současnosti od použití těchto transformací ustupuje a do popředí se dostávají metody stanovení kinetických parametrů nelineární regresí s využitím moderních počítačových softwarů.

Tabulka 16: Kinetické konstanty majoritních oxidačních reakcí SB-T-taxanů v lidských jaterních mikrosomech. Koncentrace nových taxanů 2.5 – 50 μM. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměry dvou nezávislých měření.

| Taxan | Oxidační reakce | CYP | K _m (μM) | | V _{max} (pmol/min/mg proteinu) | | V _{max} /K _m | |
|-----------|----------------------|--------|---------------------|--------------|---|--------------|----------------------------------|--------------|
| | | | Nelin. regrese | Lin. regrese | Nelin. regrese | Lin. regrese | Nelin. regrese | Lin. regrese |
| SB-T-1103 | Tvorba metabolitu M8 | CYP3A4 | 7.71 | 12.15 | 36.36 | 54.55 | 4.72 | 4.49 |
| SB-T-1214 | Tvorba metabolitu M8 | CYP3A4 | 7.11 | 10.12 | 85.62 | 105.14 | 12.04 | 10.39 |
| SB-T-1216 | Tvorba metabolitu M5 | CYP3A4 | 22.85 | 26.90 | 165.20 | 178.57 | 7.23 | 6.64 |

4.2 Vliv fenolických antioxidantů na metabolismus klasických taxanů

4.2.1. Vliv fenolických antioxidantů na metabolismus paclitaxelu v lidských a potkaních jaterních mikrosomech

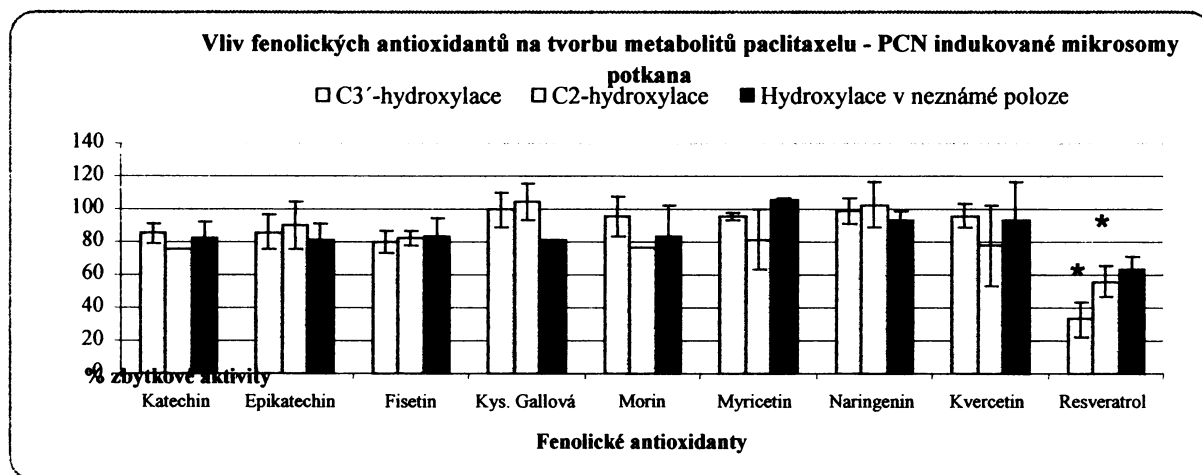
Metabolická přeměna paclitaxelu v živém organismu vede k inaktivaci tohoto léčiva.^[47,81] Proto jsou hledány inhibitory metabolismu paclitaxelu, které by snižovaly tvorbu inaktivních metabolitů a tím zvyšovaly cytotoxické působení paclitaxelu. V předkládané práci byl studován vliv devíti fenolických antioxidantů (**fisetin, katechin, epikatechin, kvercetin, kys. gallová, morin, myricetin, naringenin a resveratrol**) na tvorbu metabolitů paclitaxelu v jaterních mikrosomech potkana indukovaných PCN a v lidských jaterních mikrosomech. Jednotlivé fenolické antioxidanty byly přidávány do inkubačních směsí a pomocí HPLC bylo sledováno, zda ovlivňují tvorbu metabolitů paclitaxelu. Mezi jednotlivými sledovanými antioxidanty byly nalezeny značné rozdíly v jejich působení na metabolismus paclitaxelu v lidských a potkaních jaterních mikrosomech. **V potkaních mikrosomech**, kde se účastní metabolismu paclitaxelu pouze CYP3A1/2 podrodina, byl významným inhibitorem metabolismu paclitaxelu **resveratrol**. **Fisetin** také účinně inhiboval tvorbu metabolitů ovšem až ve vyšších a farmakologicky obtížně dosažitelných hladinách (*obr. 10A*).

V lidských jaterních mikrosomech katalyzují tvorbu metabolitů dva cytochromy P450; CYP3A4 a CYP2C8. Právě CYP2C8 je zde důležitý, protože se podílí na hlavní metabolické cestě paclitaxelu 6 α -hydroxylaci. V literatuře byly nalezeny údaje o působení fenolických antioxidantů na aktivitu tohoto lidského enzymu^[85,137] a také v této práci byl zjištěn silný účinek některých fenolických antioxidantů na aktivitu CYP2C8. **Fisetin, morin, kvercetin a resveratrol** byly účinnými **inhibitory tvorby 6 α -hydroxypaclitaxelu** katalyzované právě CYP2C8. Mírným inhibitorem byl naringenin. **Tvorbu C3'-hydroxypaclitaxelu**, který je druhým lidským hlavním metabolitem, jehož vzniku se účastní CYP3A4, **inhiboval resveratrol následovaný morinem** (*obr. 10B*). Fisetin opět účinkoval až ve vyšší 40 μ M koncentraci.

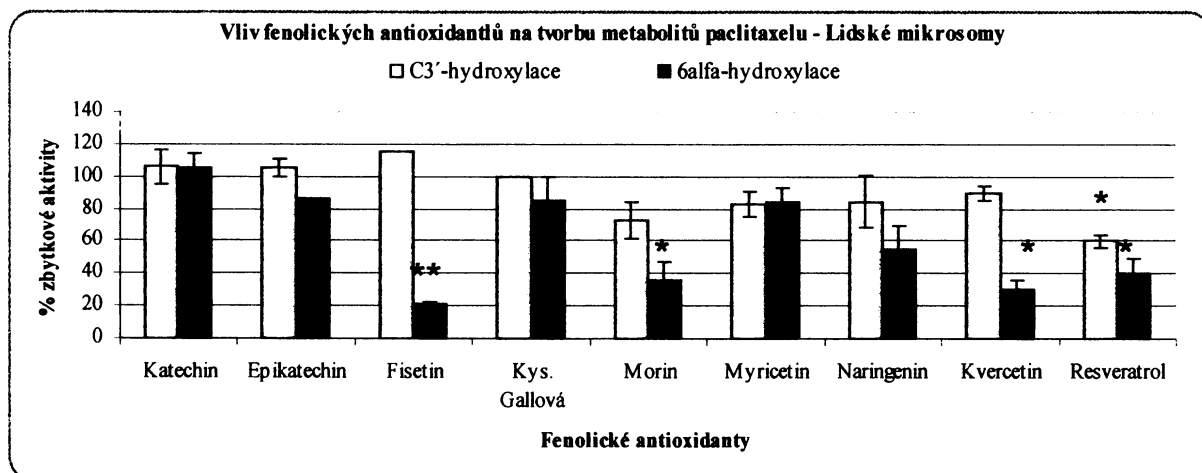
Účinné fenolické antioxidanty byly charakterizovány stanovením IC_{50} z poklesu tvorby metabolitů paclitaxelu při rostoucí koncentraci inhibitoru, dále byla určena **inhibiční konstanta (K_i) a typ inhibice** (Tabulka 17).

Obr.10: Vliv fenolických antioxidantů na tvorbu metabolitů paclitaxelu v PCN indukovaných mikrosomech potkana (A) a v lidských jaterních mikrosomech (B). Konc. paclitaxelu 10 μ M, konc. fenolických antioxidantů 30 μ M. Data jsou vyjádřena jako průměrné hodnoty \pm SD ($n \geq 2$). Jako statisticky významné jsou dle oboustranného Studentova t testu hodnoceny výsledky s hodnotami * $p < 0.05$ a ** $p < 0.01$.

A



B



Uvedené výsledky ukazují silné inhibiční účinky některých fenolických antioxidantů na metabolismus paclitaxelu zejména na tvorbu jeho hlavního metabolitu v lidském organismu 6 α -hydroxypaclitaxelu. Zvláště v případě fisetinu silně inhibujícího aktivitu lidského CYP2C8 jde o dříve neuveřejněné působení fisetinu, které může mít velký význam z hlediska možného ovlivnění metabolismu substrátů tohoto důležitého lidského cytochromu P450. Účinky fenolických antioxidantů na metabolismus paclitaxelu je třeba v budoucnu ověřit ve studiích *in vivo*. V případě potvrzení nalezených *in vitro* aktivit fenolických antioxidantů, by mohly být tyto látky podávány současně s paclitaxelem a vést k potenciaci jeho účinků zamezením ztráty biologické účinnosti paclitaxelu způsobené jeho metabolickou inaktivací.

Tabulka 17: Charakteristiky inhibice metabolismu paclitaxelu fenolickými antioxidanty v lidských a v potkaních PCN-indukovaných jaterních mikrosomech. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměrné hodnoty \pm SD ($n \geq 2$). Použité koncentrace fenolických antioxidantů; 0 – 40 μ M, paclitaxelu 0 – 15 μ M.

| Inhibitor | Mikrosomy | Inhibovaná reakce paclitaxelu | Typ inhibice | IC ₅₀ (μ M) | K _i (μ M) |
|--------------------|------------------------|-------------------------------|----------------------|-----------------------------|---------------------------|
| Fisetin | Lidské | 6 α -hydroxylace | Smíšený | 10.8 \pm 2.2 | 1.3 – 6.0 |
| Morin | Lidské | 6 α -hydroxylace | Smíšený | 17.3 \pm 2.4 | 7.3 – 12.3 |
| Kvercetin | Lidské | 6 α -hydroxylace | Smíšený | 15.9 \pm 1.3 | 4.0 – 13.0 |
| | | C3'-hydroxylace | Smíšený | 18.7 \pm 2.8 | 12.2 – 16.3 |
| Resveratrol | Potkaní PCN-indukované | C2-hydroxylace | Nekompetitivní | 26.3 \pm 6.5 | |
| | | Hydroxylace, neznámá poloha | Smíšený | 27.2 \pm 2.1 | 9.8 – 15.7 |
| | Lidské | 6 α -hydroxylace | Smíšený ^a | 26.5 \pm 2.0 | 16.5 – 20.7 |
| | | C3'-hydroxylace | | 28.5 \pm 4.6 | ^a |

^a Vzhledem k slabé inhibici nebyly K_i a typ inhibice určovány

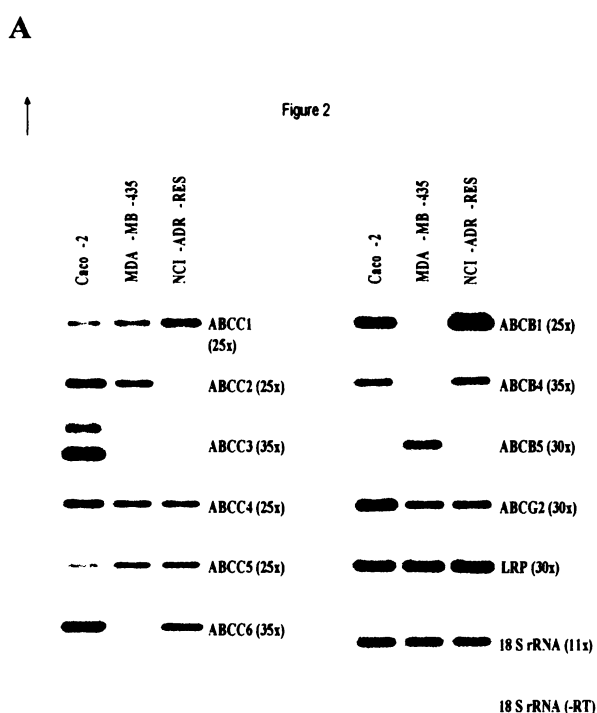
4.2.2. Vliv fenolických antioxidantů na metabolismus docetaxelu v lidských jaterních mikrosomech

Byl sledován vliv dvou přírodních fenolických antioxidantů na metabolismus docetaxelu a to **kvercetin** a **resveratrol** v lidských jaterních mikrosomech. Vzhledem k tomu, že docetaxel nevykazuje mezidruhové rozdíly metabolismu (Příloha č.III), byl rovněž vliv fenolických antioxidantů sledován pouze v lidských jaterních mikrosomech. Resveratrol byl vybrán na základě jeho výše uvedeného působení na aktivitu CYP3A4, který se účastní metabolismu docetaxelu. Kvercetin byl pak vybrán na základě jeho významu jako fenolického antioxidantu nejběžněji se vyskytujícího jako složka lidské stravy. Resveratrol účinně inhibující tvorbu C3'-hydroxypaclitaxelu metabolismus docetaxelu neovlivňoval, což naznačuje jeho velkou selektivitu vůči jednotlivým substrátům lidského CYP3A4, protože i strukturně velmi podobné látky jako jsou paclitaxel a docetaxel jsou resveratrolem po metabolické stránce odlišně ovlivňovány. Kvercetin inhiboval pouze tvorbu hlavního lidského metabolitu docetaxelu **hydroxydocetaxelu** a to až ve 30 μ M koncentraci. Ani v této koncentraci ale nedosahoval 50% inhibice. Docházelo k inhibici tvorby hydroxydocetaxelu pouze ze 41%. Sledované fenolické antioxidanty účinně inhibují zejména tvorbu lidského CYP2C8 (viz. výše), zatímco aktivita lidského CYP3A4 je ovlivňována mnohem méně, jak je potvrzeno touto studií působení resveratrolu a kvercetin na metabolismus docetaxelu v lidských jaterních mikrosomech.

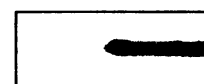
4.3. Studium transportu taxanů v lidských buněčných liniích rakoviny prsu

V úvodní části bylo zmíněno, že častým problémem úspěšnosti terapie taxany je rozvoj **mnohočetné lékové resistance nádorů (multidrug resistance, MDR)**. V této studii byl sledován transport klasických a nových taxanů lidskou sensitivní buněčnou linií rakoviny prsu (MDA-MB-435) a linií resistantní vůči adriamycinu (NCI/ADR-RES). Tyto buněčné linie se liší expresí některých ABC transportních membránových proteinů zejména P-gp, který hraje významnou roli v transportu antracyklinů, taxanů a dalších xenobiotik. Proto se dalo očekávat, že použitá buněčná linie bude resistantní kromě adriamycinu také vůči taxanům. Rozdílná **exprese 11 ABC transportérů na úrovni mRNA** byla sledována metodou semikvantitativní RT-PCR v Laboratoři regulace buněčného růstu (ÚMG AV ČR, Praha-Krč).

Hlavní rozdíl byl nalezen v expresi MDR1 genu kódujícího tvorbu P-gp, který byl exprimován ve vysokých hladinách v resistantních buňkách, zatímco v sensitivních nebyl vůbec detekován. Z dalších ABC transportních proteinů byl nalezen rozdíl v expresi ABCB4 a ABCC6 mRNA, které byly detekovány pouze v resistantních buňkách, naopak ABCB5 a ABCC2 mRNA byly exprimovány v sensitivních buňkách (*obr.11A*). Produkty těchto genů by rovněž mohly mít vliv na vznik resistance nádorových buněk vůči cytostatikům. Nejvýznamnější rozdíl pozorovaný v expresi MDR1 genu byl potvrzen **imunodetekcí P-gp také na úrovni proteinu** pomocí Western blotu s následnou chemiluminiscenční detekcí P-gp (*obr.11B*).



B MDA-MB-435 NCI/ADR-RES



Obr.11: (A) Expresa mRNA různých ABC transportérů, LRP a kontrolního genu 18S rRNA. Čísla v závorkách znamenají počet cyklů při PCR reakci. (B) Expresa proteinu P-gp chemiluminiscenční detekcí. Expresa byla stanovena v MDA-MB-435 a NCI/ADR-RES buněčných liniích rakoviny prsu. Jako pozitivní kontrola exprese ABC transportérů byly použity lidské střevní buňky adenokarcinomu (CaCo-2).

4.3.1. Cytotoxicita a transport klasických a nových taxanů v sensitivních a resistantních buněčných liniích rakoviny prsu

Byla sledována *cytotoxicita klasických a nových taxanů v sensitivní (MDA-MB-435) a resistantní (NCI/ADR-RES) buněčné linii rakoviny prsu* určením dávek IC_{50} nutných k dosažení 50% toxického účinku taxanů. Cytotoxicita byla stanovována v Laboratoři regulace buněčného růstu (ÚMG AV ČR, Praha-Krč) Ing. Marií Ehrlichovou. IC_{50} paclitaxelu a docetaxelu byly 1000x a 600x vyšší v resistantních liniích než v sensitivních buněčných liniích. Naopak hodnoty IC_{50} nových taxanů byly srovnatelné v sensitivních liniích s docetaxelem, ovšem v resistantních liniích byly mnohonásobně nižší než v případě obou klasických taxanů (Tabulka 18). Resistentní nádorové buňky jsou tedy mnohem citlivější vůči novým taxanům, což poukazuje na jejich potenciální využití zejména při rozvoji resistance nádorů.

Tabulka 18: Stanovení cytotoxických dávek IC_{50} (nM) klasických a nových taxanů v sensitivní (MDA-MB-435) a resistantní (NCI/ADR-RES) lidské buněčné linii rakoviny prsu. Hodnoty IC_{50} byly stanoveny po 96hod vystavení buněk taxanům nebo samotnému mediu s hovězím sérum albuminem jako kontrolou. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr osmi nezávislých stanovení.

| Taxany | Buněčné linie | | | |
|-----------------|----------------|---|----------------|---|
| | MDA-MB-435 | | NCI/ADR-RES | |
| Klasické taxany | IC_{50} (nM) | Sledovaný koncentrační rozsah taxanu (nM) | IC_{50} (nM) | Sledovaný koncentrační rozsah taxanu (nM) |
| Paclitaxel | 1.0 | 0.1 - 1000 | 1000 | 0.1 - 1000 |
| Docetaxel | 0.5 | 0.1 - 1000 | 300 | 0.1 - 1000 |
| Nové taxany | | | | |
| SB-T-1103 | 0.5 | 0.01 - 10 | 1.0 | 0.03 - 30 |
| SB-T-1214 | 0.3 | 0.003 - 3 | 5.0 | 0.03 - 30 |
| SB-T-1216 | 0.2 | 0.003 - 3 | 3.0 | 0.1 - 100 |

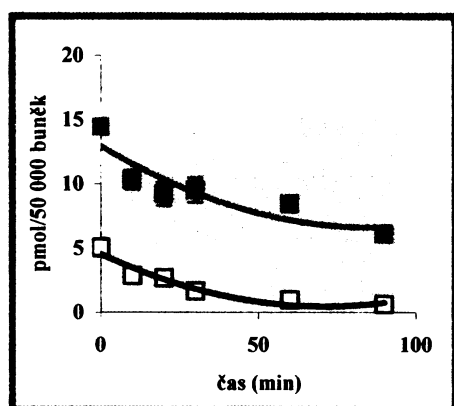
Dále byla sledována akumulace klasických i nových taxanů v obou typech buněčných linií. Paclitaxel byl použit jednak v neradioaktivní formě a jednak jako radioaktivně značená forma [^{14}C]paclitaxel. Akumulace léčiv, která nebyla radioaktivně značena, bylo měřeno po promytí buněk, jejich sklizení a následné extrakci taxanů ethylacetátem pomocí HPLC (viz. kap.3.4). Množství [^{14}C]paclitaxelu akumulovaného buněčnými linemi byla měřeno po inkubaci buněk se [^{14}C]paclitaxelem v promytých a sklizených buňkách metodou kapalně scintilace (viz. kap.3.4). V tabulce 19 jsou uvedena množství akumulovaných léčiv v obou typech sledovaných buněčných liniích. Z výsledků je patrné, že akumulace klasických taxanů se mezi oběma typy buněčných linií výrazně liší.

Resistentní linie absorbuje až 6.8x méně docetaxelu, 3.9x méně paclitaxelu a dokonce 9.7x méně [^{14}C]paclitaxelu. Rozdíl mezi neradioaktivním a radioaktivním paclitaxelem je dán tím, že použití [^{14}C]paclitaxelu umožnilo sledování při nižších koncentracích, kdy je rozdíl mezi sledovanými liniemi větší. Využití radioaktivním forem léčiv pro sledování transportu je velmi citlivé, časově nenáročné a umožňuje jak bylo ukázáno, použití velmi nízkých koncentrací léčiv s velkou přesností. Proto v případech, kde je k dispozici radioaktivně značená forma léčiva, je tato forma přednostně používána ke sledování transportu léčiv. Z tohoto důvodu byla také k dalším studiím týkajících se ovlivnění transportu paclitaxelu používána právě jeho radioaktivně značená forma. Nové taxany jsou na rozdíl od klasických taxanů absorbovány ve zhruba stejné míře resistentními i sensitivními buňkami, což potvrzuje citlivost resistentních nádorových buněk rakoviny prsu NCI/ADR-RES vůči těmto potenciálním léčivům.

Tabulka 19: Porovnání množství taxanů absorbovaných sensitivními (MDA-MB-435) a resistentními (NCI/ADR-RES) buňkami rakoviny prsu po 60, 120 a 240min inkubaci. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr a odchylka dvou nezávislých měření.

| Taxan | Koncentrace (μM) | % absorbovaného léčiva v MDA-MB-435/ NCI/ADR-RES buňkách | | |
|-------------------------------|----------------------------------|---|------------------------------|------------------------------------|
| | | 60 min inkubace | 120 min inkubace | 240 min inkubace |
| Paclitaxel | 1 | 6.3 \pm 0.8/1.6 \pm 0.2 | 5.7 \pm 1.1/1.6 \pm 0.2 | 4.5 \pm 0.3/1.6 \pm 0.1 |
| [^{14}C]paclitaxel | 0.1 | 9.3 \pm 0.4/1.9 \pm 0.1 | 14.4 \pm 3.5/2.2 \pm 0.1 | 18.4 \pm 1.1 \pm 1.9 \pm 0.1 |
| Docetaxel | 1 | 5.6 \pm 0.1/1.4 \pm 1.4 | 5.4 \pm 0.7/0.8 \pm 0.1 | - |
| SB-T-1103 | 1 | 4.0 \pm 0.1/6.1 \pm 0.5 | 5.2 \pm 1.3/6.7 \pm 0.6 | - |
| SB-T-1214 | 1 | 5.7 \pm 0.1/6.2 \pm 0.1 | 4.0 \pm 0.2/5.5 \pm 0.1 | - |
| SB-T-1216 | 1 | 7.6 \pm 0.1/4.5 \pm 0.2 | 6.1 \pm 0.4/2.8 \pm 0.4 | - |

V sensitivních i resistentních buňkách rakoviny prsu byl sledován rovněž vylučování [^{14}C]paclitaxelu po jeho předcházejícím 120min akumulaci v buňkách. Z resistentních



MDA-MB-435 buňky
□ NCI/ADR-RES buňky

NCI/ADR-RES buněk byl [^{14}C]paclitaxel vylučován z 50% již po 25min, zatímco ze sensitivních MDA-MB-435 buněk až po 90min (obr.12).

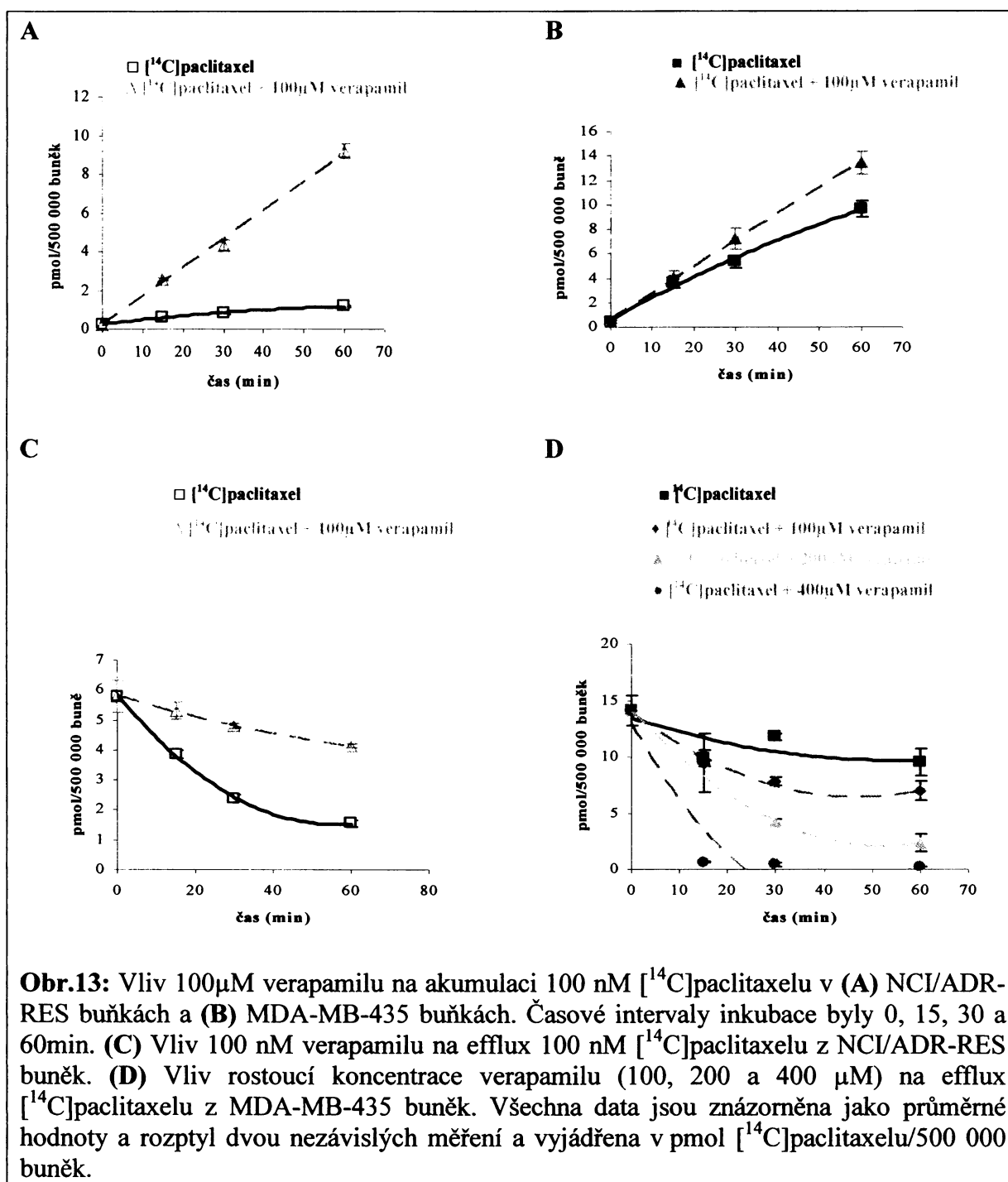
Obr.12: Vylučování [^{14}C]paclitaxelu z NCI/ADR-RES a MDA-MB-435 buněk měřený v intervalech 10, 20, 30, 60 a 90min po předcházející 120min akumulaci a při 200nM koncentraci [^{14}C]paclitaxelu. Data jsou prezentována jako průměrné hodnoty a rozptyl ze dvou nezávislých měření a vyjádřena v pmol [^{14}C]paclitaxelu/500000 buněk.

Se studiem transportu souvisí rovněž studium mechanismu působení taxanů po jejich vstupu do intracelulárního prostoru. O taxanech je velmi dobře známo, jakým mechanismem účinku působí na systém buněčných mikrotubulů.^[9,63,113,131] Kromě toho taxany také vedou k indukci apoptosy zřejmě přes aktivaci Bcl-2 genu, ovšem jaké buněčné procesy probíhají při indukci programované smrti buňky působením taxanů není zcela známo. Proto byly kromě transportu taxanů sledovány také buněčné procesy indukce apoptosy vyvolané působením taxanů a případné rozdíly v působení taxanů mezi sensitivními a resistantními buněčnými liniemi rakoviny prsu. Byla sledována řada buněčných charakteristik typických pro *průběh apoptosy* jako *vyplavování cytochromu c z mitochondrií, aktivita kaspas-3 a 9, změna exprese proteinů p53 a p21 a fragmentace DNA*. Vyplavování cytochromu c z mitochondrií po původním působení proapoptotických faktorů vede k aktivaci kaspasy-9. Kaspasy-9 se za účasti dalších kaspas podílí na aktivaci kaspasy-3, která vstupuje do buněčného jádra. Dochází k aktivaci DNAas, fragmentaci DNA a apoptose.^[157, Příloha č.VIII] Kromě této mitochondriální indukce apoptosy se na aktivaci buněčné smrti podílí i tumor supresorový protein p53, které po aktivaci, způsobené např. působením chemoterapeutik spouští řadu buněčných drah a procesů vedoucích k apoptose. K inhibici buněčného cyklu dochází po stimulaci exprese p21 účinkem aktivovaného p53.^[158] Studie mechanismu induce apoptosy působením taxanů v sensitivních (MDA-MB-435) a resistantních (NCI/ADR-RES) lidských buňkách rakoviny prsu byly prováděny v Laboratoři regulace buněčného růstu (ÚMG AV ČR, Praha – Krč), kde mají dlouholeté zkušenosti se studiem buněčné apoptosy a jejích mechanismů. Detailní popis použitých metod pro studium apoptosy i souhrn všech dosažených výsledků je obsahem *Přílohy č.VIII*. Hlavními výsledky bylo zjištění, že taxany svým působením uvnitř buněk aktivují kaspasy-9 a -3, což je pro apoptosu typické, ovšem není pozorována oligonukleosomální fragmentace DNA a navíc se liší mechanismus indukce buněčné smrti u sensitivní a resistantní buněčné linie. Zatímco resistantní buňky vyplavují cytochrom c z mitochondrií klasickým způsobem, v sensitivních liniích zůstává cytochrom c v mitochondriích, což je důkazem odlišného mechanismu indukce buněčné smrti vyvolané taxany v těchto typech nádorových buněk. Hladiny p53 a p21 se působením taxanů nemění v sensitivních ani resistantních buňkách a nejsou tedy taxany nijak ovlivňovány. Studium mechanismu indukce smrti působením taxanů a rozdíly působení taxanů v resistantní a sensitivní buněčné linii vyžadují další podrobné studium. Stejným způsobem je žádoucí sledovat mechanismus indukce apoptosy

vyvolané novými taxanovými analogy, které se mohou díky odlišné struktuře a transportu podílet na indukcii programované smrti buňky jiným způsobem než klasické taxany.

4.3.2. Vliv Verapamilu a nových taxanů na transport [¹⁴C]paclitaxelu v lidských buněčných liniích rakoviny prsu

Pro potvrzení významu P-gp v transportu taxanů, byl sledován vliv specifického inhibitoru P-gp první generace verapamilu na transport radioaktivně značeného [¹⁴C]paclitaxelu v sensitivních MDA-MB-435 i resistantních NCI/ADR-RES buňkách rakoviny prsu. Verapamil je známým inhibitorem transportní funkce P-gp používaným v klinické praxi.^[70,108] V této studii byl přidáván do roztoků [¹⁴C]paclitaxelu a media přidávaných k buňkám a transport byl sledován za podmínek popsaných v kap.3.4. Přítomnost 100μM Verapamilu zvyšovala intracelulární koncentraci [¹⁴C]paclitaxelu v NCI/ADR-RES buněčné linii s vysokou expresí P-gp až 8x a vyrovnávala tak intracelulární hladiny [¹⁴C]paclitaxelu detekované v sensitivních MDA-MB-435 buňkách, kde se přítomnost verapamilu výrazně neprojevila, docházelo k nárůstu akumulace [¹⁴C]paclitaxelu pouze 1.4x oproti vzorkům bez verapamilu (*obr.13A-B*). Jak se dalo očekávat, 100μM verapamil rovněž inhiboval efflux [¹⁴C]paclitaxelu z resistantních NCI/ADR-RES buněk (*obr.13C*). Naproti tomu, vylučování [¹⁴C]paclitaxelu ze sensitivních MDA-MB-435 buněk inhibováno nebylo, ba naopak vlivem verapamilu docházelo ke stimulaci vylučování [¹⁴C]paclitaxelu z těchto buněk a to v závislosti na vzrůstající koncentraci verapamilu (*obr.13D*). Nalezené výsledky ukazují, že verapamil je účinným inhibitorem resistance vůči paclitaxelu v prsních nádorových buňkách, ale v sensitivních buňkách nádorů může naopak zvyšovat vylučování paclitaxelu a tím právě v tomto typu buněk snižovat účinek paclitaxelu. Tato data jsou prvním zveřejněným výsledkem rozdílného působení verapamilu na transport paclitaxelu sensitivními a resistantními nádorovými buňkami, které může mít významný vliv na úspěšnost chemoterapie v kombinaci s tímto cytostatikem. Zároveň je nutné brát v úvahu poměrně závažné nežádoucí účinky, které verapamil má a všechna tato kritéria zohlednit v případech terapeutického využití verapamilu v kombinované terapii s cytostatiky.



Obdobně jako verapamil i některé deriváty klasických taxanů účinně modulovaly transportní funkci P-gp (viz. Kap.1.2.6). Proto byla sledována schopnost nových taxanů SB-T-1103, SB-T-1214 a SB-T-1216 modulovat transport [¹⁴C]paclitaxelu v sensitivních i resistantních buňkách rakoviny prsu. Přítomnost nových taxanů ovšem neovlivňovala akumulaci paclitaxelu v resistantních a sensitivních buňkách, SB-T-1214 dokonce snižoval akumulaci [¹⁴C]paclitaxelu v obou typech linií a stimuloval vylučování ze sensitivních buněk, což nasvědčuje, že sledované nové taxany, jež nejsou substráty P-gp nejsou ani

modulátory jeho transportní funkce a nemají pravděpodobně využití v kombinovaném podání s klasickými taxany, či jinými léčivými, které jsou substráty P-gp. Nové taxany nejspíš ztěžují vstup klasických taxanů do buněk. Ovšem silné účinky samotných nových taxanových analogů v resistantních nádorových buňkách je upřednostňují jako potenciální alternativu v terapii resistantních nádorů namísto klasických taxanů.

4.3.3. Vliv fenolických antioxidantů a jejich syntetických derivátů na transport [¹⁴C]paclitaxelu v lidských buněčných liniích rakoviny prsu

V současné době jsou intenzivně sledovány možnosti ovlivnění transportu řady látek prostřednictvím P-gp. Hledají se nejvhodnější **modulátory P-gp**, které by byly ve farmakologických indikacích účinné a zároveň nebyly zatíženy řadou vážných nežádoucích účinků, tak jako modulátory I. generace. V předkládané práci byl sledován vliv 2 přírodních fenolických antioxidantů a 13 syntetických derivátů flavonoidů z hlediska možné modulace transportu [¹⁴C]paclitaxelu v resistantní (NCI/ADR-RES) ale i sensitivní (MDA-MB-435) lidské buněčné linii rakoviny prsu. Z přírodních fenolických antioxidantů byly vybrány dva zástupci; **resveratrol** - úspěšně inhibující metabolismus paclitaxelu *in vitro* (viz.kap.4.2) a **kvercetin**, u kterého byly již popsány účinky na transportní funkci P-gp.^[22,25,118,120] Jako zástupci syntetických fenolických antioxidantů byly vybrány látky, které se váží k cytosolární doméně P-gp a byla u nich nalezena schopnost modulovat P-gp zprostředkovaný transport.^[11,14-16] Šlo o tyto látky;

Deriváty auronu: CB-284 (4'-bromo-4,6-dimethoxyauron), CB-285 (4'-chloro-4,6-dimethoxyauron), CB-287 (4,6,3',4',6'-pentamethoxyauron), ND-285 (4'-chloro-4-hydroxy-6-methoxyauron), ML-30 (4'-ethyl-4-hydroxy-6-methoxyauron), ML-50 (4-hydroxy-6-methoxyauron), A-55B (4'-kyano-7-iodo-4-hydroxy-6-methoxyauron)

Deriváty chalkonu: FBB-14 (4-iodo-2',4',6'-trihydroxychalkon)

Deriváty flavonu: CB-436 (4'-bromo-3-methoxy-5,7-dihydroxyflavon)

Deriváty flavonolu: kaempferid (4'-methoxy-3,5,7-trihydroxyflavon), AB-2DE (4'-iodo-3,5,7-trihydroxyflavon)

Deriváty chromonu: MH-11 (5-hydroxy-2-CO-pyrazol-methyl-chromon)

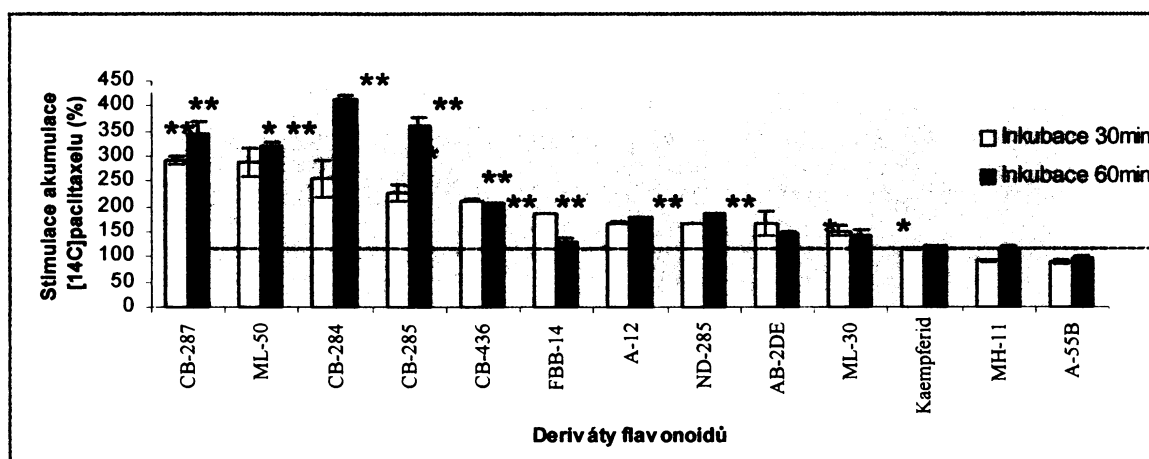
Deriváty azaisoflavonu: A-12 (3-phenyl-5,7-dihydroxy-4-chinolon)

Množství absorbovaného [^{14}C]paclitaxelu v buněčných liniích a jeho vyplavování ze sensitivních i resistantních buněk byly měřeny bez a s přidavkem antioxidantů do inkubačních směsí dle postupů popsaných v kap.3.4.

Přírodní fenolické antioxidanty až do 25 μM koncentrace neměly na transport [^{14}C]paclitaxelu **žádný účinek** v sensitivní ani resistantní buněčné linii. Jejich vliv se projevil až ve vysokých (100 μM) farmakologicky ztížil dosažitelných hladinách. Kvercetin v této koncentraci mírně zvyšoval akumulaci [^{14}C]paclitaxelu v NCI/ADR-RES buňkách i MDA-MB-435 buňkách, resveratrol ani v této vysoké koncentraci v NCI/ADR-RES buňkách nepůsobil, ale v MDA-MB-435 buňkách akumulaci [^{14}C]paclitaxelu z 30% inhiboval pravděpodobně inhibicí aktivního transportu [^{14}C]paclitaxelu dovnitř buněk. Nicméně ve farmakologicky dostupných koncentracích tyto přírodní antioxidanty transportní funkci P-gp nijak neovlivňují a jejich vliv na P-gp v *in vivo* podmínkách je nepravděpodobný.

V sérii syntetických derivátů flavonoidů celkem **šest derivátů silně zvyšovalo akumulaci [^{14}C]paclitaxelu v resistantních NCI/ADR-RES buňkách rakoviny prsu** již po 30 min inkubaci a v 10 μM koncentraci a to v tomto pořadí: CB-287 \geq ML-50 > CB-284 \geq CB-285 > CB-436. Azaisoflavin A-12, chalcon FBB-14, flavonol AB-2DE, auron ND-285 a ML-30 působily mírné zvýšení akumulace, chromon MH-11, auron A-55B a kaempferid akumulaci paclitaxelu v resistantních buňkách neovlivňovaly (*obr. 14*).

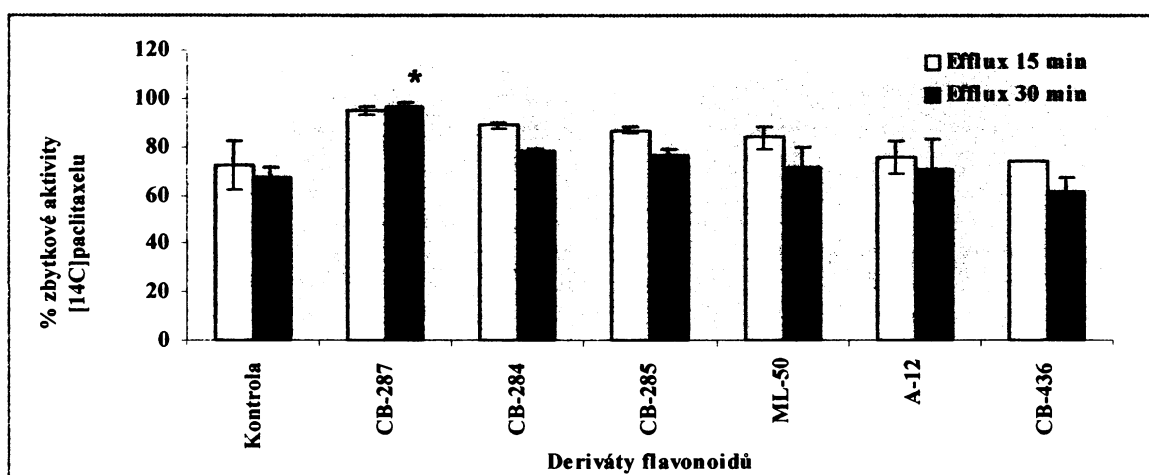
Obr.14: Vliv derivátů flavonoidů na akumulaci [^{14}C]paclitaxelu v NCI/ADR-RES lidských buněčných liniích rakoviny prsu. NCI/ADR-RES byly inkubovány se [^{14}C]paclitaxelem 30 a 60 min v přítomnosti derivátů flavonoidů (10 μM) nebo DMSO (0.1%) jako kontrolou. Data jsou znázorněna jako průměrné hodnoty a rozptyl ($n = 2$) a vyjádřena v procentech stimulované akumulace. Za statisticky významné jsou považovány podle oboustranného Studentova t testu výsledky s hodnotami * $p < 0.05$ a ** $p < 0.01$.



Šest účinných derivátů flavonoidů bylo sledováno z hlediska možné inhibice effluxu [^{14}C]paclitaxelu v *NCI/ADR-RES* resistantní buněčné linii. **Flavonoidy CB-287, CB-284, CB-285 a ML-50 mírně inhibovaly efflux [^{14}C]paclitaxelu**, látky A-12 a CB-436 neměly na efflux žádný vliv (obr.15).

Obr.15:

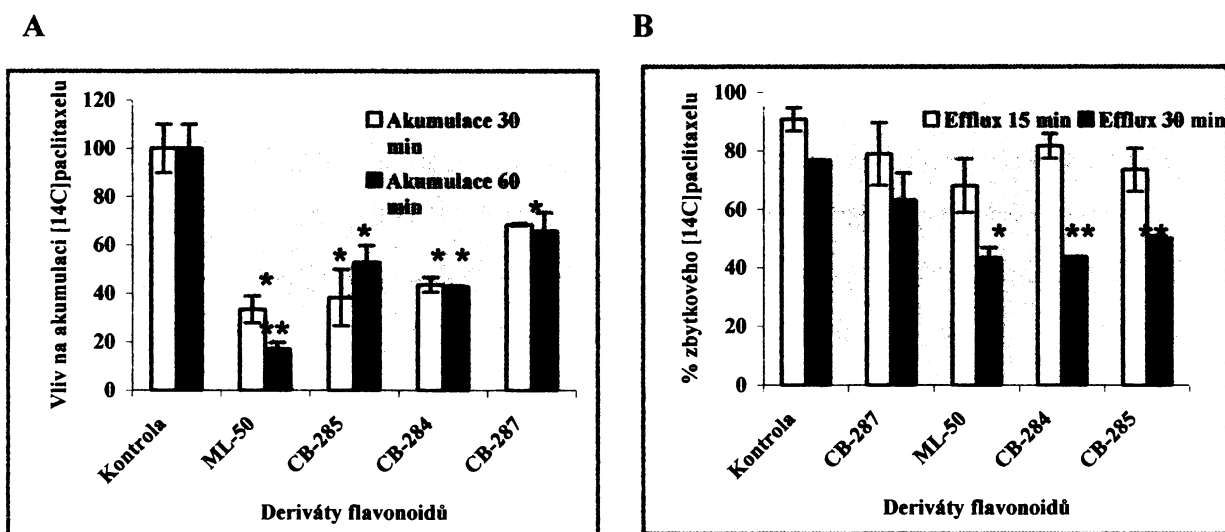
Vliv vybraných syntetických derivátů flavonoidů na efflux [^{14}C]paclitaxelu z *NCI/ADR-RES* buněk. Buňky byly inkubovány se [^{14}C]paclitaxelem 120min a následně byl sledován efflux po 15 a 30min v přítomnosti derivátů flavonoidů (10 μM) nebo DMSO (0.1%) jako kontrolou. Výsledky jsou prezentovány jako průměrné hodnoty a rozptyl ($n = 2$) a vyjádřeny v % zbytkové aktivity [^{14}C]paclitaxelu ve sledovaných intervalech effluxu. Za statisticky významné jsou považovány výsledky s hodnotami rozdílu od 100% akumulace * $p < 0.05$ a *** $p < 0.01$ s využitím Studentova t testu.



Čtyři nejvhodnější modulátory P-gp CB-287, CB-284, CB-285 a ML-50 byly také sledovány z hlediska jejich vlivu na transport [^{14}C]paclitaxelu MDA-MB-435 sensitivními buňkami. Na rozdíl od *NCI/ADR-RES* buněk, zde docházelo ke snížení akumulace [^{14}C]paclitaxelu a naopak stimulaci jeho effluxu těmito látkami, jak je znázorněno na obr.16A-B. Nalezený protichůdný výsledek působení syntetických derivátů flavonoidů může znamenat jejich působení na různé transportní proteiny podílející se na transportu paclitaxelu v obou typech buněčných linií. Zároveň se tak ukazuje, jak velký význam má stanovení exprese genů, zvláště těch, které přispívají k rozvoji resistance, protože určení jejich exprese v nádorových buňkách napomůže ve výběru nejvhodnějších léčiv a použití vhodných modulátorů membránových transportérů podle individuální exprese genů. Rozdílné chování derivátů flavonoidů podporují rovněž výsledky stanovení cytotoxicity samotných derivátů v obou typech buněčných linií. Zatímco v *NCI/ADR-RES* buněčných liniích nepůsobí samy o sobě flavonoidy cytotoxicky, v MDA-MB-435 jsou všechny

s výjimkou ND-285 se signifikancí $p < 0.05$ cytotoxické. Z hlediska chemické struktury jsou všechny účinné deriváty flavonoidů velmi hydrofobní methoxyaurony. Právě tyto látky se zdají být nejvhodnějšími modulátory transportní funkce P-gp s potenciálním využitím při výskytu rezistence nádorových buněk způsobené nadměrnou expresí P-gp.

Obr.16: Vliv derivátů flavonoidů na akumulaci (A) a efflux $[^{14}\text{C}]$ paclitaxelu (B) v MDA-MB-435 lidských sensitivních buněk rakoviny prsu. Buňky byly inkubovány v přítomnosti derivátů flavonoidů ($10\mu\text{M}$) nebo DMSO (0.1%) jako kontrolou. Výsledky jsou prezentovány jako průměrné hodnoty a rozptyl ($n = 2$). Za statisticky významné jsou považovány výsledky s hodnotami rozdílu od kontroly $*p < 0.05$ a $***p < 0.01$ s využitím Studentova t testu.



4.4. *In vivo* účinky klasických taxanů na T-buněčné lymfomy v modelovém organismu potkana

Paclitaxel a docetaxel jsou v terapii využívány především u karcinomů prsu, vaječníků a bronchogenních karcinomů. Vzhledem k jejich unikátnímu mechanismu účinku a silné protinádorové aktivitě jsou ovšem sledovány i další možné aplikace těchto léčiv. V předkládané práci byl sledován účinek taxanů a jejich kombinací na T-buněčné lymfomy v organismu laboratorního Sprague-Dawley/Cub potkana použitého jako zvířecí model tohoto typu hematologických nádorů. T-buněčných lymfomy jsou ve své podstatě maligní expansí klonů atypických T-lymfocytů projevující se jako akutní lymfocytární maligní leukémie.^[104,159] V předkládané studii byly sledovány hladiny taxanů v krvi potkanů, jejich vliv na tělesnou váhu, přežití a dva hlavní parametry nádorů velikost a váhu. Oba sledované klasické taxany mají stejný mechanismus účinku, ale působí každý v jiné fázi buněčného cyklu. Paclitaxel ovlivňuje buňky v G2/M interfázi, zatímco docetaxel působí

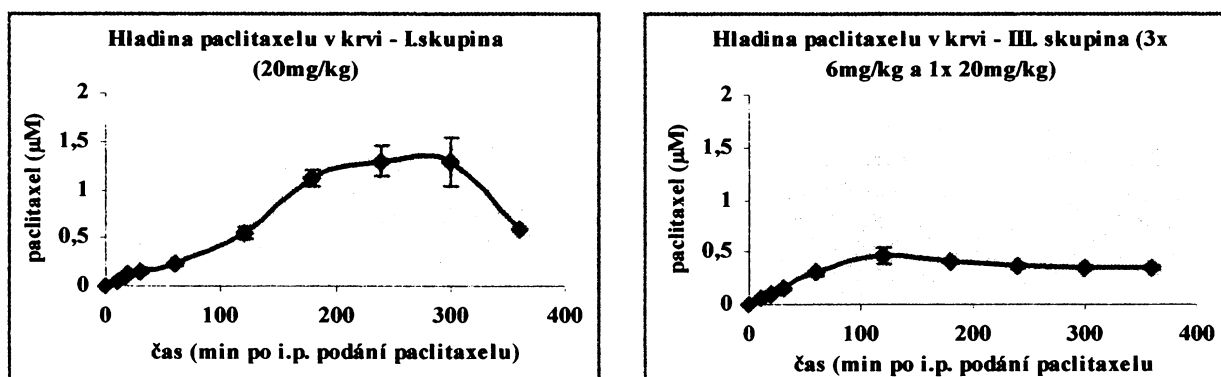
v S fázi.^[29] Na základě tohoto působení v různých fázích buněčného cyklu bylo sledováno, zda je kombinace obou léčiv účinnější na T-buněčné lymfomy než podání jednoho taxanu a tím potenciálně využitelná v protinádorové terapii T-buněčných lymfomů.

4.4.1. Sledování hladiny taxanu a jejich metabolitu v krvi potkanu po i.p. podání v organismu potkana

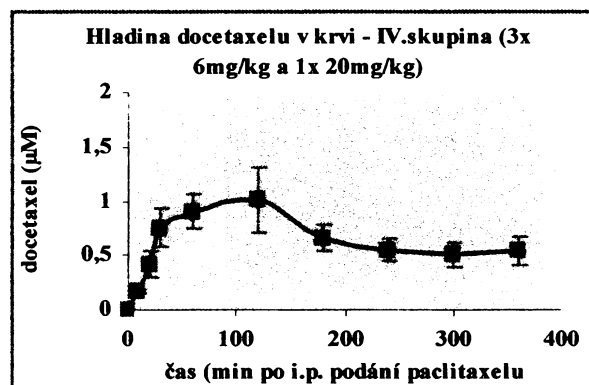
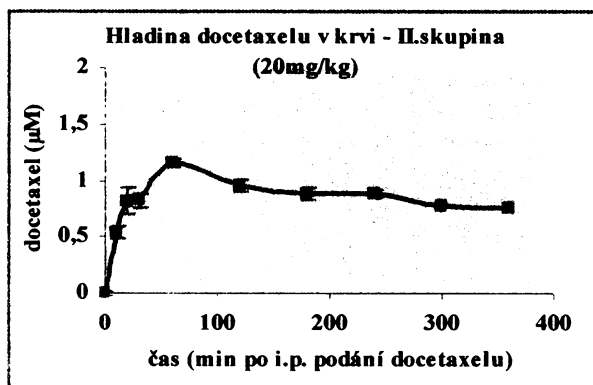
Hladiny paclitaxelu a docetaxelu byly sledovány pomocí HPLC ze vzorků krve (200 μ L) odebraných v časových intervalech 0, 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 300 a 360min po i.p. aplikaci taxanu. Potkani byli rozděleni do čtyř skupin po čtyřech potkanech podle způsobu dávkování taxanů (viz.kap.3.5); I.sk. (i.p. paclitaxel 20mg/kg), II.sk. (i.p. docetaxel 20mg/kg), III.sk. (i.p. paclitaxel 3x týdně 6mg/kg + 1x 20mg/kg) a IV.sk. (i.p. docetaxel 3x týdně 6mg/kg + 1x 20mg/kg). Zjištěné hladiny taxanů v krvi potkanů jednotlivých skupin (μ M) v průběhu času jsou znázorněny na *obr.17A,B*. Ve skupinách I. a II., kde byla použita pouze jedna dávka taxanů byly dosažené hladiny pro paclitaxel i docetaxel podobné a dosahovaly 1.3 μ M koncentrace, ovšem v případě podání docetaxelu bylo takto vysokých hladin dosaženo dříve. Opakované dávkování paclitaxelu (skupina III.) vedlo ke snížení hladin paclitaxelu v krvi potkanů, zatímco opakované dávkování docetaxelu nemělo na jeho dosažené hladiny v krvi vliv. Kromě samotných taxanů byly pomocí HPLC detekovány po i.p. podání paclitaxelu také velmi minoritní píky (plocha 0.1% plochy taxanu) odpovídající třem metabolitům, z nichž dva byly identifikovány HPLC-MS jako C3'-hydroxypaclitaxel a deacetylpaclitaxel. Po i.p. podání docetaxelu byly HPLC detekovány tři hydroxyderiváty docetaxelu vznikající opět ve velmi malých množstvích.

Obr.17: Hladiny paclitaxelu a docetaxelu v krvi podávaných i.p. v různých dávkových schématech čtyřem skupinám potkanů s T-buněčnými lymfomy. **(A)** I.skupina (i.p. paclitaxel 20mg/kg) a III.skupina (i.p. paclitaxel 3x týdně 6mg/kg + 1x 20mg/kg). **(B)** II.skupina (i.p. docetaxel 20mg/kg), a IV.skupina (i.p. docetaxel 3x týdně 6mg/kg + 1x 20mg/kg). Data jsou vyjádřena jako průměrné hodnoty \pm SD ze čtyř nezávislých měření.

A



B



4.4.2. Studium vlivu taxanu a jejich kombinací na rozvoj T-buněčných lymfomu *in vivo* v modelovém organismu potkana

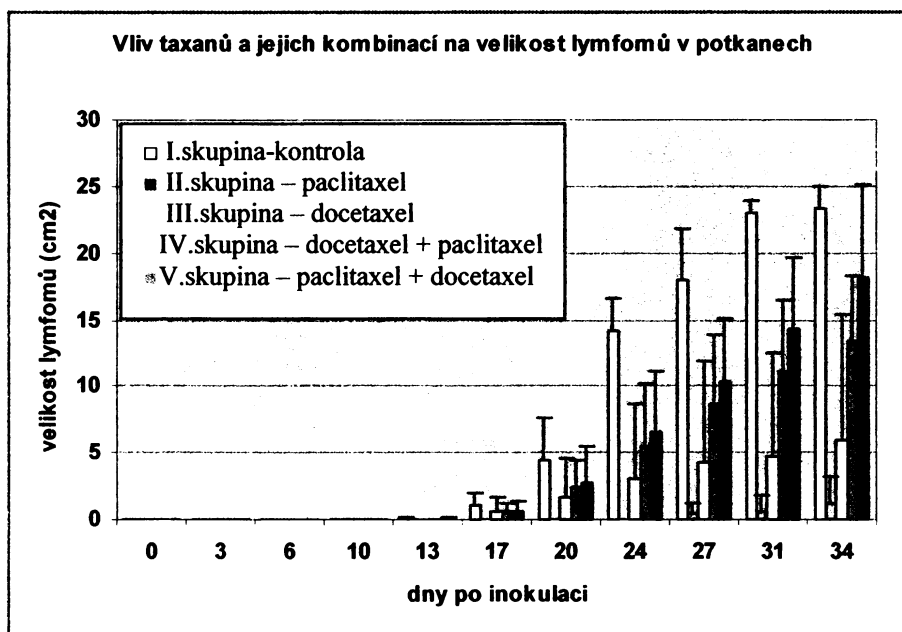
Po i.p. aplikaci taxanů a jejich kombinací v různých dávkových schématech byly sledovány parametry týkající se lymfomů jako je jejich velikost a váha a také byla sledována doba přežití potkanů. Potkani byli rozděleni do pěti skupin po pěti potkanech podle způsobu dávkování taxanů (viz.kap.3.5); I.skupina (kontrolní), II. Skupina (i.p. paclitaxel 1x týdně dávky 10, 6, 6 a 6mg/kg), III.skupina (i.p. docetaxel 1x týdně dávky 10, 6, 6 a 6mg/kg), IV.skupina (kombinace: i.p. docetaxel 10 a 6mg/kg a následně i.p. paclitaxel 2 x 6mg/kg) a V.skupina (kombinace: i.p. paclitaxel 10 a 6mg/kg a následně i.p. docetaxel 2 x 6mg/kg).

Sledované parametry;

- **Velikost lymfomů:** Subkutánní lymfomy se objevily u potkanů nejpozději 17 den po inokulaci a rostly až do 34. dne, kdy dosáhly průměrné velikosti v kontrolní skupině 23cm². Ve skupinách potkanů, kde byly podány taxany, došlo k redukci velikosti lymfomů (*obr.18*). Nejmenší byly lymfomy ve III.skupině potkanů, kde byl použit samotný docetaxel, který je tak jasně účinnějším cytostatikem pro T-buněčné lymfomy než paclitaxel.

Obr.18:

Vliv paclitaxelu, docetaxelu a jejich kombinací na velikost T-buněčných lymfomů v pěti skupinách potkanů po pěti potkanech v každé skupině. I.skupina (kontrolní), II. skupina (i.p. paclitaxel 1x týdně dávky 10, 6, 6 a 6mg/kg), III.skupina (i.p. docetaxel 1x týdně dávky 10, 6, 6 a 6mg/kg), IV.skupina (kombinace: i.p. docetaxel 10 a 6mg/kg + i.p. paclitaxel 2 x 6mg/kg) a V.skupina (kombinace: i.p. paclitaxel 10 a 6mg/kg + i.p. docetaxel 2 x 6mg/kg). Uvedené hodnoty jsou vyjádřeny jako průměrná velikost lymfomu ± SD z pěti potkanů v jedné skupině.



- **Váha lymfomů:** váha lymfomů byla signifikantně nižší mezi 24. a 34. dnem po inokulaci lymfomů pouze ve dvou skupinách potkanů. Šlo o III.skupinu, kde byl aplikován pouze docetaxel a o IV.skupinu, kde byla aplikovány kombinace dvou dávek docetaxelu následované dvěma dávkami paclitaxelu. V těchto dvou skupinách došlo také k významné redukci velikosti nádorů oproti kontrolní skupině.
- **Vliv taxanů na přežití potkanů:** všechna zvířata v kontrolní skupině žila ještě 20 den po inokulaci lymfomů a poslední z potkanů uhynul 48 den po inokulaci. Všechny ostatní skupiny potkanů, kde byly použity taxany přežívaly déle než kontrolní skupina (Tabulka 20), přičemž potkani III.skupiny, kde byl aplikován pouze docetaxel přežívali nejdéle.

Tabulka 20: Přežití pěti různých skupin potkanů s inokulovanými T-buněčnými lymfomy; I.skupina (kontrolní), II. skupina (i.p. paclitaxel 1x týdně dávky 10, 6, 6 a 6mg/kg), III.skupina (i.p. docetaxel 1x týdně dávky 10, 6, 6 a 6mg/kg), IV.skupina (kombinace: i.p. docetaxel 10 a 6mg/kg + i.p. paclitaxel 2 x 6mg/kg) a V.skupina (kombinace: i.p. paclitaxel 10 a 6mg/kg + i.p. docetaxel 2 x 6mg/kg).

| Skupina potkanů (dle aplikace taxanů) | Množství sledovaných potkanů | Uhynutí posledního potkana (dny) | Průměrný počet dní přežití potkanů oproti kontrolní skupině | Statisticky významné rozdíly v přežití potkanů jednotlivých sledovaných skupin vůči kontrolní skupině ^a |
|---------------------------------------|------------------------------|---|---|--|
| I.Kontrolní | 20 | 48 | - | - |
| II.Paclitaxel | 41 | 66 | 21 | p=0.05 |
| III.Docetaxel | 55 | 91 – dva potkani, 180 ^b – poslední potkan | 35 | p=0.01 |
| IV.Docetaxel+ Paclitaxel | 45 | 91 – dva potkani, 180 ^b – poslední potkan | 25 | p=0.05 |
| V.Paclitaxel+ Docetaxel | 41 | 77 | 21 | p=0.06 |

^astatistická významnost rozdílů přežití potkanů jednotlivých skupin vůči kontrolní skupině byla zjišťována oboustranným Studentovým t-testem. ^btyto potkani byli stále zdraví a bez výskytu lymfomu

Jako další možné dávkové schéma byla použita opakovaná pětidávková i.p. aplikace paclitaxelu nebo docetaxelu. Opět byli potkani rozděleni do skupin po šesti potkanech podle způsobu dávkování taxanů (viz.kap.3.5); I.skupina (kontrolní), II.skupina (i.p. paclitaxel 10, 6, 6, 6 a 6mg/kg), III.skupina (i.p. docetaxel 10, 6, 6, 6 a 6mg/kg). V kontrolní skupině se objevily lymfomy po 17 dnech po inokulaci buněk lymfomů, v průběhu 17 – 20 dne se objevily lymfomy v II.skupině, kde byl aplikován paclitaxel. Ve III.skupině, kde byl aplikován docetaxel se vyvinuly lymfomy pouze u dvou ze šesti potkanů. Váha lymfomů byla po 32 dnech po inokulaci v kontrolní skupině $10.3 \pm 2.1g$, ve II.skupině (i.p. paclitaxel) byla váha jednoznačně nižší $4.7 \pm 2.2g$ se signifikancí oproti kontrolní skupině $p < 0.05$. Nejnižší váha lymfomů byla nalezena ve třetí skupině (i.p. docetaxel) pouze 3.2 ± 2.4 se signifikancí oproti kontrolní skupině $p < 0.05$. Fakt, že u 2/3 sledovaných potkanů se po i.p. aplikaci docetaxelu vůbec lymfomy nevyvinuly ukazuje větší účinnost docetaxelu na tento typ nádorů a jeho potenciální využití v terapii T-buněčných lymfomů. Při posuzování kombinované terapie oběma taxany bylo zjištěno, že účinky samotného docetaxelu jsou větší než při použití v kombinaci s paclitaxelem. Kombinace taxanů působících v různých fázích buněčného cyklu tedy nevedou k zesílení vzájemných účinků taxanů na T-buněčné lymfomy.

5. ZÁVĚR

Poznatky získané v rámci předkládané disertační práce přispívají k rozšíření znalostí v oblasti metabolismu a transportu taxanů a možných ovlivnění těchto procesů. Přináší zároveň informace o metabolických přeměnách a transportu nových syntetických analogů klasických taxanů jako potenciálních protinádorových léčiv.

- ***Detailní studium metabolismu klasických taxanů, stanovení mezidruhových rozdílů metabolismu a detekce nového metabolitu paclitaxelu***

Byla sledována *in vitro* přeměna paclitaxelu a docetaxelu jaterními mikrosomálními frakcemi potkana, prasete, miniprasete a člověka. Přeměna paclitaxelu byla ve sledovaných živočišných druzích kvalitativně i kvantitativně velmi odlišná. V mikrosomálních systémech potkanů byly nalezeny a identifikovány čtyři metabolity: hlavní C3'-hydroxypaclitaxel, minoritní C2-hydroxypaclitaxel, dihydroxypaclitaxel a nově objevený neznámý hydroxypaclitaxel, který dosud nebyl v literatuře popsán. V jaterních mikrosomálních systémech prasat a miniprasat neznámý OHPCT představoval 95% z celkového množství metabolitů paclitaxelu. C3'-hydroxypaclitaxel byl minoritním metabolitem stejně jako C2-hydroxypaclitaxel, který vznikal pouze v jaterních mikrosomech miniprasat. V lidských jaterních mikrosomech byly při sledování metabolismu paclitaxelu nalezeny tři metabolity: hlavní lidský metabolit 6 α -OHPCT, jež nebyl detekován v žádném jiném sledovaném živočišném druhu. Nejvhodnějším *in vitro* experimentálním modelem pro studium metabolismu paclitaxelu jsou tedy pouze jaterní mikrosomy člověka.

Metabolický profil docetaxelu byl na rozdíl od paclitaxelu ve všech sledovaných živočišných druzích shodný. Hlavním metabolitem byl hydroxydocetaxel následovaný dvěma minoritními metabolity odpovídajícími strukturou diastereoisomerním hydroxyoxazolidinonům A a B.

- ***Identifikace forem cytochromu P450 zodpovědných za tvorbu jednotlivých metabolitů paclitaxelu a docetaxelu***

Při studiu živočišných forem interagujících s paclitaxelem a docetaxelem byly jako modelové enzymové systémy použity mikrosomální frakce potkanů premedikovaných známými induktory jednotlivých forem cytochromu P450 a v dalším přiblížení též lidské rekombinantní cytochromy P450 v rámci rekonstituovaného systému a specifické inhibitory konkrétních isoform cytochromu P450. Z potkaních mikrosomálních preparátů tvořily

všechny identifikované metabolity paclitaxelu a docetaxelu nejvyšší rychlostí mikrosomy potkanů premedikovaných PCN (induktor CYP3A1/2), což dokázalo účast podrodiny CYP3A1/2 na metabolismu paclitaxelu *in vitro* mikrosomy potkana. Účast CYP3A podrodiny na metabolismu paclitaxelu u všech sledovaných živočišných druhů potvrdila inhibice metabolismu paclitaxelu v jaterních mikrosomech potkanů, prasat, miniprasat a člověka troleandomycinem jako specifickým inhibítozem CYP3A podrodiny cytochromů P450. V neposlední řadě, v sérii lidských cDNA exprimovaných cytochromů P450 (CYP1A2, 1B1, 2A6, 2C9, 2E1 a 3A4) byl aktivní pouze CYP3A4, který metabolisoval paclitaxel na C3'-OHPCT a C2-OHPCT, což potvrdilo významnou úlohu CYP3A4 na metabolismu paclitaxelu v lidském organismu. V lidských jaterních mikrosomech byla navíc prokázána významná role CYP2C8 na tvorbě hlavního lidského metabolitu 6 α -OHPCT, která byla významně inhibována silným inhibítozem tohoto lidského enzymu fisetinem.

- ***Detailní studium metabolismu nových syntetických analogů klasických taxanů: SB-T-1103, SB-T-1214 a SB-T-1216, určení mezidruhových rozdílů metabolismu a identifikace forem cytochromu P450 účastnících se metabolismu nových taxanů***

Byla sledována dosud zcela neznámá *in vitro* přeměna třech nových taxanových analogů jaterními mikrosomálními frakcemi nepremedikovaného potkana, PCN-indukovaného potkana, prasete, miniprasete, člověka a rovněž sérií lidských cDNA exprimovaných cytochromů P450 v rámci rekonstituovaného systému. SB-T-1103 byl metabolisován na 11 produktů označovaných M1-M11, SB-T-1214 na 9 metabolitů označovaných M1-M9 a SB-T-1216 tvořil 8 metabolitů M1-M8. Metabolický profil všech tří nových taxanů vykazoval značné odlišnosti v PCN-indukovaných mikrosomech potkana, kde díky zvýšenému množství CYP3A1/2 vůbec nevznikaly některé minoritní metabolity a na druhé straně obvyklé majoritní metabolity byly dále oxidovány. Tyto výsledky potvrdily roli CYP3A podrodiny v metabolismu SB-T-1103, SB-T-1214 a SB-T-1216. Ze série lidských cDNA exprimovaných CYP1A2, 1B1, 2A6, 2C9, 2E1 a 3A4 se účastnil metabolismu nových taxanů pouze CYP3A4, který se podílel na vzniku všech majoritních metabolitů nových taxanů a je tak významným cytochromem P450 účastnícím se metabolismu taxanových analogů SB-T-1103, SB-T-1214 a SB-T-1216.

- ***Stanovení fenolických antioxidantů jako inhibitorů metabolismu klasických taxanů paclitaxelu a docetaxelu***

Pomocí inhibičních experimentů bylo prokázáno, že některé fenolické antioxidanty přírodního původu ovlivňují metabolismus paclitaxelu *in vitro* mikrosomálními systémy potkana a člověka. U takto účinných látek byly stanoveny jejich IC₅₀ a pro nejvíce účinné také inhibiční konstanta a typ inhibice. Nejúčinnějšími látkami inhibujícími metabolismus paclitaxelu v mikrosomálních systémech potkana a člověka byly resveratrol a fisetin. Z dalších fenolických antioxidantů inhibovaly především tvorbu hlavního lidského metabolitu 6 α -OHPCT katalyzovanou CYP2C8 morin, kvercetin a mírně působící naringenin. V případě docetaxelu byla v lidských jaterních mikrosomech inhibována tvorba hlavního metabolitu docetaxelu hydroxydocetaxelu kvercetinem, ovšem jen mírně. Sledované fenolické antioxidanty tedy účinně inhibují především enzymatickou aktivitu lidského CYP2C8, zatímco aktivita lidského CYP3A4 je ovlivňována mnohem méně.

- ***Stanovení cytotoxicity a transportu klasických taxanů v lidské sensitivní buněčné linii rakoviny prsu a linii resistantní vůči adriamycinu***

Vzhledem k častému rozvoji rezistence nádorových buněk vůči taxanům byl sledován transport a cytotoxicita klasických taxanů v lidské buněčné linii rakoviny prsu MDA-MB-435, která je sensitivní vůči cytostatikům a NCI/ADR-RES linii resistantní vůči adriamycinu. Tyto dvě linie se liší expresí některých membránových ABC transportních proteinů zejména expresí P-glykoproteinu, který je v nadměrné míře exprimován v resistantních liniích, zatímco úplně chybí v sensitivních buňkách. Klasické taxany paclitaxel a docetaxel byly 1000x respektive 600x cytotoxičtější v sensitivních nádorových buňkách. Značně rozdílný byl také transport obou sledovaných klasických taxanů. Akumulace paclitaxelu a docetaxelu byla řádově vyšší sensitivními buňkami rakoviny prsu a naopak docházelo k významně rychlejšímu vyplavování paclitaxelu z resistantních buněk. Použitá buněčná linie s prokázanou resistencí vůči adriamycinu je tedy značně resistantní rovněž vůči klasickým taxanům. Také buněčné procesy indukce apoptosy vyvolané působením taxanů se lišily v sensitivní a resistantní buněčné linii rakoviny prsu. Taxany v obou liniích aktivovaly kaspasy-9 a -3, ale pouze resistantní buňky vyplavovaly cytochrom c z mitochondrií jako při klasické mitochondriální indukci apoptosy. Tento výsledek naznačuje odlišný mechanismus indukce buněčné smrti vyvolané taxany ve sledovaných typech nádorových buněk

- ***Studium cytotoxicity a transportu nových taxanových analogů v lidské sensitivní buněčné linii rakoviny prsu a linii resistantní vůči adriamycinu***

Cytotoxicita a transport byly sledovány stejně jako v případě klasických taxanů v lidských sensitivních (MDA-MB-435) a resistantních (NCI/ADR-RES) buňkách rakoviny prsu. Na rozdíl od paclitaxelu a docetaxelu byla ovšem cytotoxicita i akumulace všech třech sledovaných derivátů taxanů (SB-T-1103, SB-T-1214 a SB-T-1216) stejná v sensitivních i resistantních buňkách, čímž byla dokázána citlivost resistantních nádorových buněk rakoviny prsu vůči těmto potenciálním léčivům, které by se tak mohly stát vhodnou léčebnou alternativou v případech rozvoje rezistence nádorů prsu vůči klasickým taxanům dané vysokou expresí P-glykoproteinu.

- ***Verapamil a některé syntetické deriváty flavonoidů účinně ovlivňují transport paclitaxelu v lidské sensitivní a resistantní buněčné linii rakoviny prsu***

Byl sledován vliv verapamilu a série třinácti syntetických derivátů flavonoidů s velkou vazebnou afinitou k P-glykoproteinu jako možných modulátorů transportní funkce P-glykoproteinu zodpovědné za resistenci. Verapamil byl účinným inhibitorem transportu zodpovědného za resistenci vůči paclitaxelu v prsních nádorových buňkách. Na druhou stranu, v sensitivní buněčné linii zvyšoval vyplavování paclitaxelu a tím by mohl právě v tomto typu buněk snižovat účinek zmíněného cytostatika. Ze syntetických derivátů flavonoidů celkem šest derivátů silně zvyšovalo akumulaci [¹⁴C]paclitaxelu v resistantních buňkách rakoviny prsu v tomto pořadí: CB-287 ≥ ML-50 > CB-284 ≥ CB-285 > CB-436 > A-12. Flavonoidy CB-287, CB-284, CB-285 a ML-50 inhibovaly zároveň i vylučování [¹⁴C]paclitaxelu z resistantních buněk. V sensitivní buněčné linii byl účinek těchto flavonoidů opačný, což představuje zajímavý výsledek z hlediska mechanismu transportu.

- ***In vivo účinky taxanů na T-buněčné lymfomy v modelovém organismu laboratorního potkana***

Byly sledovány aplikace paclitaxelu, docetaxelu a jejich kombinací v různých dávkových schématech na T-buněčné lymfomy implantované laboratornímu potkanu. Ze všech sledovaných dávkových schémat nejúčinněji působil opakovaně podávaný docetaxel, který byl účinnější než paclitaxel nebo jejich vzájemná kombinace. Docetaxel je tak vhodným potenciálním léčivem v terapii T-buněčných lymfomů. Kombinace taxanů působících v různých fázích buněčného cyklu naopak nevedou k zesílení vzájemných účinků taxanů na T-buněčné lymfomy.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] van Acker SA, van der Berg DJ, Tromp MNLJ, Griffioen DH, van der Wright WJF, Bast A: *Free Radic Biol Med* **20**; 331-342, 1998.
- [2] Alahari SK, Dean NM, Fisher MH, DeLong R, Manoharan M, Tivel KL, Juliano RL.: *Mol Pharmacol* **50(4)**; 808-819, 1996.
- [3] Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.: *Úvod do molekulární biologie buňky*. Espero Publishing, Ústí nad Labem, 1998.
- [4] Anderson CD, Wang J, Kumar GN, McMillan JM, Walle UK, Walle T: *Drug Metab Dispos* **23(11)**; 1286-1290, 1995.
- [5] Anzenbacher P, Soucek P, Anzenbacherova E, Gut I, Hruby K, Svoboda Z, Kvetina J. *Drug Metab Dispos* **26(1)**; 56-59, 1998.
- [6] Arbuck SG, Christian MC, Fisherman JS, Cazenave LA, Sarosy G, Suffness M, Adams J, Canetta R, Cole KE, Friedman MA: *J Natl Cancer Inst Monogr* **15**; 11-24, 1993.
- [7] Arnal M, Franco N, Fargeot P, Riedinger JM, Brunet-Lecomte P, Lizard-Nacol S: *Breast Cancer Res Treat* **61(1)**; 13-20, 2000.
- [8] Bar-Nun S, Kreibich G, Adesnik M, Alterman L, Negishi M, Sabatini DD. *Proc Natl Acad Sci USA* **77(2)**; 965-969, 1980.
- [9] Bissery MC, Nohynek G, Sanderink GJ, Lavelle F.: *Anticancer Drugs* **6**; 339-368, 1995.
- [10] Boehnke-Michaud L, Valero V, Hortobagyi G: *Drug Saf.* **23**; 401-428, 2000.
- [11] Bois, F.; Beney, C.; Boumendjel, A.; Mariotte, A.-M.; Conseil, G.; Di Pietro, A. *J. Med. Chem* **41**, 4161-4164, 1998.
- [12] Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB.: *Cell* **74(4)**; 597-608, 1993.
- [13] Bořek-Dohalská L, Stiborová M.: *Chem Listy* **94**; 226-229, 2000.
- [14] Boumendjel A, Bois F, Beney C, Mariotte A.-M, Conseil G, Di Pietro A: *Bioorg Med Chem Lett* **11**, 75-77, 2001.
- [15] Boumendjel A, Beney C, Deka N, Mariotte A-M, Lawson MA, Trompier D, Baubichon-Cortay H, Di Pietro A: *Chem Pharm Bull* **50**; 854-856, 2002a.
- [16] Boumendjel A, Di Pietro A, Dumontet C, Barron D: *Med Res Rev* **22**, 512-529, 2002b.
- [17] Brooks TA, Minderman H, O'Loughlin KL, Pera P, Ojima I, Baer MR, Bernacki RJ: *Mol Cancer Ther* **2(11)**; 1195-1205, 2003. Erratum in: *Mol Cancer Ther* **3(1)**; 101, 2004.
- [18] Bruno R, Sanderink GJ: *Cancer Surv* **17**; 305-113, 1993.
- [19] Cachoux F, Isarno T, Wartmann M, Altmann KH: *Chembiochem.* **7(1)**; 54-57, 2006.
- [20] Commercoon A, Bourzat JD, Bézard D, Vuilhorgne M.: *Tetrahedron* **50**; 10289-10298, 1994.
- [21] Conney A.: *Life Sciences* **39**; 2493-2518, 1986.
- [22] Conseil G, Baubichon-Cortay H, Dayan G, Jault JM, Barron D, Di Pietro A: *Proc Natl Acad Sci USA* **95(17)**; 9831-9836, 1998.
- [23] Cooper DK, Gollackner B, Sachs DH. *Annu Rev Med* **53**; 133-147, 2002.
- [24] Cresteil T, Monsarrat B, Alvinerie P, Treluyer JM, Vieira I, Wright M: *Cancer Res* **54(2)**; 386-392, 1994.
- [25] Critchfield JW, Welsh CJ, Phang JM, Yeh GC: *Biochem Pharmacol* **48(7)**; 1437-1445, 1994.
- [26] Desai P, Zhou Y, Duan J, Kouzi S: *ISSX Proceedings 10, 7th North American ISSX Meeting*, San Diego, California, USA, 1996.

- [27] Ding S, Chamberlain M, McLaren A, Goh L, Duncan I, Wolf CR.: *Br J Cancer* **85(8)**; 1175-1184, 2001.
- [28] Dixon M: *J Biochem* **55**; 170-171, 1953.
- [29] Dorr RT: *Pharmacotherapy* **17**; 96S-104S, 1997.
- [30] Edenharder R, Rauscher R, Platt KL: *Mutat Res* **379(1)**; 21-32, 1997.
- [31] Ferguson LR: *Mutat Res* **475(1-2)**; 89-111, 2001.
- [32] Ferlini C, Distefano M, Pignatelli F, Lin S, Riva A, Bombardelli E, Mancuso S, Ojima I, Scambia G. *Br J Cancer* **83(12)**; 1762-1768, 2000.
- [33] Fischer V, Rodriguez-Gascon A, Heitz F, Tynes R, Hauck C, Cohen D, Vickers AE: *Drug Metab Dispos* **26(8)**; 802-811, 1998.
- [34] Fuhr U, Klittich K, Staib AH: *Br J Clin Pharmacol* **35(4)**; 431-6, 1993.
- [35] Ghosal A, Satoh H, Thomas PE, Bush E, Moore D.: *Drug Metab Dispos* **24(9)**; 940-947, 1996.
- [36] Gonzalez FJ, Korzekwa KR: *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **35**; 369-390, 1995.
- [37] Gottesman MM, Pastan I: *Annu Rev Biochem* **62**; 385-427, 1993.
- [38] Guengerich FP.: *Chem Res Toxicol* **3**; 363-371, 1990.
- [39] Guengerich FP, Kim DH.: *Carcinogenesis* **11**; 2275-2279, 1990.
- [40] Guengerich FP: v knize *Cytochrome P450- Structure, Mechanism and Biochemistry* (Ortiz de Montellano PR), 2 vyd, Plenum Press, NY, 473, 1995.
- [41] Gut I, Souček P, Hodek P.: *Prac Lékařství* **45**; 15-20, 1993a.
- [42] Gut I, Terelius Y, Frantik E, Linhart I, Soucek P, Filipcova B, Kluckova H. *Arch Toxicol* **67(4)**; 237-243, 1993b.
- [43] Gut I, Danielova V, Holubova J, Soucek P, Kluckova H: *Arch Toxicol* **74(8)**; 437-446, 2000.
- [44] Hadjeri M, Barbier M, Ronot X, Mariotte A.-M, Boumendjel A, Boutonnat J: *J Med Chem* **46**; 2125-2131, 2003.
- [45] Haldar S, Jena N, Croce CM: *Proc Natl Acad Sci U S A* **92(10)**; 4507-4511, 1995.
- [46] Haldar S, Chintapalli J, Croce CM: *Cancer Res* **56(6)**; 1253-1255, 1996.
- [47] Harris JW, Katki A, Anderson LW, Chmurny GN, Paukstelis JV, Collins JM: *J Med Chem* **37(5)**; 706-709, 1994.
- [48] He L, Orr GA, Horwitz SB: *Drug Discov Today* **6(22)**; 1153-1164, 2001.
- [49] Henderson MC, Miranda CL, Stevens JF, Deinzer ML, Buhler DR: *Xenobiotica* **30(3)**; 235-51, 2000.
- [50] Hertog MG, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D: *Nutr Cancer* **20(1)**; 21-29, 1993.
- [51] Higgins CF, Gottesman MM: *Trends Biochem Sci* **17(1)**; 18-21, 1992.
- [52] Hollman PCH, Katan MB: *Arch Toxicol* **20**; 237-248, 1998.
- [53] Hořejší V a Bartůňková J: *Základy imunologie*, Triton Praha, 1998.
- [54] Hugger ED, Novak BL, Burton PS, Audus KL, Borchardt RT: *J Pharm Sci* **91(9)**; 1991-2002, 2002.
- [55] Chao CC, Huang YT, Ma CM, Chou WY, Lin-Chao S.: *Mol Pharmacol* **41(1)**; 69-75, 1992.
- [56] Jamis-Dow CA, Klecker RW, Sarosy G, Reed E, Collins JM. *Cancer Chemother Pharmacol* **33(1)**; 48-52, 1993.
- [57] Jefcoate CR, Liehr JG, Santen RJ, Sutter TR, Yager JD, Yue W, Santner SJ, Tekmal R, Demers L, Pauley R, Naftolin F, Mor G, Berstein L.: *J Natl Cancer Inst Monogr* **27**; 95-112, 2000.
- [58] Jodoin J, Demeule M, Beliveau R: *Biochim Biophys Acta* **1542(1-3)**; 149-159, 2002.
- [59] Jordan MA, Ojima I, Rosas F, Distefano M, Wilson L, Scambia G, Ferlini C: *Chem Biol.* **9(1)**; 93-101, 2002.

- [60] Jurima-Romet M, Casley WL, Leblanc CA, Nowakowska M. *Toxicol In Vitro* **14(3)**; 253-263, 2000.
- [61] Kang MH, Figg WD, Ando Y, Blagosklonny MV, Liewehr D, Fojo T, Bates SE. *Clin Cancer Res* **7(6)**; 1610-1617, 2001.
- [62] Klener P: *Remedia* **5**; 154-159, 1995.
- [63] Klener P: *Protinádorová chemoterapie*, Galén Praha 1996.
- [64] Klener P: *Klinická onkologie*. Galén a Karolinum, Praha, 2002.
- [65] Kumar GN, Walle UK, Walle T: *J Pharmacol Exp Ther.* **268(3)**;1160-1165, 1994.
- [66] Kusunoki N, Takara K, Tanigawara Y, Yamauchi A, Ueda K, Komada F, Ku Y, Kuroda Y, Saitoh Y, Okumura K: *Jpn J Cancer Res* **89(11)**; 1220 – 1228, 1998.
- [67] Kuwano M, Uchiumi T, Hayakawa H, Ono M, Wada M, Izumi H, Kohno K.: *Cancer Sci* **94(1)**; 9-14, 2003.
- [68] Kvetina J, Svoboda Z, Nobilis M, Pastera J, Anzenbacher P.: *Gen Physiol Biophys.* **18**; 80-85, 1999.
- [69] Leonessa F, Clarke R: *Endocr Relat Cancer* **10(1)**; 43-73, 2003.
- [70] Leveille-Webster CR, Arias IM: *J Membr Biol* **43(2)**; 89-102, 1995.
- [71] Ling V: *Cancer Chemother Pharmacol* **40**; S3-8, 1997.
- [72] Litman T, Druley TE, Stein WD, Bates SE: *Cell Mol Life Sci* **58**; 931-959, 2001.
- [73] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: *J Biol Chem* **193**; 265-275, 1951.
- [74] Macholán L. , Barthová J. , Kučera I. , Zelinka J: v *Enzymologie*, Státní pedagogické nakladatelství Praha, 1983.
- [75] Marre F, Sanderink GJ, de Sousa G, Gaillard C, Martinet M, Rahmani R: *Cancer Res* **56(6)**;1296-1302, 1996.
- [76] Matějková Š, Gut I: *Remedia* **10**; 272-281, 2000.
- [77] Mechetner E, Kyshtoobayeva A, Zonis S, Kim H, Stroup R, Garcia R, Parker RJ, Fruehauf JP: *Clin Cancer Res* **4(2)**; 389-398, 1998.
- [78] Miller ML, Ojima I: *Chem Rec* **1(3)**; 195-211, 2001.
- [79] Minderman H, Brooks TA, O'Loughlin KL, Ojima I, Bernacki RJ, Baer MR: *Cancer Chemother Pharmacol* **53(5)**; 363-369, 2004.
- [80] Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, Brangi M, Greenberger L, Dean M, Fojo T, Bates SE: *Cancer Res* **59(1)**; 8-13, 1999.
- [81] Monsarrat B, Mariel E, Cros S, Gares M, Guenard D, Gueritte-Voegelein F, Wright M. *Drug Metab Dispos* **18(6)**; 895-901, 1990.
- [82] Monsarrat B, Alvinerie P, Wright M, Dubois J, Gueritte-Voegelein F, Guenard D, Donehower RC, Rowinsky EK: *J Natl Cancer Inst Monogr* **15**; 39-46, 1993.
- [83] Monsarrat, B, Royer, I, Wright, M, Cresteil, T: *Bull Cancer* **84**; 125-133, 1997.
- [84] Monsarrat B, Chatelut E, Royer I, Alvinerie P, Dubois J, Dezeuse A, Roche H, Cros S, Wright M, Canal P: *Drug Metab Dispos* **26(3)**; 229-233, 1998.
- [85] Moon JY, Lee DW, Park KH: *Xenobiotica* **28(2)**; 117-126, 1998.
- [86] Murakami K, Mason HS: *J Biol Chem* **242**; 1102-1110, 1967.
- [87] Nakanishi T, Karp JE, Tan M, Doyle LA, Peters T, Yang W, Wei D, Ross DD.: *Clin Cancer Res* **9(9)**; 3320-3328, 2003.
- [88] Nandi S, Guzman RC, Yang J: *Proc Natl Acad Sci USA* **92**; 3650-3657, 1995.
- [89] Nebert DW, Nelson DR, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W, Phillips JR, Sato R, Waterman MR: *DNA* **8(1)**; 1-13, 1989.
- [90] Nedelcheva V, Gut I: *Prac Lékařství* **46**; 58-67, 1994.
- [91] Nedelcheva V, Gut I, Soucek P, Frantik E: *Chem Biol Interact* **115(1)**; 53-70, 1998.

- [92] Nedelcheva V, Gut I, Soucek P, Tichavska B, Tynkova L, Mraz J, Guengerich FP, Ingelman-Sundberg M: *Arch Toxicol* **73(1)**; 33-40, 1999.
- [93] Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, Okada K, Nebert DW: *DNA Cell Biol* **12(1)**; 1-51, 1993.
- [94] *Novotvary 1999* ČR. Zdravotnická statistika. ÚZIS, NOR ČR, Praha, 1999.
- [95] Ojima I, Duclos O, Zucco M, Bissery MC, Combeau C, Vrignaud P, Riou JF, Lavelle F: *J Med Chem* **37(16)**; 2602-2608, 1994.
- [96] Ojima I, Slater JC, Michaud E, Kuduk SD, Bounaud PY, Vrignaud P, Bissery MC, Veith JM, Pera P, Bernacki RJ: *J Med Chem* **39(20)**; 3889-3896, 1996.
- [97] Ojima I, Bounaud PY, Takeuchi C, Pera P, Bernacki RJ: *Bioorg Med Chem Lett* **8(2)**; 189-194, 1998.
- [98] Ojima I, Inoue T, Chakravarty S: *J Fluorine Chem* **97**; 3, 1999a.
- [99] Ojima I, Inoue T, Slater S, Lin S, Kuduk S, Chakravarty S, Walsh JJ, Gilchrist L, McDermott AE, Cresteil T, Monsarrat B, Pera p, Bernacki RJ: v *Asymmetric Fluoroorganic Chemistry: Synthesis, application and Future Directions*, American Chemical Society, Washington DC, Chapter 12, 1999b.
- [100] Ojima I, Ferlini C: *Chem Biol* **10(7)**; 583-584, 2003.
- [101] Ojima I: *Chembiochem* **5(5)**; 628-635, 2004.
- [102] Omura T, Sato R: *J Biol Chem* **239**; 2370-2378, 1964.
- [103] Ono S, Hatanaka T, Hotta H, Satoh T, Gonzalez FJ, Tsutsui M: *Xenobiotica* **26**; 681-693, 1996.
- [104] Otova B, Sladka M, Damoiseaux J, Panczak A, Mandys V, Marinov I.: *Folia Biol (Praha)* **48(6)**; 213-226, 2002.
- [105] van Oosterom AT, Schrijvers D, Schriivers D [corrected to Schrijvers D: *Anticancer Drugs* **6(3)**; 356-68, 1995. Review. Erratum in: *Anticancer Drugs* **6(4)**; 618, 1995.
- [106] Pelkonen O, Maenpaal J, Taavitsainen P, Rautio A, Raunio H: *Xenobiotica* **28**; 1203-1253, 1998.
- [107] Penson RT, Oliva E, Skates SJ, Glyptis T, Fuller AF Jr, Goodman A, Seiden MV: *Gynecol Oncol* **93**; 98-106, 2004.
- [108] Perez-Victoria JM, Chiquero MJ, Conseil G, Dayan G, Di Pietro A, Barron D, Castanys S, Gamarro F: *Biochemistry* **38(6)**; 1736-1743, 1999.
- [109] Pietta PG: Flavonoids and antioxidants. *J Natl Prod* **63**; 1035-1042, 2000.
- [110] Polizzi D, Pratesi G, Tortoreto M, Supino R, Riva A, Bombardelli E, Zunino F: *Cancer Res* **59(5)**; 1036-1040, 1999.
- [111] Potmesil M, Hsiang YH, Liu LF, Bank B, Grossberg H, Kirschenbaum S, Forlenza TJ, Penziner A, Kanganis D: *Cancer Res* **48(17)**; 3537-3543, 1988.
- [112] Potmesil M and Pinedo H.: v *Camptothecins: New Anticancer Agents*, CRC Press, London, UK, p. 113, 1994.
- [113] Rahman A, Korzekwa KR, Grogan J, Gonzalez FJ, Harris JW: *Cancer Res* **54**; 5543-5546, 1994.
- [114] Ravdin PM: *Semin Oncol* **22(6 Suppl 13)**; 29-34, 1995.
- [115] Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G: *Free Radic Biol Med* **20(7)**; 933-956, 1996. Erratum in: *Free Radic Biol Med* **21(3)**:417, 1996.
- [116] Ritke MK, Roberts D, Allan WP, Raymond J, Bergoltz VV, Yalowich JC: *Br J Cancer* **69(4)**; 687-697, 1994.
- [117] Royer I, Monsarrat B, Sonnier M, Wright M, Cresteil T: *Cancer Res* **56(1)**; 58-65, 1996.

- [118] Scambia G, Ranelletti FO, Panici PB, De Vincenzo R, Bonanno G, Ferrandina G, Piantelli M, Bussa S, Rumi C, Cianfriglia M, Manucuso S: *Cancer Chemother Pharmacol* **34(6)**; 459-464, 1994.
- [119] Selvakumaran M, Lin HK, Miyashita T, Wang HG, Krajewski S, Reed JC, Hoffman B, Liebermann D: *Oncogene* **9(6)**; 1791-1798, 1994.
- [120] Shapiro AB, Ling V: *Biochem Pharmacol* **53(4)**; 587-596, 1997.
- [121] Shou, M, Martinet, M, Korzekwa, KR, Krausz, KW, Gonzalez, FJ, Gelboin, HV: *Pharmacogenetics* **8**; 391-401, 1998.
- [122] Schibler M, Cabral F: *J Cell Biol* **102**; 1522-1531, 1986.
- [123] Siess MH, Guillermic M, Le Bon AM, Suschetet M: *Xenobiotica* **19(12)**; 1379-1386, 1989.
- [124] Siess MH, Mas JP, Canivenc-Lavier MC, Suschetet M: *J Toxicol Environ Health* **49(5)**; 481-496, 1996.
- [125] Sikic BI, Fisher GA, Lum BL, Halsey J, Beketic-Oreskovic L, Chen G.: *Cancer Chemother Pharmacol* **40**; S13-19, 1997.
- [126] Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM: *Clin Biochem.* **30(2)**; 91-113, 1997a.
- [127] Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM: *J Clin Lab Anal* **11(5)**; 287-313, 1997b.
- [128] Souček P, Gut I: *Xenobiotica* **22**; 83-103, 1992.
- [129] Souček P, Gut I: *Čas Lék Čes* **132**; 353-358, 1993.
- [130] De Souza MV: *ScientificWorldJournal* **4(11)**; 415-436, 2004.
- [131] Sparreboom A, Tellingen O, Scherrenburg EJ, Boesen JJB, Huizing MT, Nooijen WJ, Versluis C, Beijnen JH: *Drug Metab Dispos* **24**; 655-658, 1996.
- [132] Stiborová M, Hudeček J, Hodek P, Frei E: *Chem Listy* **93**; 229-237, 1999.
- [133] Taniguchi H, Imai Y, Sato R: *Arch Biochem Biophys* **232(2)**; 585-596, 1984.
- [134] Taniguchi R, Kumai T, Matsumoto N, Watanabe M, Kamio K, Suzuki S, Kobayashi SJ: *Pharmacol Sci* **97(1)**; 83-90, 2005.
- [135] Topham JC.: *Biochem Pharmacol* **19**; 1695-1701, 1970.
- [136] Troutman MD, Luo G, Gan LS, Thakker DR: v *Drug-Drug Interactions* (Rodrigues AD ed), Marcel Dekker, NY, USA, pp 295-357, 2002.
- [137] Tsyrllov IB, Mikhailenko VM, Gelboin HV: *Biochim Biophys Acta* **1205(2)**; 325-335, 1994.
- [138] Vainio H a Bianchini F.: *IARC Handbooks of Cancer Prevention, vol 7, Breast Cancer Screening*. IARC Press Lyon, France, 2002.
- [139] Vodrážka Z: *Biochemie I*, Academia Praha, ČR, 1992.
- [140] Vorlíček J: v *Klinická onkologie (Obecná část)*, Masarykova Universita. Brno, ISBN 80-210-1256-0, 1995.
- [141] Vredenburg MR, Ojima I, Veith J, Pera P, Kee K, Cabral F, Sharma A, Kanter P, Greco WR, Bernacki RJ: *J Natl Cancer Inst* **93(16)**; 1234-1245, 2001.
- [142] Wang Y, Cao J, Zeng S: *World J Gastroenterol* **10(9)**; 1365-1368, 2004.
- [143] Walle T, Kumar GN, McMillan JM, Thornburg KR, Walle UK: *Biochem Pharmacol* **46(9)**; 1661-1664, 1993.
- [144] Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT: *Am Chem Soc* **93**; 2325-2327, 1971.
- [145] Wei D, Mei Y, Liu J: *Biotechnol Lett* **25(4)**; 291-294, 2003.
- [146] Wrighton P, Brian WR, Sari MA, Iwasaki M, Guengerich FP, Ranay JL, Molowa DJ, Branden V: *Mol Pharmacol* **38**; 207-213, 1990.
- [147] Wrighton SA, Schuetz EG, Watkins PB, Maurel P, Barwick J, Bailey BS, Hartle HT, Young B, Guzelian P: *Mol Pharmacol* **28(3)**; 312-321, 1985.
- [148] Yamazaki H, Shimada T: *Drug Metab Dispos* **26(11)**; 1053-1057, 1998.

- [149] *Zdravotnická ročenka České republiky 2002*. ÚZIS ČR, Praha, 2003.
- [150] Zhai S, Dai R, Friedman FK, Vestal RE: *Drug Metab Dispos* **26(10)**; 989-992, 1998.
- [151] Zhang JT: *Mol Membr Biol* **18**; 145-152, 2001.
- [152] <http://wine1.sb.fsu.edu/BCH4053/Lecture30/Lecture30.htm>
- [153] <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>
- [154] <http://cmgm.stanford.edu/biochem218/Projects%201998/Chen,%20Kevin.pdf>
- [155] <http://www.fda.gov/cder/foi/label/1998/20262s24lbl.pdf>
- [156] <http://nutrigene.4tcom/humanabc.htm>.
- [157] <http://www.genomicobject.net/member3/GONET/apoptosis.html>
- [158] <http://afallahi.com/myresearch/gipson2.htm>
- [159] http://www.linkos.cz/vzdelavani/2_00/01.php

Příloha I

Václavíková R., Horský S., Šimek P. and Gut I.:
Paclitaxel metabolism in rat and human liver
microsomes is inhibited by phenolic antioxidants.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol **368**: 200-
209, 2003.

Radka Václavíková · Stanislav Horský · Petr Šimek
Ivan Gut

Paclitaxel metabolism in rat and human liver microsomes is inhibited by phenolic antioxidants

Received: 16 December 2002 / Accepted: 20 June 2003 / Published online: 14 August 2003

© Springer-Verlag 2003

Abstract Paclitaxel is an important, recently introduced anti-neoplastic drug. Paclitaxel metabolites are virtually inactive in comparison with the parent drug. The study investigated whether phenolic antioxidants could inhibit metabolic inactivation sufficiently to increase paclitaxel effects. Cytochrome P450 (CYP)-catalysed metabolism of paclitaxel was investigated in rat and human liver microsomes. In rat microsomes, paclitaxel was metabolised mainly to C3'-hydroxypaclitaxel (C3'-OHP), less to C2-hydroxypaclitaxel (C2-OHP), di-hydroxypaclitaxel (di-OHP) and another monohydroxylated paclitaxel. In human liver microsomes, 6 α -hydroxypaclitaxel (6 α -OHP), formed by CYP2C8, was the main metabolite, while C3'-OHP, C2-OHP and another product different from di-OHP were minor metabolites, formed by CYP3A4. In individual human livers 6 α -OHP was formed at 1.8-fold to 13-fold higher rates than C3'-OHP. Kinetic parameters (K_m and V_{max}) of production of various metabolites in rat and human liver microsomes revealed differences between species as well as human individual differences. Nine phenolic antioxidants ((+)-catechin, (-)-epicatechin, fisetin, gallic acid, morin, myricetin, naringenin, quercetin and resveratrol) were tested for inhibition of paclitaxel metabolism. In rat microsomes, resveratrol was more inhibitory than fisetin; the other phenolic antioxidants were without effect. In human microsomes, the inhibiting potency decreased in the order fisetin > quercetin > morin > resveratrol, while the other phenolic antioxidants were not inhibitory; the formation of 6 α -OHP (CYP2C8) was generally more inhibited than that of C3'-OHP. The inhibition

was mostly mixed-type. The results suggest that oral administration of some phenolic substances might increase paclitaxel blood concentrations during chemotherapy.

Keywords Paclitaxel · Cytochrome P450 · Rat · Human · Liver microsomes · Pharmacokinetics · Inhibition · Phenolic antioxidants

Introduction

Paclitaxel (Taxol) belongs to a rather new class of anti-cancer drugs, originally extracted from the bark of Pacific yew (*Taxus brevifolia*) (Wani et al. 1971), and now manufactured in a partly synthetic process. It was approved for human therapy in 1994 and it has been successful in the therapy of breast, ovarian and lung cancer (Rowinsky et al. 1992; Klener 1995). Its efficiency in the therapy of oesophageal, head and neck cancers is presently under investigation. Taxanes are mitotic poisons, stimulating polymerisation of microtubuli and inhibiting their depolymerisation (Spencer and Faulds 1994). Instead of the formation of the mitotic spindle, they cause the formation of deformed structures – asterisks and stars (Schiff et al. 1999). Paclitaxel also induces apoptosis by various mechanisms (Fan 1999; Aoudjit et al. 2001).

Paclitaxel is metabolised primarily in the liver and the metabolites are excreted in the bile (Monsarrat et al. 1990, 1993). Considerable, but not fully documented species differences in paclitaxel metabolism have been reported in a meeting abstract (Desai et al. 1996).

The same two major metabolites have been determined in rat liver microsomes and isolated hepatocytes in vitro as well as in intact rats in vivo. Major in vitro product was paclitaxel hydroxylated at C3' of the phenyl in the side chain of C13 (C3'-OHP) and the second detected metabolite was C2-OHP (Anderson et al. 1995; Walle et al. 1993). Three other metabolites were found in the dexamethasone treated rats, two were identified as deacetylpaclitaxel and deacetylated C2-OHP (Anderson et al. 1995). Nine me-

R. Václavíková (✉) · S. Horský · I. Gut
Centre of Occupational Diseases,
National Institute of Public Health,
Šrobárova 48, 100 42 Prague 10, Czech Republic
Tel.: +420-267082709, Fax: +420-267131236,
e-mail: rvaclavikova@szu.cz

P. Šimek
Department of Analytical Biochemistry, Entomologic Institute,
CAS, Branisovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

tabolites were detected in vivo, C3'-OHP, C2-OHP and baccatin III were identified (Monsarrat et al. 1990).

In humans, two products of paclitaxel were detected in liver microsomes and isolated hepatocytes in vitro. The main metabolite, absent in rats, was 6 α -OHP with an OH group at C6 of the taxane ring. In contrast to rats C3'-OHP was the minor metabolite (Cresteil et al. 1994; Rahman et al. 1994; Kumar et al. 1994; Walle 1996). In human microsomes and liver slices there was found another minor metabolite di-OHP, formed from 6 α -OHP (Harris et al. 1994a). In an in vivo study these and seven other metabolites were detected in the bile of patients, with 10-deacetylpaclitaxel, 10-deacetylbaccatin III and baccatin III being identified. Six detected metabolites of paclitaxel were identified in the urine too, and 6 α -OHP, C3'-OHP, di-OHP and 10-deacetylpaclitaxel were also identified in plasma (Monsarrat et al. 1998). In human liver 6 α -OHP is formed by CYP2C8 (Rahman et al. 1994) which is not present in rats. C3'-OHP is produced by CYP3A4 (Rahman et al. 1994; Harris et al. 1994a) in humans. The formation of di-OHP results from stepwise catalysis by these separate enzymes (Rahman et al. 1994). In rats, metabolites are produced by CYP3A1/2 (Anderson et al. 1995; Walle et al. 1993).

6 α -OHP was about 30-fold less active in tumour cell lines in vitro (Harris et al. 1994b), C3'-OHP, C2-OHP and baccatin III were less cytotoxic than paclitaxel on in vitro L1210 leukaemia growth (Monsarrat et al. 1990). Taxol effects were also diminished by P-glycoprotein, the only known multidrug resistance (MDR) transporter for efficient Taxol efflux from tumour cells (Dantzig et al. 2001). The effect of paclitaxel can be modulated by overexpression of tubulin B1 isotype (Kyu-Ho et al. 2000) and by various genes of cell cycle regulation.

Phenolic antioxidants possess various favourable properties. These compounds include flavonoids, hydroxystilbenes and derivatives of phenolic acids (Soleas et al. 1997; Matějková and Gut 2000). Phenolic antioxidants are present in various kinds of fruit and vegetable, tea, fruit juices and, especially in red wine (Soleas et al. 1997; Hertog et al. 1992, 1993). They efficiently quench various free radicals, inhibit oxidation of membranous and LDL lipids and proteins and act against other processes (Soleas et al. 1997). Several rat and human in vitro studies (Guengerich and Kim 1990; Obermeier et al. 1995; Buening et al. 1981; Dai et al. 1997) indicate that phenolic antioxidants inhibit or stimulate activities of CYP enzymes. They efficiently inhibited CYP1A1/2 activities (Moon et al. 1998; Zhai et al. 1998), and some flavonoids also inhibited CYP2C8 (Rahman et al. 1994; Harris et al. 1994a) or CYP3A4 (Guengerich and Kim 1990; Buening et al. 1981) activities.

This study investigated in vitro microsomal formation of paclitaxel metabolites including those which have been so far determined only in vivo, with the aim to analyse differences between humans and rats and enzyme kinetics, and to estimate human interindividual variability. Moreover, we studied the inhibition of CYP3A and CYP2C8-catalysed paclitaxel metabolism in rats and humans by a

large series of phenolic antioxidants. The aim was to reveal, whether inhibition of paclitaxel metabolism by phenolic antioxidants could be sufficient to provide significant inhibition in vivo and thereby to cause a marked enhancement of paclitaxel tumour suppressing action or to enable a decrease in doses required for maintaining therapeutic drug concentrations. The observation that certain polyphenols also inhibit the activity of conjugation enzymes (de Santi et al. 2000) offers a further substantiation of such hypothesis.

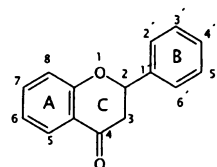
Methods

Chemicals. Paclitaxel (TAXOL) and myricetin were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland); 6 α -hydroxypaclitaxel was purchased from Gentest Corporation (Woburn, MA, USA); naringenin and fisetin were from Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, FRG); gallic acid, morin, catechin, epicatechin, quercetin, resveratrol, pregnenolon-16 α -carbonitril (PCN), NADP, glucose-6-phosphate and benzene were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA); glucose-6-phosphate dehydrogenase was from Boehringer (Mannheim, FRG). The basic structure and the chemical and common names of naturally occurring phenolic antioxidants tested are given in Table 1.

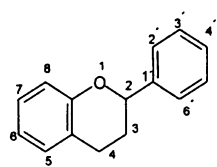
Preparation and characterisation of microsomes. Male Wistar rats (weight 280–300 g), purchased from VELAZ, CZ, were maintained on pellet diet and tap water ad libitum a week before use. The animals were sacrificed by decapitation, livers were rapidly excised and chilled in ice-cold physiological saline and homogenised in ice-cold 150 mM KCl/50 mM Tris-HCl, pH 7.4. Human liver samples were obtained from transplantation donors in accordance with the law. Livers were collected from 10 male patients with unknown drug history, who invariably died from head injury (gun shot, traffic accidents). The age of the donors ranged from 16 to 42 years. During the heart or kidney transplantation procedure the corpses were infused with cold physiological saline and as soon as the hearts or kidneys were excised, the liver samples were excised and immediately frozen in liquid nitrogen and maintained there until use. The time period between the beginning of blood exchange and freezing the liver in liquid nitrogen was 9–46 min and this period as well as the age did not correlate with various CYP activities and immunochemical levels (Nedelcheva et al. 1999). These human liver samples were homogenised in the same way as the rat livers.

Microsomes were prepared by differential centrifugation as described in detail previously (Gut et al. 1993). CYP concentration was estimated according to Omura and Sato (1964) with the use of molar extinction coefficient 91,000. The concentration of microsomal protein was determined according to Lowry et al. (1951) with bovine serum albumin as standard. Specific induction of CYP2E1 by benzene inhalation, that of CYP3A1/2 by pregnenolon 16 α -carbonitril pretreatment in rats and immunochemical characterisation of the induction was performed as described previously (Gut et al. 1993, 2000; Nedelcheva et al. 1998).

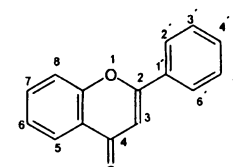
Incubation of paclitaxel with isolated microsomes. The incubation mixture included microsomal protein, 1 mg/ml, in 150 mM KCl/50 mM Tris buffer, pH 7.4, paclitaxel added as 10 mM solution in methanol, with variable final paclitaxel concentrations and methanol at maximum concentration 0.24% (w/v, i.e., 0.3% v/v), which were proved not to influence paclitaxel metabolism. The reaction was initiated by adding an NADPH-generating system (final concentration 1 mM NADP, 10 mM glucose-6-phosphate, 10 mM MgCl₂ and 0.5 U/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase). The samples were incubated at 37°C for 30 min in a shaking water bath. The reaction was stopped and paclitaxel and the metabolites were extracted by addition of ethyl acetate (two subsequent extractions, 2×3 ml).

Table 1 Chemical structure of tested phenolic antioxidants**Flavonoids**

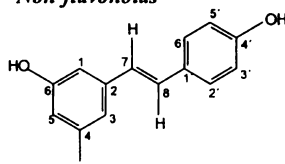
Flavanon



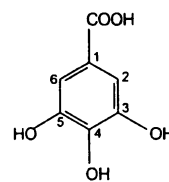
Flavanol



Flavonol

Non-flavonoids

Resveratrol



Gallic acid

| Class of phenolic antioxidants | Common name | Chemical name |
|----------------------------------|-----------------|-----------------------------------|
| Flavonoids | | |
| Flavanols | (+)-catechin | 3,5,7,3',4'-Flavanpentol |
| | (-)-epicatechin | cis-3,5,7,3',4'-Flavanpentol |
| Flavonols | fisetin | 3,7,3',4'-Tetrahydroxyflavone |
| | morin | 3,5,7,2',4'-Pentahydroxyflavone |
| | myricetin | 3,5,7,3',4',5'-Hexahydroxyflavone |
| | quercetin | 3,5,7,3',4'-Pentahydroxyflavone |
| Flavanons | naringenin | 5,7,4'-Trihydroxyflavone |
| Non-flavonoids | | |
| Stilbens | resveratrol | 3,5,4'-Trihydroxystilbene |
| Derivates of benzoic acid | gallic acid | 3,4,5-Trihydroxybenzoic acid |

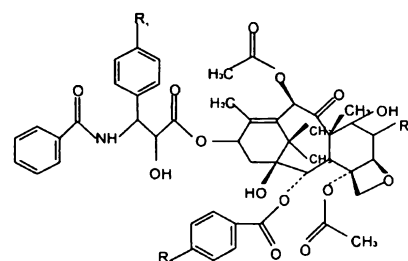
HPLC analysis. Ethyl acetate extracts were evaporated to dryness under a mild nitrogen stream. The dry extracts were dissolved in 200 μ l of the mobile phase (methanol: water, 65:35, v/v) as described by Cresteil et al. (1994) and analysed on HPLC. The following HPLC conditions were used: HPLC Hewlett-Packard Series 1100 with autosampler, 20 μ l sample loop. The Macherey-Nagel column 4 \times 250 mm with Nucleosil 10-5 C18, the above mobile phase, flow 1.2 ml/min, detection 232 nm. The records were analysed by CSW software (Chromatography Station for Windows), version 1.7. Initially, only products formed in the presence of paclitaxel and NADPH and not present in absence of either of them were considered as paclitaxel metabolites. Four metabolites of paclitaxel were formed in untreated and PCN-pretreated rat microsomes (Fig. 1); these were characterised as three monohydroxylated and one dihydroxylated product by MS/MS. The fractions (metabolites of paclitaxel) obtained by collecting defined peaks during HPLC analysis were dried under a mild nitrogen stream.

For the analysis by MS the samples were dissolved in 4 \times 125 μ l 10 mM ammonium formate and methanol (1:1), transferred into autosampler vials and measured by the HPLC-ESI MS method, column Luna 3 μ , C18, 150 \times 1 mm, mobile phase methanol/10 mM ammonium formate 7:3.

The metabolites were quantitated with the use of paclitaxel as standard, assuming similar molar extinction coefficients. 6 α -OHP was identified by HPLC-MS analysis and by comparison with an authentic standard obtained from Gentest Corporation, USA. The molecular weight of C3'-OHP was identified by HPLC-MS analysis; the fact that this represented the main metabolite of paclitaxel in rats and quantitatively second metabolite in humans confirmed position of the hydroxyl group. Hydroxyl position of C2-OHP and di-OHP could not be characterised, since low amounts of these products did not permit to obtain amounts sufficient for NMR analysis, but presence of C2-OHP could be surmised from reports of Anderson et al. (1995) and Walle et al. (1993).

Fig. 1 Chemical structure of paclitaxel and its metabolites. n.d. position of the hydroxyl group could not be identified by mass spectrometry

| Compound | MW | R ₁ | R ₂ | R ₃ |
|-------------------------------|-----|----------------|----------------|----------------|
| paclitaxel | 854 | H | H | H |
| 6 α -hydroxypaclitaxel | 870 | H | OH | H |
| C3'-hydroxypaclitaxel | 870 | OH | H | H |
| C2-hydroxypaclitaxel | 870 | H | H | OH |
| dihydroxypaclitaxel | 886 | OH | OH | H |
| unknown | | | | |
| hydroxypaclitaxel | 870 | n.d. | n.d. | n.d. |



Kinetic analysis. For kinetic assays we used paclitaxel concentrations in the range of 2.5–25 μM . The apparent V_{max} and K_m values were calculated from double reciprocal plots in the Microsoft Excel software. The kinetic and inhibition experiments were performed with the sample of H6 human liver microsomes, which exhibited the highest enzyme activity and thus provided the best precision and enabled analysis of all four metabolites detected in human microsomes. PCN-pretreated rats were the source of hepatic microsomes for enzyme kinetics and inhibition studies in rats, because those microsomes displayed the highest activity in the metabolism of paclitaxel (see Results).

Chemical inhibition. Inhibition studies were performed in the presence of 30 μM catechin, epicatechin, fisetin, gallic acid, morin, myricetin, naringenin, quercetin and resveratrol. Phenolic antioxidants were diluted in methanol. Stock solutions (1 mM) were added to the tubes, evaporated to dryness under a nitrogen stream and redissolved in the incubation mixtures by sonication at 40–80°C. The concentration of paclitaxel was 10 μM . The kinetics of inhibition were determined in the concentration range of resveratrol 0–30 μM , morin 0–20 μM , fisetin 0–20 μM , quercetin 0–30 μM and paclitaxel 0–15 μM . The constants characterising inhibition (K_i) were determined by the use of Dixon plots; the type of inhibition was analysed by using double reciprocal plots (Lineweaver-Burk) using Microsoft Excel software.

Statistics. All data are presented as means \pm SD of estimates. Significant differences ($p < 0.05$ and $p < 0.01$) in the effects of phenolic antioxidants were estimated with Student's *t*-test. Those data are the mean of separate determinations ($n \geq 2$) and the activity was expressed as a percentage of the control \pm SD.

Results

Metabolism of paclitaxel in rat liver microsomes

Under MS conditions, the following characteristics were obtained for the respective products: paclitaxel authentic standard, RT=6.52 min, MH+=854.3; 6 α -OHP, RT=6.12 min, MH+=870.3. The metabolites characterised in the collected peaks were as follows: RT=3.16 min, MH+=886.3, concluded to be di-OHP; RT=3.92 min, MH+=870.3, OHP; RT=4.73 min, MH+=870.3, OHP; RT=5.56 min, MH+=870.3, OHP which was different from 6 α -OHP and concluded to be a precursor of di-OHP.

C3'-OHP was identified by molecular weight and due to its known predominance in the rat and by being quantitatively second to 6 α -OHP in human microsomes. The position of hydroxyls in di-OHP cannot be identified from MS/MS spectra. C2-OHP was identified by being quantitatively next to C3'-OHP in rat liver microsomes in accordance with results of Anderson et al. (1995) and Walle et al. (1993). Another monohydroxylated OHP, which was not reported before, was characterised by MS analysis, with the OH position not yet characterised. In the methanol: water 65:35 (v/v) mobile phase, their RT in % relative to paclitaxel RT (100%) were reproducible in all (more than 40) experiments: di-OHP: 41 \pm 0.15%, C3'-OHP 51.7 \pm 0.2%, C2-OHP 62.8 \pm 0.3%, unknown-position OHP 80.4 \pm 0.15%. Full characterisation of this metabolite isolated from a large-scale incubation is presently under way. This metabolite has a close, but reproducibly different RT (and %RT) from the human 6 α -OHP (see below), and in

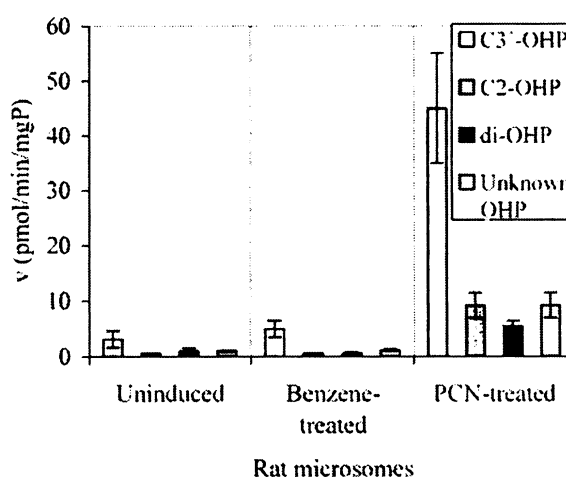


Fig. 2 Effect of CYP induction on paclitaxel metabolism in rat liver microsomes. Paclitaxel 10 μM was incubated with liver microsomes from uninduced, benzene-treated and PCN-treated rats as indicated in Materials and methods. Data were means \pm SD from three different experiments and expressed as pmol metabolites in 1 min by 1 mg microsomal protein

the 40 analyses, %RT proved to give higher reproducibility than absolute RT values in minutes. Moreover, %RT remained almost unchanged, whether 250 \times 4 or 125 \times 4 HPLC column was used, although RT in min were two-fold different.

CYP2E1 induction by benzene did not modify the metabolic rates and ratios between these four metabolites (Fig. 2). Induction of CYP3A1/2 by PCN increased the formation of all four metabolites. In relation to paclitaxel concentration the formation of C3'-OHP was 7- to 30-fold higher, C2-OHP 11- to 45-fold higher, di-OHP 2- to 13-fold higher and OHP with unknown hydroxyl position 5- to 15-fold higher than in the untreated microsomes, yet their order of representation remained unchanged.

Metabolism of paclitaxel in human liver microsomes

Four metabolites were formed: 6 α -OHP was the main metabolite (RT=79.55 \pm 0.15% of paclitaxel), C3'-OHP being quantitatively second. C2-OHP with % RT identical to the rat C2-OHP and the next minor metabolite, which was not yet reported in microsomal studies, was formed too and its RT (44 \pm 0.2% of paclitaxel) was reproducibly different from that of di-OHP (41 \pm 0.15%), which was present only in rat microsomes. In 10 different human microsomes, the formation of C3'-OHP significantly correlated with production of this metabolite ($r=0.914$) as well as with C2-OHP ($r=0.871$) indicating that all three were formed by CYP3A4. The rates of formation of 6 α -OHP and C3'-OHP in individual human microsomes were 6 to 7-fold different, their ratio being 1.8 to 13. Examples of their different ratios can be seen in Fig. 3.

Fig. 3 Interindividual variability of paclitaxel metabolism in different human liver microsomes. Paclitaxel (10 μ M) was incubated with 10 different human liver microsomes as indicated in Materials and methods. Empty bars present the formation of C3'-OHP and dark bars present the formation of 6 α -OHP. Data were means \pm SD from three different experiments and expressed as pmol metabolites in 1 min by 1 mg microsomal protein

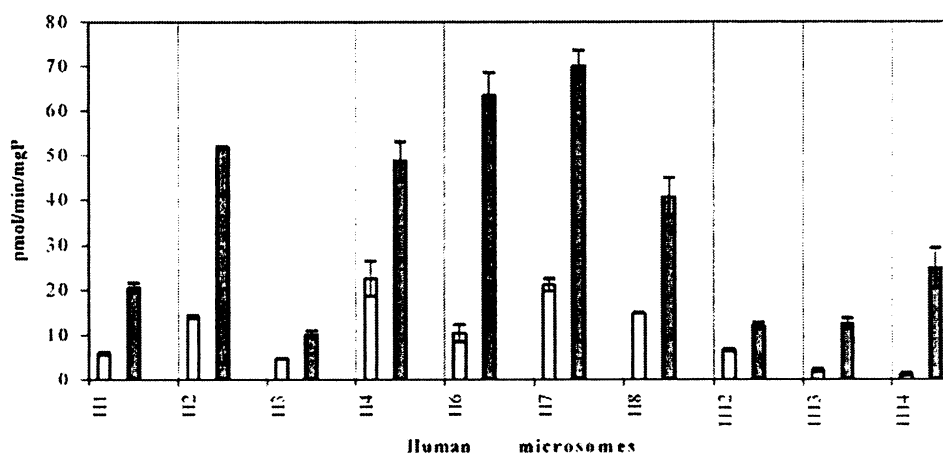


Table 2 Kinetic rate constants of paclitaxel oxidation in rat and human liver microsomes ($n=3$). Substrate concentrations used for paclitaxel oxidation were 2.5–25 μ M. Results are presented as means \pm SD

| Microsomes | Enzyme reaction | CYP catalysts | K_m (μ M) | V_{max} * | V_{max}/K_m |
|------------------|---------------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|
| Untreated rats | C3'-hydroxylation | CYP 3A1/2 | 16.1 \pm 2.4 | 19.7 \pm 11.7 | 1.2 |
| PCN-treated rats | C3'-hydroxylation | CYP 3A1/2 | 24.5 \pm 4.3 | 184.5 \pm 11.1 | 7.5 |
| | C2-hydroxylation | CYP 3A1/2 | 32.6 \pm 13.5 | 40.2 \pm 11.1 | 1.2 |
| | Unknown hydroxylation | CYP 3A1/2 | 17.1 \pm 4.5 | 26.4 \pm 5.8 | 1.5 |
| Humans | C3'-hydroxylation | CYP 3A4 | 19.9 \pm 1.9 | 14.3 \pm 1.9 | 0.7 |
| | 6 α -hydroxylation | CYP 2C8 | 9.3 \pm 4.7 | 60.9 \pm 39.7 | 6.5 |

* V_{max} in pmol/min/mg of mg microsomal protein

Kinetic parameters

The formation of various paclitaxel metabolites in rat and human microsomes mostly obeyed the Michaelis-Menten kinetics, as documented in the Lineweaver-Burk plots (data not shown). The kinetic characteristics, K_m (Michaelis constant) and V_{max} (maximum velocity) for paclitaxel oxidation are displayed in Table 2 and results of typical experiments may be seen in Fig. 4A, B.

Chemical inhibition studies

Significant inhibition of the formation of paclitaxel metabolites in rat and human microsomes by some phenolic antioxidants is shown in Fig. 5A, B. The data indicate marked differences in the effects of the tested phenolic compounds.

In rat microsomes, where CYP3A1/2 are apparently the only CYP enzymes metabolising paclitaxel, resveratrol proved to be the most efficient inhibitor of paclitaxel metabolism (Fig. 5A), whereas fisetin exerted significant inhibition only at higher, pharmacologically hardly relevant concentrations (data not shown).

In human microsomes, where CYP3A4 and CYP2C8 take part in paclitaxel oxidation, phenolic antioxidants influenced particularly the formation of 6 α -OHP, catalysed by CYP2C8. Fisetin, morin, quercetin and resveratrol were

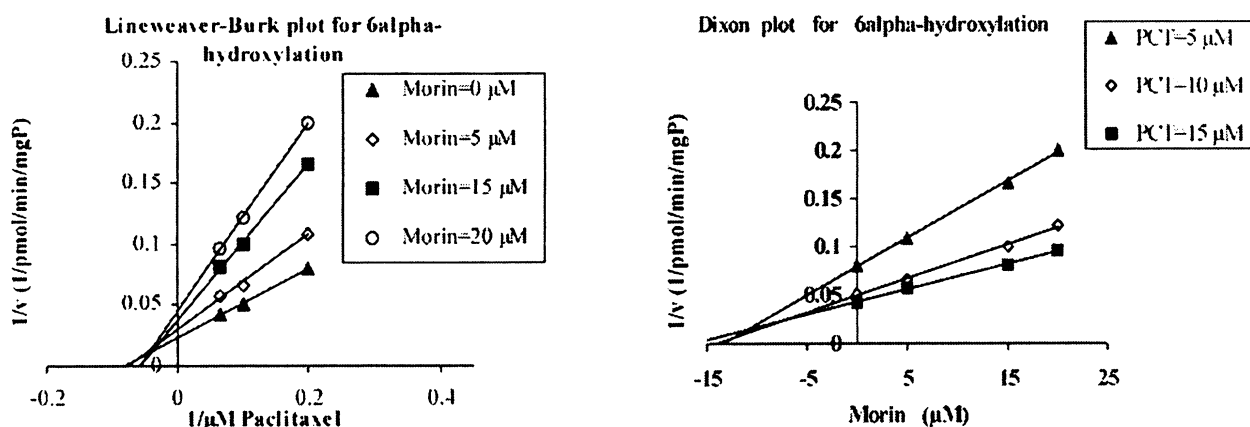
the effective inhibitors, naringenin was a mild inhibitor and the other phenolic antioxidants were not inhibitory. The production of C3'-OHP was influenced less, being inhibited by resveratrol, less by morin (Fig. 5B), whereas fisetin exerted a mild inhibition at 40 μ M concentration only (data not shown).

For those phenolic antioxidants, which exerted significant inhibition, IC_{50} values and K_i constants and the type of inhibition were also established (Table 3). The strong inhibition of the formation of 6 α -OHP by morin, fisetin (not characterised before) was of particular interest, since it is the main metabolite of paclitaxel in humans (Fig. 4A, B).

Discussion

Paclitaxel is an important recently introduced anti-neoplastic agent. A detailed knowledge of its human metabolism and of the enzymes involved may help to understand individual differences in response to treatment, rat metabolism being useful in understanding the effects of modulation of paclitaxel metabolism under in vivo conditions. Previous studies showed the role of CYP2C8 and CYP3A4 in enzyme-catalysed human metabolism of paclitaxel (Creteil et al. 1994; Rahman et al. 1994; Harris et al. 1994a) and CYP3A1/2 in that of the rat (Anderson et al. 1995; Walle et al. 1993).

A) Inhibition by morin



B) Inhibition by fisetin

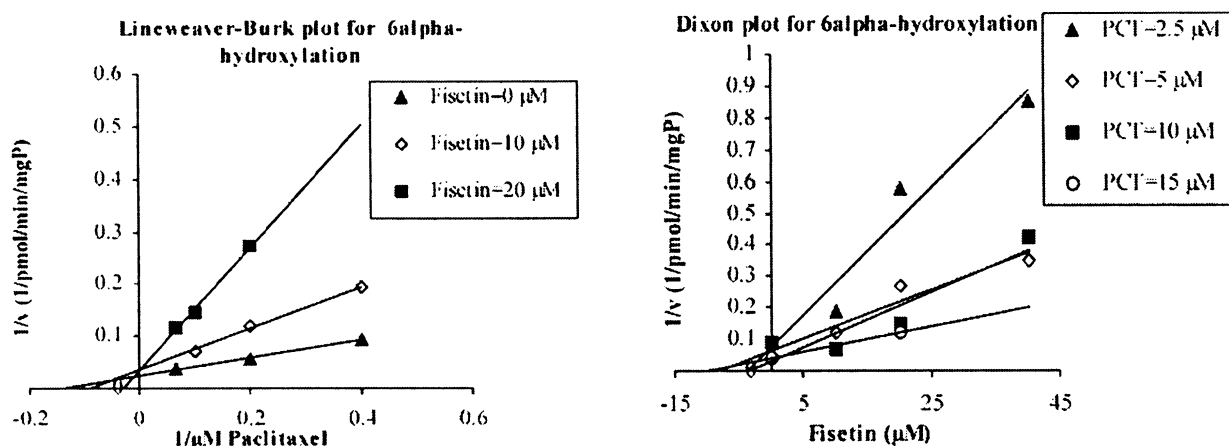


Fig. 4 Effect of **A** morin and **B** fisetin on 6 α -hydroxylation of paclitaxel by human liver microsomes. Inhibition experiments were performed as detailed in Materials and methods. Results are the mean of individual experiments ($n=2$). The estimated K_i values were determined with Dixon Plot analysis using Microsoft Excel to fit the curves using linear regression. Types of inhibition were determined with Lineweaver-Burk Plot analysis using Microsoft Excel to fit curves using linear regression

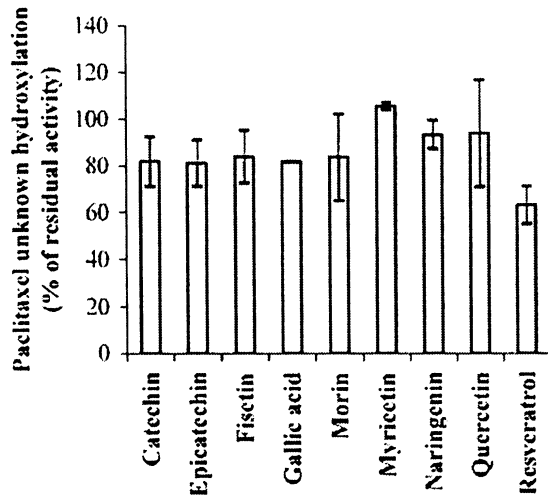
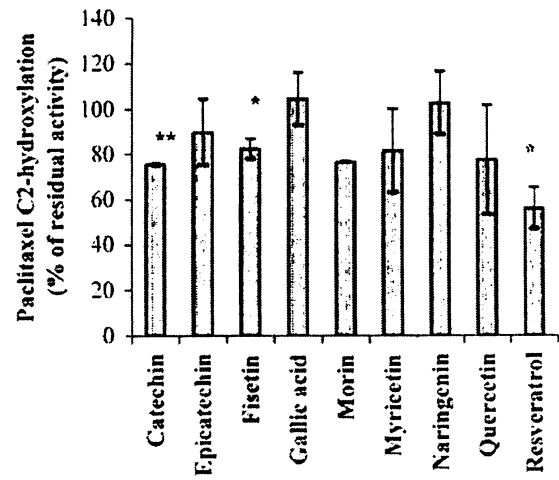
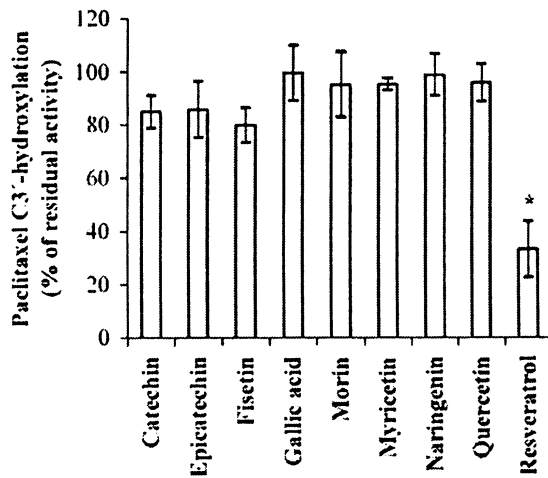
In vitro and in vivo studies revealed 6 α -OHP as the major human metabolite of paclitaxel, while C3'-OHP (Cresteil et al. 1994; Rahman et al. 1994) was a minor product which was formed in human liver microsomes and slices at about a 5-fold lower rate, and di-OHP even at a 15- to 20-fold lesser one, with the two OH groups apparently in the C6 α and C3' positions (Harris et al. 1994a). Sonnichsen et al. (1995) reported that in some human microsomes more C3'-OHP than 6 α -OHP was formed, apparently due to relative CYP3A4/CYP2C8 expression. Other metabolites of paclitaxel were detected only in the bile, blood, urine or faeces in vivo (Monsarrat

et al. 1998). Our data support the data, that the ratio between 6 α -OHP and C3'-OHP varies significantly, but, in our liver microsomes from different human individuals, 6 α -OHP was invariably the main metabolite, C3'-OHP was second, and C2-OHP and another so far unidentified metabolite whose RT markedly differed from our rat di-OHP, were minor products.

In previous in vitro rat microsomal studies with paclitaxel, C3'-OHP was the main metabolite, and C2-OHP was a minor product (Anderson et al. 1995; Walle et al. 1993). We have shown, however, that rat microsomes form di-OHP and another hydroxypaclitaxel, both characterised by MS/MS. The position of the hydroxyl group in the new metabolite is now under study on the basis of a bulky incubation and characterisation by NMR. The metabolite has a RT (80.4 \pm 0.15%), which has close, yet reproducibly different RT from the human 6 α -OHP metabolite (79.5 \pm 0.15%) in at least 40 experiments.

Our previous study with rat microsomes co-incubated with paclitaxel and P388d1 or HeLa cells suggested that CYP2E1 might be involved in paclitaxel metabolism,

A) Rat microsomes



B) Human microsomes

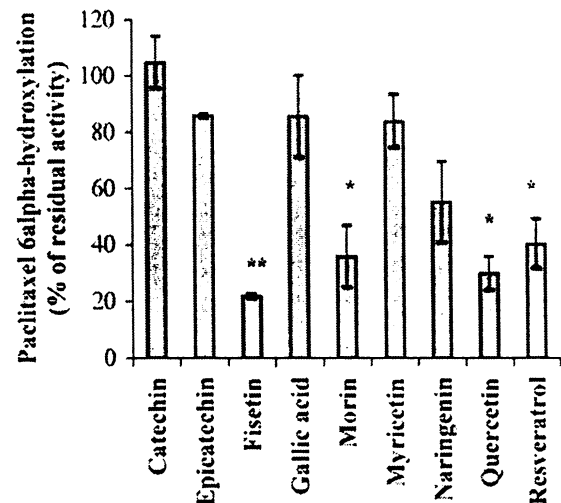
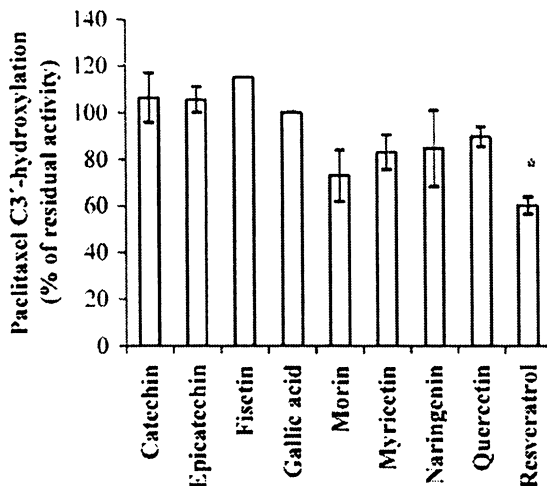


Fig. 5 Effect of phenolic antioxidants on the formation of paclitaxel metabolites in PCN-treated A rat liver microsomes and B human liver microsomes. Paclitaxel concentration was 10 μ M, concentration of phenolic antioxidants was 30 μ M. Inhibition experiments were performed as detailed in Materials and methods. Data

are expressed as the percentage of remaining activity relative to control incubate and are means \pm SD of individual experiments ($n \geq 2$) with pooled samples from rat and human livers. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ for Student's t -tests

Table 3 Characterisation of inhibited paclitaxel oxidation by phenolic antioxidants in human liver microsomes and by resveratrol in PCN-treated rat liver microsomes ($n \geq 2$). Phenolic antioxidants concentrations were 0–40 μM . Paclitaxel concentration was 0–15 μM in all cases

| Inhibitor | Source of microsomes | Inhibited reaction of paclitaxel | Type of inhibition | IC ₅₀ (μM) | K _i (μM) |
|-------------|----------------------|----------------------------------|--------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| Fisetin | Human | 6 α -hydroxylation | Mixed | 10.8 \pm 2.2 | 1.3–6.0 |
| Morin | Human | 6 α -hydroxylation | Mixed | 17.3 \pm 2.4 | 7.3–12.3 |
| Quercetin | Human | 6 α -hydroxylation | Mixed | 15.9 \pm 1.3 | 4.0–13.0 |
| Resveratrol | PCN-treated rat | C3'-hydroxylation | Mixed | 18.7 \pm 2.8 | 12.2–16.3 |
| | | C2-hydroxylation | Uncompetitive | 26.3 \pm 6.5 | |
| | | Unknown hydroxylation | Mixed | 27.2 \pm 2.1 | 9.8–15.7 |
| | Human | 6 α -hydroxylation | Mixed | 26.5 \pm 2.0 | 16.5–20.7 |
| | | C3'-hydroxylation | — ^a | 28.5 \pm 4.6 | — ^a |

^aBecause of limited inhibition, kinetic characterisation was not performed

since uninduced microsomes did not change the effect of the drug, whereas CYP2E1-induced microsomes increased its cytotoxicity. Co-incubation with CYP3A1/2-induced microsomes obviously decreased its cytotoxicity (Gut et al. 2000), since CYP3A1/2 is the main rat enzyme in paclitaxel oxidation (Anderson et al. 1995; Walle et al. 1993), which generally gives less active products. A several-fold higher rate of paclitaxel metabolism in CYP3A1/2-induced microsomes enabled a reliable characterisation of the unknown metabolite as hydroxypaclitaxel by MS and to perform a kinetic analysis of the minor metabolites. The kinetic behaviour mostly appeared to follow the Michaelis-Menten kinetics. In human microsomes, K_m for 6 α -OHP formation (by CYP2C8) was 9.34 \pm 4.72 μM , i.e. significantly less than for other paclitaxel metabolites. For a marked variability, K_m of C2-hydroxylation (32.62 \pm 13.51 μM) was less reliable.

The observation that paclitaxel metabolites have markedly lower therapeutic potency suggests that inhibition of paclitaxel metabolism could increase the effects of the drug. Natural phenolics seem to be potentially useful chemicals, since they exert anti-neoplastic effects of their own and were shown to inhibit, among others, CYP2C8 (Rahman et al. 1994; Harris et al. 1994a, 1994b) and CYP3A4 activity (Guengerich and Kim 1990). The published data (Harris et al. 1994a) enabled calculations of IC₅₀ for the inhibition of 6 α -OHP formation in human liver microsomes for quercetin (9 μM) and kaempferol (9 μM), while IC₅₀ for naringenin was reached at unrealistically high concentrations.

In our study, resveratrol inhibited the oxidation of paclitaxel in rat and human liver microsomes, inhibiting both 6 α -OHP and C3'-OHP formation in the latter. Harris et al. (1994a) presented data on the inhibition of 6 α -OHP production by quercetin, which could be used to estimate IC₅₀ as being 9 μM and Rahman et al. (1994) reported 1.1 to 1.3 μM K_i for quercetin, but we observed an IC₅₀ of 15.90 \pm 1.32 μM for quercetin. Harris et al. (1994a) used up to 2% ethanol in the incubation, but Busby et al. (1999) reported significant inhibition of CYP3A4 by 3% ethanol and Palamanda et al. (2000) observed 50–60% inhibition of CYP2C9 at 1–2% ethanol. We found significant concentration-related inhibition of paclitaxel metabolism by

0.5–2% ethanol (v/v, i.e., 0.4–1.6% w/v), and even this level would be irrelevant in vivo. Ethanol might have contributed to the low K_i reported in the literature. The use of organic solvents poses significant interpretation problems. Although ethanol is used in paclitaxel and docetaxel infusion mixtures, its concentration then reached in vivo is below 0.05%, even if metabolism and elimination is not considered. The use of up to 2% ethanol in the in vitro incubations is meaningless, since most humans would not survive even 5-fold lower concentrations. Moreover, 2% ethanol can dissolve hydrophobic chemicals at levels unattainable without it – for example, 100 μM quercetin requires 90°C to be dissolved in water, yet 50 μM quercetin was studied in inhibition of paclitaxel oxidation (Kumar et al. 1994; Harris et al. 1994a). Moreover, up to 200 μM paclitaxel was reportedly used (Rahman et al. 1994), but our detailed investigation proved that, without ethanol or methanol, paclitaxel concentration above 10 μM could not be reached in water, and the addition of higher levels of paclitaxel resulted in lower absolute levels, since the drug was apparently precipitated. These questions are mostly not properly addressed in some in vitro studies. We therefore used up to 0.2% concentration of methanol, although it did not inhibit paclitaxel metabolism at up to 1% concentration. Ethanol seemed unsuitable for the above reasons. Moreover, of the commonly used solvents, methanol is most similar to water.

In the present study, we investigated the role of the structure of phenolic antioxidants. The CYP3A-produced C3'-OHP, C2-OHP and di-OHP metabolites in rat and human microsomes were markedly inhibited by resveratrol, whereas flavonoids were less effective. Among the flavonoids, only 40 μM flavonol fisetin inhibited paclitaxel metabolism in rat microsomes and C3'-OHP formation in human microsomes, whereas the flavonols quercetin and myricetin, flavanone naringenin and flavanols catechin and epicatechin, were not significantly inhibitory. The CYP2C8-produced 6 α -OHP was significantly inhibited by the stilbene resveratrol and particularly by flavonols fisetin, quercetin and morin. Apparently, flavonoids lacking C2–C3 double bond, OH group at C3 of the C ring (naringenin) and oxo group on C4 of B ring (catechin and epicatechin) were not significantly inhibiting at the rele-

vant concentrations we have used. Flavonols possessing these structural characteristics exerted significant inhibition. The hexaflavonol myricetin with a OH group at C5' of the B ring which the other flavonols do not have, exerted only slight inhibition of paclitaxel metabolism. This result indicates that this hydroxyl could diminish the inhibitory effects of phenolic antioxidants on the activity of human CYP2C8.

These structural requirements for the inhibition of paclitaxel metabolism mostly resemble those required for the inhibition of CYP1A1/2 activities by flavonoids, where the C2–C3 double bond, a OH group at C3 of the C ring (naringenin) and an oxo group on C4 of B ring were prerequisites for the most efficient inhibitors (Moon et al. 1998; Tsyrllov et al. 1997). There is still the question, whether the inhibition of CYP activity might be due to phenolic antioxidant binding to the CYP active site(s). In a study to follow we are investigating this hypothesis with the use of CYP-CYP reductase bicistronic system (Parikh et al. 1997), which should decrease possible interference of other unknown factors related to the use of the rather complex microsomal system.

Additional investigation will be needed to determine whether these phenolic antioxidants can influence CYP-catalysed metabolism of paclitaxel in vivo. These studies are important, since many phenolic antioxidants are naturally occurring constituents of the human diet and possess interesting anti-tumour properties of their own.

In conclusion, the study

1. Revealed new microsomal metabolites of paclitaxel, specifically di-OHP and an unknown hydroxypaclitaxel in rats, which were specified by MS, and C2-OHP and another metabolite of paclitaxel in humans
2. Determined the inhibition of paclitaxel metabolism by some flavonoids and the stilbene resveratrol and their K_i values
3. Indicated the structural requirements for their inhibiting properties

Acknowledgements This work was supported by grant IGA NL/6715–3 and NL/7567–3. All the experiments complied with the current laws of the Czech Republic.

References

- Anderson CD, Wang J, Kumar GN, McMillan JM, Walle UK, Walle T (1995) Dexamethasone induction of taxol metabolism in the rat. *Drug Metab Dispos* 23:1286–1290
- Aoudjit F, Vuori K (2001) Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* 20:4995–5004
- Buening MK, Chang RL, Huang M-T, Fortner JG, Wood AW, Conney AH (1981) Activation and inhibition of benzo(a)pyrene and Aflatoxin B₁ metabolism in human liver microsomes by naturally occurring flavonoids. *Cancer Res* 41:67–72
- Busby WF Jr, Ackermann JM, Crespi CL (1999) Effect of methanol, ethanol, dimethylsulfoxide, and acetonitrile on activities of cDNA-expressed human cytochromes P-450. *Drug Metab Dispos* 27:246–249
- Cresteil T, Monsarrat B, Alvinerie P, Tréluyer JM, Vieira I, Wright M (1994) Taxol metabolism by human liver microsomes: identification of cytochromes P450 isozymes involved in its biotransformation. *Cancer Res* 54:386–392
- Dai R, Jacobson KA, Robinson RC, Friedman FK (1997) Differential effects of flavonoids on testosterone-metabolizing cytochrome P450s. *Life Sci* 61:75–80
- Dantzig AH, Law KL, Cao J, Starling JJ (2001) Reversal of multidrug resistance by the P-glycoprotein modulator, LY335979, from the bench to the clinic. *Curr Med Chem* 8:39–50
- Desai P, Zhu Y, Duan J, Kouzi S (1996) Interspecies variation in paclitaxel metabolism in rat, guinea pig, dog, monkey and human. 7th North American ISSX Meeting, San Diego, California
- De Santi C, Pietrabissa A, Spisni R, Mosca F, Pacifici GM (2000) Sulphation of resveratrol, a natural compound present in wine, and its inhibition by natural flavonoids. *Xenobiotica* 30:857–866
- Fan W (1999) Possible mechanisms of paclitaxel-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol* 57:1215–1221
- Guengerich FP, Kim DH (1990) In vitro inhibition of dihydropyridine oxidation and aflatoxin B₁ activation in human liver microsomes by naringenin and other flavonoids. *Carcinogenesis* 11:2275–2279
- Gut I, Terelius Y, Frantík E, Linhart I, Souček P, Filipcová B, Klučková H (1993) Exposure to various benzene derivatives differently induces cytochromes P450 2B1 and P450 2E1 in rat liver. *Arch Toxicol* 67:237–243
- Gut I, Danielová V, Holubová J, Souček P, Klučková H (2000) Cytotoxicity of cyclophosphamide, paclitaxel, and docetaxel for tumor cell lines in vitro: effects of concentration, time and cytochrome P450-catalyzed metabolism. *Arch Toxicol* 74:437–446
- Harris JW, Rahman A, Kim B-R, Guengerich FP, Collins JM (1994a) Metabolism of Taxol by human hepatic microsomes and liver slices: participation of cytochrome P450 3A4 and an unknown P450 enzyme. *Cancer Res* 54:4026–4035
- Harris JW, Katki A, Anderson LW, Chmurny GN, Paukstelis JV, Collins JM (1994b) Isolation, structural determination, and biological activity of 6 α -hydroxytaxol, the principal human metabolite of Taxol. *J Med Chem* 37:706–709
- Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB (1992) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. *J Agric Food Chem* 40:2379–2383
- Hertog MGL, Hollman PCH, van de Putte B (1993) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *J Agric Food Chem* 41:1242–1246
- Klener P (1995) [Taxanes – a new group of anticancer chemotherapeutic agents] (in Czech). *Remedia* 5:154–160
- Kumar GN, Walle UK, Walle T (1994) Cytochrome P450 3A-mediated human liver microsomal taxol 6 α -hydroxylation. *J Pharm Exp Ther* 268:1160–1165
- Kyu-Ho HE, Gehrke L, Tahir SK, Credo RB, Cherian SP, Sham H, Rosenberg NGS (2000) Modulation of drug resistance by alpha-tubulin in paclitaxel-resistant human lung cancer cell lines. *Eur J Cancer* 36:1565–1571
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Matějková Š, Gut I (2000) [Food phenolics as protective compounds against atherosclerosis] (in Czech). *Remedia* 10:272–281
- Monsarrat B, Mariel E, Cros S, Garés M, Guénard D, Gueritte-Voegelein F, Wright M (1990) Isolation and identification of three major metabolites of Taxol in rat bile. *Drug Metab Dispos* 18:895–901
- Monsarrat B, Alvinerie P, Wright M, Dubois J, Gueritte-Voegelein F, Guénard D, Donehower RC, Rowinsky EK (1993) Hepatic metabolism and biliary excretion of taxol in rats and humans. *J Natl Cancer Inst Monogr* 15:39–46

- Monsarrat B, Chtelut E, Royer I, Alvinerie P, Dubois J, Dezeuse A, Roche H, Cros S, Wright M, Canal P (1998) Modification of paclitaxel metabolism in a cancer patient by induction of cytochrome P450 3A4. *Drug Metab Dispos* 26:229–233
- Moon J-Y, Lee D-W, Park K-H (1998) Inhibition of 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity in rat liver microsomes by naturally occurring flavonoids: structure-activity relationships. *Xenobiotica* 28:117–126
- Nedelcheva V, Gut I, Soucek P, Frantik E (1998) Cytochrome P450 catalyzed oxidation of monochlorobenzene, 1,2- and 1,4-dichlorobenzene in rat, mouse and human liver microsomes. *Chem Biol Interact* 115:53–70
- Nedelcheva V, Gut I, Soucek P, Tichavská B, Tynkova L, Mraz J, Guengerich FP, Ingelman-Sundberg M (1999) Metabolism of benzene in human liver microsomes: individual variations in relation to CYP2E1 expression. *Arch Toxicol* 73:33–40
- Obermeier M, White RE, Yang CS (1995) Effects of bioflavonoids on hepatic P450 activities. *Xenobiotica* 25:575–584
- Omura T, Sato R (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes: evidence for its haemoproteine nature. *J Biol Chem* 239:2370–2378
- Palamanda J, Feng W-W, Lin C-C, Nomeir AA (2000) Stimulation of tolbutamide hydroxylation by acetone and acetonitrile in human liver microsomes and in a cytochrome P-450 2C9-reconstituted system. *Drug Metab Dispos* 28:38–43
- Parikh A, Gillam EMJ, Guengerich FP (1997) Drug metabolism by *Escherichia coli* expressing human cytochrome P450. *Nat Biotechnol* 15:784–788
- Rahman A, Korzekwa KR, Grogan J, Gonzalez J, Harris JW (1994) Selective biotransformation of Taxol to 6 α -hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8. *Cancer Res* 54:5543–5546
- Rowinsky EK, Onetto N, Canetta RM, Arbuck SG (1992) Taxol: the first of the taxanes, an important new class of antitumor agents. *Semin Oncol* 19:646–662
- Schiff PB, Fant J, Horwitz SB (1979) Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 22:665–667
- Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM (1997) Wine is a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J Clin Lab Anal* 11:287–313
- Sonnichsen DS, Liu Q, Schuetz EG, Schuetz JD, Pappo A, Relling MV (1995) Variability in human cytochrome P450 paclitaxel metabolism. *J Pharm Exp Ther* 275:566–575
- Spencer MC, Faulds D (1994) Paclitaxel: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the treatment of cancer. *Drugs* 48:795–845
- Tsyrolov IB, Mikhailenko VM, Gelboin HV (1994) Isozyme- and species-specific susceptibility of cDNA-expressed CYP1A P-450s to different flavonoids. *Biochim Biophys Acta* 1205:325–335
- Walle T (1996) Assays of CYP2C5- and CYP3A4-mediated metabolism of Taxol in vivo and in vitro. In: Johnson EF, Waterman MR (eds) *Methods in enzymology*. Academic, New York, p 145
- Walle T, Kumar GN, McMillan JM, Thornburg KR, Walle UK (1993) Taxol metabolism in rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 46:1661–1664
- Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT (1971) Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of Taxol, a novel antileucemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* 93:2325–2327
- Zhai S, Dai R, Friedman FK, Vestal RE (1998) Comparative inhibition of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids. *Drug Metab Dispos* 26:989–992

Příloha II

Václavíková R., Horský S. and Gut I.:

New in vitro metabolites of paclitaxel in humans, rats, minipigs
and regular pigs and CYP involved in their formation.

In: *Cytochrome P450, Biochemistry, Biophysics and Drug
Metabolism* (Anzenbacher P. and Hudeček J., eds.), pp.

Monduzzi Editore, Bologna, 2003.

New In Vitro Metabolites of Paclitaxel in Humans, Rats, Minipigs and Regular Pigs

R. Václavíková, S. Horský and I. Gut

*National Institute of Public Health,
Center of Occupational Diseases, Prague 10, Czech Republic*

Summary

We investigated in vitro interspecies variability in the metabolism of important anticancer drug paclitaxel. In the rat microsomes, paclitaxel was metabolized mainly to C3'-hydroxypaclitaxel (C3'-OHP), C2-hydroxypaclitaxel (C2-OHP), di-hydroxypaclitaxel (di-OHP) and an unknown hydroxypaclitaxel. In the minipig microsomes, this unknown hydroxypaclitaxel was the main metabolite, whereas C3'-OHP and C2-OHP were minor products; in the regular pig microsomes, the same metabolic pattern was demonstrated. In human liver microsomes 6 α -hydroxypaclitaxel (6 α -OHP) was the main metabolite, followed by C3'-OHP, C2-OHP and two other metabolites not yet fully characterized.

Introduction

Paclitaxel (Taxol®) is an important recently introduced antineoplastic drug. It is used in the therapy of breast and ovarian cancer [1]. Paclitaxel is mainly eliminated by the hepatobiliary route [2]. Rat liver microsomes and hepatocytes hydroxylated paclitaxel to C3'-OHP, less to C2-OHP, deacetylpaclitaxel and deacetylated C2-OHP [3,4]. Nine metabolites were detected *in vivo* in the rat bile and C3'-OHP, C2-OHP and baccatin III were identified [2]. In rats, the hydroxylated metabolites are produced by CYP3A1/2 [3,4]. *In vitro*, human liver microsomes metabolized paclitaxel mainly to 6 α -OHP and less to C3'-OHP and di-OHP [5,6]. *In vivo* these and several other metabolites were detected in the bile, urine and plasma of patients, while 10-deacetylpaclitaxel and 10-deacetylbaccatin III and baccatin III were identified [7]. 6 α -OHP is formed by human liver CYP2C8 [5]. C3'-OHP is produced by CYP3A4 [5,6].

This study investigated *in vitro* microsomal paclitaxel metabolic differences in minipigs, regular pigs, humans and rats. It seemed of particular interest, since metabolism in pigs supposedly resemble closely that of humans and pig livers have been even considered future candidates for human transplantation.

Materials and Methods

Microsomes from male Wistar rats (weight 280-300g) were prepared by homogenization and differential centrifugation as described in detail before [8]. Specific induction of CYP2E1 by benzene inhalation and that of CYP3A1/2 by pregnenolon 16 α -carbonitrile pretreatment in rats and immunochemical characterization of the induction was performed as described before [8,9].

Incubations. The incubation mixture included microsomal protein, 1mg/ml, in 150mM KCl/50mM Tris-HCl buffer, pH 7.4 and 10 μ M paclitaxel. The reaction was initiated by adding NADPH-generating system, final concentrations: 1mM NADP; 10mM glucose-6-phosphate; 10mM MgCl₂; 0.5 U/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase. The samples were incubated at 37°C for 30 min in a shaking water bath. For the kinetic assays 2.5 – 25 μ M paclitaxel was used.

Sample preparation and HPLC analysis. Paclitaxel and its metabolites were extracted with 2 x 3.5 ml of ethyl acetate. Extracts were evaporated to dryness under mild nitrogen stream and reconstituted in 200 μ L of the mobile phase (methanol: water, 65:35, v/v) and analyzed by HPLC with flow rate 1.0 ml/min and detection 232 nm. 6 α -OHP and C3'-OHP were identified by MS analysis and by comparison with authentic standards.

Identification of other paclitaxel metabolites by MS/MS. Elution fraction samples were measured by the HPLC-ESI MS method, column Luna 3 μ , C18, 150x1 mm, mobile phase methanol/10 mM ammonium formate (7:3, v:v).

Results and Conclusions

The following products of paclitaxel were obtained (Figure 1). Rats formed primarily C3'-OHP, C2-OHP being quantitatively second and a minor so far unreported di-OHP was also produced. Moreover, rat microsomes metabolized paclitaxel to a so far unreported hydroxypaclitaxel, which was characterized by HPLC-MS. This unknown OHP was quantitatively the third rat metabolite; it was observed in CYP3A1/2-induced as well as in uninduced rat liver microsomes. The minipig and regular pig microsomes produced predominantly (95% of all metabolites) the so far unknown OHP, which was a minor product in rats. C3'-OHP was a minor metabolite in minipigs and both sexes of regular pigs, but C2-

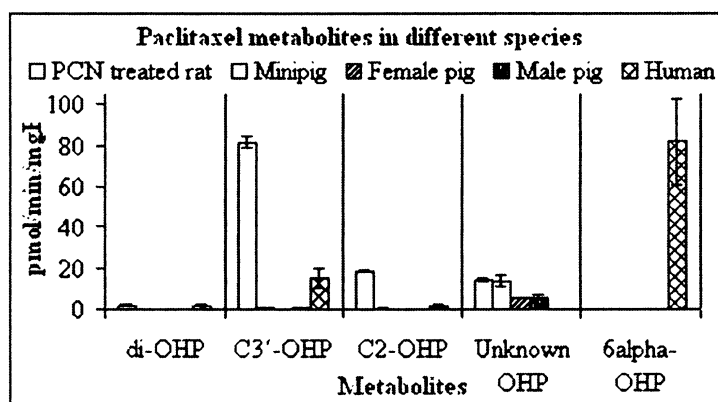


Figure 1: Interspecies variability in the formation of paclitaxel metabolites. Data were means and SD expressed as pmol metabolites in 1 min by 1 mg microsomal protein.

OHP was detected only in minipigs. The overall metabolic rates in minipigs were similar to untreated rats, while regular pigs metabolized paclitaxel at less than half of that. Only in human liver microsomes, 6 α -OHP was formed. The other metabolites were C3'-OHP, C2-OHP and a minor di-OHP, which was previously detected in human microsomes *in vitro* [6]. The kinetic data of the formation of various paclitaxel metabolites in rat, minipig, regular pig and human microsomes, respectively, obeyed the Michaelis-Menten kinetics. The kinetic characteristics, K_m (Michaelis constant) and V_{max} (maximum velocity) for paclitaxel oxidation are displayed in Table 1.

In conclusion, several new hydroxylated metabolites were detected in human, rat, pig and minipig microsomes. It became obvious that despite various similarities between human and pig or minipig metabolism, and even similarities of their CYP3A orthologues, these enzymes form significantly different products of paclitaxel in regular pigs and

Table 1: Kinetic parameters of paclitaxel oxidation in different species. Data are presented as means and SD ($n = 3$).

| Microsomes | Paclitaxel hydroxylation | CYP enzymes | K_m (μM) | V_{max} (pmol/min/mgP) | V_{max}/K_m |
|-------------|--------------------------|-------------|-------------------|--------------------------|---------------|
| PCN rat | C3' | 3A1/2 | 24,5 \pm 4,3 | 184.5 \pm 11.1 | 7.5 |
| | C2 | | 32,6 \pm 13,5 | 40.2 \pm 11.1 | 1.2 |
| | Unknown | | 17,1 \pm 4,5 | 26.4 \pm 5.8 | 1.5 |
| Minipig | Unknown | 3A29 | 14.7 \pm 2.2 | 28.7 \pm 3.9 | 2.0 |
| Regular pig | Unknown | 3A29 | 16.8 \pm 2.7 | 13.5 \pm 2.7 | 0,8 |
| Human | C3' | 3A4 | 19.9 \pm 1.9 | 14.3 \pm 1.9 | 0,7 |
| | 6alpha | 2C8 | 9.3 \pm 4.7 | 60.9 \pm 39.7 | 6,5 |

minipigs in contrast to humans. Moreover, pigs are apparently lacking a CYP2C8 orthologue, which would be able to form the apparently unique human 6 α -OHP metabolite.

Acknowledgements

This work was supported by grants IGA MH CZ, NL/6715-3 and NL 7567-3. The authors are indebted to Dr. P. Šimek (CAS, Ěeské Budjovice) for the identification of paclitaxel metabolites by MS/MS.

References

- [1] ROWINSKY EK, ONETTO N, CANETTA RM, ARBUCK SG, Taxol: the first of the taxanes, an important new class of antitumor agents. *Semin Oncol* 19:646-662, 1992.
- [2] MONSARRAT B, MARIEL E, CROS S, GARÉS M, GUÉNARD D, GUERITTE-VOEGELEIN F, WRIGHT M, Isolation and identification of three major metabolites of taxol in rat bile. *Drug Metab Dispos* 18:895-901, 1990.
- [3] ANDERSON CD, WANG J, KUMAR GN, McMILLAN JM, WALLE UK, WALLE T, Dexamethasone induction of taxol metabolism in the rat. *Drug Metab Dispos* 23:1286-90, 1995.
- [4] WALLE T, KUMAR GN, McMILLAN JM, THORNBURG KR, WALLE UK, Taxol metabolism in rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 46:1661-4, 1993.
- [5] RAHMAN A, KORZEKWA KR, GROGAN J, GONZALEZ J, HARRIS JW, Selective biotransformation of taxol to 6 α -hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8. *Cancer Res* 54:5543-6, 1994.
- [6] HARRIS JW, RAHMAN A, KIM B-R, GUENGERICH FP, COLLINS JM, Metabolism of taxol by human hepatic microsomes and liver slices: Participation of cytochrome P450 3A4 and an unknown P450 enzyme. *Cancer Res* 54:4026-35, 1994.
- [7] MONSARRAT B, CHATELUT E, ROYER I, ALVINERIE P, DUBOIS J, DEZEUSE A, ROCHE H, CROS S, WRIGHT M, CANAL P, Modification of paclitaxel metabolism in a cancer patient by induction of cytochrome P450 3A4. *Drug Metab Dispos* 26:229-33, 1998.
- [8] GUT I, NEDELICHEVA V, SOUČEK P, STOPKA P, VODIČKA P, GELBOIN HV, INGELMAN-SUNDBERG M, The role of CYP2E1 and 2B1 in metabolic activation of benzene derivatives. *Arch Toxicol* 71:45-56, 1996.
- [9] GUT I, DANIELOVÁ V, HOLUBOVÁ J, SOUČEK P, KLUČKOVÁ H, Cytotoxicity of cyclophosphamide, paclitaxel, and docetaxel for tumor cell lines in vitro: effects of concentration, time and cytochrome P450-catalyzed metabolism. *Arch Toxicol* 2000; 74:437-46.

Příloha III

Václavíková R., Souček P., Svobodová L., Anzenbacher P.,

Šimek P., F.P. Guengerich and Gut I.:

Different in vitro metabolism of paclitaxel and docetaxel in
humans, rats, pigs and minipigs.

Drug Metab Dispos **32**: 666-674, 2004.

DIFFERENT IN VITRO METABOLISM OF PACLITAXEL AND DOCETAXEL IN HUMANS, RATS, PIGS, AND MINIPIGS

Radka Vaclavikova, Pavel Soucek, Lenka Svobodova, Pavel Anzenbacher, Petr Simek, F. Peter Guengerich, and Ivan Gut

National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic (R.V., P.S., L.S., I.G.); Medical Faculty, Palacky University, Olomouc, Czech Republic (P.A.); Entomologic Institute of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Ceske Budejovice, Czech Republic (P.S.); and Department of Biochemistry and Toxicology, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee (F.P.G.)

Received November 3, 2003; accepted February 25, 2004

This article is available online at <http://dmd.aspetjournals.org>

ABSTRACT:

We investigated cytochrome P450 (P450)-catalyzed metabolism of the important cancer drugs paclitaxel and docetaxel in rat, pig, minipig, and human liver microsomes and cDNA-expressed P450 enzymes. In rat microsomes, paclitaxel was metabolized mainly to C3'-hydroxy-paclitaxel (C3'-OHP) and to a lesser extent to C2-hydroxy-paclitaxel (C2-OHP), di-hydroxy-paclitaxel (di-OHP), and another unknown monohydroxylated paclitaxel. In pig and minipig microsomes, this unknown hydroxy-paclitaxel was the main metabolite, whereas C3'-OHP was a minor product. In minipigs, C2-OHP was the next minor product. In human liver microsomes, 6 α -hydroxy-paclitaxel (6 α -OHP) was the main metabolite, followed by C3'-OHP and C2-OHP. Among different cDNA-expressed human P450 enzymes (CYP1A2, 1B1, 2A6, 2C9, 2E1, and 3A4), only CYP3A4 enzyme formed C3'-OHP and C2-OHP. Docetaxel was metabolized in pig, minipig, rat, and human liver microsomes

mainly to hydroxydocetaxel (OHDTX), whereas CYP3A-induced rat microsomes produced primarily diastereomeric hydroxyoxazolidinones. Human liver microsomes from 10 different individuals formed OHDTX at different rates correlated with CYP3A4 content. Troleandomycin as a selective inhibitor of CYP3A inhibited the formation of C3'-OHP, C2-OHP, and di-OHP, as well as the unknown OHP produced in rat, minipig, and pig microsomes. In human liver microsomes, troleandomycin inhibited C3'-OHP and C2-OHP formation, and a suitable inhibitor of human CYP2C8, fisetin, strongly inhibited the formation of 6 α -OHP, known to be catalyzed by human CYP2C8. In conclusion, the metabolism of docetaxel is the same in all four species, but metabolism of paclitaxel is different, and 6 α -OHP remains a uniquely human metabolite. Pigs and minipigs compared with each other formed the same metabolites of paclitaxel.

Paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere) are mitotic poisons stimulating polymerization of microtubuli and inhibiting their depolymerization (Spencer and Faulds, 1994). These drugs cause the formation of deformed tubulin structures, e.g., asterisks and stars (Schiff et al., 1979), and induce apoptosis (Fan, 1999; Aoudjit and Vuori, 2001). They have been successfully used in breast, ovarian,

This work was financed by Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic Grants NL/6715-3 and NL/7567-3 (I.G., R.V., S.H., P.S.), U.S. Public Health Service Grants R01 CA90426 and P30 ES00267 (F.P.G.), and Grant Agency of the Czech Republic Grant 203/02/1152 (P.S.).

Citation of meeting abstracts where the work was presented: Vaclaviková R, Horský S, and Gut I (2003) Interspecies variability of paclitaxel metabolism in humans, rats, minipigs and regular pigs, in XXII. Xenobiochemical Symposium, 2003 Jun 9-11, Smolenice, Slovak. Abstract in memorial volume Posters, Section 4, p. 51-52; Vaclaviková R, Horský S, and Gut I (2003) New in vitro metabolites of paclitaxel in humans, rats, minipigs and regular pigs and P450 involved in their formation, at the 13th International Conference on Cytochromes P450, 2003 Jun 29-Jul 3, Prague, Czech Republic. Abstract in *Chemické Listy* 97(6), S188, WP54; Vaclaviková R, Horský S, and Gut I, New in vitro metabolites of paclitaxel in humans, rats, minipigs and regular pigs. Proceedings: Cytochromes P450, Biochemistry, Biophysics and Drug Metabolism, Monduzzi Editore, International Proceedings division, Work Code D629C0043; Vaclaviková R, Svobodová S, Horský S, Šimek P, and Gut I (2003) Poster; Taxanes: antitumor effects and interspecies differences in metabolism. Active presentation of poster in EURO-TOX 2003, Sep 28-Oct 1, Florence, Italy.

and lung cancer therapy (Rowinsky et al., 1992; Huizing et al., 1995; Klener, 1995).

Paclitaxel is metabolized primarily in liver, and its metabolites are excreted in the bile (Monsarrat et al., 1990, 1993). Four metabolites have been identified in rat liver microsomes and hepatocytes, mainly paclitaxel hydroxylated at the phenyl C3' at the side chain of C13 (C3'-OHP¹) and, to a lesser extent, C2-OHP (Walle et al., 1993; Anderson et al., 1995) (Fig. 1). Three other metabolites were found in dexamethasone-treated rats, two of which were identified as deacetylpaclitaxel and deacetylated C2-OHP (Anderson et al., 1995). Nine metabolites were detected in vivo in rat bile, and C3'-OHP, C2-OHP, and baccatin III were identified (Monsarrat et al., 1990). In rats, the hydroxylated metabolites are produced by CYP3A1/2 (Walle et al., 1993; Anderson et al., 1995). In human liver microsomes, three

¹ Abbreviations used are: C3'-OHP, C3'-hydroxy-paclitaxel; P450, cytochrome P450; C2-OHP, C2-hydroxy-paclitaxel; di-OHP, di-hydroxy-paclitaxel; 6 α -OHP, 6 α -hydroxy-paclitaxel; TAO, troleandomycin; PCN, pregnenolon-16 α -carbonitrile; MS, mass spectrometry; MS/MS, tandem MS; t_R, retention time; HPLC, high performance liquid chromatography; NPR, NADP(H)-cytochrome P450 reductase;

Address correspondence to: Radka Vaclavikova, National Institute of Public Health, Srobarova 48, 100 42 Prague 10, Czech Republic. E-mail: rvaclavikova@szu.cz

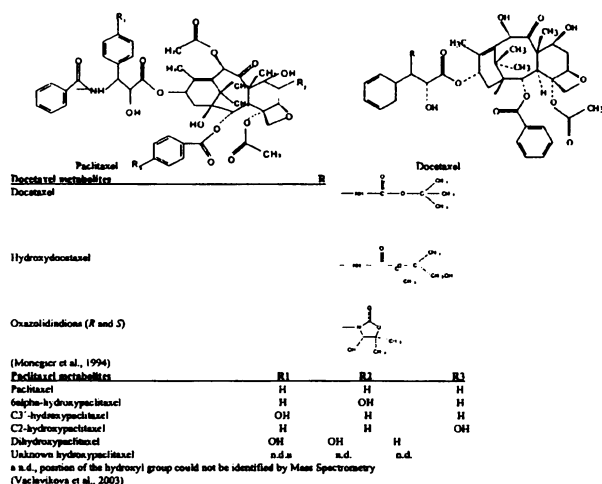


FIG. 1. Chemical structures of paclitaxel, docetaxel, and their metabolites.

metabolites were identified in vitro; 6 α -OHP (with a OH group on the phenyl at C6 of the taxane ring) was the main metabolite, whereas C3'-OHP was formed to a lesser extent (Cresteil et al., 1994; Kumar et al., 1994; Rahman et al., 1994). A minor di-OHP metabolite, formed from 6 α -OHP, was found in human liver slices and microsomes (Harris et al., 1994b). In an in vivo study, these and seven other metabolites were detected in the bile of patients, and 10-deacetylpaclitaxel, 10-deacetylbaccatin III, and baccatin III were also identified (Monsarrat et al., 1998). Six metabolites of paclitaxel were identified in urine and 6 α -OHP, C3'-OHP, di-OHP, and 10-deacetylpaclitaxel were also identified in plasma (Monsarrat et al., 1998). 6 α -OHP is formed by human liver CYP2C8 (Rahman et al., 1994). CYP2C8 also oxidizes other clinically important drugs such as the antidiabetic troglitazone, the antiarrhythmic amiodarone, the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitor cerivastatin, retinoids, and arachidonic acid (Nakajima et al., 2003). C3'-OHP is produced by CYP3A4 (Harris et al., 1994b; Rahman et al., 1994). The formation of di-OHP results from stepwise catalysis by CYP2C8 and CYP3A4 (Harris et al., 1994b). 6 α -OHP was about 30-fold less active than paclitaxel in tumor cell lines in vitro (Harris et al., 1994a), and C3'-OHP, C2-OHP, and baccatin III were also less cytotoxic (Monsarrat et al., 1990). Human CYP1A2, 2E1, 3A4, and 3A5 expressed in *Escherichia coli*, HepG2, or human lymphoblastoid cells catalyzed only C3'-OHP formation (Harris et al., 1994b).

Docetaxel is metabolized to the same products in humans and rats in vitro and in mice, rabbits, and dogs in vivo. The main metabolite formed in vivo is hydroxylated at C13 of the *tert*-butyl side chain. It is further oxidized and cyclized via an unstable aldehyde to two stereomeric hydroxyoxazolidinediones. Hydroxydocetaxel can also be oxidized, via an unstable carboxylic acid, to oxazolidinedione (Marre et al., 1996; Royer et al., 1996; Monsarrat et al., 1997). CYP3A4/5 dominates human metabolism of docetaxel (Shou et al., 1998), indicating that their different individual expression might result in different metabolism of docetaxel among individuals.

We investigated in vitro metabolism of paclitaxel and docetaxel in pig and minipig microsomes in comparison with humans and rats. Metabolism of taxanes has not yet been investigated in pigs or minipigs. The aim was to determine whether pigs metabolize paclitaxel and docetaxel in a similar way and whether their metabolism resembles that in humans, who had been considered the only species to form 6 α -OHP. Minipigs and pigs might be suitable experimental animals to predict metabolic pathways in humans, because the most important human P450 isoform (CYP3A) has ortholog isoform

present in minipigs at comparable levels and activities, and there is no need to induce P450 enzyme levels (Anzenbacher et al., 1998). Moreover, CYP3A29 has been identified in the pig according to European Molecular Biology Laboratory/GenBank/DNA Data Bank of Japan databank submissions (Jurima-Romet et al., 2000) as an ortholog of human CYP3A4. Furthermore, metabolism in pigs supposedly closely resembles that of humans, and pig livers have even been considered future candidates for human transplantation.

Materials and Methods

Chemicals. Paclitaxel was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland); 6 α -OHP was purchased from BD Gentest (Woburn, MA). C3'-OHP, pregnenolon-16 α -carbonitrile (PCN), and fisetin were from Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Germany). Docetaxel, hydroxydocetaxel, two stereomeric hydroxyoxazolidinediones, oxazolidinedione, and 7-epidocetaxel were generous gifts of Aventis (Strasbourg, France).

Preparation and Characterization of Microsomes. Male Wistar SPF rats, purchased from VELAZ (Prague, Czech Republic) (weight 280–300 g), were kept on a pellet diet and tap water ad libitum 1 week before experiments. For induction of CYP3A1/2, PCN was given in five intragastric intubations, 25 mg/kg in olive oil, in 12-h intervals during 3 days. Animals were killed 24 h after the last PCN dose, giving high CYP3A1/2 induction as described before (Nedelcheva et al., 1998). They were euthanized by decapitation, and livers were rapidly excised and chilled in ice-cold physiological saline and homogenized in an ice-cold solution of 150 mM KCl/50 mM Tris-HCl, pH 7.4. Human liver samples were obtained from transplantation donors in accordance with Czech law. Livers were collected from 10 male organ donors with unknown drug history who had died from head injury (gun shot, traffic accidents) at the age of 16 to 42 years. During the heart or kidney transplantation procedure, the liver samples were excised and immediately frozen and then maintained in liquid nitrogen. The time period between the beginning of blood exchange and freezing the liver in liquid nitrogen was 9 to 46 min; this period, as well as age, did not correlate with various P450 activities and immunochemical levels (Nedelcheva et al., 1999). These liver samples were homogenized in the same way as the rat livers. Untreated castrated male minipigs (Brno White variety of Goettingen minipig; Research Institute of Veterinary Medicine, Brno, Czech Republic) weighing 22 to 31 kg and 6 months old, were kept in a breeding facility of The Palacky University (Olomouc, Czech Republic). Untreated castrated male pigs and female pigs (Czech Markedly Fleishy breed) were obtained from Slaughter House Cesky Brod (Cesky Brod, Czech Republic) and the Research Institute of Animal Production (Prague-Uhrineves, Czech Republic). All pigs were fed regular commercial pig food. The livers from pigs and minipigs were obtained 10 min after electrocution, followed by exsanguination. Microsomes were prepared by differential centrifugation as described previously (Gut et al., 1993). P450 concentration was estimated according to the method of Omura and Sato (1964). The concentration of microsomal protein was determined according to the method of Lowry et al. (1951), with bovine serum albumin as standard. Specific induction of CYP3A1/2 in rats by pregnenolone 16 α -carbonitrile pretreatment (inducing higher levels than dexamethasone) was immunochemically characterized as described previously (Nedelcheva et al., 1998; Gut et al., 2000). Specific P450 contents are shown in Table 1.

Incubations. The incubation mixture included 150 mM KCl/50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 1 mg/ml microsomal protein, and 10 μ M paclitaxel or docetaxel, added as 10 mM solutions in methanol (up to 0.1% v/v). Even a 1% concentration of methanol did not inhibit metabolism of paclitaxel or docetaxel in our experiments (data not shown). Selection of a 10 μ M concentration was related to K_m values reported and observed by us, and these levels are close to C_{max} levels during infusion. Samples with microsomes from different species were incubated at the same time in several experiments to exclude interexperiment variability. The reaction was initiated by adding an NADPH-generating system (final concentrations 1 mM NADP, 10 mM glucose 6-phosphate, 10 mM MgCl₂, 0.5 U/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase). The samples were incubated at 37°C for 30 min in a shaking water bath. The incubation was stopped by chilling the samples and immediate extraction with ethyl acetate. Control samples were incubated in the absence of the NADPH-generating system.

TABLE 1
P450-specific contents in liver microsomes from different species

| P450-Specific Content | | | | | |
|--------------------------------|----------------------------|--------------------|--------------------------|------------------------|-------------------|
| Untreated rat (n = 5) | PCN-Treated Rat (n = 5) | Minipig (n = 2) | Pig (Females) (n = 3) | Pig (Males) (n = 3) | Human (n = 10) |
| <i>nmol P450/mg of protein</i> | | | | | |
| 0.39 | 0.95–1.16 | 0.23 | 0.39–0.44 | 0.36–0.50 | 0.13–0.31 |

Metabolite Formation by cDNA-Expressed Human P450 Enzymes. *E. coli* membranes with simultaneously expressed CYP3A4 or several other P450s and NPR [NADP(H)-cytochrome P450 reductase] were used for analysis of paclitaxel metabolism. Plasmids based on the bicistronic system were obtained from F. P. Guengerich (preparation described by Parikh et al., 1997). Samples of 1.0 ml total volume contained CYP3A4-NPR (150 pmol of P450/incubation and NPR at similar levels) with 10 μ M paclitaxel (added as 1 μ l of 10 mM solution in methanol) and were incubated as described above.

Sample Preparation and HPLC Analysis. After the reactions with microsomes and cDNA-expressed CYP3A4, paclitaxel or docetaxel and their metabolites were extracted into distilled ethyl acetate (two times at 3.5 ml). These ethyl acetate extracts were evaporated to dryness under a nitrogen stream. The dry extracts were dissolved in 200 μ l of the mobile phase methanol/water, 65:35 (v/v) for paclitaxel (Creteil et al., 1994). The mobile phase for docetaxel (acetonitrile/methanol/tetrahydrofuran/water, 21:35:2:42) gave better resolution of metabolites than the previously used mixture of acetonitrile/methanol/water (26:32:42) or the previously mentioned mixture of methanol/water, or a mixture of ammonium acetate/acetonitrile (43:57, v/v) (Garg and Ackland, 2000). The HPLC conditions were as follows: HPLC Agilent Series 1100 system with autosampler, 20- μ l sample loop; Macherey-Nagel column (4 \times 250 mm with Nucleosil 10-5 C18), flow rate 1.2 ml/min, detection wavelength 232 nm (paclitaxel) and 230 nm (docetaxel). The data were analyzed by CSW software (Chromatography Station for Windows, version 1.7; DataApex, Prague, Czech Republic). Only products formed in the presence of paclitaxel or docetaxel and NADPH and not present in the absence of either of them were considered as drug metabolites. 6 α -OHP was identified by MS analysis and by comparison with an authentic standard (BD Gentest). C3'-OHP was identified by means of MS and by comparison with authentic standard (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Both these metabolites were quantified according to calibration curves, which were linear in the range of 0.1 to 100 μ M concentrations. Commercial standards are not available for C2-OHP and for the unknown metabolite of paclitaxel; therefore, paclitaxel was used as a standard, assuming an identical molar extinction coefficient, as described in Vaclavikova et al. (2003). Docetaxel metabolites were detected and quantified according to the signal of authentic standard products generously provided by Aventis.

Identification of Other Paclitaxel Metabolites by MS/MS. HPLC elution fractions, representing metabolites of paclitaxel, were collected as defined peaks during HPLC analysis and dried under a nitrogen stream. For analysis by MS, the samples were dissolved in 125 μ l of 10 mM ammonium formate/methanol (1:1), transferred into autosampler vials, and measured using an HPLC-electrospray ionization MS method, with a Luna 3- μ m C18 column, 1 \times 150 mm, mobile phase methanol/10 mM ammonium formate (7:3 v/v). The structures of taxanes and their metabolites are shown in Fig. 1. The characteristics of the respective products of paclitaxel are listed in Table 2.

Enzyme Kinetic Assays. For kinetic assays, 2.5 to 25 μ M paclitaxel or docetaxel concentrations were used. The apparent V_{max} and K_m values were calculated from equations fitting the data in double-reciprocal plots in the program Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA). The H6 human liver microsomal sample, exhibiting the highest enzyme activity, provided the best precision and enabled analysis of all four detectable human metabolites. Microsomes from control and PCN-pretreated rats were used for the same purpose, because of high activity.

Inhibition Studies. Inhibition studies of paclitaxel metabolism were performed in the presence of 20, 30, 60, or 100 μ M troleandomycin (inhibitor of CYP3A) and 30 μ M fisetin (inhibitor of CYP2C8) (Vaclavikova et al., 2003) in the incubation mixtures. Troleandomycin was preincubated for 5 min at 37°C (Nedelcheva et al., 1998) with the microsomes or cDNA-expressed CYP3A4 in the presence of the NADPH-generating system before the addition

of paclitaxel (10 μ M). Fisetin (1 mM stock solution in methanol used to make 30 μ M concentration in the incubation mixture) was added to the tubes, the methanol was evaporated to dryness under a nitrogen stream, and fisetin was redissolved in 150 mM KCl/50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) by sonication at 80°C for 20 min. After the 20-min sonication, fisetin had not lost its activity. The other components of incubation were added subsequently, and the incubations and HPLC analysis were performed as described above. Inhibition studies were not done with docetaxel, because CYP3A enzymes apparently formed all the metabolites studied.

Statistics. Data are presented as means \pm S.D. of the experimental values. Analysis of statistical significance (* p < 0.05 or ** p < 0.01), where appropriate, was performed using a one-sided Student's t test. The p values corresponded to at least two separate determinations.

Results

Microsomal Metabolism of Paclitaxel. The metabolites isolated from incubations with rat liver microsomes were characterized: t_R = 3.16 min, MH + 886.3, di-OHP; t_R = 3.92 min, MH + 870.3, OHP; t_R = 4.73 min, MH + 870.3, OHP; t_R = 5.56 min, MH + 870.3, OHP (which was different from 6 α -OHP and was concluded to be a precursor of di-OHP with the OH position not yet characterized) (Table 2). Rats formed, primarily, C3'-OHP; less, C2-OHP and a minor, previously not reported di-OHP, whose exact positions of hydroxyls could not be identified from MS/MS spectra. C3'-OHP was identified by MS as OHP (t_R = 3.92 min) and by comparison with an authentic standard. C2-OHP was identified as OHP (t_R = 4.73 min) by MS and specifically as C2-OHP, because it was the second most abundant product next to C3'-OHP found in rat liver microsomes (Table 3), in accordance with Walle et al. (1993) and Anderson et al. (1995). HPLC conditions used by Anderson and Walle (1993) are described in the legend for Table 2. Moreover, rat microsomes metabolized paclitaxel to a previously not reported OHP (t_R = 5.56 min), which was characterized by HPLC-MS. This unknown OHP was quantitatively the third most abundant rat metabolite and was observed in CYP3A1/2-induced as well as in uninduced rat liver microsomes (Table 3). This metabolite has a close, but reproducibly different t_R (80.40% \pm 0.15% of paclitaxel) from that of 6 α -OHP found in human microsomes (t_R = 79.55 \pm 0.15% of paclitaxel), and the percentage t_R proved to give higher reproducibility than absolute t_R values in minutes.

6 α -Hydroxypaclitaxel (6 α -OHP), formed as major metabolite in human microsomes, was not formed by microsomes from pigs, minipigs, or rats. The human microsomes from different individuals also formed C3'-OHP and C2-OHP (Table 3).

The pig and minipig microsomes produced predominantly the above-mentioned unknown OHP, which created 95% of all detected products of paclitaxel, whereas it was a minor product in rats. C3'-OHP was a minor metabolite in minipigs and both sexes of pigs; C2-OHP was a minor product, which was detected only in minipigs. The overall metabolic rates in minipigs were higher than in pigs and untreated rats (Table 3).

Kinetic Characterization of Paclitaxel Metabolism. We compared the kinetic parameters of paclitaxel oxidation not previously reported in pig and minipig microsomes with those of human and rat microsomes. The formation of various paclitaxel metabolites in rat,

TABLE 2
Identification and characterization of reported and tentative products of paclitaxel metabolism

| Profiles | Rats | | | | Humans | | | |
|--|---------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|------------------|------------|
| | di-OHP | C3'-OHP | C2-OHP | OHP | C3'-OHP | C2-OHP | 6 α -OHP | Paclitaxel |
| Known products | | | | | | | | |
| Tentative products | | | | | | | | |
| Authentic standard | n.a. | Yes | n.a. | n.a. | Yes | n.a. | Yes | Yes |
| % t_R of paclitaxel ^a | 41 \pm 0.15 | 51.7 \pm 0.2 | 62.8 \pm 0.3 | 80.4 \pm 0.15 | 51.7 \pm 0.2 | 62.8 \pm 0.3 | 79.55 \pm 0.15 | 100 |
| t_R for HPLC-UV ^a (min) | 6.15 | 7.76 | 9.42 | 12.06 | 7.76 | 9.42 | 12.06 | 15 |
| t_R for HPLC-MS ^a (min) | 3.16 | 3.92 | 4.73 | 5.56 | 3.92 | 4.73 | 6.12 | 6.52 |
| MH + HPLC-MS ^a | 886.3 | 870.3 | 870.3 | 870.3 | 870.3 | 870.3 | 870.3 | 854.3 |
| HPLC-MS | di-OHP | C3'-OHP | OHP | OHP | C3'-OHP | OHP | 6 α -OHP | Paclitaxel |
| Order of amount, literature ^b | n.r. | 1 | 2 | n.r. | 2 | 1 | 1 | n.r. |
| Order of amount, our data | 4 | 1 | 2 | 3 | 2 | 3 | 1 | |
| Inference | di-OHP | C3'-OHP | C2-OHP | OHP | C3'-OHP | C2-OHP | 6 α -OHP | Paclitaxel |

n.a., not available; n.r., has not been reported before.

^a Our data.

^b HPLC conditions for detection: rat microsomes, [³H]Taxol HPLC separation, mobile phase 35% acetonitrile, wavelength 229 nm, flow rate 1 ml/min (Walle et al., 1993; Anderson et al., 1995); human microsomes, mobile phase 35% acetonitrile, wavelength 229 nm, flow rate 0.6 ml/min (Kumar et al., 1994), mobile phase methanol/H₂O (65:35), 235 nm, flow rate 1 ml/min (Creteil et al., 1994).

TABLE 3

Variability in the formation of paclitaxel metabolites

Oxidation of paclitaxel was investigated in liver microsomes or in cDNA-expressed CYP3A4. Data are means \pm S.D. ($n = 3$). Boldface indicates that this was the main metabolite described in this study.

| Species | Paclitaxel Metabolites | | | | |
|-----------------------|---------------------------------------|--|-----------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| | di-OHP | C3'-OHP | C2-OHP | 6 α -OHP | Unknown OHP |
| | <i>pmol/min/mg microsomal protein</i> | | | | |
| Untreated rat | 1.0 \pm 0.5 | 3.16 \pm 1.5 | 0.5 \pm 0.2 | * | 1.0 \pm 0.2 |
| Rat (PCN-induced) | 1.9 \pm 0.1 | 81.5 \pm 2.7 | 18.5 \pm 0.3 | * | 14.4 \pm 0.8 |
| Minipig | * | 0.4 \pm 0.2 | 0.3 \pm 0.1 | * | 13.8 \pm 2.5 |
| Regular pig (females) | * | 0.3 \pm 0.0 | * | * | 5.8 \pm 0.1 |
| Regular pig (males) | * | 0.5 \pm 0.1 | * | * | 5.9 \pm 1.2 |
| Human | * | 15.0 \pm 4.5 | 1.5 \pm 0.9 | 81.8 \pm 21.2 | * |
| CYP3A4 | * | 1.38 \pm 0.2^a | 0.15 \pm 0.1 ^a | * | * |

*, metabolite was not detected in liver microsomes or CYP3A4.

^a Rates of formation of paclitaxel metabolites in cDNA-expressed CYP3A4 are presented as pmol/min/nmol P450.

pig, minipig, and human microsomes all showed hyperbolic kinetics. The sample curve of estimation of kinetic characteristics is shown in Fig. 4A. The K_m and V_{max} values for major paclitaxel oxidation, calculated from Lineweaver-Burk plots, are presented in Table 4.

Chemical Inhibition Studies with Paclitaxel. Inhibition of the formation of paclitaxel metabolites by selective CYP3A inhibitor TAO is shown in Fig. 2, A to C. In the CYP3A1/2-induced rat microsomes from rats treated with PCN, TAO significantly inhibited the conversion of paclitaxel to all four detected metabolites (Fig. 2A). In minipig microsomes, TAO inhibited the formation of C3'-OHP, C2-OHP, and the unknown OHP (t_R at 80.4% of paclitaxel) (Fig. 2B). In the male and female pig microsomes, the formation of C3'-OHP and of the unknown OHP (80.4% t_R) was inhibited by TAO (Fig. 2C); inhibition of this unknown OHP in minipigs was stronger than in pigs. In human microsomes, TAO strongly inhibited the production of C3'-OHP and C2-OHP. As expected, TAO did not inhibit the formation of the major human metabolite 6 α -OHP, which is catalyzed by CYP2C8 (Rahman et al., 1994). Fisetin significantly inhibited the formation of 6 α -OHP in human liver microsomes and exerted only a mild but significant effect on the formation of other paclitaxel metabolites (Fig. 3).

Metabolism of Paclitaxel by cDNA-Expressed P450s. Human CYP3A4 expressed in *E. coli* metabolized paclitaxel to C3'-OHP and C2-OHP (Table 3), indicating that CYP3A4 formed both these products. Moreover, TAO inhibited the formation of both metabolites by $\geq 90\%$ (Fig. 3). In contrast, fisetin, which significantly inhibited the formation of the CYP2C8-produced 6 α -OHP, inhibited the formation

of C3'-OHP and C2-OHP markedly less than did TAO, in a manner similar to that of human microsomes.

Microsomal Metabolism of Docetaxel. In contrast to paclitaxel, the rat, human, pig, and minipig microsomes formed the same metabolites of docetaxel, with hydroxydocetaxel being the main product. In contrast, CYP3A-induced microsomes from rats treated with PCN produced a markedly different pattern of docetaxel metabolites when analyzed under the same conditions (10 μ M docetaxel, 30-min incubation, 1 mg/ml microsomal protein), in that virtually all docetaxel was consumed and both diastereomeric hydroxyoxazolidinones were predominant metabolites. The difference was related to high CYP3A expression in PCN microsomes. Identical data were obtained when the incubation lasted only 10 min (Table 5). However, reduction of the microsomal protein concentration to 0.1 mg/ml resulted in a pattern of docetaxel metabolites similar to that of untreated rats and the other species used (data not shown).

Kinetic Characteristics of Docetaxel Metabolism. Docetaxel metabolism in pig, minipig, human, and untreated rat microsomes revealed differences in K_m , V_{max} , and enzyme efficiency (V_{max}/K_m) (Table 6). The sample curve of estimation of kinetic characteristics is shown in Fig. 4B. Possible differences in metabolic rates and consequent inactivation of docetaxel may also occur among the studied species in vivo.

Discussion

This study compared metabolic profiles and rates of paclitaxel and docetaxel in different species, especially in pigs and minipigs, both of

TABLE 4

Kinetic constants of major paclitaxel oxidation in rat, minipig, regular pig, and human liver microsomes

Substrate concentrations used for paclitaxel oxidation were 2.5 to 25 μM . Results are presented as means \pm S.D. ($n = 3$).

| Microsomes | Paclitaxel Hydroxylation | P450 Enzymes | K_m μM | V_{max} $\text{pmol}/\text{min}/\text{mg protein}$ | V_{max}/K_m |
|------------------------------|--------------------------|------------------|------------------------|---|---------------|
| Untreated rat ^a | C3' | CYP3A1/2 | 16 \pm 2 | 20 \pm 12 | 1.2 |
| PCN-treated rat ^a | C3' | CYP3A1/2 | 25 \pm 4 | 184 \pm 11 | 7.5 |
| Minipig | Unknown | Possible CYP3A29 | 15 \pm 2 | 29 \pm 4 | 1.9 |
| Pig | Unknown | Possible CYP3A29 | 17 \pm 3 | 14 \pm 3 | 0.8 |
| Human sample H6 ^a | 6 α | CYP 2C8 | 9 \pm 5 | 61 \pm 40 | 6.5 |

^a Kinetic parameters reported in Vaclavikova et al. (2003).

which have not been studied before in this context. Minipig liver microsomes expressed activities characteristic of human CYP3A4 (nifedipine oxidation), 2A6 (coumarin 7-hydroxylation), 2D6 (bufuralol 1'-hydroxylation), 2C9 (tolbutamide hydroxylation), and 2E1 (*p*-nitrophenol hydroxylation) (Anzenbacher et al., 1998). The testosterone 6 β -hydroxylation activity of minipig microsomes also corresponded to values for human liver microsomal activity (Anzenbacher et al., 1998), and this enzyme activity was higher in minipigs than in pigs (Skaanild and Trios, 1997). In pigs, we paid particular attention to CYP3A and CYP2C8, which are important in the metabolism of paclitaxel and docetaxel, and we have found great similarity between the metabolic profiles of testosterone in human and pig livers in comparison with rats and dogs. This correlated with the fact that CYP3A4 is the major P450 isozyme in the human liver and suggested that a CYP3A isozyme must also be the major hepatic P450 in the pig. The same testosterone metabolic profile was found between pig and human hepatocytes (Donato et al., 1999). The cross-reactivity of human CYP3A4 antibodies with pig liver microsomal protein suggests at least partial homology between the human CYP3A4 and its equivalent isoform in pig liver. Furthermore, human cDNA probe for CYP3A4 hybridized to pig liver mRNA indicated that the pig CYP3A29 gene has considerable homology to the human gene (Jurima-Romet et al., 2000). Minipigs also contained proteins similar to human CYP3A4 and/or 3A5 as shown by immunoblotting (Anzenbacher et al., 1998). Moreover, the N-terminal amino acid sequences of the minipig liver microsomal CYP3A and pig CYP3A29 were identical and showed 60% identity with human CYP3A4 (Soucek et al., 2001). Despite all of these similarities between minipigs, pigs, and humans, we found marked species differences in paclitaxel metabolism. The 40% difference between the amino acid sequence of human CYP3A4 and CYP3A29 ortholog in pigs may result in large differences in substrate specificity. Therefore, it is not surprising that we have found differences in paclitaxel metabolism. Minipig and regular pig microsomes oxidized paclitaxel mainly to an OHP different from all fully characterized OHP metabolites. It was a minor metabolite in rats and absent in humans (Vaclavikova et al., 2003), and may be 4-hydroxypaclitaxel or 10-hydroxypaclitaxel (Slatter et al., 1997). The results show that structurally and metabolically similar pig/minipig and human P450 enzymes may form different products of paclitaxel and suggest significant differences in their catalytic sites. 6 α -OHP was the main metabolite in human microsomes and C3'-OHP was the main product in rats. Thus, the metabolic profile of paclitaxel in pigs and minipigs differed completely from that in humans and also in rats. Considering the fact that small differences between amino acid sequence of P450 orthologs may result in significantly different metabolism of xenobiotics, identical metabolic profiles of paclitaxel and docetaxel found here suggest that pig and minipig CYP3A enzymes are closely related. The overall metabolic rates in untreated pigs, minipigs, and rats were similar but significantly lower than those in most human microsomes due to the fact that humans metabolize

paclitaxel mainly using CYP2C8. The 10-fold higher metabolic rate in microsomes of rats treated with PCN than in untreated rats corresponded to CYP3A1/2 induction. The V_{max}/K_m for 6 α -OHP (6.5) was significantly higher than that for any other metabolite in these species except PCN-treated rats, which represent an artificial case with severalfold higher CYP3A1/2 levels than in uninduced rats.

TAO is a known inhibitor of CYP3A activity in human (Harris et al., 1994b), rat (Nedelcheva et al., 1998), and minipig (Anzenbacher et al., 1998) microsomes. In this study we investigated the effect of TAO on paclitaxel metabolism in pigs and minipigs in comparison with its effect in rats and humans. Although human P450s and their established markers and inhibitors are not always appropriate for extrapolation to other animal P450s, TAO was found to be a good inhibitor of human CYP3A4 ortholog form CYP3A29 in minipigs. Harris et al. (1994b) observed that the formation of C3'-OHP was inhibited by 20 μM TAO to 15% of control activity. In this work with PCN-treated rat liver microsomes, TAO (30, 60, or 100 μM) caused a concentration-related inhibition of C3'-OHP to 15% and that of C2-OHP to 5% of control activity (Fig. 2A). The inhibition of C3'-OHP and C2-OHP formation in minipig microsomes by 30 μM TAO was virtually complete as well as that of C3'-OHP in male and female pig microsomes. The formation of the unknown OHP was inhibited in a dose-related manner by 30, 60, and 100 μM TAO to 10% of control activity in minipigs and less in female (to 30%) and male (to 45%) pigs; the inhibition in microsomes isolated from PCN-treated rats reached 30% of control activity without evidence of a concentration effect. In human liver microsomes and CYP3A4-containing membranes, TAO significantly inhibited the production of C3'-OHP and C2-OHP but did not affect 6 α -OHP formation, whereas the opposite was true for the effect of fisetin. The role of human CYP3A4 in C2-OHP formation was clearly demonstrated by its production with cDNA-expressed CYP3A4 as well as its inhibition by TAO. The formation of C3'-OHP, C2-OHP in all four species, and unknown OHP in minipigs, pigs, and rats was strongly inhibited by TAO. Moreover, our data indicate that human CYP2C8 was the only P450 involved in the formation of 6 α -OHP. These inhibition studies indicated that the minor paclitaxel metabolite in human microsomes (44% t_R of paclitaxel) was apparently not the di-OHP reported by Harris et al. (1994a), since it was not sufficiently inhibited by fisetin, although CYP2C8 is involved in di-OHP formation and fisetin was shown to inhibit CYP2C8.

The sensitivity of particular P450 enzymes to TAO was high in pigs, minipigs, and humans, but significantly less in rats and also varied for the different metabolites. In a previous study, TAO exerted differential inhibition of nifedipine oxidation catalyzed by CYP3A in minipig and human microsomes (Anzenbacher et al., 1998). It may be due to structural differences in the CYP3A active sites of minipigs and humans. Different sensitivity to inhibition by TAO also supports the idea that catalytic sites of CYP3A enzymes in these species differ. Fisetin seemed to be a rather selective inhibitor of CYP2C8 in human

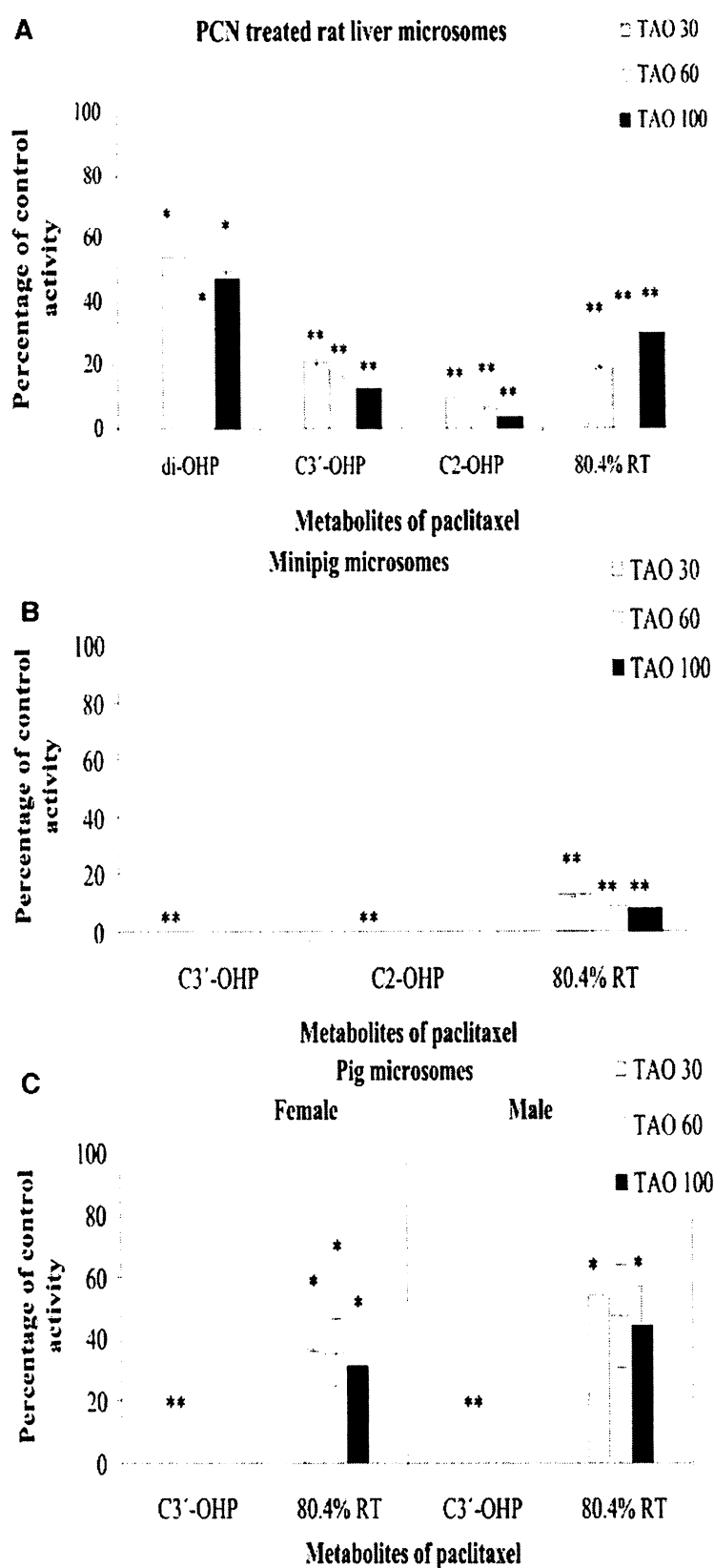


FIG. 2. Inhibition of paclitaxel metabolism by TAO in rat, minipig, and pig liver microsomes.

TAO (30, 60, and 100 μM) was used to study its inhibitory effect on the oxidation of paclitaxel (10 μM) in PCN-treated rat, minipig, and pig liver microsomes. Incubation conditions were carried out as described under *Materials and Methods*. Experimental samples with TAO were compared with activity of the particular P450 isoform without the presence of TAO but otherwise prepared in the same way. Data are presented as percentage of control activity of relevant liver microsomes in the formation of paclitaxel metabolites. Each data point represents the mean (\pm S.D.) from at least two determinations. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ for Student's t tests.

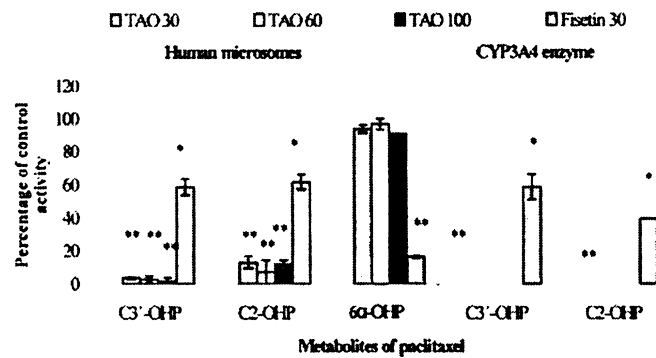


FIG. 3. Inhibition of paclitaxel metabolism by TAO and fisetin in human liver microsomes and cDNA-expressed CYP3A4.

Fisetin (30 μM) and troleandomycin (30, 60, and 100 μM) were used to study their inhibition effects on the oxidation of paclitaxel (10 μM) in human liver microsomes (left side) and cDNA-expressed CYP3A4 enzymes (right side). Incubation conditions were carried out as described under *Materials and Methods*. Data are presented as percentage of control activity of relevant liver microsomes or cDNA-expressed CYP3A4 enzymes in the formation of paclitaxel metabolites. Each data point represents the mean (\pm S.D.) from at least two determinations. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ for Student's t tests.

TABLE 5

Variability in the formation of docetaxel metabolites by liver microsomes from different species

Docetaxel concentration was 10 μM . Results are means \pm S.D. of at least two determinations from 30-min incubations. In PCN microsomes, 10-min incubations that already metabolized docetaxel completely were used. Values are the rates of formation of docetaxel metabolites in different liver microsomes.

| Species | Hydroxydocetaxel | Hydroxyoxazolidinone 'A' | Hydroxyoxazolidinone 'B' |
|-----------------------|------------------|--|--------------------------|
| | | <i>pmol of metabolite/min/mg protein</i> | |
| Untreated rat | 32 \pm 1 | 0.9 \pm 0.02 | * |
| Rat (PCN induced) | * | 213.3 \pm 8.2 | 258.7 \pm 13.6 |
| Minipig | 21 \pm 4 | * | * |
| Regular pig (females) | 10 | * | * |
| Regular pig (males) | 12 \pm 2 | * | * |
| Human sample H6 | 3.5 \pm 1.5 | 0.7 \pm 0.6 | 0.7 \pm 0.1 |

*, metabolite was not detected.

TABLE 6

Kinetic constants of docetaxel oxidation to hydroxydocetaxel in rat, pig, minipig, and human liver microsomes

The results are means of at least two experiments with microsomes pooled from six rats or one castrated minipig, a representative regular pig of three males or three females, and two male humans. Substrate concentrations used for docetaxel oxidation were 2 to 25 μM .

| Microsomes | P450 Enzymes | K_m | V_{max} | V_{max}/K_m |
|---------------------|--------------|---------------|----------------------------|---------------|
| | | μM | <i>pmol/min/mg protein</i> | |
| Untreated rat | CYP3A1/2 | 5.6 | 52 | 9.1 |
| Minipig | CYP3A29 | 3.5 | 52 | 15 |
| | | 8.1 (males) | 23 (males) | 2.9 |
| Regular pig | CYP3A29 | 5.1 (females) | 21 (females) | 4.0 |
| Humans ^a | CYP3A3/4 | 3.9–6.9 | 11.8–23 | 0.3–16.2 |

^a Interval of kinetic constants from two male human microsomes.

microsomes. Fisetin (30 μM) inhibited CYP2C8-catalyzed formation of 6 α -OHP by more than 80%. This result was particularly interesting since this 6 α -hydroxylation of paclitaxel is used as a marker substrate activity of human CYP2C8 (Projean et al., 2003). However, fisetin is not a specific inhibitor of CYP2C8, since it also inhibited CYP3A-catalyzed formation of C3'-OHP in human microsomes by up to 40% in this study and by less than 20% in another study with human and rat microsomes (Vaclavikova et al., 2003). Moreover, it was a good inhibitor ($IC_{50} = 9 \mu\text{M}$) of CYP1A1/1A2-dependent 7-ethoxycoumarin *O*-deethylase activity in rat liver microsomes (Moon et al., 1998). However, CYP1A1/1A2 do not participate in taxane metabolism.

In untreated rats, pigs, minipigs, and humans, docetaxel was metabolized primarily to hydroxydocetaxel, and two diastereomeric hydroxyoxazolidinones were minor products, whereas CYP3A1/2-induced rat microsomes metabolized docetaxel mainly to both hydroxyoxazolidinones, and hydroxydocetaxel was a minor product. Shorter incubations and less microsomal protein resulted in a meta-

bolic pattern similar to that of untreated rats or the other species. The K_m values and the metabolic rates of hydroxydocetaxel formation were similar in all the tested species. However, some human livers metabolized docetaxel at 10-fold lower rates than did the other species, apparently due to great variability in CYP3A4/5 expression. A new mobile phase (acetonitrile/methanol/tetrahydrofuran/water, 21:35:2:42 v/v) enabled isocratic separation of hydroxydocetaxel and both diastereomeric hydroxyoxazolidinones within a reasonable time of 33 min for complete analysis.

It seems interesting that humans metabolized paclitaxel at significantly higher rates than the other species, but the opposite was true for docetaxel. This phenomenon is partly due to the fact that paclitaxel and docetaxel are metabolized by CYP3A orthologs, whereas paclitaxel is also oxidized by the uniquely human CYP2C8.

In conclusion, both taxanes are oxidized to products that are less antineoplastic than the parent drug. The antineoplastic effects of taxanes observed in vivo are apparently related to metabolic rates

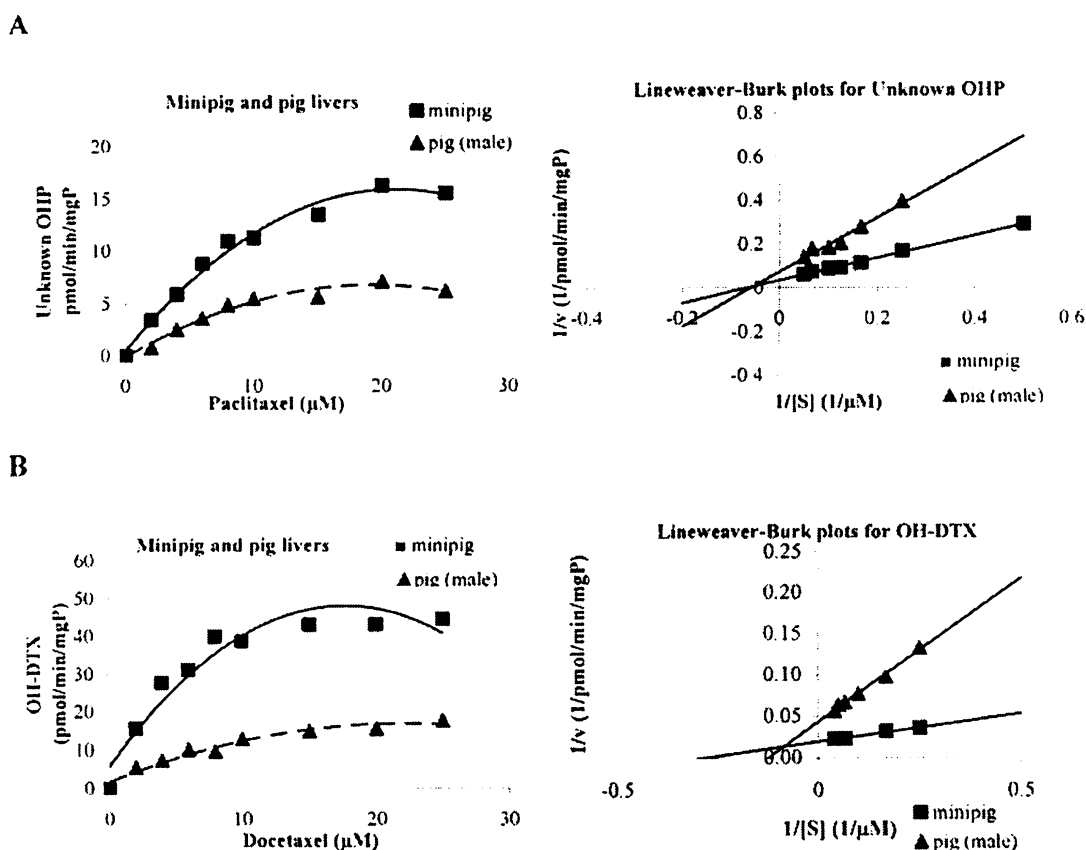


FIG. 4. Representative kinetic curves and Lineweaver-Burk plots of major paclitaxel (A) and docetaxel (B) oxidation in minipig and pig male liver microsomes. Incubation conditions were carried out as described under *Materials and Methods*. Data are derived from at least duplicate determinations.

rather than to metabolic profiles. Humans (in vitro) metabolize paclitaxel at higher rates than do the other untreated species, and the anticancer effects may, therefore, be less than might be observed in the other species. CYP3A orthologs formed similar products of docetaxel. In the case of paclitaxel, humans, pigs, minipigs, and rats, respectively, formed different major metabolites, apparently due to different catalytic sites of particular P450s and due to participation of specific human CYP2C8, which is responsible for the human 6 α -hydroxylation of paclitaxel. Although inhibition studies with TAO indicate participation of CYP3A ortholog forms in paclitaxel metabolism in different species, further studies are needed to fully characterize pig, minipig, and human P450 orthologs. Knowledge of which P450 enzymes form the respective metabolites enables extrapolation of P450 expression in vivo to metabolic inactivation, and consequent species and possibly human individual differences in the antineoplastic effects of taxanes, which can help to predict pharmacological interactions.

Acknowledgments. We gratefully acknowledge the generous gift of the authentic samples of docetaxel and its five metabolites by Agnes Gonthier (Aventis, Strasbourg, France). Pig livers were kindly provided by Dr. B. Hlavackova, Slaughter House Cesky Brod, and by Dr. M. Rezek, Research Institute of Animal Production.

References

- Anderson CD, Wang J, Kumar GN, McMillan JM, Walle UK, and Walle T (1995) Dexamethasone induction of taxol metabolism in the rat. *Drug Metab Dispos* 23:1286–1290.
- Anzenbacher P, Soucek P, Anzenbacherova E, Gut I, Hruby K, Svoboda Z, and Kvetina J (1998) Presence and activity of cytochrome P450 isoforms in minipig liver microsomes. Comparison with human liver samples. *Drug Metab Dispos* 26:56–59.

- Aoudjit F and Vuori K (2001) Integrin signalling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* 20:4995–5004.
- Cresteil T, Monsarrat B, Alvinerie P, Tréluyer JM, Vicira I, and Wright M (1994) Taxol metabolism by human liver microsomes: identification of cytochromes P450 isozymes involved in its biotransformation. *Cancer Res* 54:386–392.
- Donato MT, Castell JV, and Gómez-Lechón MJ (1999) Characterization of drug metabolizing activities in pig hepatocytes for use in bioartificial liver devices: comparison with other hepatic cellular models. *J Hepat* 31:542–549.
- Fan W (1999) Possible mechanisms of paclitaxel-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol* 57:1215–1221.
- Garg MB and Ackland SP (2000) Simple and sensitive high-performance liquid chromatography. Method for determination of docetaxel in human plasma or urine. *J Chromatog B* 748:383–388.
- Gut I, Daniclova V, Holubova J, Soucek P, and Kluckova II (2000) Cytotoxicity of cyclophosphamide, paclitaxel and docetaxel for tumor cell lines in vitro: effects of concentration, time and cytochrome P450-catalyzed metabolism. *Arch Toxicol* 74:437–446.
- Gut I, Terelius Y, Frantik E, Linhart I, Soucek P, Filipcova B, and Kluckova II (1993) Exposure to various benzene derivatives differently induces cytochromes P450 2B1 and P450 2E1 in rat liver. *Arch Toxicol* 67:237–243.
- Harris JW, Katki A, Anderson LW, Chmurny GN, Paukstelis JV, and Collins JM (1994a) Isolation, structural determination, and biological activity of 6 α -hydroxytaxol, the principal human metabolic of taxol. *J Med Chem* 37:706–709.
- Harris JW, Rahman A, Kim BR, Guengerich FP, and Collins JM (1994b) Metabolism of taxol by human hepatic microsomes and liver slices: participation of cytochrome P450 3A4 and an unknown P450 enzyme. *Cancer Res* 54:4026–4035.
- Huizing MT, Sewberath Misser VH, Pieters RC, ten Bokkel Huinink WW, Vecnhof CII, Vermorken JB, Pinedo HM, and Beijnen JH (1995) Taxanes: a new class of antitumor agents. *Cancer Invest* 13:381–404.
- Jurima-Romet M, Casley WL, Leblanc CA, and Nowakowska M (2000) Evidence for the catalysis of dextromethorphan O-demethylation by a CYP2D6-like enzyme in pig liver. *Toxicol in Vitro* 14:253–263.
- Klener P (1995) Taxanes—new class of antitumor chemotherapeutics [in Czech]. *Remedia* 5:154–160.
- Kumar GN, Walle UK, and Walle T (1994) Cytochrome P450 3A-mediated human liver microsomal taxol 6 α -hydroxylation. *J Pharmacol Exp Ther* 268:1160–1165.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275.
- Marre F, Sanderink GJ, de Sousa G, Gaillard C, Martinet M, and Rahmani R (1996) Biotransformation of docetaxel (Taxotere) in vitro: involvement of the CYP3A subfamily in humans. *Cancer Res* 56:1296–1302.

- Monegier B, Gaillard C, Sable S, and Vuilhorgne M (1994) Structures of the major human metabolites of docetaxel (RP 56976-Taxotere). *Tetrahedron Lett* 35:3715-3718.
- Monsarrat B, Alvinerie P, Wright M, Dubois J, Gueritte-Voegelcin F, Guenard D, Donchower RC, and Rowinsky EK (1993) Hepatic metabolism and biliary excretion of taxol in rats and humans. *J Natl Cancer Inst Monogr* 15:39-46.
- Monsarrat B, Chtelut E, Royer I, Alvinerie P, Dubois J, Dezeuse A, Roche H, Cros S, Wright M, and Canal P (1998) Modification of paclitaxel metabolism in a cancer patient by induction of cytochrome P450 3A4. *Drug Metab Dispos* 26:229-233.
- Monsarrat B, Mariel E, Cros S, Garés M, Guénard D, Gueritte-Voegelcin F, and Wright M (1990) Isolation and identification of three major metabolites of taxol in rat bile. *Drug Metab Dispos* 18:895-901.
- Monsarrat B, Royer I, Wright M, and Cresteil T (1997) Biotransformation of taxoids by human cytochromes P450: structure-activity relationship. *Bull Cancer* 84:125-133.
- Moon JY, Lee DW, and Park KH (1998) Inhibition of 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity in rat liver microsomes by naturally occurring flavonoids: structure-activity relationships. *Xenobiotica* 28:117-126.
- Nakajima M, Fujiki Y, Noda K, Ohtsuka H, Ohkuni H, Kyo S, Inoue M, Kuroiwa Y, and Yokoi T (2003) Genetic polymorphisms of CYP2C8 in Japanese population. *Drug Metab Dispos* 31:687-690.
- Nedelcheva V, Gut I, Soucek P, and Frantik E (1998) Cytochrome P450 catalyzed oxidation of monochlorobenzene, 1,2- and 1,4-dichlorobenzene in rat, mouse and human liver microsomes. *Chem Biol Interact* 115:53-70.
- Nedelcheva V, Gut I, Soucek P, Tichavska B, Tynkova I, Mraz J, Guengerich FP and Ingelman-Sundberg M (1999) Metabolism of benzene in human liver microsomes: individual variations in relation to CYP2E1 expression. *Arch Toxicol* 73:33-40.
- Omura T and Sato R (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes: evidence for its haemoprotein nature. *J Biol Chem* 239:2370-2378.
- Parikh A, Gillam EM, and Guengerich FP (1997) Drug metabolism by *Escherichia coli* expressing human cytochromes P450. *Nat Biotechnol* 15:784-788.
- Projean D, Morin PE, Tu TM, and Ducharme J (2003) Identification of CYP3A4 and CYP2C8 as the major cytochrome P450s responsible for morphine N-demethylation in human liver microsomes. *Xenobiotica* 33:841-854.
- Rahman A, Korzcwka KR, Grogan J, Gonzalez J, and Harris JW (1994) Selective biotransformation of taxol to 6 α -hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8. *Cancer Res* 54:5543-5546.
- Rowinsky EK, Onetto N, Canetta RM, and Arbusk SG (1992) Taxol: the first of the taxanes, an important new class of antitumor agents. *Semin Oncol* 19:646-662.
- Royer I, Monsarrat B, Sonnier M, Wright M, and Cresteil T (1996) Metabolism of docetaxel by human cytochromes P450: interactions with paclitaxel and other antineoplastic drugs. *Cancer Res* 56:58-65.
- Schiff PB, Fant J, and Horwitz SB (1979) Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature (Lond)* 22:665-667.
- Shou M, Korzcwka KR, Krausz KW, Gonzalez FJ, and Gelboin HV (1998) Role of human cytochrome P450 3A4 and 3A5 in the metabolism of Taxotere and its derivatives: enzyme specificity, interindividual distribution and metabolic contribution in human liver. *Pharmacogenetics* 8:391-401.
- Skaaniid MT and Trios Ch (1997) Characterization of the P450 system in Gottingen minipigs. *Pharmacol Toxicol* 80 (Suppl 2):28-33.
- Slatter JG, Feenstra KL, Mattern SJ, Waggoner DJ, Northup JJ, Feller CJ, DeKoning TF, and McGovern JP (1997) Comparison of the pharmacokinetics and oral bioavailability of paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere) in male BDF₁ mice and observation of a hydroxyacetyl metabolite of taxol. 6th European ISSX Meeting, Gothenburg, Sweden. *ISSX Proc* 11:181.
- Soucek P, Zuber R, Anzenbacherova E, Anzenbacher P, and Guengerich FP (2001) Minipig cytochrome P450 3A, 2A and 2C enzymes have similar properties to human analogs. *BMC Pharmacology* (<http://biomedcentral.com/1471-2210/1/11>).
- Spencer MC and Faulds D (1994) Paclitaxel: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the treatment of cancer. *Drugs* 48:795-845.
- Vaclavikova R, Horsky S, Simek P, and Gut I (2003) Paclitaxel metabolism in rat and human liver microsomes is inhibited by phenolic antioxidants. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 368:200-209.
- Walle T, Kumar GN, McMillan JM, Thornburg KR, and Walle UK (1993) Taxol metabolism in rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 46:1661-1664.

Příloha IV

Ehrlichová M., Václavíková R., Ojima I., Pepe A.,
Kuznetsova LV., Chen J., Truksa J., Kovář J. and Gut I.:
Transport and cytotoxicity of paclitaxel, docetaxel and novel
taxanes in human breast cancer cells.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol **372(1)**: 95-105,
2005.

Marie Ehrlichova · Radka Vaclavikova · Iwao Ojima ·
Antonella Pepe · Larisa V. Kuznetsova · Jin Chen ·
Jaroslav Truksa · Jan Kovar · Ivan Gut

Transport and cytotoxicity of paclitaxel, docetaxel, and novel taxanes in human breast cancer cells

Received: 7 March 2005 / Accepted: 29 June 2005 / Published online: 30 July 2005
© Springer-Verlag 2005

Abstract The resistance of tumors to classic taxanes (paclitaxel and docetaxel) presents problems in chemotherapy. Thus, new taxanes with higher antitumor activity in resistant tumors are synthesized. This study compared cytotoxicity and transport of paclitaxel and docetaxel with novel taxanes SB-T-1103, SB-T-1214, and SB-T-1216 in adriamycin-sensitive (MDA-MB-435) and -resistant (NCI/ADR-RES) human breast cancer cells. The cell lines examined differ in adriamycin transport, suggesting different expression of ABC membrane transporters. Reverse transcription-polymerase chain reaction revealed that NCI/ADR-RES cells expressed high levels of P-glycoprotein mRNA, which was absent in MDA-MB-435 cells, while the opposite was true for MRP2 mRNA. Both cell lines shared or differently expressed eight other ABC transporters and LRP. NCI/ADR-RES cells were 1,000-fold more resistant to paclitaxel and 600-fold more resistant to docetaxel in MTT assay than MDA-MB-435 cells, but almost equally sensitive to SB-T-1103, SB-T-1214, and SB-T-1216. This complied with the fact that NCI/ADR-RES cells absorbed almost 20-fold less [¹⁴C]paclitaxel, about 7-fold less docetaxel, and almost equal amounts of SB-T-1103, SB-T-1214, and SB-T-1216 as the MDA-MB-435 cells.

Verapamil increased uptake of [¹⁴C]paclitaxel by NCI/ADR-RES cells 7-fold and decreased its efflux 2.5-fold; in contrast, it weakly influenced uptake and increased the efflux in MDA-MB-435 cells. SB-T-1103 and SB-T-1216 did not influence transport of paclitaxel, but SB-T-1214 decreased [¹⁴C]paclitaxel uptake in both cell lines indicating inhibition of uptake. This suggests that the novel taxanes are not inhibitors of P-glycoprotein. However, novel taxanes exert much higher activity on resistant tumor cells than classic taxanes and seem to be potential drugs for therapy in taxane-resistant tumors.

Keywords Taxanes · Multidrug resistance · Uptake · Efflux · ABC transporters · Verapamil

Introduction

Paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere) are important cytostatics in the therapy of breast, ovarian and other cancers (Vaclavikova et al. 2003). However, chemotherapy often causes development of multidrug resistance (MDR) in cancer cells (Ding et al. 2001). Effects of taxanes on MDR tumors may be significantly decreased by high expression of ABC transporters exporting drugs from tumors (Dean et al. 2001). We have shown that cytochrome P450 (CYP) metabolism decreased cytotoxicity of paclitaxel and docetaxel for tumor cells (Gut et al. 2000). The efflux of taxanes from tumors may decrease their anticancer efficiency even more significantly for protecting the target cells directly. Paclitaxel and docetaxel are exported from tumor cells by P-glycoprotein (P-gp), which belongs to the ABC family transport proteins; it is encoded by the ABCB1 (MDR1) gene (Gottesman and Pastan 1993; Litman et al. 2001; Penson et al. 2004). Cancer cells over-expressing P-gp have increased ability to extrude a wide variety of chemically diverse cytotoxic drugs (Zhang 2001). Some novel taxanes possess extremely high potency against drug-resistant cancer cells expressing the MDR phenotype (Miller and Ojima 2001). For instance, the structurally similar SB-T-101187, SB-T-1213, and SB-T-1250 act as

M. Ehrlichova · J. Truksa · J. Kovar
Cell Growth Control Laboratory,
Institute of Molecular Genetics,
Academy of Sciences of the Czech Republic,
Videnska 1083,
142 00 Prague 4, Czech Republic

R. Vaclavikova (✉) · I. Gut
Biotransformation Group,
National Institute of Public Health,
Srobarova 48,
100 42 Prague 10, Czech Republic
e-mail: rvaclavikova@szu.cz
Tel.: +420-2-67082709
Fax: +420-2-67311236

I. Ojima · A. Pepe · L. V. Kuznetsova · J. Chen
Institute of Chemical Biology and Drug Discovery,
State University of New York at Stony Brook,
Stony Brook, NY 11794-3400, USA

cytotoxic agents and also inhibit the P-gp efflux pump (Ferlini et al. 2000). Based on those results we assumed that the three novel taxanes SB-T-1214, SB-T-1216, and SB-T-1103 may possess the same property.

Substrates of P-gp supposedly enter P-gp after partitioning into the membrane, rather than from the extracellular or intracellular aqueous phase. The drug-binding pocket may be large enough to accommodate two substrates simultaneously. P-gp was competitively inhibited by cyclosporin A and allosterically by daunorubicin, epirubicin, gramicidin S and D, vinblastine, amiodarone, and colchicines, but cooperative stimulation was found with progesterone, diltiazem, amitriptyline, and propranolol (Litman et al. 1997).

As an ATP-driven efflux pump P-gp uses energy from ATP hydrolysis (Zhang 2001). Although the binding and hydrolysis of ATP transporters apparently provide the driving force for substrate transfer, the molecular physiology of these proteins is still largely unknown (Cantiello 2001). Drugs activate the P-gp ATPase activity and the released energy drives their transport. Verapamil is an effective antagonist of resistance to numerous drugs in most MDR cell lines (Ford and Hait 1990). As verapamil is a P-gp substrate, its binding to P-gp resulting in a conformational change may competitively inhibit binding of other substrates. As a modulator of P-gp, verapamil increases ATP binding to P-gp (Shepard et al. 1998), which could increase P-gp saturation with ATP, but this might rather result in stimulation of P-gp transport. It reportedly stimulates ATPase activity by an induced-fit mechanism in the drug-binding pocket (Loo et al. 2003), which may actually limit the availability of ATP for other substrates or cause ATP hydrolysis and depletion as another mechanism of its inhibiting action.

The aim of this work was to show:

1. Whether two breast cancer lines, an adriamycin-sensitive MDA-MB-435 and an adriamycin-resistant NCI/ADR-RES would differ in sensitivity to paclitaxel, docetaxel, SB-T-1214, SB-T-1216, and ST-T-1103
2. Whether such differences would be related to drug transport
3. Possible involvement of ABCB1 or other transporters measured by expression of their mRNAs
4. We also studied whether modulation of P-gp by verapamil or these SBT drugs would inhibit paclitaxel efflux and thereby reverse the resistance expected in NCI/ADR-RES cells

Materials and methods

Materials

Paclitaxel for HPLC measurement was obtained from Bristol-Myers Squibb (Princeton, NJ, USA). Paclitaxel for measurement of the cell growth and survival: (Taxol, for injection, 7 mM; MeadJohnson, Bristol-Myers Squibb), in obtained form was used as a stock solution. Docetaxel for HPLC measurement was a generous gift from Aventis (Paris,

France). Docetaxel for measurement of the cell growth and survival: (Taxotere, for injection, 12.4 mM, Rhone-Poulenc, Rorer, France) in obtained form was used as a stock solution. Novel taxanes, SB-T-1214, SB-T-1216, and SB-T-1103, were synthesized by Prof. I. Ojima (Stony Brook, NY, USA). Chemical structures of the drugs examined are shown in Fig. 1. [¹⁴C]Paclitaxel was from Moravek Biochemicals (Brea, CA, USA). Fetal bovine serum (FBS) was from J. Kysilka (Brno, Czech Republic). L-glutamine, HEPES, penicillin, streptomycin, and trypsin were obtained from PAN Biotech GmbH (Aidenbach, Germany). DMSO was from J.T. Baker B.V. (Deventer, Holland). Phenol was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All other chemicals used were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Cell culture

Human breast carcinoma cell lines MDA-MB-435 and NCI-ADR-RES were obtained from National Cancer Institute at Frederick (MD, USA). Cells were maintained in the basic medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS medium) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. RPMI 1640 containing extra L-glutamine (300 µg/ml), sodium pyruvate (110 µg/ml), HEPES (15 mM), penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 µg/ml) was used as a basic medium. The cells were trypsinized before use (0.2% trypsin and 0.02% EDTA in PBS).

Cell growth and survival

Cells maintained in FBS medium were harvested by low-speed centrifugation, washed with FBS and seeded at 10,000 cells/100 µl of medium into the wells of a 96-well plastic plate. SB-T analogs dissolved in DMSO (tissue culture quality) were used as stock solutions. Stock solutions of paclitaxel (7 mM) and docetaxel (12.4 mM), as described in "Materials," and SB-T analogs (1 mM) were diluted with FBS medium to obtain the required concentrations. Cell growth and survival were evaluated under control conditions (FBS medium alone) or after exposure to paclitaxel or docetaxel (0.1–1,000 nM) or SB-T-analogs: (SB-T-1103: 0.01–10 nM for MDA-MB-435 cells and 0.03–30 nM for NCI/ADR-RES cells, SB-T-1214: 0.003–3 nM for MDA-MB-435 cells, and 0.03–30 nM for NCI/ADR-RES cells, SB-T-1216: 0.003–3 nM for MDA-MB-435 cells and 0.1–100 nM for NCI/ADR-RES cells) in FBS medium. Moreover, cells were exposed to paclitaxel (0.3 nM and 3 nM/MDA-MB-435; 0.03 µM and 0.3 µM/NCI-ADR-RES) alone or with the addition of verapamil (1, 3, 10 and 30 µM) for 96 h. Ten microliters of (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5 diphenyltetrazolium bromide (MTT, 5 g L⁻¹) was added to cells in each well and the plate was incubated for 2 h at 37°C in a humidified incubator. After the incubation, 80 µl of medium was aspirated, 150 µl of 0.04 N HCl in isopropanol was added and the mixture was resuspended. The absorbance was measured at 570 nm using a

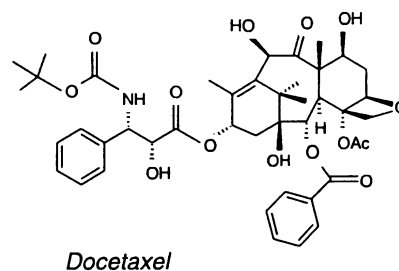
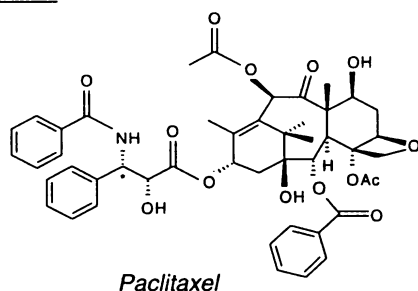
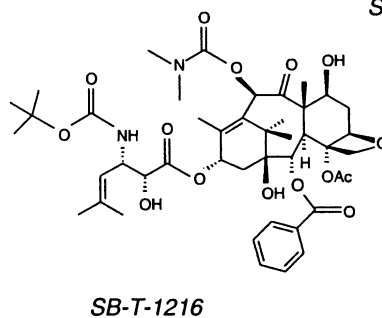
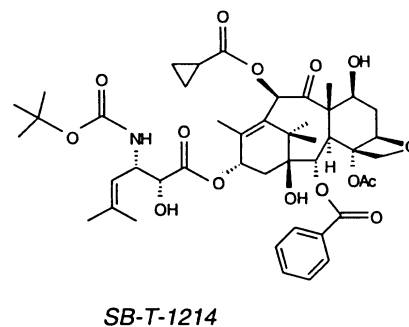
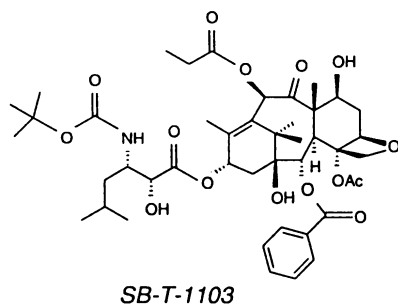
Classic Taxanes:Novel Taxanes:

Fig. 1 Structures of taxanes examined. *Asterisk* marks the site of ^{14}C radiolabel

microplate reader Spectra Sunrise (Tecan) according to Mosmann (1983).

Assessment of the tumor cell volume

The volume of the tumor cells was assessed by centrifugation ($500\times g$ for 10 min) of 5 ml cell suspension containing 2.5×10^6 cells in graduated Falcon and then Eppendorf tubes and comparing the volume of the cell with a series of volumes within the relevant range.

Paclitaxel and docetaxel transport

For the uptake assay, cells were exposed to fresh medium or medium containing 1 μM paclitaxel, 1, 2, and 4 μM docetaxel or 20–500 nM [^{14}C]paclitaxel, dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) at maximum concentration 0.1% (v/v). After incubation for 15–240 min, medium containing the drug was quickly aspirated and the adherent cells were washed three times with ice-cold phosphate buffer saline (PBS). The cells were released by 2×400 μl of trypsin and

EDTA (humid atmosphere, 37°C , 15 min) and sucked three times into the tip of an automatic pipette and then ejected into a glass tube containing ethyl acetate (paclitaxel and docetaxel for high performance liquid chromatography [HPLC] analysis), or into a scintillation vial ([^{14}C]paclitaxel for liquid scintillation) using Bray solution. Sodium dodecyl sulfate (200 μl) was added up to 2% final concentration for lysis of cells and release of the drug. The efflux measurements were performed after 2-h loading with 100 nM [^{14}C]paclitaxel. Cells were then washed twice with PBS, placed in fresh medium and analyzed after 10, 20, 30, 60, and 90 min. Releasing of cells was the same as described above.

Effect of verapamil and SB-T analogs on paclitaxel transport

For the study of [^{14}C]paclitaxel uptake modulation, cells were preincubated for 30 min with fresh medium or medium containing 100 μM verapamil or SB-T-1214, -1216, and -1103 (as specified in the figures). The medium was rapidly replaced by fresh medium with 100 nM [^{14}C]

paclitaxel or that containing 100 nM [^{14}C]paclitaxel plus the above concentration of verapamil or SB-T analogs and cells were incubated for different periods of time as specified in the figures. Cells were then rapidly washed with ice-cold PBS three times, released, and dissolved as described above. In the efflux assays, cells were preincubated for 120 min with 100 or 200 nM [^{14}C]paclitaxel. The medium was then replaced with lukewarm fresh medium with or without verapamil or medium containing a relevant SB-T analog and cells were incubated at 37°C for time periods specified in Figs. 5 and 6. Cells were then rapidly washed with ice-cold PBS three times, released, and dissolved as described above.

Transport of SB-T-1103, SB-T-1214, and SB-T-1216

The uptake of these SB-T analogs was investigated in MDA-MB-435 and NCI/ADR-RES cells exposed to 1 μM concentrations for 15–120 min. Since radioactive analogs were not available, concentrations were analyzed by HPLC as described below.

HPLC determination of paclitaxel, docetaxel, SB-T-1214, SB-T-1216 or SB-T-1103

After incubation, cells were released by trypsin and EDTA (500 μl in a humid atmosphere at 37°C for 15 min) and sucked and ejected three times by automatic pipette into the wells and then into glass centrifuge tubes. Taxanes were extracted into 2 \times 3.5 ml of ethyl acetate (vortex mixer for 3 \times 15 s). The test tubes were centrifuged (1,500 $\times g$ for 10 min) and clear ethyl acetate extracts (6 ml each) were evaporated to dryness under a mild nitrogen stream. The dry extracts were dissolved in mobile phase and paclitaxel ana-

lyzed by HPLC as described before (sample dissolved in 200 μl of the mobile phase methanol:water, 65:35 [v/v], Macherey-Nagel column 4 \times 250 mm with Nucleosil 100-5 C18, flow 1 ml/min (Vaclavikova et al. 2003). For the determination of docetaxel the mobile phase containing acetonitrile: 0.02 M ammonium acetate buffer, pH=5 (43:57, v/v) was chosen (Garg and Ackland 2000). The following HPLC conditions were used: HPLC Agilent 1100 with autosampler, 20 μl sample loop, Macherey-Nagel column 4 \times 250 mm with Nucleosil 100-5 C18, flow 1.0 ml/min, detection at 230 nm (paclitaxel and SB-T taxanes) and 227 nm (docetaxel). We used a new sensitive method for SB-T analogs (Macherey-Nagel column 2 \times 125 mm with Nucleosil 100-5 C18, flow 0.3 ml/min, the same mobile phase as with docetaxel). Records were analyzed by CSW software (Chromatography Station for Windows), version 1.7. SB-T-1214, SB-T-1216 or SB-T-1103 (1 μM), added to 1 ml of pure RPMI medium with 10% FBS were used as external standards and processed in the same way as the samples.

Isolation of mRNA and RT-PCR analysis

Approximately 10⁶ cells per sample were harvested by low-speed centrifugation and washed twice with PBS. The cells were then lysed in 500 μl of lysis buffer (4 M guanidium isothiocyanate, 0.5% sarcosyl, 25 mM sodium citrate, pH=7.0) on ice. Lysate was frozen at -70°C for further analysis. Total RNA was isolated by the modified acid phenol method (Chomczynski and Sacchi 1987). RNA (1 μg) was reversely transcribed by 120 U of M-MLV (Moloney murine leukemia virus) reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) per sample according to the manufacturer's instructions using random hexamer priming. Prepared cDNA (one-tenth of prepared amount, 1 μl) was used for polymerase chain reaction (PCR).

Fig. 2 Expression of mRNA for various ABC transporters, LRP and control gene-18S rRNA in Caco-2, MDA-MB-435, and NCI/ADR-RES cells. Caco-2-cells were used as a positive control of the expression of different transporters. 18 S rRNA was used as a house-keeping gene. *Numbers in parentheses* show the number of polymerase chain reaction (PCR) cycles that were selected so that PCR amplification was interrupted in its exponential phase

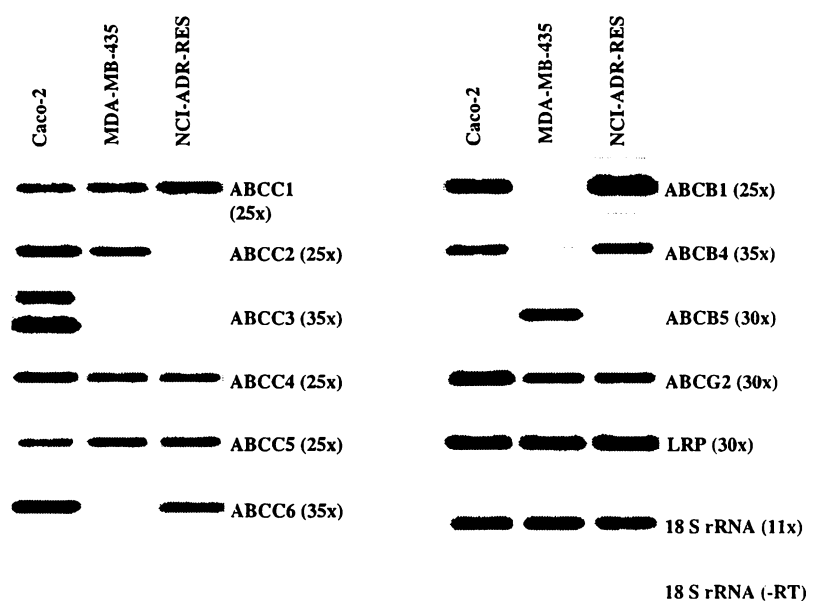


Table 1 Determination of lethal concentrations of classical taxanes and novel taxanes in sensitive (MDA-MB-435 cells) and resistant (NCI/ADR-RES) cells

| Taxanes | Cells | | | |
|--------------------------|-----------------------|-------------------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| | MDA-MB-435 cells | | NCI/ADR-RES cells | |
| | IC ₅₀ (nM) | Concentration range of taxanes (nM) | IC ₅₀ (nM) | Concentration range of taxanes |
| Classical taxanes | | | | |
| Paclitaxel | 1.0 | 0.1–1,000 | 1,000 | 0.1–1,000 |
| Docetaxel | 0.5 | 0.1–1,000 | 300 | 0.1–1,000 |
| Novel taxanes | | | | |
| SB-T-1103 | 0.5 | 0.01–10 | 1.0 | 0.03–30 |
| SB-T-1214 | 0.3 | 0.003–3 | 5.0 | 0.03–30 |
| SB-T-1216 | 0.2 | 0.003–3 | 3.0 | 0.1–100 |

Cell growth and survival were evaluated under the control conditions (fetal bovine serum [FBS]) or after exposure to taxanes for 96 h. Effect of each concentration was assessed in eight independent wells

For PCR amplification of all the genes tested, primers provided by Life Technologies (Rockville, MD, USA) were used. PCR was carried out in a 25- μ l volume using 0.625 U of Taq polymerase according to the manufacturer's instructions (Promega, Madison, WI, USA). Sequences of the primers used have been published previously (Taipalensuu et al. 2001) except for ABCB5 primers, which were designed according to the NCBI database (5'forward-TTCATCCTCCGTGG-CTTATC-3' and 5'reverse-ACACGGCTGTTGTCACCATA-3'). PCR reaction was run in the Touchgene thermal cycler (Techne) using 2-min initial denaturation at 95°C followed by 45-s denaturation at 94°C,

45-s annealing at 58°C (ABCG2, ABCC3, ABCC1), 60°C (ABCB5, LRP, ABCB1, ABCC2, ABCC3, ABCC4 and ABCC6), and 66°C (18S rRNA), 35-s extension at 72°C for 11 (18S rRNA) 25 (ABCB1) or 30 (ABCB5, ABCC3) cycles, 45-s extension at 72°C for 25 (ABCB1, ABCC5) or 30 (ABCB4, ABCG2) cycles, 1-min extension at 72°C for 25 (ABCC2, ABCC4) or 30 (LRP, ABCC6) cycles and accompanied by a 10-min final extension at 72°C. PCR products were analyzed by electrophoresis in 2% agarose (Pharmacia, Peapack, NJ, USA) gel at constant 8 V/cm using TAE buffer (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid). DNA, visualized by ethidium bromide fluorescence, was photographed using the LAS 1000 CCD camera (Fuji; Fig. 2). The amount of the selected PCR product was densitometrically determined using AIDA software. The calibration curve was calculated from several DNA fragments of known mass/quantity.

Results

Sensitivity of MDA-MB-435 and NCI/ADR-RES to paclitaxel, docetaxel and new taxane analogs

The NCI/ADR-RES breast cancer cell line was markedly more resistant to paclitaxel and docetaxel than the MDA-MB-435 one. The IC₅₀ value of paclitaxel for NCI/ADR-RES was 1,000-fold higher and the IC₅₀ for docetaxel was 600-fold higher than for MDA-MB-435 cells (Table 1).

The IC₅₀ concentrations of SB-T-1103, SB-T-1214, and SB-T-1216 for the MDA-MB-435 were very similar to docetaxel (Table 1). Their IC₅₀ concentrations for NCI/ADR-RES cells were significantly lower than for paclitaxel and docetaxel.

Table 2 The expression of the ABC transporter genes

| ABC genes | Alias | Expression of genes for ABC membrane transporters in different cell lines | | |
|------------------|---------------------|---|------------------|-------------------|
| | | Caco-2 cells | MDA-MB-435 cells | NCI/ADR-RES cells |
| ABCB1 | MDR1, P-gp, PGY1 | 752±160 (16) | 5±1 (0) | 4,693±1,181 (100) |
| ABCB4 | MDR3, PFIC-3, PGY-3 | 0 (0) | 0 (0) | 3±1 (0) |
| ABCB5 | – | 0 (0) | 19±2 (0) | 1±1 (0) |
| ABCC1 | MRP1, MRP, GS-X | 103±27 (2) | 155± 47 (3) | 486±278 (10) |
| ABCC2 | MRP2, cMOAT, cMRP | 3,428±100 (73) | 817±14 (17) | 18±2 (0) |
| ABCC3 | MRP3, MLP2, MOAT-D | 47±4 (1) | 2±1 (0) | 6±2 (0) |
| ABCC4 | MRP4, MOAT-B | 2,363±855 (50) | 724±15 (15) | 453±263 (10) |
| ABCC5 | MRP5, SMRP, MOAT-C | 70±18 (2) | 111±32 (2) | 257±107 (5) |
| ABCC6 | MRP6, MLP1, ARA | 21±2 (0) | 0 (0) | 5±2 (0) |
| ABCG2 | BCRP, MXR, ABCP | 170±44 (4) | 6±1 (0) | 8±1 (0) |
| LRP ^a | MVP, LRP/MVP | 53±8 (1) | 31±5 (1) | 90±17 (2) |
| 18 S rRNA | – | 363±73 (7) | 297±59 (6) | 246±42 (5) |

Different expression of ABC membrane transporters and LRP protein was determined in sensitive MDA-MB-435 cells and resistant NCI/ADR-RES cells. Caco-2 cells were used as a positive control of the expression of different transporters. The data represent the amount of the PCR product (ng) after 25 cycles, calibrated according to several DNA fragments of defined molecular mass, using AIDA software. Data in parentheses are in percent of ABCB1 expression in NCI/ADR-RES. Data are shown as mean ± SD (*n*=3)

^aLRP is not a member of the ABC transporter family. LRP was identified as the major vault protein in humans and multidrug-resistant cancer cells frequently overexpress this protein (Scheffer et al. 1995)

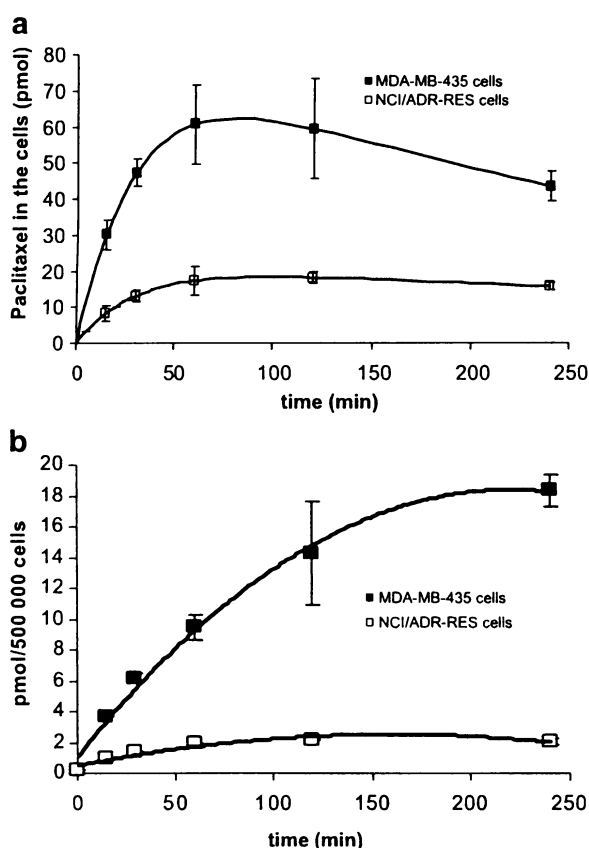


Fig. 3 **a** Uptake of non-radioactive paclitaxel by NCI/ADR-RES cells and MDA-MB-435 after 15, 30, 60, 120, and 240 min incubation of 1 μ M paclitaxel. The levels of paclitaxel were measured by HPLC. **b** Uptake of radioactive labeled [14 C]paclitaxel by NCI/ADR-RES cells and MDA-MB-435 after 15, 30, 60, 120, and 240 min incubation with 100 nM paclitaxel. The levels of paclitaxel were measured by liquid scintillation. Data are shown as means of duplicate determinations \pm SD

mRNA expression of ABCB1 and other transporters

The two cell lines markedly differed in that NCI/ADR-RES cells expressed high levels of ABCB1 mRNA and almost no ABCC2 and ABCB5 mRNAs, whereas MDA-MB-435 cells lacked ABCB1 and expressed markedly higher levels

of ABCC2 and several-fold higher levels of ABCB5 mRNA (Table 2). Both cell lines expressed rather similar levels of ABCC1, ABCC4 mRNA, and ABCC5, low levels of ABCG2 and medium levels of LRP mRNAs, and lacked or expressed very low levels of ABCB4, ABCB5, and ABCC6 mRNAs (Fig. 2).

Transport of paclitaxel and docetaxel

The uptake and efflux of paclitaxel and docetaxel were investigated to prove the hypothesis that P-gp-related efflux was responsible for different sensitivities of MDA-MB-435 and NCI/ADR-RES cells. Intracellular concentrations during uptake result from the sum of inward and outward transport, but in the efflux experiments, the re-uptake probably plays a minor role due to very low drug levels in the medium.

Paclitaxel uptake was initially determined in cells exposed to 1 μ M of non-radioactive paclitaxel with analysis by HPLC. MDA-MB-435 cells absorbed up to 6-fold higher levels than NCI/ADR-RES cells (Fig. 3a). The decreasing intracellular levels of paclitaxel in the sensitive MDA-MB-435 cells between 60 and 240 min of exposure could be related to cytotoxicity, since 1 nM concentration was the IC₅₀ level in these cells after 96-h exposure and such a decrease did not occur in NCI/ADR-RES cells, where the IC₅₀ after 96-h exposure was 1 μ M. Docetaxel (1–2 μ M) uptake after 60–120 min was 4- to 6.8-fold higher in MDA-MB-435 than in NCI/ADR-RES cells. The amounts of imported paclitaxel and docetaxel in MDA-MB-435 cells and NCI/ADR-RES cells exposed to 1 μ M paclitaxel or docetaxel are shown in Table 3.

The MDA-MB-435 cells constituted 0.4% of the incubation volume and NCI/ADR-RES cells represented 0.6% of the volume. Thus, MDA-MB-435 cells, which absorbed 0.063 nmol from the available 1 nmol of [14 C]paclitaxel, reached a 16-fold higher level than that of the medium, whereas NCI/ADR-RES cells, which absorbed 0.018 nmol, reached a <3-fold higher level than the medium.

The uptake of [14 C]paclitaxel at 100 nM concentration in the medium showed a time course of intracellular levels similar to non-radioactive paclitaxel, but the levels did not decrease after 60 min (Fig. 3b), apparently due to a 10-fold

Table 3 Comparison of proportions of taxanes absorbed into MDA-MB-435 and NCI/ADR-RES cells after incubation for 60, 120 or 240 min and HPLC detection

| Taxane | Concentration (μ M) | Percentage of absorbed drugs in MDA-MB-435/NCI/ADR-RES cells ^a | | |
|------------------------|--------------------------|---|------------------------------|------------------------------------|
| | | 60 min incubation | 120 min incubation | 240 min incubation |
| Paclitaxel | 1 | 6.3 \pm 0.8/1.6 \pm 0.2 | 5.7 \pm 1.1/1.6 \pm 0.2 | 4.5 \pm 0.3/1.6 \pm 0.1 |
| [14 C]paclitaxel | 0.1 | 9.3 \pm 0.4/1.9 \pm 0.1 | 14.4 \pm 3.5/2.2 \pm 0.1 | 18.4 \pm 1.1 \pm 1.9 \pm 0.1 |
| Docetaxel | 1 | 5.6 \pm 0.1/1.4 \pm 1.4 | 5.4 \pm 0.7/0.8 \pm 0.1 | – |
| SB-T-1103 | 1 | 4.0 \pm 0.1/6.1 \pm 0.5 | 5.2 \pm 1.3/6.7 \pm 0.6 | – |
| SB-T-1214 | 1 | 5.7 \pm 0.1/6.2 \pm 0.1 | 4.0 \pm 0.2/5.5 \pm 0.1 | – |
| SB-T-1216 | 1 | 7.6 \pm 0.1/4.5 \pm 0.2 | 6.1 \pm 0.4/2.8 \pm 0.4 | – |

^aThe percentage of taxanes absorbed by the cells (0.5×10^6 /ml/well) during various periods of incubation selected in relation to their cytotoxicity. (–), not analyzed. Variability is expressed as \pm differences of the two separate experimental values ($n=2$)

lower concentration. The uptake of [^{14}C]paclitaxel in the resistant NCI/ADR-RES cells at 20, 50, 200, and 500 nM concentrations respectively was proportional to the concentration (Fig. 4a), suggesting that the elimination capacity of P-gp at this concentration range was not capacity-limited. In contrast, intracellular [^{14}C]paclitaxel levels in the sensitive MDA-MB-435 cells increased less than proportionally to concentration (Fig. 4b) and the levels after 15-min exposure were 9-fold higher than in the resistant NCI/ADR-RES cells, but only 4.4-fold higher after 60 min, suggesting possible capacity-limited inward transport. During 4-h incubation at 20 or 50 nM [^{14}C]paclitaxel-sensitive MDA-MB-435 cells accumulated up to almost 13% of the available [^{14}C]paclitaxel, whereas resistant NCI/ADR-RES cells accumulated about 1.3% of it. The above-mentioned different volumes of the cells indicated that the MDA-MB-435 cells reached about 33-fold higher concentration of [^{14}C]paclitaxel, whereas NCI/ADR-RES cells—due to their larger volume and lower accumulated amount—reached only a 2-fold higher concentration than that in the medium.

In cells exposed to 200 μM [^{14}C]paclitaxel for 120 min and transferred into fresh medium (Fig. 4c), the subsequent efflux decreased [^{14}C]paclitaxel levels in resistant NCI/ADR-RES cells to 50% within 25 min, while in the MDA-MB-435 cells the concentration decreased to 50% after 90 min. In the NCI/ADR-RES cells, the concentration at the onset of efflux was 2.5-fold lower than in the sensitive MDA-MB-435 cells and a 4-fold difference in concentration developed at 90 min of elimination.

Effect of verapamil on [^{14}C]paclitaxel transport and cytotoxicity

The presence of 100 μM verapamil increased [^{14}C]paclitaxel intracellular concentration in NCI/ADR-RES cells highly expressing P-gp 8-fold (Fig. 5a) reaching concentrations similar to MDA-MB-435 cells. In the MDA-MB-435 cells not expressing P-gp, verapamil only increased the intracellular levels of [^{14}C]paclitaxel 1.4-fold (Fig. 5b). As expected, efflux of [^{14}C]paclitaxel after 120 min loading with 100 nM [^{14}C]paclitaxel was inhibited by 100 μM verapamil in NCI/ADR-RES cells (Fig. 5c). In contrast, the efflux of [^{14}C]paclitaxel from MDA-MB-435 cells was stimulated in proportion to 100–400 μM verapamil (Fig. 5d), which has apparently not been reported before.

Cytotoxicity of 0.3 μM paclitaxel for NCI/ADR-RES cells (40% of the cells survived) in a 96-h assay was increased about 30-fold by verapamil (only about 1% of the cells survived), although verapamil (up to 10 μM) alone was not cytotoxic, indicating that the effect on paclitaxel transport was the crucial factor increasing paclitaxel cytotoxicity. In contrast, cytotoxicity of 3 nM paclitaxel, killing 50% of MDA-MB-435 cells, was only doubled and cytotoxicity of 0.3 nM paclitaxel, the nearest non-cytotoxic concentration, was not influenced by verapamil at all (data not shown).

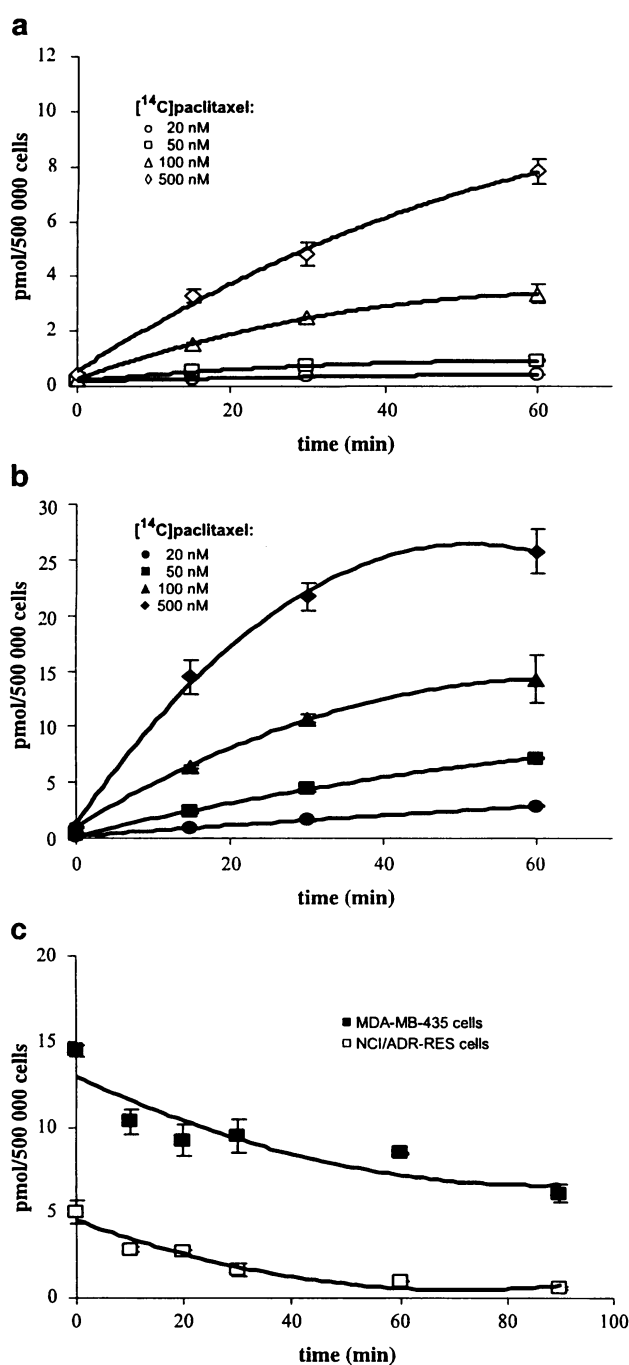


Fig. 4 Effect of growing concentrations of [^{14}C]paclitaxel on its uptake in **a** NCI/ADR-RES cells and **b** MDA-MB-435 cells. Incubation periods were 0, 15, 30, and 60 min. **c** [^{14}C]Paclitaxel efflux from NCI/ADR-RES and MDA-MB-435 cells after 120 min loading at 200 nM concentration of [^{14}C]paclitaxel. Efflux times were 10, 20, 30, 60, and 90 min. The levels of paclitaxel were measured by liquid scintillation. Data are shown as means of duplicate determinations \pm SD and expressed as pmol/500,000 cells/well

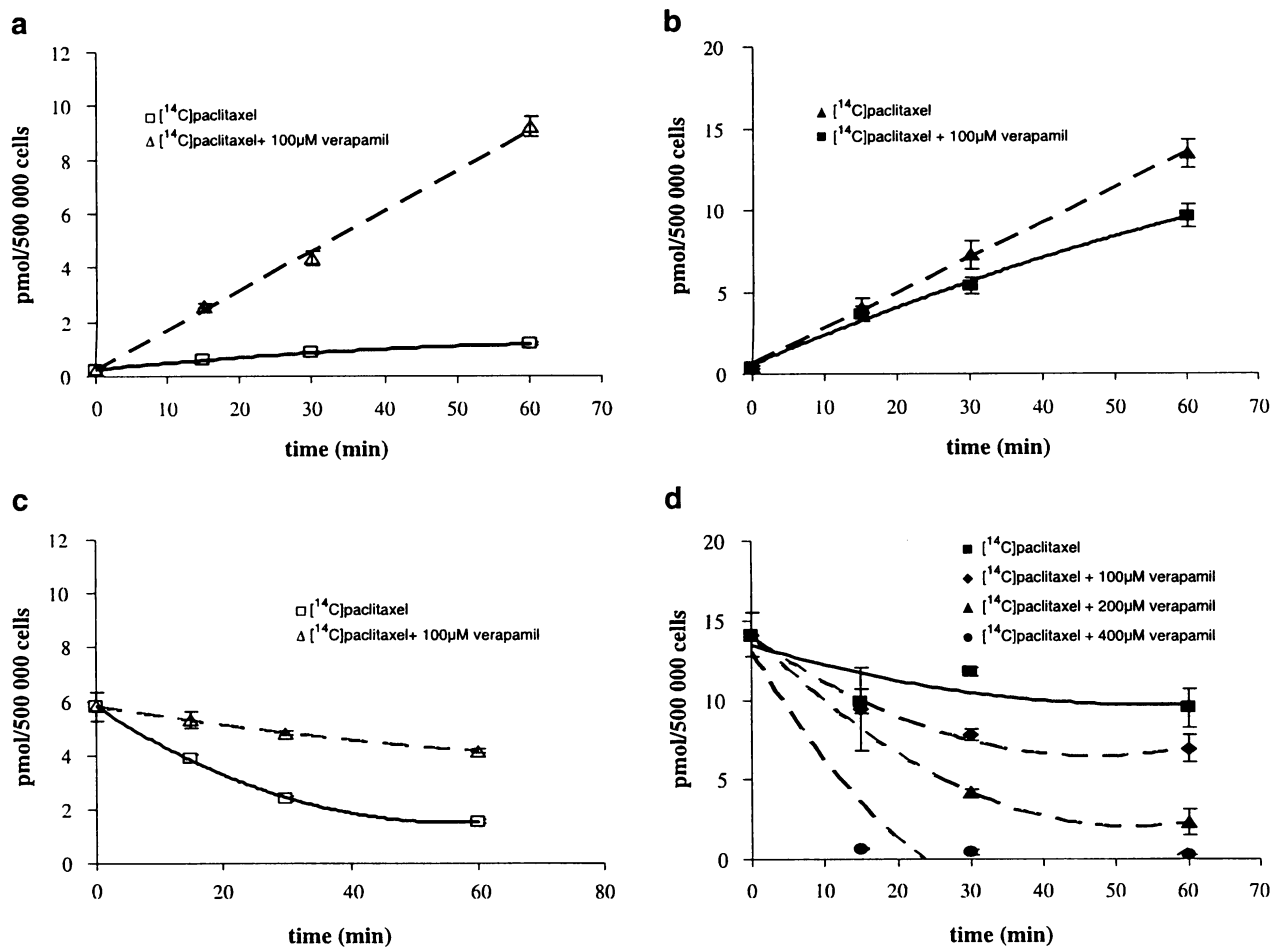


Fig. 5 Effect of 100 μM verapamil on uptake of 100 nM [¹⁴C]paclitaxel in **a** NCI/ADR-RES cells and **b** MDA-MB-435 cells. Incubation periods were 0, 15, 30, and 60 min. **c** The effect of verapamil on efflux of 100 nM [¹⁴C]paclitaxel in NCI/ADR-RES cells. **d** The effect of growing concentration of verapamil (100, 200,

and 400 μM respectively) on [¹⁴C]paclitaxel efflux in MDA-MB-435 cells. Efflux times were 0, 15, 30, and 60 min. The levels of paclitaxel were measured by liquid scintillation. Data are shown as means of duplicate determinations ± SD and expressed as pmol/500,000 cells/well

Uptake of SBT analogs and its relation to cytotoxicity

The hypothesis that small differences in the toxicities of SB-T-1214, SB-T-1216, and SB-T-1103 between MDA-MB-435 and NCI/ADR-RES cells are due to their modulation of P-gp was investigated by measuring their uptake by the two cell lines with greatly differing P-gp expression. Both cell lines exposed to 1 μM SB-T-1103, SB-T-1214 or SB-T-1216 absorbed, during 60 or 120 min of incubation, similar amounts of the drugs (Table 3). This complies with the fact that NCI/ADR-RES cells are much more resistant to paclitaxel and docetaxel than MDA-MB-435, but their sensitivity to SB-Ts is similar.

Effect of SB-T-1103, SB-T-1214 or SB-T-1216 on [¹⁴C]paclitaxel transport

Contrary to our expectation that SB-T taxanes would enhance [¹⁴C]paclitaxel uptake in NCI/ADR-RES line highly

expressing P-gp similar to verapamil, SB-T-1214 and SB-T-1103 had no effect and SB-T-1214 even caused a dose-dependent inhibition of [¹⁴C]paclitaxel uptake in NCI/ADR/RES cells highly expressing P-gp (Fig. 6a) and MDA-MB-435 cells not expressing P-gp (Fig. 6b).

The expected inhibition of [¹⁴C]paclitaxel efflux from NCI/ADR-RES cells highly expressing P-gp by the P-gp modulating SB-T-1214 was not observed (data not shown). In contrast, SB-T-1214 appeared to stimulate efflux of [¹⁴C]paclitaxel from MDA-MB-435 cells not expressing P-gp (Fig. 6c). Subsequently, we observed that the [¹⁴C]paclitaxel content in MDA-MB-435 cells pre-exposed for 120 min and rapidly washed with ice-cold PBS was proportionally decreased by rinsing with increasing concentrations of SB-T-1214 in ice-cold PBS indicating that it did not influence the ABC transport processes, but rather released [¹⁴C]paclitaxel from the cell surface.

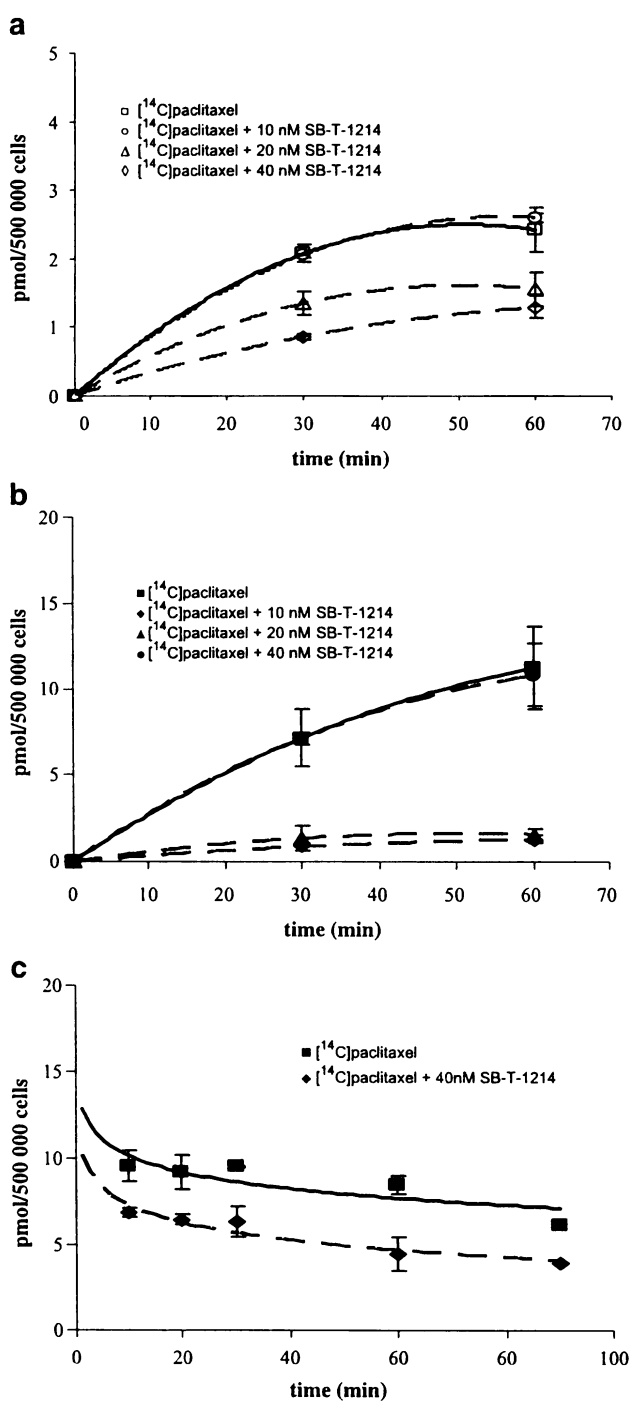


Fig. 6 The effect of novel taxane SB-T-1214 on the uptake of 100 nM $[^{14}\text{C}]$ paclitaxel after 30 and 60 min of incubation in **a** NCI/ADR-RES cells and **b** MDA-MB-435 cells. **c** The effect of the novel taxane SB-T-1214 on the efflux of 100 nM $[^{14}\text{C}]$ paclitaxel in MDA-MB-435 cells. Incubation periods were 0, 10, 20, 30, 60, and 90 min. The levels of paclitaxel were measured by liquid scintillation and are expressed as pmol/500,000 cells/well. Data are shown as means of duplicate determinations \pm SD

Discussion

This study shows that the adriamycin-resistant NCI/ADR-RES cells highly expressing P-gp were 1,000-fold more resistant to paclitaxel and 600-fold more resistant to docetaxel, but almost equally sensitive to SB-T-1103, SB-T-1214, and SB-T-1216 than MDA-MB-435 cell lines not expressing P-gp. The almost 20-fold lower uptake of $[^{14}\text{C}]$ paclitaxel and significantly lower uptake of docetaxel in NCI/ADR-RES were apparently responsible for their resistance compared with MDA-MB-435 cells and the similar uptake of SB-Ts was responsible for their similar sensitivity. This complies with the fact that P-gp exports paclitaxel and docetaxel from tumor cells (Gottesman and Pastan 1993; Litman et al. 2001), but questions its role in the transport of SB-T taxanes.

The fact that NCI/ADR-RES cells accumulated $[^{14}\text{C}]$ paclitaxel in proportion to a 20–500 nM level, whereas MDA-MB-435 cells accumulated less than proportionally suggests that uptake in the latter cells could be capacity limited, although the absolute amounts were much higher than in the resistant cells. MDA-MB-435 cells in particular accumulated a markedly lower proportion of paclitaxel at 1 μM than at the 500-nM level (Fig. 4a, b; Table 3), but capacity-limited uptake was evident in the whole concentration range.

At clinically relevant concentrations the internal concentration of $[^{14}\text{C}]$ paclitaxel in MDA-MB-435 cells was >30-fold higher than in the medium, whereas in NCI/ADR-RES cells this was only 2-fold higher. In this aspect NCI/ADR-RES cells resemble conditions in tumors in the organism more than the MDA-MB-435 cells. The capacity-limited uptake in MDA-MB-435 cells at lower concentrations indicates that sensitivity may not result only from weak drug efflux, but also from efficient inward transport by tumor cells. Obviously, the very high drug concentration observed in the tumor cells is partly attributed to the fact that under in vitro incubation conditions the drug concentration in the medium during incubation remains virtually unchanged. In contrast, tumor cells in the organism take advantage of the drug elimination by metabolism and excretion, which decreases drug concentration in the extracellular space, and the effluxed drug is rapidly drained from its surroundings by blood and eventually urine and feces.

Although this difference in paclitaxel uptake between the two cell lines (<20-fold) is less than the differences in IC_{50} (1,000-fold), the fact that the multiplying of $\text{IC}_{50} \times \text{time}$ for taxanes significantly decreases with time of cell exposure, and the uptake lasted up to 2 h, whereas cytotoxicity was evaluated after 96 h suggests that difference in uptake may play a dominant role in the 1,000-fold different IC_{50} values between the two cell lines.

Verapamil significantly increased $[^{14}\text{C}]$ paclitaxel uptake (8-fold) and decreased its efflux in NCI/ADR-RES cells highly expressing P-gp. In the MDA-MB-435 cells not expressing P-gp verapamil increased $[^{14}\text{C}]$ paclitaxel uptake

marginally (1.4-fold) and unexpectedly induced a dose-dependent increase in [^{14}C]paclitaxel efflux. This suggests that these cells may express another transporter that is stimulated by verapamil. Since MDA-MB-435 cells are lacking P-gp, but highly express ABCB5 and ABCC2 (Mrp2), which both export drugs from the cells (Huang et al. 2004; Ferguson et al. 2005), the concentration-related stimulation of paclitaxel efflux could be due to stimulation of either of these two transporters. Although the stimulation of paclitaxel efflux occurred at rather high concentrations of verapamil, this represents an interesting phenomenon. Mrp2 is a potential candidate for efflux of paclitaxel from MDA-MB-435 cells, because Ferguson et al. (2005) reported significantly higher resistance to paclitaxel in kidney cancer cells highly expressing MRP2. Thus, verapamil may have a potentially favorable antitumor effect on cancer cells highly expressing P-gp, but a contrary effect in tumors highly expressing ABCB2 or ABCC5, which might compromise its clinical use in certain tumors. It should be re-emphasized, though, that the stimulation occurred at rather high concentrations of verapamil.

Stimulation of active drug transport by another drug is not a new phenomenon. P-gp-mediated transport can be stimulated, e.g., by cooperativity, but in this case the export mechanism is unrelated to P-gp, which is absent in MDA-MB-435 cells. Moreover, we can speculate about a mechanism related to the binding of paclitaxel to beta-tubulin, which effectively binds taxanes and may be partly responsible for the fact that MDA-MB-435 cells can accumulate paclitaxel at an almost 20-fold higher concentration than that in the medium in contrast to relatively uniform distribution in the organism (Eisenhauer and Vermorken 1998). Verapamil releases vincristine from binding to tubulin (Parekh and Simpkins 1996). Although the binding site for paclitaxel is different from vincristine, such a mechanism could change the balance of intracellular levels of paclitaxel between cytoplasm and beta-tubulin and thereby diminish paclitaxel uptake from the extracellular space.

The fact that the novel taxanes SB-T-1103, SB-T-1214, and SB-T-1216 modulate P-gp in a way described with the structurally similar SB-T-101187, SB-T-1213, and SB-T-1250 (Ojima et al. 1996; Ferlini et al. 2000) may explain their observed 1,000-fold lower IC_{50} concentrations for NCI/ADR-RES cells than that of paclitaxel. This complies with the finding that both cell lines absorbed similar amounts of SB-T-1103, SB-T-1214, and SB-T-1216 (Table 3).

The reported effective modulation of the P-gp efflux pump by SB-T analogs (Ojima et al. 1996; Ferlini et al. 2000) was expected to increase [^{14}C]paclitaxel uptake, especially in NCI/ADR-RES cells highly expressing P-gp. However, SB-T-1216 and SB-T-1103 did not significantly influence [^{14}C]paclitaxel uptake (data not shown) and SB-T-1214 even inhibited it in both tumor cell lines irrespective of P-gp expression and did not influence efflux in either type of cells. The effect may be due to inhibition of inward transport, unrelated to P-gp, as the inhibition was proportional to SB-T-1214 concentration in both tumor cell lines. Moreover, inhibition of inward transport could be

due to strong binding of SB-T-1214 to beta-tubulin, preventing efficient uptake of [^{14}C]paclitaxel as mentioned above.

Finally, the MDA-MB-435 and NCI/ADR-RES cell lines proved to be interesting models for the significantly different expression of ABCB1, ABCC2, and ABCB5 genes and for the expression of several other genes of ABC transporters and LRP transporter. Semi-quantitative RT-PCR was found to be a suitable and sufficiently sensitive method for the detection of large series of ABC transporter genes even in very small amounts. The application of this method is supported by the finding that even very low levels of MDR1 or MRP mRNA in human breast cancer cell lines were successfully detected, whereas protein products were not detected by immunohistochemistry (Faneyte et al. 2001a, 2001b). Moreover, good correlation was found in the expression of mRNA MDR1 and MRP1 genes and their protein detection and function (van der Kolk et al. 2000). In conclusion, MDA-MB-435 and NCI/ADR-RES human breast cancer cells displayed markedly different transport of paclitaxel and docetaxel, but similar uptake of novel taxanes SB-T-1103, SB-T-1214, and SB-T-1216. The 1,000-fold higher cytotoxicity of novel taxanes for resistant tumor cells than that of classical taxanes is potentially useful for therapy for taxane-resistant tumors. Verapamil predictably decreased P-gp-related efflux of paclitaxel and increased cytotoxicity in NCI/ADR-RES cells, but it unexpectedly stimulated the efflux of paclitaxel in MDA-MB-435 cells by a P-gp-unrelated mechanism in a phenomenon that is still unknown. SB-T-1214, which effectively overcame the P-gp efflux pump, did not inhibit [^{14}C]paclitaxel efflux in NCI/ADR-cells, but inhibited [^{14}C]paclitaxel uptake, probably by inhibition of active inward transport. Thus, higher sensitivity of a tumor line may not only be due to lower active efflux, but possibly also be due to higher inward active transport.

Acknowledgements This work was supported by grants IGA NL/7567-3 and GACR 305/04/0403 and grants from the National Institute of Health, USA, GM42978 and CA103314 (to I.O.)

References

- Cantiello HF (2001) Electrodifusional ATP movement through CFTR and other ABC transporters. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 443:S22–S27
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156–159
- Dean M, Rhetsky A, Allikmets R (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 11:1156–1166
- Ding S, Chamberlain M, McLaren A, Goh L, Duncan I, Wolf CR (2001) Cross-talk between signalling pathways and the multi-drug resistant protein MDR-1. *Br J Cancer* 85:1175–1184
- Eisenhauer EA, Vermorken JB (1998) The taxoids. Comparative clinical pharmacology and therapeutic potential. *Drugs* 55:5–30
- Faneyte IF, Kristel PM, van de Vijver MJ (2001a) Determining MDR1/P-glycoprotein expression in breast cancer. *Int J Cancer* 93:114–122

- Faneyte IF, Kristel PM, Vijver MJ (2001b) Multidrug resistance associated genes MRP1, MRP2 and MRP3 in primary and anthracycline exposed breast cancer. *Anticancer Res* 24:2931–2939
- Ferguson RE, Jackson SM, Stanley AJ, Joyce AD, Hamden P, Morrison EE, Patel PM, Phillips RM, Selby PJ, Banks RE (2005) Intrinsic chemotherapy resistance to the tubulin-binding antimetabolic agents in renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 115:155–163
- Ferlini C, Distefano M, Pignatelli F, Lin S, Riva A, Bombardelli E, Mancuso S, Ojima I, Scambia G (2000) Antitumour activity of novel taxanes act at the same time as cytotoxic agents and P-glycoprotein inhibitors. *Br J Cancer* 83:1762–1768
- Ford JM, Hait WN (1990) Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol Rev* 42:155–199
- Garg MB, Ackland SP (2000) Simple and sensitive high-performance liquid chromatography. Method for determination of docetaxel in human plasma and urine. *J Chromatogr B* 748:383–388
- Gottesman MM, Pastan I (1993) Modulation of multidrug resistance phenotype. *Cell Pharmacol* 1:S111–S112
- Gut I, Danielova V, Holubova J, Soucek P, Kluckova H (2000) Cytotoxicity of cyclophosphamide, paclitaxel, and docetaxel for tumor cell lines in vitro: effects of concentration, time and cytochrome P450-catalyzed metabolism. *Arch Toxicol* 74:437–446
- Huang Y, Anderle P, Bussey KJ, Barbacioru C, Shankavaram U, Dai Z, Reinhold WC, Papp A, Weinstein JN, Sadee W (2004) Membrane transporters and channels: role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res* 64:4294–4301
- Litman T, Zeuthen T, Skovsgaard T, Stein WD (1997) Competitive, non-competitive and cooperative interactions between substrates of P-glycoprotein as measured by its ATPase activity. *Biochim Biophys Acta* 1361:169–176
- Litman T, Druley TE, Stein WD, Bates SE (2001) From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell Mol Life Sci* 58:931–959
- Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM (2003) Simultaneous binding of two different drugs in the binding pocket of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *J Biol Chem* 278:39706–39710
- Miller ML, Ojima I (2001) Chemistry and chemical biology of taxane anticancer agents. *Chem Rec* 1:195–211
- Mosmann TJ (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63
- Ojima I, Slater JC, Michaud E, Kuduk SD, Bounaud PY, Vrignaud P, Bissery MC, Veith JM, Pera P, Bernacki RJ (1996) Synthesis and structure-activity relationships of the second-generation antitumor taxoids: exceptional activity against drug-resistant cancer cells. *J Med Chem* 39:3889–3896
- Parekh H, Simpkins H (1996) Species-specific differences in taxol transport and cytotoxicity against human and rodent tumor cells. Evidence for an alternate transport system. *Biochem Pharmacol* 51:301–311
- Penson RT, Oliva E, Skates SJ, Glyptis T, Fuller AF Jr, Goodman A, Seiden MV (2004) Expression of multidrug resistance-1 protein inversely correlates with paclitaxel response and survival in ovarian cancer patients: a study in serial samples. *Gynecol Oncol* 93:98–106
- Scheffer GL, Wijngaard PL, Flens MJ, Izquierdo MA, Slovak ML, Pinedo HM, Meijer CJ, Clevers HC, Scheper RJ (1995) The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. *Nat Med* 1:578–582
- Shepard RL, Winter MA, Hsaio SC, Pearce HL, Beck WT, Dantzig AH (1998) Effect of modulators on the ATPase activity and vanadate nucleotide trapping of human P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol* 56:719–727
- Taipalensuu J, Tomblom H, Lindberg G, Einarsson C, Sjoqvist F, Melhus H, Garberg P, Sjostrom B, Lundgren B, Artursson P (2001) Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers. *J Pharmacol Exp Ther* 299:164–170
- Vaclavikova R, Horsky S, Simek P, Gut I (2003) The paclitaxel metabolism in rat and human liver microsomes is inhibited by phenolic antioxidants. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 368:200–209
- Van der Kolk DM, de Vries EG, van Putten WJ, Verdonck LF, Ossenkoppele GJ, Verhoef GE, Vellenga E (2000) P-glycoprotein and multidrug resistance protein activities in relation to treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 6:3205–3214
- Zhang JT (2001) The multi-structural feature of the multidrug resistance gene product P-glycoprotein: implications for its mechanism of action (hypothesis). *Mol Membr Biol* 18:145–152

Příloha V

Gut I., Ojima I., Václavíková R., Šimek P., Horský S.,

Linhart I., Souček P., Kondrová E.:

Metabolism of new generation taxanes in human, pig,
minipig and rat liver microsomes.

Předloženo k recenzi v *Xenobiotica*.

METABOLISM OF NEW GENERATION TAXANES IN HUMAN, PIG, MINIPIG AND RAT LIVER MICROSOMES

Ivan Gut, Iwao Ojima, Radka Vaclavikova, Petr Simek, Stanislav Horsky, Igor Linhart, Pavel Soucek, Eliska Kondrova

National Institute of Public Health, CZ-100 42 Prague 10 (I.G., R.V., S.H., P.S., E.K.), Czech Republic, Institute of Entomology, CAS, CZ- Ceske Budejovice (P.Simek.), Czech Republic; State University of New York at Stony Brook, N.Y. (I.O.), USA; Faculty of Science, Charles University, CZ- Prague (R.V.), Czech Republic, 3rd Faculty of Medicine, Charles University, CZ- Prague (E.K.), Czech Republic, Institute of Chemical Technology, CY-Prague (I.L.)

RUNNING TITLE PAGE

Running title: Metabolism of novel SB-T taxanes

Corresponding author: Dr. Ivan Gut

Biotransformation Group
National Institute of Public Health
Srobarova 48
CZ-100 42 Prague 10
Czech Republic
tel. +4202 67 082 765, fax. +4202 267 311 236
e-mail: ivan.gut@szu.cz

Manuscript data: Number of text pages: 24

Number of Tables: 4

Number of Figures: 3

Number of References: 14

Number of words in the Abstract: 208

Number of words in the Introduction: 361

Number of words in the Discussion: 590

Nonstandard abbreviations: CYP, cytochrome P450; PCN, pregnenolon-16 α -carbonitrile; MS/MS tandem mass spectrometry; t_R , retention time; HPLC, high performance liquid chromatography.

FOOTNOTES:

Financial support from the Grant Agency of the Czech Republic (Project No. 305/04/0403) is gratefully acknowledged.

Part of the results was presented at the 15th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, Mainz, Germany, July 4 – July 9, 2005.

Address correspondence to: Dr. Ivan Gut, Biotransformation Group, National Institute of Public Health, Srobarova 48, CZ-100 42 Prague 10, Czech Republic, e-mail: ivan.gut@szu.cz.

ABSTRACT:

Novel taxanes, SB-T-1103, SB-T-1214 and SB-T-1216 are up to 1000-fold more cytotoxic for resistant tumor cells than clinically used paclitaxel and docetaxel. We investigated their so far unknown metabolism in human, rat, pig and minipig liver microsomes. Metabolites were separated by HPLC and their structures were then characterized by HPLC/MS/MS analysis. Metabolic pathways derived from their structures were confirmed by investigating further metabolism of purified metabolites. SB-T-1103, SB-T-1214 and SB-T-1216 were metabolized to 11, 10 and 8 products, respectively. In contrast to docetaxel, side chain hydroxylation did not occur at the *tert*-butyl, but on 2-methyl propane or 2-methylpropane and these metabolites of structurally similar SB-T-1214 and SB-T-1216 were similar. There were significant qualitative and quantitative species differences in their metabolism. For example human and untreated rat microsomes hydroxylated SB-T-1216 more at the side chain, whereas pig and minipig microsomes oxidized more the taxane core. The different metabolic patterns of SB-T-1103, SB-T-1214 and SB-T-1216 in microsomes of rats with induced high expression of CYP3A1/2 compared to uninduced rats are compatible with the role of CYP3A in taxane metabolism. The principal role of CYP3A orthologues in taxane metabolism was confirmed by the formation of all significant metabolites by human cDNA expressed CYP3A4 and lack of metabolism by CYP1A2, 1B1, 2A6, 2C9 and 2E1. Detailed knowledge of metabolic pathways of the examined agents and their rates is extremely important due to possible metabolic inactivation of these three novel potential drugs for therapy of taxane-resistant tumors. The relatively slowest metabolism of SB-T-1103 could be important for its antitumor efficiency *in vivo*.

Paclitaxel (TAXOL[®]) and docetaxel (TAXOTERE[®]) are currently used as important anticancer drugs in the therapy of breast and ovarian cancer (Rowinsky et al., 1992; Huizing et al., 1995) as well as for the treatment of lung, head and neck, prostate, and cervical cancers.

Although both paclitaxel and docetaxel (Fig.1) possess strong antitumor activity, treatment with these drugs often results in a number of undesirable side effects, as well as multidrug resistance (MDR), often associated with high expression of the ABC transporter P-glycoprotein (P-gp) (Gottesman & Pastan, 1993; Litman et al., 2001). Photo-affinity labeling of P-gp using photo-reactive radiolabeled paclitaxel analogs along with molecular modeling revealed a unique binding region for paclitaxel on the C-terminal half of P-gp (Geney et al., 2002).

Thus, it has become essential to develop new anticancer agents with higher activity against other tumors, drug-resistant tumors and fewer side effects. This effort resulted in the development of the second-generation taxoids (Miller & Ojima, 2001). These taxoids possess extremely high potency against drug-resistant cancer cells expressing the MDR phenotype. For instance, SB-T-110131 (IDN5109) has recently entered human clinical trials due to its high potency against a variety of drug-resistant tumors, exceptional oral activity and reduced general toxicity, neurotoxicity or cardiotoxicity (Miller & Ojima, 2001). Three of the second generation of taxanes (SB-T-11033, 121303 and 121304) show the same activity in drug-resistant and drug-sensitive cell lines (Ojima et al., 1999). A new group of 20 noncytotoxic synthetic taxane-based reversal agents (tRAs) having the taxane baccatin backbone, but lacking the C-13 side chain of paclitaxel modulated paclitaxel cytotoxicity in P-gp-overexpressing MDA435/LCC6-MDR1 cells. Four of them, especially tRA 98006, exerted broad-spectrum activity, modulating mitoxantrone efflux in resistant cell lines overexpressing P-gp, MRP-1 and BCRP (Brooks et al., 2003).

This study investigated (1) *in vitro* metabolic profiles and rates of three newly developed taxanes (SB-T-1103, SB-T-1214 and SB-T-1216) with modification at the C-10 and C-3' of the taxane framework. These positions have been previously found critical to make taxanes highly active against cells overexpressing the efflux pump P-glycoprotein (Ferlini et al.2000). All tested taxanes possess extremely high potency against resistant human breast cancer cells (Ojima et al., 1996) in comparison with classical taxanes suggesting great potential against taxane-resistant tumors. We have recently shown (Ehrlichova et al. 2005) that uptake of these three novel taxanes by P-gp highly expressing NCI/ADR-RES breast cancer cells was similar to sensitive MDA-MB-435 cells, although the uptake of paclitaxel and docetaxel in the former cells was up to 20-fold lower, indicating their great potential for P-gp related resistant tumors. We also investigated (2) whether different species metabolize these taxanes similarly (such as in docetaxel) or whether humans form specifically different metabolite (s) as is the case with paclitaxel and (3) compared the *in vitro* rates of metabolism, which could diminish effects of the drugs, as shown with paclitaxel and docetaxel and not detectable with metabolically poorly active tumors cell lines.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. The new generation taxanes were developed by prof. Iwao Ojima (Department of Chemistry, State University of New York at Stony Brook, N.Y). Methanol, acetonitrile and tetrahydrofuran were purchased from Merck (Darmstadt, FRG). Glucose 6-phosphate dehydrogenase was from Boehringer (Mannheim, FRG) and all other chemicals were from Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, FRG).

Preparation and Characterization of Microsomes. Male Wistar SPF rats purchased from VELAZ, CZ (weight 280–300 g) were kept on pellet diet and tap water ad libitum one week before experiments. For induction of CYP3A1/2, pregnenolone-16 α -carbonitrile (PCN) was given in five i.g. intubations, 25mg/kg in olive oil at 12h intervals for 3 days. Animals were killed 24h after the last PCN dose (Nedelcheva et al., 1998) giving higher CYP3A1/2 induction than

dexamethasone. They were euthanized by decapitation, and livers were rapidly excised and chilled in ice-cold physiological saline and homogenized in an ice-cold solution of 150 mM KCl/50 mM Tris-HCl, pH 7.4. Human liver samples were obtained from transplantation donors in accordance with Czech law. Livers were collected from 10 male organ donors with unknown drug history who had died from head injury (gun shot, traffic accidents) at the age of 16 to 42 years. During the heart or kidney transplantation procedure the liver samples were excised and immediately frozen and then maintained in liquid nitrogen. The time period between the beginning of blood exchange and freezing the liver in liquid nitrogen (9 - 46 min) as well as age did not correlate with various CYP activities and immunochemical levels (Nedelcheva et al., 1999). Untreated castrated male minipigs (Brno White variety of Goettingen minipig, 22-31kg, 6 months old) were kept in a breeding facility of The Palacky University (Olomouc, CZ). Untreated castrated male pigs (Czech Markedly Fleahy breed) were obtained from the Slaughter House, VUZV, Ricany, CZ). All pigs were fed regular commercial pig food. The livers from pigs and minipigs, obtained 10 min after electrocution and exsanguination, were kept on ice and homogenized within 2 h. Human and pig microsomes were prepared by differential centrifugation as described previously (Nedelcheva et al., 1998). CYP level was analyzed spectrophotometrically (Omura & Sato, 1964) and concentration of microsomal protein according to Lowry et al. (1951) with bovine serum albumin as standard.

Incubations. The incubation mixture (1.0ml) included 150 mM KCl/50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 1 mg of microsomal protein and 10 μ M SB-T-1103, SB-T-1214 or SB-T-1216 (added as 10 mM in methanol, up to 0.1%, v/v final concentration). Up to 1% concentration of methanol did not inhibit the metabolism of SB-T-1103, SB-T-1214 and SB-T-1216 (data not shown). The reaction was initiated by adding an NADPH-generating system (final concentrations 1 mM NADP; 10 mM glucose 6-phosphate; 10 mM MgCl₂; 0.5 U/ml of glucose 6-phosphate dehydrogenase). The samples were incubated at 37 °C for 30 min in a shaking water bath. The incubation was stopped by chilling the samples and immediate extraction with ethyl acetate. Control samples were incubated without the NADPH-generating system or without the SB-T analogues. 10 ml incubations were used to obtain sufficient amounts for HPLC/MS/MS analysis of the products. All the major metabolites isolated were subjected to further metabolism under identical conditions.

Metabolite Formation by cDNA-expressed Human P450 Enzymes. *E.coli* membranes with CYP bicistronic systems of CYP1A2, 1B1, 2A6, 2E1, 2C9 or 3A4 coupled with HOR (human P450 oxidoreductase) (Parikh et al., 1997) were used for analysis of their participation in the metabolism of SB-T-1103, SB-T-1214 or SB-T-1216. Plasmids containing the bicistronic system of various cDNA enzymes were obtained from F.P. Guengerich. Incubations (1.0 ml) with CYP3A4-HOR (150 pmol P450/ incubation and HOR present at a similar level) and 10 μ M SB-T-1103, SB-T-1214 or SB-T-1216 were processed as those with microsomes.

Sample Preparation and HPLC Analysis. Ethyl acetate extracts of SB-T-1103, SB-T-1214 or SB-T-1216 and their metabolites were evaporated to dryness under a mild nitrogen stream. The dry extracts were dissolved in 200 μ l of the mobile phase of methanol: water, 70:30 (v/v). The mobile phase previously used for optimal resolution of docetaxel oxazolidinediones (acetonitrile: methanol: tetrahydrofuran: water, 21:35:2:42) was used alternatively to indicate, whether all metabolites were resolved. HPLC conditions were as follows: HPLC Agilent Series 1100 HPLC system with autosampler, 20 μ l sample loop; Macherey-Nagel column (4 x 250 mm, Nucleosil 100-5 C18), flow rate 1.0 ml/min, detection wavelength 230 nm. The data were analyzed by CSW software (Chromatography Station for Windows), version 1.7. Only products formed in the presence of SB-T-1103, SB-T-1214 or SB-T-1216, and NADPH and not present in absence of either of them were considered as drug metabolites. In some experiments, HPLC ECOM (Prague,

CZ) was used for analytical purposes and for collection of metabolite peaks for subsequent HPLC/MS/MS analyses. The metabolite profiles were identical in both HPLC systems. Since all detected metabolites contained the taxane ring and none of them is available commercially, the metabolites were quantified assuming their similar signals in HPLC-UV detection.

Identification of metabolites of SB-T-1103, SB-T-1214 and SB-T-1216 by HPLC/MS/MS. HPLC elution fractions, representing metabolites of SB-T-1103, SB-T-1214 or SB-T-1216 were collected as defined peaks during HPLC analysis and dried under a mild nitrogen stream. Reanalysis of aliquots confirmed t_R and high purity of the collected metabolites (up to 98% in the major metabolites). The conditions for MS analysis were as follows: Synergi Hydro-RP, 85x2mm, 4 μ m, column temperature 35 °C, mobile phase MeOH – deionized water 70:30 with 10 mM ammonium formate, flow rate 200 μ l/min an LCQ mass spectrometer (ThermoFinnigan, USA) equipped with an electrospray ionization probe and operated in data dependent fullscan and MS/MS modes. Mass range 200-1100 mass units precursor isolation width, 5.normalized collision energy, 22 %. The samples were dissolved in 125 μ l of 10 mM ammonium formate/methanol (1:1), transferred into autosampler vials and 5 μ l injected into the HPLC column.

RESULTS

The structures of the taxanes are shown in Fig.1. The HPLC characteristics (t_R in min, t_R as % of the particular SB-T) of the respective metabolites of SB-T-1103, SB-T-1214 and SB-T-1216 are listed in Tables 2-4. Specific CYP contents are shown in Table 1.

Metabolism of SB-T-1103. SB-T-1103 was metabolized to 11 products. According to their increasing peak retention characteristics on an HPLC reversed phase column, the metabolites were designated consecutively as **M1-M11** (Table 2). Metabolites representing at least 90% of all products were subjected to HPLC/MS/MS analysis. Untreated rat (M4, M5, M7, M8, M9) and PCN rat microsomes (M2, M3, M4, M6, M8), respectively, were suitable sources for collection of the quantitatively most important metabolites.

M1 was a minor metabolite, present only in pig and rat microsomes. **M2**, found only in PCN microsomes (25% of all detected metabolites) was double-hydroxylated at the C13/C3'. CID ESI MS² spectra of fragment proved the hydroxylation of 2-methylpropane, positioned according to chemical reactivity at the two backbone carbons (S+32, monoisotopic molecular mass 874.4). The M2 peak contained a minor trihydroxylated S+48 metabolite (MM, 890.5, 9% of the M2 peak in MS analysis). **M3** (T-57, MM 786.4) also detected only in PCN microsomes (12% of all metabolites), represented a loss of the C-10 propionate at the taxane core; M3 peak also contained a T-57/S+16 product hydroxylated as M7 or M8, i.e. at one carbon of the 2-methylpropane backbone (MM, 802.4, 14% of M3 peak mass). **M4** (S+16+T+16, MM 874.4) absent in humans, constituted 5-6% of metabolites in pig and minipig microsomes. It was hydroxylated at the C13/C3' 2-methylpropane backbone as well as at the C-10 propionate of the taxane core.

M5 (+16, MM, 858.4) was a minor monohydroxylated product (position of OH not determined) in all untreated microsomes and absent in PCN ones; the peak isolated from rat microsomes contained a minor dihydroxylated metabolite (S+16+T+16, MM 874.4, 26% of M5 fraction). **M6**, another minor metabolite, showed isomeric structure to M4 (S+16+T+16, MM, 874.4). M6 is apparently hydroxylated on the C-2 benzyl of the taxane core. **M7** (S+16, MM, 858.4), was hydroxylated at C13/C3' 2-methylpropane backbone. It was absent in humans and minipigs, constituted 15% of all rat metabolites. **M8**, hydroxylated on the other carbon of the C13/C3' 2-methylpropane backbone (S+16, MM, 858.4) was the main product in microsomes from humans, untreated rats, pigs and minipigs (70% of all metabolites) and 50% in PCN microsomes. The M-56 fragment in MS analysis of M7 and M8, respectively, indicating cleavage of tert-butyl shows that hydroxylation proceeds on the 2-methylpropane structure, in contrast to

docetaxel, where hydroxylation occurs at *tert*-butyl. The proposed structure of the M7 and M8 isomers, derived from chemical reactivity allocates their hydroxyls to either carbon of the 2-methylpropyl backbone rather than to the methyl groups. Since isolated M8 was metabolized to M3 and M4, the same position was hydroxylated in all three products. **M9** (T+16, MM, 858.4, -OH position not identified) formed 13% of human products, 5% in rats being a minor metabolite or absent in the other microsomes. **M10** was a minor metabolite present only in rats. **M11** accounted for 6-11% of sum of metabolites in human, pig and minipig microsomes, being a minor product in rats and absent in PCN microsomes.

In a "THF" mobile phase (acetonitrile/methanol/H₂O/tetrahydrofuran, 21:35:42:2, by volume) we determined 13 metabolites, which corresponded to those found in the methanol mobile phase. The total time of analysis was 72 min (*t_R* of SB-T-1103) versus 21 min in the methanol: H₂O phase.

The sum of metabolites (pmol/mg protein/min) in pig microsomes (39.2) was comparable to humans (27.1), but two-fold higher in minipigs (63.8) and 5-fold higher in rats (139.7).

The individual metabolic steps were further investigated by isolation of M5, M7, M8, M9 and M10 formed from SB-T-1103 by untreated rat microsomes and M2, M3, M4, M6 and M8 from PCN rat microsomes and subjecting them to further metabolism. All the purified metabolites were metabolized further by PCN microsomes indicating their intermediate character; the purified M8 metabolite (S+16) was metabolized to M2 (S+32) and M4 (S+16+T+16), indicating that the alkyl site on a C-13 side chain in M4 was oxidized faster than the taxane ring.

Among cDNA-expressed CYP1A2, 1B1, 2A6, 2C9, 2E1 and 3A4, only CYP3A4 metabolized SB-T-1103 forming mainly M8, but also M1, M5, M9 and M11.

The proposed metabolic scheme (Fig.4A) is based on the HPLC/MS/MS analysis and further metabolism of purified metabolites.

Metabolism of SB-T-1214. SB-T-1214 produced 9 metabolites, named M1-M9 (Table 3) according to increasing *t_R* as detected at 230 nm. **M1** metabolite, (S+16+14, MM, 884.4), a hydroxylated and oxygenated minor product in human, pig and minipig microsomes, constituted 10% in untreated rats and was predominant in PCN rat microsomes (68% of SB-T-1214 metabolites). The MS-derived formal aldehyde structure at one methyl of C13/C3' 2-methylpropenyl would be in equilibrium with cyclic 2-hydroxy-3-methyl-2, 5-dihydropyrrol, but the proposed structure considering chemical reactivity prefers hydroxylation of both methyl groups and double bound oxygen at C2' instead of original hydroxyl. The isomeric **M2** (S+16+14) was present only in pig and minipig microsomes, but absent in humans and rats, and formed 1% of the metabolites in PCN microsomes. **M3** (S+32, MM, 885.4) is a dihydroxylated metabolite at C13/C3' 2'-methylpropene. It was found only in PCN microsomes. **M4 and M5** were very minor metabolites found only in rats. Their structures were not elucidated. **M6** (S+14+T+16, MM 883.4), formed only by PCN microsomes, was a minor product with formal aldehyde modification at the C-13/C3' 2-methylpropenyl as in M2 or M9, the proposed structure being hydroxylation of one methyl and double bound oxygen at C2' instead of original hydroxyl, and another OH at the taxane core. **M7** (structure not determined) constituted up to 7% in human, pig and minipig metabolites, being absent in rat and PCN microsomes. **M8** (S+16, MM, 869.4) was hydroxylated at one methyl of C13/C3' 2'-methylpropene. It was apparently the primary metabolite and the main product of SB-T-1214 in all species constituting about 80% of all metabolites in microsomes from humans, untreated rats, pigs and minipigs, but only 11% in PCN microsomes due to their high metabolic activity and its subsequent metabolism. In **M9** (S+14, MM, 867.4), secondary MS fragmentation at *m/z* 887 (???) suggests an oxidation at 2-methylpropenyl group of the side chain at C13. Unsaturated aldehyde formed may be stabilised by ring closure yielding 2-hydroxy-3-methyl-2,5-dihydropyrrol-2-yl moiety which is in an

equilibrium with the ring opened form. Alternatively, hydroxylation at the methyl end along with oxidation of hydroxyl at C2' to carbonyl group may explain observed MS fragmentation.

M9 was quantitatively significant in humans and rats, but a minor product in pigs and minipigs. Thus, M8, M9 and M1 constituted almost 100% of all products in humans and rats, whereas M8, M2 and M7 did so in pigs and minipigs. The detected 9 metabolites together with the variant structure of S+OH+14 present as a small contaminant of the same formula in the M1 peak fraction made up 10 metabolites of SB-T-1214.

The principal metabolic pathways (Fig.3B) were confirmed by purifying M8 and M9 from untreated rat microsomes and subjecting them to metabolism in PCN microsomes, which formed most actively M1. M8 indeed produced mainly M1 and partly M9, whereas M9 formed only M1 in accordance with their structures. In 10 min, M8 was metabolized mostly to M1 (70%) and M9 (15%), while after 30 min incubation, M1 was the only product, apparently via the M9 metabolite.

The analysis in the "THF" mobile phase required 49 min giving a metabolic profile identical to the above methanol: H₂O mobile phase (21 min sufficient for complete analysis).

The sum of metabolites (pmol/mg protein/min) in humans (256.6) were comparable to that in rats (330.8), but 4.5-fold higher than in pigs (57.0) and 2.5-fold higher than in minipigs (100.7).

Among cDNA-expressed CYP1A2, 1B1, 2A6, 2C9, 2E1 and 3A4, only CYP3A4 metabolized SB-T-1214, producing predominantly M8, less M9 and a minor amount of M7.

Metabolism of SB-T-1216. SB-T-1216 was metabolized to M1-M8 numbered according to their increasing t_R as detected at 230 nm (Table 4).

In contrast to the two other SB-T's, SB-T-1216 is attacked on the methyl of the dimethylamino group at C-10. The side-chain alkyl is oxygenated in similar positions as SB-T-1214.

The most hydrophilic **M1** metabolite (S+14 +16+T+16, MM 901.4) has the MS-derived structure of a hydroxylated aldehyde at C13/C3' 2'-methylpropenyl, which is an unstable enol that would be more stable in the metabolically unusual keto form, and the proposed structure is based on chemical reactivity is the dihydroxylated product at the methyl groups with double bound oxygen at C2' instead of the original hydroxyl. It is also hydroxylated at the methyl of the C-10 dimethylaminogroup and represented only 2-4% of all metabolites in human, pig and minipig microsomes, 6% in rats, but 63% of all products in PCN microsomes in accordance with their high metabolic activity and probability that it was one of the final metabolites in vitro.

M2 (S+16+T+16, MM, 887.4) was hydroxylated at C13/C3' 2'-methylpropenyl and hydroxylated also at one methyl of the dimethylamino group at C-10. It was formed at low rates and had similar relative representation in human, pig and minipig microsomes. It constituted 18% of rat products, but was a minor product in PCN microsomes, suggesting its further metabolism, apparently to M1. Only PCN microsomes formed **M3** (not identified, 1% of all products) and **M4** (S+14+T+16, MM, 885.4) which constituted 24% of products there. The MS analysis suggests a formal aldehyde in equilibrium with cyclic 2-hydroxy-3-methyl-2, 5-dihydropyrrol, the proposed structure related to chemical reactivity indicates more probable hydroxymethyl product with double-bound oxygen atom at C2' such as in M2. The second hydroxylation is at one methyl of the dimethylamino group at C-10. M4 peak contained another very minor metabolite (T+16+S+16, MM 888.4), representing 4% of the peak in HPLC/MS/MS analysis. **M5** (S+16, MM, 872.4) hydroxylated at one methyl of C13/C3' 2'-methylpropenyl was the main metabolite in human (63%), untreated rat (50%) and PCN microsomes (63%) and quantitatively second product in pigs (24%) and minipigs (23%), while a reverse ratio was observed with M8 (see below). The M5 peak contained a very minor S+14+16 metabolite (0.4% of the peak in

HPLC/MS/MS analysis). **M6** was detected in PCN microsomes only. In the oxygenated **M7** (S+14, MM, 870.4) secondary MS fragmentation suggests an oxidation at 2-methylpropenyl group of the side chain at C13. Unsaturated aldehyde formed may be stabilised by ring closure yielding 2-hydroxy-3-methyl-2,5-dihydropyrrol-2-yl moiety which is in an equilibrium with the ring opened form. Alternatively, hydroxylation at the methyl end along with oxidation of hydroxyl at C2' to carbonyl group may explain observed MS fragmentation.. It was significant in rats (12%), less in humans (6%) and was missing or consisting less than 1% of products in pigs and minipigs. The peak contained a minor dihydroxylated metabolite (MM, 888.4, 13% of the peak in HPLC/MS/MS analysis, i.e. about 1% of all metabolites).

M8 (T+16, MM, 872.4) was hydroxylated at C-10 of the taxane core on the characteristic dimethylaminocarbonyl group. **M8** formed more than 70% of metabolites in pigs and minipigs, but 18-19% in humans and rats giving a reverse order of M5:M8 in humans and rats versus pigs and minipigs. Thus, humans and rats hydroxylate (oxidize) SB-T-1216 mainly at the side chain, whereas pigs and minipigs at the C-10 dimethylamino group. Moreover, rats apparently metabolize **M5** significantly to **M7**, which is a minor or missing metabolite in pigs and minipigs. Furthermore, PCN rat microsomes formed three specific metabolites, and did not form **M8**, which was quantitatively very important in all other microsomes. The suggested metabolic pathways (Fig.3C) are based on HPLC/MS/MS analysis and further metabolism of purified metabolites (see below). Thus, SB-T-1216 was metabolized to 8 products as analyzed in the methanol: water mobile phase and two additional minor metabolites found by HPLC/MS/MS made up a total of 10 metabolites.

The sum of metabolites (pmol/mg protein/min) in humans (103.6), pigs (94.8) and minipigs (115.9) were almost identical, but 3-fold in higher in rats (329.1), suggesting that the rat may not be a good model to study efficiency of SB-T-1216 metabolism and related antitumor action.

Analysis in the "THF" mobile phase gave an almost identical spectrum of metabolites as the methanol: H₂O phase. Five other minor metabolites were detected (making a total of 15 metabolites), which constituted only about 4% of all metabolites in human, pig, minipig and untreated rat microsomes. The "THF" mobile phase required 39 min for complete analysis versus 13 min in the methanol: H₂O phase.

Further metabolism of SB-T-1216 metabolites was studied with **M2**, **M5**, **M7** and **M8** isolated from incubations with untreated rat microsomes and **M5** and **M8** purified from minipig microsomes. In PCN microsomes **M5** produced **M4**, **M1** and **M2**, possible precursor of **M1** and **M4**. **M7** was metabolized to **M6**. **M8** isolated as the main product from minipig microsomes, was metabolized in untreated rat microsomes 56% to **M2** and 35% to **M4**, while PCN microsomes transformed **M8** by 6% to **M2**, 25% to **M4** and the rest was metabolized to **M1**.

Among cDNA-expressed CYP1A2, 1B1, 2A6, 2C9, 2E1 and 3A4, only CYP3A4 metabolized SB-T-1216, producing almost equally **M2**, **M5** and **M8**.

DISCUSSION

Metabolism of SB-T-1103, SB-T-1214 and SB-T-1216 has not been studied yet. These drugs are potentially promising for exerting up to 1000-higher antitumor activity than paclitaxel or docetaxel in MDR-related resistant breast cancer cells. However, metabolism by human CYP enzymes probably inactivates them efficiently and decreases their effects similarly as it occurs by metabolism of paclitaxel and docetaxel. CYP-catalyzed metabolism of SB-T- analogs could suggest a suitable animal model for studying drug efficiency in vivo. Moreover, the spectrum of metabolites in different animal species provided new data for comparing catalytic similarity of human, pig, minipig and rat CYP orthologs, specifically CYP3A.

SB-T-1103 was metabolized to 11 products, SB-T-1214 to 10 products and SB-T-1216 to 8 products, but only three or four of them usually formed 95% of all metabolites and even two metabolites did so in case of SB-T-1216 metabolism in pigs and minipigs. One metabolite always represented about 70% of all products in untreated animals and humans.

Purification of all significant metabolites and subjecting them to further metabolism confirmed metabolic pathways assumed from hydrophobicity in reverse-phase HPLC analysis, and especially from their structures disclosed by HPLC/MS/MS analyses.

It has become obvious that in contrast to docetaxel, the SB-T's side chain was not hydroxylated at the present tert-butyl, but on the more reactive 2-methylpropane (SB-T-1103) or 2-methylpropene SB-T-1214 and SB-T-1216, which produced similar metabolites of the two latter taxanes. Moreover, loss of propionyl on C-10 (SB-T-1103) or hydroxylation of methyl on the C-10 dimethylamino group (SB-T-1216) as well as hydroxylation on the C-2 aromatic ring (SB-T-1103) occurred.

Species differences in the metabolism of the structurally similar SB-T-1103, SB-T-1214 and SB-T-1216 indicated that none of the animals is a generally preferable metabolic model for human CYP-catalyzed metabolism. Specifically, M8 was the main metabolite of SB-T-1103 in all four species, but the second human M9 metabolite was less significant in rats and virtually missing in pigs and minipigs, whereas the second important rat metabolite M7 was missing in humans and minipigs and was a very minor metabolite in pigs. Likewise, M8 was the main product of SB-T-1214 in all four species, but M2 and M7 added to the sum of 95% in pig and minipig metabolites, being absent in humans and rats, where similar conditions apply to M1 and M9. SB-T-1216 was metabolized identically in pigs and minipigs to M5 and M8, which made up 95% of the products (ratio 1:3), but these metabolites were formed in the reverse ratio of 4:1 in humans and rats and the second main product in rats was M2, which was a minor metabolite in humans. Thus, metabolism in any animal species used was not generally similar to humans. The major metabolites were produced in all species.

PCN microsomes from rats with induced CYP3A produced different patterns of metabolites of the three novel taxanes than all the other "untreated" ones. That was apparently due to a high induction of CYP3A, the only so far known CYP form metabolizing taxanes except in humans, where CYP2C8 is also involved in the metabolism of paclitaxel (Rahman et al. 1994). It suggested the important role of CYP3A in the metabolism of these new chemicals and also complied with the step-wise metabolism revealed by structures of the metabolites. Obviously the most important argument in favor of the role of CYP3A was provided by human cDNA-expressed CYP enzymes, while CYP1A2, 1B1, 2A6, 2C9 and 2E1 were completely inactive.

The sum of metabolites (pmol/mg protein/min) of SB-T-1103 increased in the following order, human (27.1) < pig (39.2) < minipig (63.8) < rat (139.7). The order in SB-T-1214 was pig (57) < minipig (100.7) < human (256.6) < rat (330.8), and that of SB-T-1216 pig (94.8) = minipig (115.9) = human (103.6) < rat (329.1). This also reveals that human microsomes metabolized the three taxanes in almost ten-fold different rates. Thus, SB-T-1214 may be most extensively metabolized and rapidly inactivated in the human liver. Rapid metabolism of novel taxanes may significantly affect their anticancer action. Further studies on cytotoxicity of the main metabolites should indicate the importance of metabolism in the anticancer effects of these promising agents.

Acknowledgments: The pig livers were kindly provided by Dr. Hlavackova and Dr. Rezek (VUZV Uhrineves, CZ). The minipig livers were kindly provided as a gift by Prof. Pavel Anzenbacher (Department of Pharmacology, Palacky University, Olomouc, CZ). Authors gratefully acknowledge the generous gift of the CYP3A4 and other CYP bicistronic systems by Prof. F.P. Guengerich (Vanderbilt University, Nashville, TN, USA).

REFERENCES

- Brooks T, Minderman H, O'Loughlin KL, Pera P, Ojima I, Baer MR, Bernacki RJ. 2003. Taxane-based reversal agents modulate drug resistance mediated by P-glycoprotein, multidrug resistance protein, and breast cancer resistance protein. *Molecular Cancer Therapeutics* 2: 1195-205.
- Ferlini C, Distefano M, Pignaletti F, Lin S, Riva A, Bombardelli E, Mancuso S, Ojima I, Scambia G. 2000. Antitumor activity of novel taxanes that act at the same time as cytotoxic agents and P-glycoprotein inhibitor. *British Journal of Cancer* 83: 1762-1768.
- Geney R, Ungureanu M, Li D, Ojima I. 2002. Overcoming multidrug resistance in taxane chemotherapy. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 40: 918-25.
- Gottesman MM, Pastan I. 1993. Modulation of multidrug resistance phenotype. *Cellular Pharmacology* 1: S111-S112.
- Huizing MT, Sewberath Misser VH, Pieters RC, ten Bokkel Huinink WW, Veenhof CH, Vermorken JB, Pinedo HM, Beijnen JH. 1995. Taxanes: a new class of antitumor agents. *Cancer Investigation* 13: 381-404.
- Litman T, Druley TE, Stein WD, Bates SE. 2001. From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 931-59.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-75.
- Miller ML, Ojima I. 2001. Chemistry and chemical biology of taxane anticancer agents. *Chemical Record* 1: 195-211.
- Nedelcheva V, Gut I, Soucek P, Frantik E. 1998. Cytochrome P450 catalyzed oxidation of monochlorobenzene, 1,2- and 1,4-dichlorobenzene in rat, mouse and human liver microsomes. *Chemical and Biological Interactions* 115: 53-70.
- Nedelcheva V, Gut I, Soucek P, Tichavska B, Tynkova L, Mraz J, Guengerich FP, Ingelman-Sundberg M. 1999. Metabolism of benzene in human liver microsomes: individual variations in relation to CYP2E1 expression. *Archives of Toxicology* 73: 33-40.
- Ojima I, Slater JC, Michaud E, Kuduk SD, Bounaud PY, Vrignaud P, Bissery MC, Veith JM, Pera P, Bernacki RJ. 1996. Synthesis and structure-activity relationships of the second-generation antitumor taxoids: exceptional activity against drug-resistant cancer cells. *Journal of Medicinal Chemistry* 39: 3889-96.
- Ojima I, Wang T, Miller ML, Lin S, Borella CP, Geng X, Pera P, Bernacki RJ. 1999. Synthesis and structure-activity relationships of new second-generation taxoids. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 9: 3423-8.
- Omura T, Sato R. 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes: evidence for its haemoprotein nature. *Journal of Biological Chemistry* 239: 2370-8.
- Parikh A, Gillam EM, Guengerich FP. 1997. Drug metabolism by *Escherichia coli* expressing human cytochromes P450. *Nature Biotechnology* 15: 784-8.
- Rahman A, Korzekwa KR, Grogan J, Gonzalez J, Harris JW. 1994. Selective biotransformation of Taxol to 6 α -hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8. *Cancer Research* 54:5543-5546.
- Rowinsky EK, Onetto N, Canetta RM, Arbuck SG. 1992. Taxol: the first of the taxanes, an important new class of antitumor agents. *Seminars in Oncology* 19: 646-62.

Legends to figures:

Fig.1. Chemical structures of classical taxanes paclitaxel and docetaxel in comparison to three new generation taxanes.

Fig.2. Typical HPLC chromatograms of (A) SB-T-1103, (B) SB-T-1214 and (C) SB-T-1216 and their metabolites (M1, etc.) in rat liver microsomes in the methanol: H₂O mobile phase. For details see Materials and Methods.

Fig.3 CID MS² electrospray mass spectra of the SB-T taxanes.

A. SB-T-1103.

Precursor MH⁺ = **m/z 844**; diagnostic product ions: **m/z 583**, a taxane core fragment **T**, i.e. loss of the principal C-13 side chain **S**; **m/z 788**, [MH-56]⁺, i.e. loss of 2-methylpropene from the C-13; **m/z 770**, [MH-74]⁺, i.e. loss of 2-methylpropene followed by water loss, or a competitive loss of propionic acid from the C-10; **m/z 744**, [MH-100]⁺, i.e. loss of 2-methylpropene followed by the loss of CO₂ at C-13; **m/z 714**, [MH-130]⁺, i.e. loss of 2-methylpropene at C-13 followed by propionic acid loss at C-10; **m/z 670**, [MH-174]⁺, i.e. consecutive loss of m/z 74 and m/z 100 at C-10 and C-13, respectively.

The SB-T 1103 metabolite structures were deduced from the mass shifts of the diagnostic ions in the CID MS² and MS³ EI mass spectra.

B. SB-T-1214.

Precursor MH⁺ = **m/z 854**; diagnostic product ions: **m/z 595**, a taxane core fragment **T**, i.e. loss of the principal C-13 side chain **S**; **m/z 798**, [MH-56]⁺, loss of 2-methylpropene at C-13; **m/z 780**, i.e. [MH-74]⁺, i.e. loss of 2-methylpropene followed by water loss; **m/z 768**, [MH-86]⁺, i.e. loss of cyclopropanecarboxylic acid at C-10; **m/z 754**, [MH-100]⁺, i.e. loss of 2-methylpropene followed by the loss of CO₂ at C-13; **m/z 712**, i.e. loss of 2-methylpropene at C-13 followed by the loss of cyclopropanecarboxylic acid at C-10.

The SB-T 1214 metabolite structures were deduced from the mass shifts of the diagnostic ions in the CID MS² and MS³ EI mass spectra.

C. SB-T-1216.

Precursor MH⁺ = **m/z 857**; diagnostic product ions: **m/z 598**, a taxane core fragment **T**; i.e. loss of the principal C-13 side chain **S**; **m/z 801**, [MH-56]⁺, i.e. loss of 2-methylpropene at C-13; **m/z 768**, [MH-89]⁺, i.e. loss of N,N-dimethylcarbamic acid at C-10; **m/z 712**, [MH-145]⁺, i.e. loss of 2-methylpropene followed by the loss of N,N-dimethylcarbamic acid; **m/z 668**, [MH-189]⁺, i.e. consecutive loss of m/z 89 and m/z 100 from the positions C-10 and C-13, respectively.

The SB-T 1216 metabolite structures were deduced from the mass shifts of the diagnostic ions in the CID MS² and MS³ EI mass spectra.

Fig.4. The scheme of SB-T-1103 (A), SB-T-1214 (B) and SB-T-1216 (C) metabolism in liver microsomes. The suggested pathways (broken lines) are based on structures of the metabolites obtained in HPLC/MS/MS analysis, and the proved pathways (full lines) also on further metabolism of the isolated metabolites performed in conditions identical to those for metabolism of the respective SB-T analogs as described in Methods. The metabolites were isolated from incubations with hepatic microsomes prepared from untreated rats, those from rats with high CYP3A1/2 induction or microsomes from untreated minipigs, wherever they were most abundant. Their further metabolism was then concurrently investigated in all these microsomes to prove that the pathways were present in all these species. Principal pathways shared by all investigated species are described; % of metabolites indicates their relative representation in different species.

Table I. CYP specific contents in liver microsomes from male animals of different species.

| CYP specific content | Untreated rat(N ^a = 5) | PCN-treated rat (N = 5) | Minipig (N = 2) | Pig (N = 3) | Human (N = 10) |
|---------------------------|-----------------------------------|-------------------------|-------------------|------------------------|------------------------|
| nmolCYP/ mg of protein | 0.39±0.02 | 1.04±.08 0.95–1.16 | 0.21;0.25 0.23 | 0.43±0.06 0.36–0.50 | 0.21±0.06 0.13–0.31 |

^aN=number of samples from different species.

Table II. Metabolites of SB-T-1103 (MW 843.95) in liver microsomes of different species. Metabolites M1 – M11 (pmol/min/mgP)
 Rates of metabolite formation are expressed in pmol/mg protein/min. Data are means \pm SD ($n = 3$).

| Metabolite | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 | M6 | M7 | M8 | M9 | M10 | M11 |
|---------------------|---------------|----------------------------|-----------------------|-------------------------|---------------|---------------|----------------|-----------------|---------------|---------------|---------------|
| t_R , min | 4.5 | 5.0 | 5.3 | 6.9 | 7.0 | 7.6 | 8.0 | 9.0 | 10.0 | 13.6 | 14.5 |
| t_R , % SBT | 21 | 23 | 25 | 29 | 33 | 36 | 39 | 42 | 48 | 66 | 68 |
| Schematic structure | - | S ^a +32 S+48 | T-57 and T-57/S+16 | S+16/T ^b +16 | +16 T+S+32 | S+16/T+16 | S+16 | S+16 | T+16 | - | - |
| MM | | | 803/819 | 875 | 859/875 | 875 | 859 | 859 | 859 | - | - |
| Microsomes | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 | M6 | M7 | M8 | M9 | M10 | M11 |
| Human | - | - | - | - | 1.0 \pm 0.1 | 0.8 \pm 0.0 | - | 19.7 \pm 0.1 | 3.5 \pm 0.1 | - | 2.1 \pm 0.3 |
| Pig | 2.9 \pm 1.6 | - | - | 2.0 \pm 0.0 | 1.6 \pm 0.5 | 0.8 \pm 0.0 | 3.1 \pm 0.31 | 26.3 \pm 0.1 | - | - | 2.5 \pm 0.0 |
| Minipig | - | - | - | 4.1 \pm 0.7 | 1.9 \pm 0.2 | 3.2 \pm 0.2 | - | 46.2 \pm 3.4 | 1.1 \pm 0.1 | - | 7.3 \pm 0.0 |
| Rat | 3.2 \pm 0.8 | - | - | 1.7 \pm 0.0 | 6.7 \pm 0 | 0.8 \pm 0.1 | 21.7 \pm 0.3 | 93.9 \pm 2.5 | 6.8 \pm 0 | 2.1 \pm 0.1 | 2.8 \pm 0.2 |
| PCN rat | - | 52.6 \pm 13.7 | 25.9 \pm 8.0 | 18.9 \pm 1.1 | - | 5.3 \pm 0.3 | 2.3 \pm 1.4 | 101.7 \pm 1.4 | - | - | - |

^aS = C-13 principal side chain,

^bT = taxane core

Table III. Metabolites of SB-T-1214 (MM = 853,95 dle Ojimy, 853 dle dr.Š.) in liver microsomes of different species. Rates of metabolite formation are expressed in pmol/mg protein/min. Data are means \pm SD ($n = 3$).

| Metabolite | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 | M6 | M7 | M8 | M9 |
|---------------------|-----------------------|---------------|----------------|---------------|----------------|-------------------------|---------------|------------------|----------------|
| t_R , min | 3.6 | 4.5 | 5.0 | 5.4 | 5.7 | 6.3 | 6.7 | 7.7 | 9.5 |
| t_R , % SB-T | 25 | 30 | 34 | 36.5 | 40 | 43 | 45 | 52 | 63.5 |
| Schematic structure | S ^a +16+14 | S+16+14 | S+32 | - | - | S+14+T ^b +16 | - | S+16 | S+14 |
| MM nově | 883 | 883 | 885 | | | 883 | | 869 | 867 |
| Microsomes | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 | M6 | M7 | M8 | M9 |
| Human | 8.2 \pm 1.3 | - | - | - | - | - | 3.7 \pm 0.7 | 224.1 \pm 11.5 | 20.6 \pm 0.8 |
| Pig | 1.7 \pm 0.4 | 6.0 \pm 2.2 | - | - | - | - | 4.1 \pm 0.7 | 44.7 \pm 0.9 | 0.5 \pm 0.3 |
| Minipig | 2.6 \pm 0.6 | 7.7 \pm 2.5 | - | - | - | - | 5.6 \pm 0.4 | 82.9 \pm 3.5 | 1.9 \pm 0.1 |
| Rat | 32.0 \pm 2.7 | - | - | 1.1 \pm 0.3 | 1.6 \pm 0.10 | - | - | 256.0 \pm 8.5 | 40.1 \pm 3.0 |
| PCN rat | 352.2 \pm 4.4 | 6.7 \pm 0.6 | 11.5 \pm 0.1 | 1.2 \pm 0.1 | - | 12.6 \pm 0.3 | - | 57.4 \pm 2.8 | 77.9 \pm 1.1 |

^aS = C-13 principal side chain, ^bT = taxane core.

Table IV. Metabolites of SB-T-1216 (MM 856 → 857 dle Ojimy) in liver microsomes of different species. Rates of metabolite formation are expressed in pmol/mg protein/min. Data are means ± SD (*n* = 3).

| Metabolite | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 | M6 | M7 | M8 |
|------------------------------------|--|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------|-----------|------------|-----------|
| <i>t_R</i> , min | 3.2 | 5.1 | 5.3 | 6.15 | 6.7 | 7.5 | 8.25 | 9.8 |
| <i>t_R</i> , % SB-T | 24 | 39 | 41 | 48 | 51 | 58 | 64 | 76 |
| Schematic Structure | S ^a +14+16/T ^b +16 | S+16/T+16 | - | S+16/T+16 | S+16 | - | S+14 | T+16 |
| Novy popis kontrola 1.11.05 | OH na S-C3' O na S-C3' OH na C10 | OH na S-C3' OH na C10 | OH na S-C3' OH na C10 | O na S-C3' OH na C10 | OH na S-C3' | | O na S-C3' | OH na C10 |
| MM new | 903 | 887 | | 885 | 872 | | 870 | 872 |
| Metabolites M1 – M8 (pmol/min/mgP) | | | | | | | | |
| Microsomes | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 | M6 | M7 | M8 |
| Human H6 | 4.9± 3.2 | 7.5± 0.4 | - | - | 64.8± 1.7 | - | 6.4± 0.9 | 20.2± 1.4 |
| Pig 4 | 3.5± 0.3 | 0.8± 0.2 | - | - | 22.4± 0.7 | - | - | 68.0± 1.8 |
| Minipig | 2.6± 0.1 | 1.9± 0.4 | - | - | 26.9± 0.3 | - | 0.8± 0.1 | 83.7± 0.8 |
| Rat | 20.8± 3.9 | 59.4± 2.3 | - | - | 166.3± 1.7 | - | 39.7± 2.0 | 43.4± 1.0 |
| PCN rat | 142.1± 7.7 | 6.2± 0.1 | 2.6± 0.4 | 55.0± 0.6 | - | 19.0± 0.8 | 4.1± 0.4 | - |

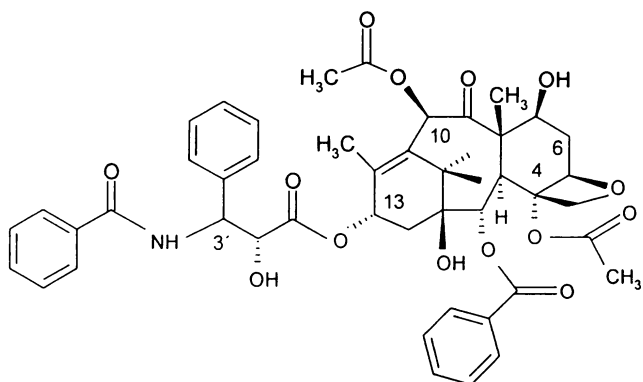
^aS = C-13 principal side chain ^bT = taxane core

Table V. The amounts of metabolites of SB-T-taxanes formed by human cDNA expressed CYP3A4 in *E.coli* membranes during 30 min incubations. The other systems of CYPs (CYP1A2, 1B1, 2A6, 2C9 a 2E1) did not metabolize the new taxanes.

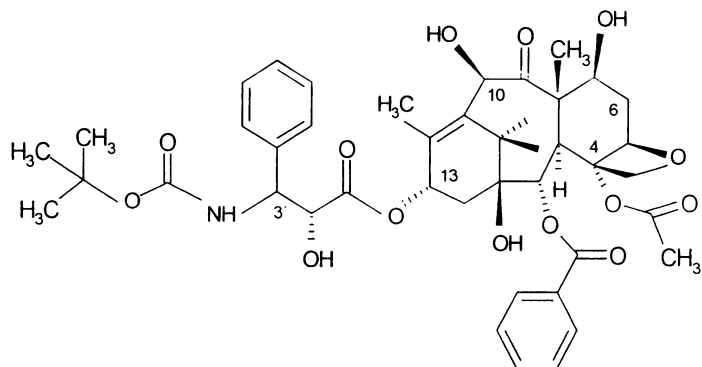
| Taxane | Metabolite | Amount (pmol/min/nmol CYP) |
|-----------|------------|-------------------------------|
| SB-T-1103 | M5 | 0.15 ± 0.02 |
| | M8 | 41.4 ± 2.5 |
| | M11 | 0.1 ± 0.05 |
| SB-T-1214 | M7 | 0.1 ± 0.04 |
| | M8 | 35.2 ± 0.3 |
| | M9 | 13.4 ± 2.5 |
| SB-T-1216 | M2 | 18.9 ± 2.0 |
| | M5 | 16.5 ± 2.3 |
| | M8 | 15.1 ± 1.9 |

Figure 1

Classic Taxanes:

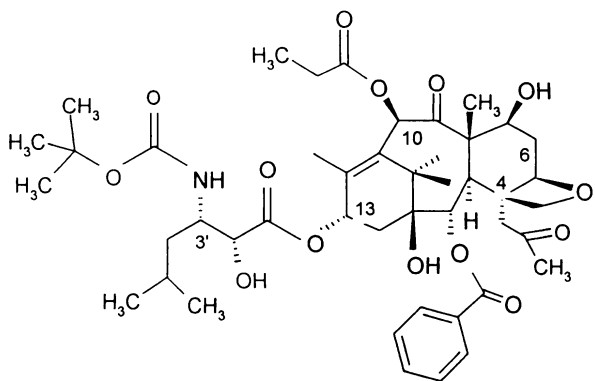


Paclitaxel

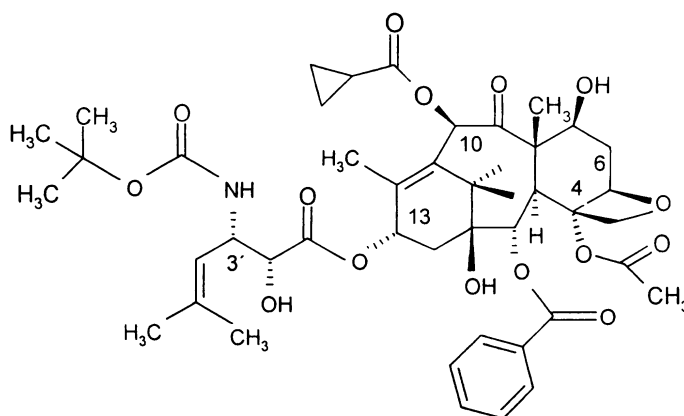


Docetaxel

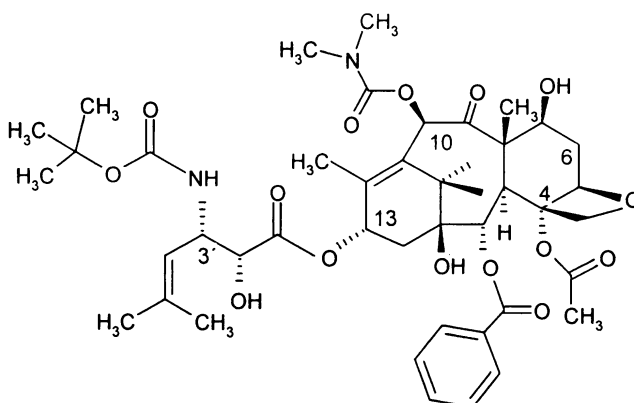
Novel Taxanes:



SB-T-1103



SB-T-1214



SB-T-1216

Figure 2A, SB-T-1103

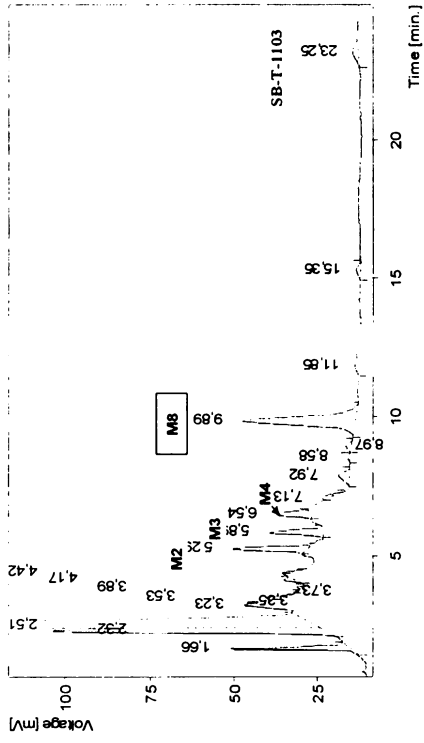


Figure 2B (SB-T-1214)

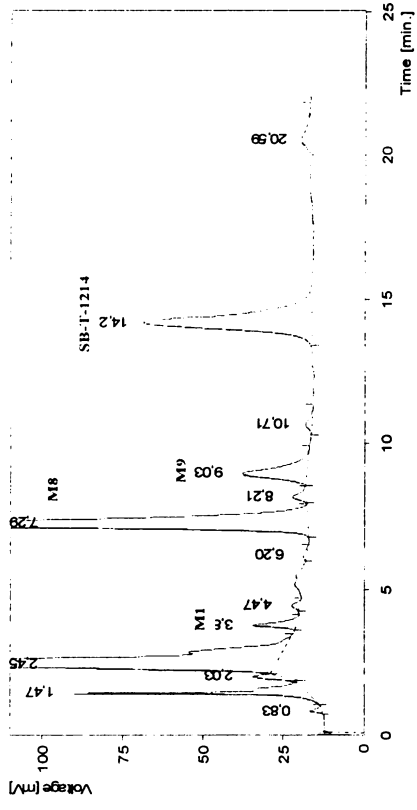


Figure 2C (SB-T-1216)

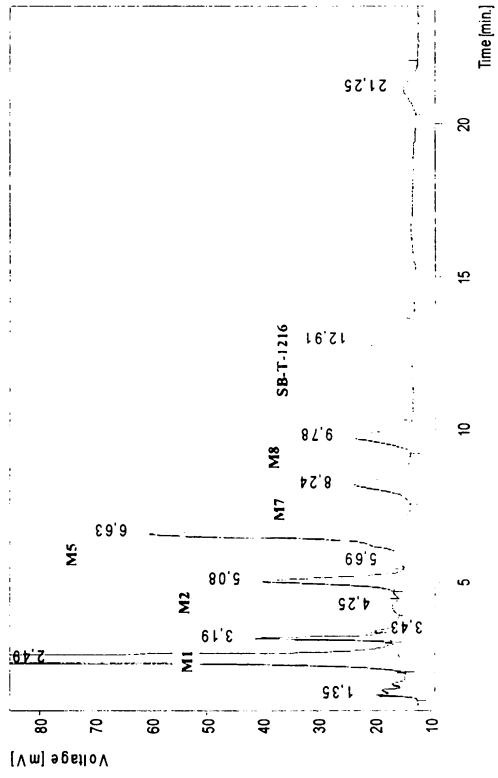


Figure 3

CID ESI MS2 spectra of the SB-T taxanes

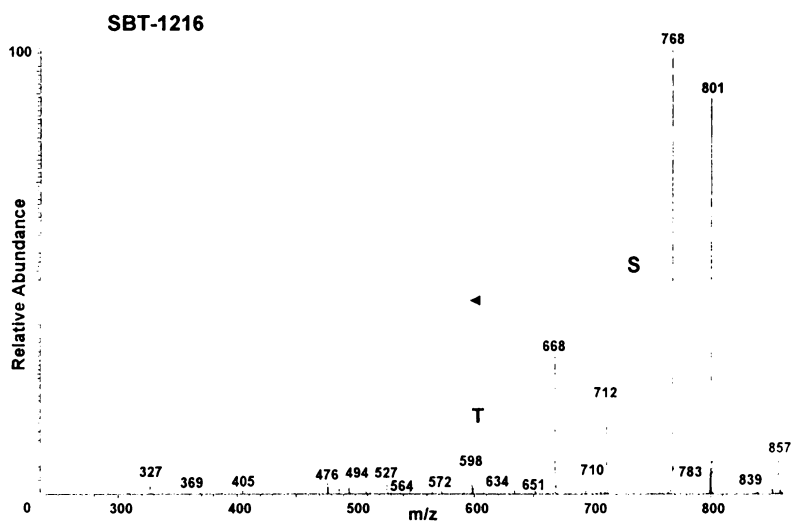
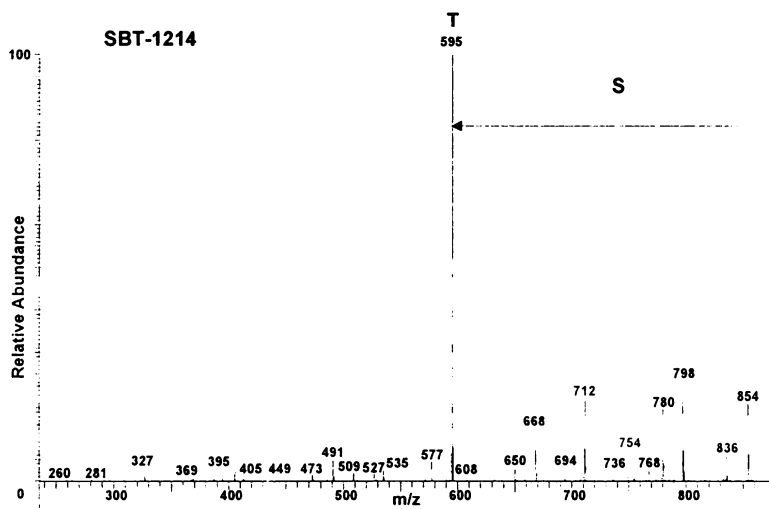
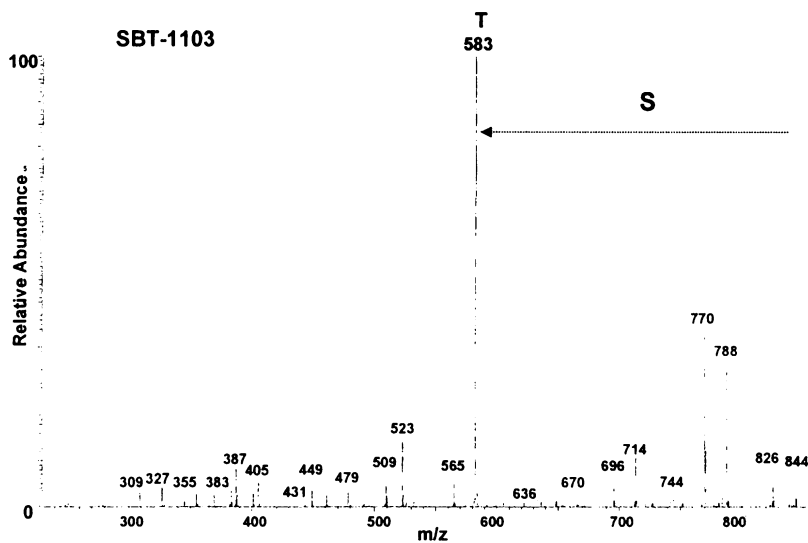


Figure 4A

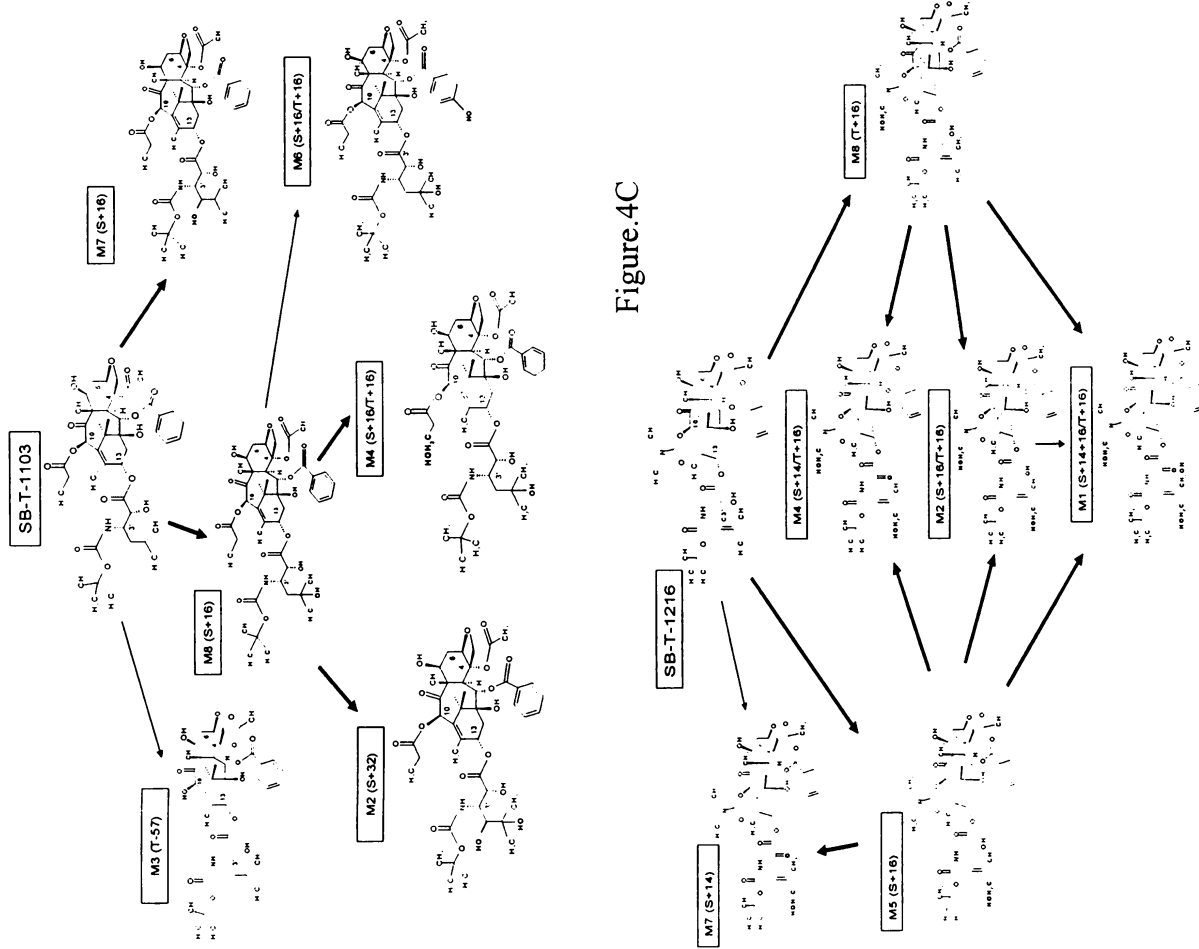


Figure 4B

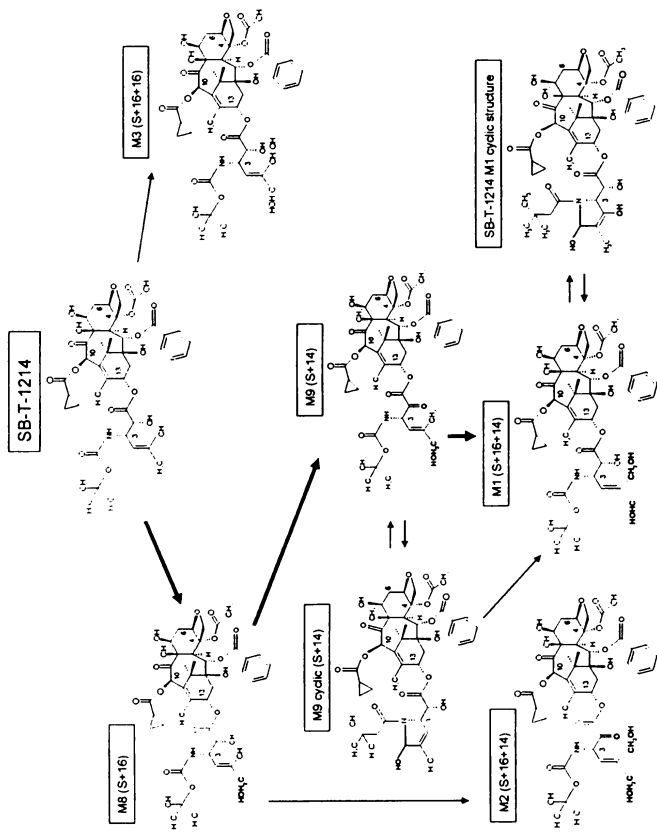
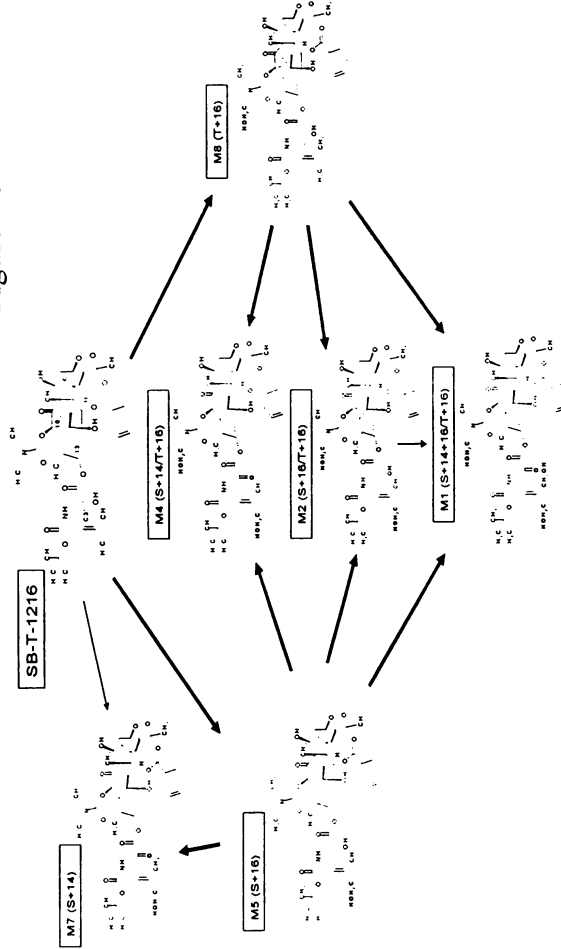


Figure 4C



Příloha VI

Václavíková R., Boumendjel A., Ehrlichová M., Kovář J.

and Gut I.:

Modulation of Paclitaxel Transport by Flavonoid

Derivatives in Human Breast Cancer Cells. Is there a

Correlation Between Binding Affinity to NBD of P-gp and

Modulation of Transport?

Bioorg Med Chem Mar 1: [Epub ahead of print], 2006.

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Bioorganic &
Medicinal
Chemistry

Bioorganic & Medicinal Chemistry xxx (2006) xxx–xxx

Modulation of paclitaxel transport by flavonoid derivatives in human breast cancer cells. Is there a correlation between binding affinity to NBD of P-gp and modulation of transport?

Radka Václavíková,^{a,*} Ahcene Boumendjel,^b Marie Ehrlichová,^c
Jan Kovář^c and Ivan Gut^a

^a*Biotransformation Group, National Institute of Public Health, Srobarova 48, 10042 Praha 10, Czech Republic*

^b*Département de Pharmacochimie Moléculaire, UMR-CNRS 5063, Faculté de Pharmacie de Grenoble, 5 Avenue de Verdun, 38240 Meylan, France*

^c*Institute of Molecular Genetics, Czech Academy of Sciences, Videnska 1083, 140 00 Praha 4, Czech Republic*

Received 23 November 2005; revised 7 February 2006; accepted 14 February 2006

Abstract—We have investigated the effect of 13 flavonoid derivatives on [¹⁴C]paclitaxel transport in two human breast cancer cell lines, the adriamycin-resistant NCI/ADR-RES and sensitive MDA-MB-435. For this study, we selected representatives of aurones, chalcones, flavones, flavonols, chromones, and isoflavones with known binding affinity toward nucleotide-binding domain (NBD2) of P-glycoprotein and for which no reported work is available regarding paclitaxel transport. Aurones **CB-284**, **CB-285**, **CB-287**, and **ML-50** most effectively inhibited P-gp related transport in the resistant line in comparison with chalcones, flavones, flavonols, chromones, and isoflavone derivatives and accordingly increased the accumulation of [¹⁴C]paclitaxel and decreased its efflux. Those agents efficiently modulated paclitaxel transport in P-gp highly expressing resistant human breast cancer cells and they could increase the efficiency of chemotherapy in paclitaxel-resistant tumors. In contrast, the sensitive cell line responded reversely in that **CB-284**, **CB-285**, **CB-287**, and **ML-50** significantly inhibited accumulation of [¹⁴C]paclitaxel and especially **CB-287**, which significantly stimulated its efflux. Some, but not all, of the data correlated with the binding of flavonoid derivatives to P-gp, and indicated that even in the P-gp highly expressing NCI/ADR-RES cells, the binding was not the only factor influencing the transport of [¹⁴C]paclitaxel. Opposite effects of flavonoid derivatives on the P-gp highly expressing and MDA-MB-435 non-expressing cell lines indicate that paclitaxel is not only transported by P-gp and let us assume that Mrp2 or ABCC5 seem to be good transport-candidates in these cells. The inhibition of paclitaxel accumulation and stimulation of its efflux are potentially unfavorable for drug therapy and since they could be due to modulation of drug transporters other than P-gp, their expression in tumors is of great significance for efficient chemotherapy.

© 2006 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Tumor cells frequently possess or develop resistance, which constitutes a major problem for cancer chemotherapy.^{1,2} A significant part of intrinsic or acquired resistance of tumors to chemotherapy, called multidrug resistance (MDR), is caused by high expression of ABC transporters responsible for the efflux of drugs from tumors. The MDR phenotype often correlates with high expression of membrane ABC transporter P-glycopro-

tein (P-gp). P-gp is a transmembrane ATP-dependent efflux pump which significantly reduces the intracellular levels of many anticancer drugs in tumors.³

Important anticancer drugs belonging to taxanes (paclitaxel and docetaxel) and anthracyclines (doxorubicin) are excellent substrates for the drug transporter P-gp.^{4,5} The resistance to paclitaxel and doxorubicin in patients with breast cancer is correlated with increased P-gp expression.⁶

P-gp reversers offer a possible therapeutic approach for increasing drug concentrations in tumors; more than 40 have been described⁷ and their number is steadily increasing. Well-known specific inhibitors of P-gp

Keywords: Paclitaxel; Multidrug resistance; P-glycoprotein; Flavonoid derivatives.

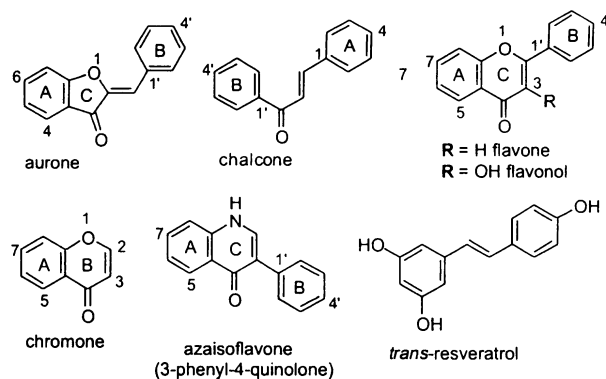
* Corresponding author. Tel.: +4202 6708 2709; fax: +4202 6731 1236; e-mail: rvaclavikova@szu.cz

transport such as cyclosporine A and verapamil suppress MDR and they appear to be competitive inhibitors and substrates of P-gp.⁸ High levels of those modulators are required, which produce undesirable side effects.⁹ That is why new modulators, which are not themselves effluxed by P-gp, are being looked for.

Nowadays, there is an intensive search for new potent MDR-reversal agents with minimal adverse effects. Naturally occurring flavonoids and resveratrol may be suitable candidates for: (a) being natural and low-toxic antioxidant constituents of food, (b) bind to P-gp,¹⁰ (c) inhibiting CYP-catalyzed inactivation of paclitaxel,¹¹ and (d) exerting anticancer activity of their own.¹² It was reported that flavonoids are a new class of bifunctional modulators, which partly overlap the ATP-binding site and the vicinal hydrophobic region interacting with steroids within the cytosolic domain of P-gp.¹³ Flavonoids such as kaempferol, galangin, quercetin, their hydrophobic derivatives, and genistein, which modulate drug efflux in MDR cancer cells, bind with similar affinities and relative efficiencies to purified H₆-NBD2 (nucleotide-binding domain) cytosolic domain of P-gp.¹³ Perez-Victoria et al. suggested that only flavonoids, which bind with high affinity to the cytosolic domain of P-gp, are able to increase daunomycin accumulation in *Leishmania tropica* line overexpressing this transporter and inhibit the parasite's growth in the presence of the drug.⁹ However, contradictory effects were reported; quercetin and its methoxylated derivative inhibited the efflux of rhodamine-123 and restored sensitivity to adriamycin in MCF-7 breast cancer cells¹⁴ and quercetin bound to purified P-gp and efficiently inhibited its activity.¹⁵ In contrast, quercetin, kaempferol, and galangin increased adriamycin efflux in HCT-15 colon cells supposedly via a P-gp-mediated mechanism.¹⁶ Among other types of plant polyphenols, green tea polyphenols, such as (–)-epigallocatechin gallate, inhibited the binding and efflux of two P-gp substrates, rhodamine-123 and [³H]-vinblastine, in resistant Chinese hamster ovary cells (CH^RC5) and human colon adenocarcinoma cells (Caco-2).¹⁷

In view of these contradictory results, we focused our study on a new generation of synthetic flavonoid derivatives as more promising modulators of P-gp-mediated transport. Those flavonoid analogues, which successfully interact with the NBD2 domain of P-gp are potential MDR modulators and reversing agents of cancer resistance to cytotoxic drugs.^{18–21} The purpose of the present study was to investigate flavonoid derivatives with known binding affinities to NBD2 of P-gp for their effect on [¹⁴C]paclitaxel transport in both resistant and sensitive human breast cancer cells. In addition to the evaluation of the effect on paclitaxel accumulation and efflux, we decided to shed light on the existence or not of a correlation between binding affinity to NBD2 of P-gp and modulation activity. Structures of these derivatives belong to different subclasses of natural flavonoids and include: aurones, chalcones, flavones, flavonols, chromones, and isoflavones. Their structures and binding affinities to NBD2 of P-gp are shown in Table 1. For the sake of comparison, we selected quercetin for its proved binding to P-gp. Moreover, quercetin was the most effective inhibitor

Table 1. Structures of tested flavonoid derivatives and their binding affinity to P-gp



| Class/name | Substituents | K_D^a (μ M) |
|--------------------------|---|------------------------------|
| Stilbenes | 3,5,4'-Trihydroxystilbene | ND |
| Aurones | | |
| CB-284 | 4,6-OMe; 4'-Br | 0.82 \pm 0.08 ^b |
| CB-285 | 4,6-OMe; 4'-Cl | 0.99 \pm 0.2 ^b |
| CB-287 | 4,6,3',4',6'-OMe | 92 \pm 43 ^b |
| ML-50 | 4-OH; 6-OMe | 1.32 \pm 0.33 ^b |
| ND-285 | 4-OH; 6-OMe; 4'-Cl | 0.46 \pm 0.08 ^b |
| ML-30 | 4-OH; 6-OMe; 4'-CH ₂ CH ₃ | 10 \pm 0.15 |
| A-55B | 4-OH; 6-OMe; 7-I; 4'-CN | ND |
| Chalcone | | |
| FBB-14 | 4-I; 2',4',6'-OH | 0.25 \pm 0.06 ^c |
| Flavone | | |
| CB-436 | 3-OMe; 5,7-OH; 4'-Br | >100 |
| Flavonols | | |
| Kaempferid | 5,7-OH; 4'-OMe | 5.0 \pm 0.2 ^d |
| AB-2DE | 5,7-OH; 4'-I | 1.06 \pm 0.08 ^d |
| Quercetin | 5,7,3',4' | 7.0 \pm 0.5 ^e |
| Chromone | | |
| MH-11^f | 2-CO-N(CH ₂) ₂ -CH ₃ ; 5-OH | >100 |
| Azaisoflavone | | |
| A-12^f | 3-Phenyl; 5,7-OH | >100 |

ND, K_D was not measured.

^a Dissociation constant of binding to P-gp.

^b Ref. 20.

^c Ref. 18.

^d Ref. 19.

^e Ref. 10.

^f **MH-11** and **A-12** enhanced accumulation of rhodamine-123 in K562R resistant cells 5-fold and 2-fold higher than cyclosporine A at 1 μ M concentration.²⁵

of CYP metabolism of paclitaxel out of eight flavonoids and resveratrol was selected as an even more effective inhibitor of paclitaxel metabolism.¹¹

2. Results

2.1. Flavonoid enhancement of [¹⁴C]paclitaxel accumulation in resistant human breast cancer cells

120

On the basis of known similarity between CYP3A and P-gp substrates, we initially investigated the effect of two natural polyphenols; flavonoid quercetin and stilbene *trans*-resveratrol on [¹⁴C]paclitaxel (a P-gp sub-

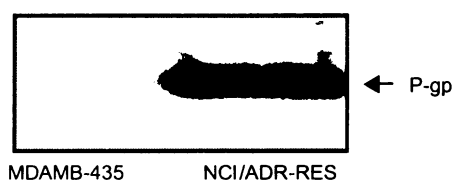


Figure 1. The difference in expression of P-gp in sensitive (MDA-MB-435) and adriamycin-resistant (NCI/ADR-RES) human breast cancer cells.

MDA-MB-435 cells with low P-gp expression (data not shown).

Based on the results obtained from the accumulation assay, we went forward to investigate whether flavonoids which significantly increased [14 C]paclitaxel accumulation would inhibit efflux of this drug in NCI/ADR-RES cells as a proof of P-gp-mediated transport. It was found that, in the presence of CB-287, the remaining intracellular amount of [14 C]paclitaxel after 15 and 30 min of efflux was higher than control. For example, in the control cells, the efflux eliminated 33% of the onset level of [14 C]paclitaxel versus 3% in those exposed to CB-287 (10 μ M), meaning that the latter decreased the efflux 10 times. Under the same conditions, the other flavonoid derivatives CB-284, CB-285, ML-50, A-12 and CB-436 did not significantly influence elimination of [14 C]paclitaxel (Fig. 3). These data suggest that at 10 μ M and higher levels, the efflux of [14 C]paclitaxel in human resistant cancer cells could be decreased by CB-287, the flavonoid derivative of the aurone subclass.

2.3. Different effects of flavonoids on [14 C]paclitaxel transport in sensitive human breast cancer cells

Four compounds, which most effectively stimulated [14 C]paclitaxel accumulation in NCI/ADR-RES cell lines, were also tested in the sensitive MDA-MB-435 cells. Contrary to their effects in resistant NCI/ADR-RES cells, all of them significantly decreased the uptake of [14 C]paclitaxel in sensitive human breast cancer cells (Fig. 4A). For example, after 60 min, the uptake of [14 C]paclitaxel was 6-fold inhibited by ML-50 as compared with the control. These results suggest that different transporters may be involved in the two cell lines. Moreover, in contrast to the resistant NCI/ADR-RES cells, the efflux of [14 C]paclitaxel in MDA-MB-435 cells during 30 min was significantly stimulated in the presence of ML-50, CB-284, and CB-285 (Fig. 4B).

2.4. Cytotoxicity of tested flavonoid derivatives in NCI/ADR-RES and MDA-MB-435 human breast cancer cell lines

The tested flavonoids (10 μ M) did not have any significant effect on cell cytotoxicity of NCI/ADR-RES cells except for A-55B. On the other hand, all the tested flavonoid derivatives (except ND-285) were significantly ($P < 0.05$) cytotoxic for sensitive cells MDA-MB-435 (Table 2). These results support different behavior of flavonoid derivatives in sensitive MDA-MB-435 and resistant NCI/ADR-RES human breast cancer cell lines.

3. Structure–activity relationship and discussion

Quercetin, a naturally occurring flavonoid, known to bind to and influence P-gp related transport, only slightly inhibited transport of the P-gp substrate [14 C]paclitaxel in P-gp highly expressing NCI/ADR-RES cells. In this study, we selected representatives of different flavonoid-subclasses (aurones, chalcones, flavones, flavonols, chromones, and isoflavones) with known

strate) accumulation. These two substances are among the most efficient inhibitors of paclitaxel metabolism by human and rat CYP3As.¹¹ However, at 100 μ M (25 μ M was ineffective), quercetin weakly increased [14 C]paclitaxel accumulation (30% increase) in both NCI/ADR-RES cells (selected for resistance to the P-gp substrate adriamycin) and sensitive MDA-MB-435 cells (Fig. 2A). This weak and similar effect in both cell lines indicates that P-gp was not responsible for the enhancement. In contrast, resveratrol (100 μ M) inhibited uptake (30%) of [14 C]paclitaxel in MDA-MB-435 (but not in NCI/ADR-RES) cells during 30 min, suggesting an inhibition of inward active transport. The effect was apparently too weak to be significant in vivo, decreased until 60 min of incubation and 25 μ M resveratrol was ineffective (Fig. 2A).

We subsequently investigated the effects of flavonoid derivatives on transport of [14 C]paclitaxel in NCI/ADR-RES. Figure 1 illustrates that resistant NCI/ADR-RES cells expressed high levels of P-gp protein, which the sensitive MDA-MB-435 cells were lacking. Thus, we expected meaningful differences in paclitaxel transport in the two cell lines.

In our transport studies, the cells were incubated with [14 C]paclitaxel without or with one of 13 different synthetic flavonoids, namely: aurones (CB-284, CB-285, CB-287, CB-436, ND-285, ML-302, ML-50, and A-55B), chalcone (FBB-14), flavones (CB-436), flavonols (AB-2DE and kaempferid), chromone (MH-11), and azaisoflavones (A-12).

The accumulation of [14 C]paclitaxel was measured after 30 min and 60 min (Fig. 2B). Six out of the 13 flavonoids strongly enhanced the accumulation of [14 C]paclitaxel in the resistant cells after 30 min in the following order: CB-287 \geq ML-50 > CB-284 \geq CB-285 > CB-436 > A-12 (Fig. 2). After 60 min, the order was somewhat different, but the first four most effective flavonoids remained most effective as well.

Chalcone FBB-14, flavonol AB-2DE, aurones ND-285 and ML-30 exerted a significant, but mild effect, whereas three flavonoids, chromone MH-11, and aurone A-55B did not influence paclitaxel accumulation.

2.2. Flavonoid inhibition of [14 C]paclitaxel efflux in resistant human breast cancer cells

The efflux of [14 C]paclitaxel alone in the resistant NCI/ADR-RES cells was 4-fold higher than in the sensitive

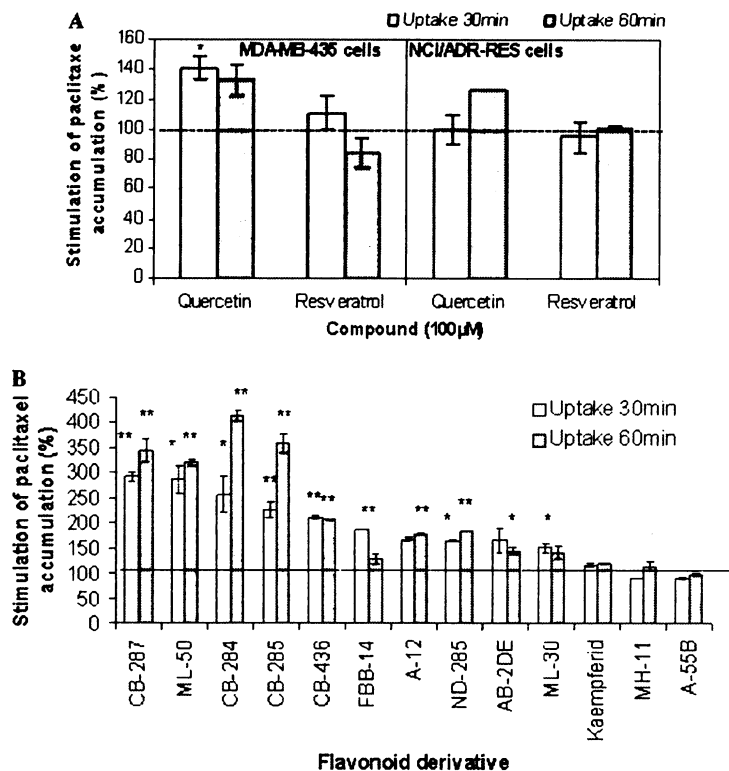


Figure 2. (A) Effect of quercetin and resveratrol on [14 C]paclitaxel accumulation in NCI/ADR-RES and MDA-MB-435 human breast cancer cell lines. NCI/ADR-RES and MDA-MB-435 cells were loaded with [14 C]paclitaxel for 30 and 60 min in the presence of flavonoid derivatives (100 μ M) or DMSO as control. (B) Effect of flavonoid derivatives on [14 C]paclitaxel accumulation in NCI/ADR-RES human breast cancer cell lines. NCI/ADR-RES cells were loaded with [14 C]paclitaxel for 30 and 60 min in the presence of flavonoid derivatives (10 μ M) or DMSO (0.1%) as control. Values (means \pm SD, $n \geq 2$) are expressed as a percentage of stimulated accumulation. Asterisks denote a difference from the 100% accumulation at $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$, using a two-tailed t -test.

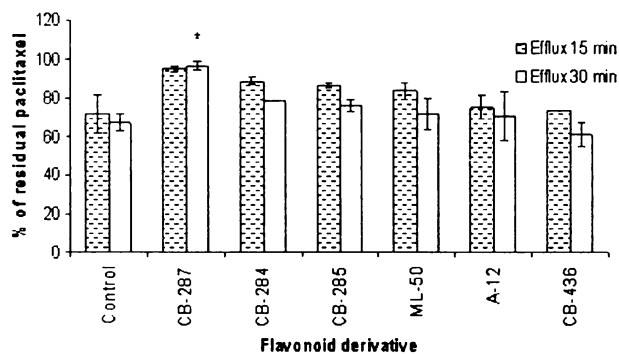


Figure 3. The effect of flavonoid derivatives which influenced accumulation of [14 C]paclitaxel on efflux in NCI/ADR-RES cells. Cells were loaded with [14 C]paclitaxel for 1 h and then allowed to efflux for 15 or 30 min in the presence of flavonoid derivative (10 μ M) or DMSO (0.1%) as control. The values (means \pm SD, $n \geq 2$) represent residual cellular radioactivity after the efflux expressed as percentage of values found at the onset of efflux. Asterisks denote a difference from the 100% accumulation at $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$, using a two-tailed t -test.

binding affinity toward the nucleotide-binding domain (NBD2) of P-gp (Table 1) and investigated them as modulators of paclitaxel transport. We found that synthetic flavonoids, especially aurones, increased the accumulation and decreased the efflux of [14 C]paclitaxel in NCI/ADR-RES cells. As paclitaxel is a P-gp sub-

strate, the effect occurring in the P-gp expressing cells and not in P-gp-lacking MDA-MB-435 cells indicates that aurones are acting very likely via P-gp inhibition.

The decreased accumulation and increased efflux of [14 C]paclitaxel in MDA-MB-435 cells are completely contradictory to their effects in NCI/ADR-RES cells. It is known that paclitaxel is significantly transported by another ABC transporter.²² The fact that MDA-MB-435 cells do not express P-gp, but strongly express Mrp2 and ABCC5 (lacking in the NCI/ADR-RES cells),²³ suggests their possible involvement in paclitaxel transport in MDA-MB-435 cells. The role of other ABC transporters in effects of flavonoids on transport of doxorubicin (P-gp substrate) in different cell lines was already suggested before.^{14–16} It is noteworthy to highlight that an ABC protein is able to transport P-gp substrates, but it is not inhibited by P-gp inhibitors.²⁴

Some of these flavonoids increased the accumulation of [14 C]paclitaxel, with the most active compounds being members of the aurone class. Structural features enhancing the activity of aurones on paclitaxel transport were methoxy groups on both A- and B-rings (CB-287) and to a lesser extent, the simultaneous presence of methoxy groups on the A-ring and a halogen at 4'-position with Br being more effective than Cl (CB-285 and CB-284). Replacing the 4-methoxy group with a hydroxyl was dis-

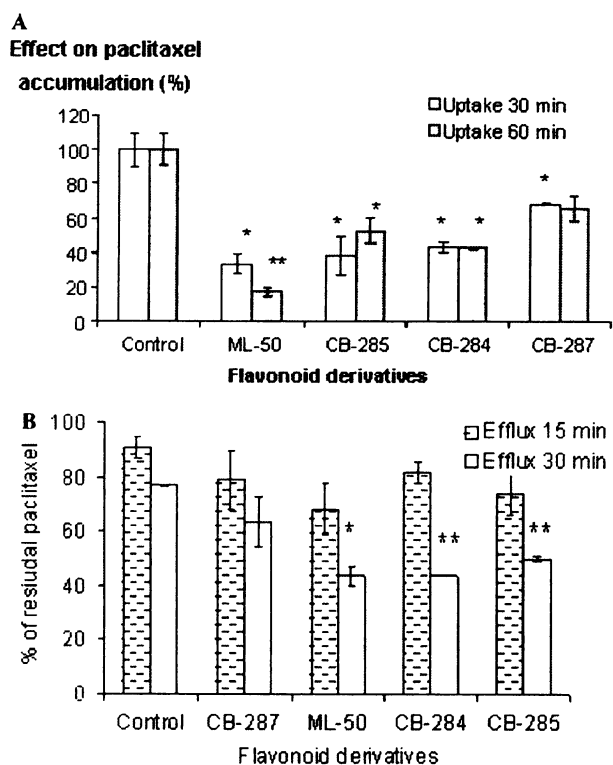


Figure 4. (A) The effect of flavonoid derivatives on [^{14}C]paclitaxel uptake in MDA-MB-435 sensitive human breast cancer cells. MDA-MB-435 cells were loaded with [^{14}C]paclitaxel for 30 min and 60 min in the presence of flavonoids (10 μM) or DMSO (0.1%) as control. Values (means \pm SD, $n \geq 2$). (B) The effect of flavonoid derivatives on [^{14}C]paclitaxel efflux in MDA-MB-435 cells. Cells were loaded with [^{14}C]paclitaxel for 1 h and then allowed to efflux for 15 or 30 min in the presence of flavonoid derivative (10 μM) or DMSO (0.1%) as control. The values (means \pm SD, $n \geq 2$) represent residual cellular radioactivity after the efflux expressed as percentage of values found at the onset of efflux. Asterisks denote a difference from the 100% accumulation at $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$, using a two-tailed t -test.

Table 2. Cytotoxicity of tested flavonoid derivatives in MDA-MB-435 and NCI/ADR-RES cells

| Flavonoid derivative | Cell line | |
|----------------------|--------------------|--------------------|
| | MDA-MB-435 | NCI/ADR-RES |
| Control ^a | 0.931 \pm 0.076* | 0.554 \pm 0.052 |
| Kaempferid | 0.690 \pm 0.107* | 0.488 \pm 0.025 |
| MH-11 | 0.721 \pm 0.095* | 0.471 \pm 0.046 |
| A-12 | 0.696 \pm 0.112* | 0.488 \pm 0.065 |
| FBB-14 | 0.100 \pm 0.044* | 0.608 \pm 0.069 |
| A-55B | 0.534 \pm 0.033* | 0.290 \pm 0.042* |
| CB-287 | 0.705 \pm 0.103* | 0.525 \pm 0.098 |
| CB-285 | 0.657 \pm 0.087* | 0.483 \pm 0.050 |
| ML-50 | 0.745 \pm 0.110* | 0.525 \pm 0.038 |
| CB-284 | 0.551 \pm 0.087* | 0.538 \pm 0.030 |
| CB-436 | 0.641 \pm 0.180* | 0.550 \pm 0.132 |
| ML-30 | 0.628 \pm 0.069* | 0.468 \pm 0.042 |
| AB-2DE | 0.746 \pm 0.080* | 0.550 \pm 0.035 |
| ND-285 | 0.852 \pm 0.066 | 0.579 \pm 0.064 |

Effect of flavonoid derivatives on the growth and survival of MDA-MB-435 and NCI/ADR-RES cells. Cells were seeded at 10×10^3 cells/100 μL of medium in the well. The number of living cells was determined after 96 h of incubation. Numbers in the table indicate the mean of absorbance values (A^{570}) of eight separate cultures \pm SEM. The data were evaluated by one-way ANOVA with Newman-Keuls post hoc comparison (post hoc test).

^a Control, control cells without flavonoid derivatives.

* $P < 0.05$ compared with control values.

affinity toward NBD2 ($K_D = 0.25 \mu\text{M}$),¹⁸ but shows a moderate activity on [^{14}C]paclitaxel transport, because it increased the accumulation only to 155% of control values. Flavonol (AB-2DE) behaves in the same manner as chalcone FBB-14. In this study, we included a chromone representative (MH-11) and an isoflavone analog (A-12) which have very low binding affinity toward NBD2, but potentiated daunorubicin cytotoxicity in an adriamycin-resistant human myeloid leukemia cell line (K562) and increased the intracellular accumulation of rhodamine-123, a probe of P-gp-mediated transport.²⁵ The observation that MH-11 at 20 μM did not significantly influence accumulation of the P-gp substrate [^{14}C]paclitaxel in NCI/ADR-RES cell line questions the specificity of these two substrates for P-gp. This difference in effect on accumulation may be due to the fact that these two studies were performed on different P-gp expressing cell types.

It is obvious that establishing a relation between binding affinity and modulation activity on a single cell type can be correctly done. Unfortunately, when cells of different types and origins are used, it renders the correlation more complicated. Moreover, potential human use of these inhibitors will require to prove their efficiency of MDR-reversal in vivo, for example, by positron emission tracer imaging as described, for example, in Ref. 26.

4. Conclusion

In conclusion, some flavonoids, especially 4,6-dimethoxyaurons CB-284, CB-285, and CB-287 and 4-hydroxy-4-methoxyaurone (ML-50), proved to be efficient modulators of paclitaxel transport in P-gp highly

advantageous for the activity (CB-285 vs ND-285). This is quite surprising, because in an earlier study it was reported that the presence of a hydroxy group at the 4-position of aurones is essential for the binding affinity to NBD2 of P-gp.²⁰ The highest activity of 4,6-dimethoxyaurones can be explained by their high hydrophobic character in comparison to 4-hydroxyaurones, as it is known that most P-gp inhibitors are hydrophobic compounds.

The apparent lack of correlation between the power of binding affinity and high modulation activity addresses the issue related to whether or not one can transpose in vitro effective compounds (affinity to NBD2) to the cellular test which measures MDR-reversing activity. Dissociation constant (K_D) values which are measured on the cytosolic NBD2 of P-gp may indicate potential interaction with P-gp but do not ensure a significant reversing activity.

The latter assumption is confirmed by the investigation of the only compound belonging to the chalcone subclass tested in this study, 4-iodo-2',4',6'-trihydroxychalcone (FBB-14). FBB-14 possesses the highest binding

280

290

300

310

expressing resistant human breast cancer cells. Moreover, they are significantly more efficient than natural flavonoids such as quercetin, reported to possess that activity. These agents could increase the efficiency of chemotherapy with paclitaxel in P-gp highly expressing breast tumors. However, care should be taken of the fact that drug transport in the P-gp non-expressing tumors may be influenced quite differently due to other transporters. Further studies are needed to investigate whether these derivatives are sufficiently potent to increase the effects of P-gp transported anticancer drugs in vivo.

5. Experimental

5.1. Chemicals

[¹⁴C]paclitaxel (TAXOL[®]) was purchased from Moravek Biochemicals (Brea, CA). Fetal bovine serum (FBS) was purchased from J. Kysilka (Brno, CZ), L-glutamine, HEPES, penicillin, streptomycin, and trypsin were obtained from PAN Biotech GmbH (Aidenbach, Germany). Monoclonal antibody MDR H-241 (source: rabbit) was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG was from Sigma (St. Louis, MO). Blocker Blotto in TBS and other reagents for Western blotting and ECL detection of P-gp were from Pierce (Rockford, IL). Hyperfilm ECL for the high-speed detection of chemiluminescent signal from protein blots was purchased from Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK). All other chemicals used were purchased from Sigma (St. Louis, MO).

5.2. Cells and culture conditions

The human breast carcinoma cell lines MDA-MB-435 and NCI-ADR-RES were obtained from the National Cancer Institute (Frederick, MD, USA). Cells were maintained in the basic medium supplemented with 10% FBS at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. RPMI 1640 medium containing extra L-glutamine (300 µg/mL), sodium pyruvate (110 µg/mL), HEPES (15 mM), penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 µg/mL) was used as the basic medium. The cells were trypsinized before use (0.2% trypsin and 0.02% EDTA in PBS).

5.3. Cell growth and survival—MTT assay

Cells maintained in 10% FBS medium were harvested by low-speed centrifugation, washed with FBS medium, and seeded 10 × 10³ cells/100 µL of medium into wells of a 96-well plastic plate. Cell growth and survival were evaluated under control conditions (FBS medium) or after exposure to flavonoid derivatives (10 µM) for 96 h. Ten microliters of MTT (5 g L⁻¹) was added to the cells in each well and incubated for 2 h at 37 °C in a humidified incubator (5% CO₂). After the incubation, 80 µL of medium was aspirated, 150 µL of 0.04 N HCl in isopropanol was added, and the mixture was resuspended. Absorbance was measured at 570 nm using a Spectra Sunrise microplate reader (Tecan).

5.4. Effect of flavonoids on [¹⁴C]paclitaxel uptake

The cells were preincubated with 100 nM [¹⁴C]paclitaxel for 30 min either with fresh medium or 5–20 µM flavonoid derivative (specified in figures) or 100 µM quercetin and resveratrol dissolved in DMSO (maximum concentration in medium 0.1%, v/v). The medium was then rapidly replaced with fresh medium containing 100 nM [¹⁴C]paclitaxel with or without flavonoids. The cells were incubated at 37 °C for various periods as specified in the figures and then the cells were rapidly washed three times with ice-cold PBS. The cells were released by 2 × 400 µL of trypsin and EDTA (humid atmosphere, 37 °C, 15 min). Sodium dodecyl sulfate in water (200 µL) was added up to 2% final concentration for lysis of the cells and Bray solution (10 mL) was used for liquid scintillation.

5.5. Effect of flavonoid derivatives on [¹⁴C]paclitaxel efflux

In the efflux assays, cells were preincubated with 100 nM [¹⁴C]paclitaxel for 2 h. The medium was then replaced with lukewarm fresh medium or medium with flavonoids and cells were incubated at 37 °C for time periods specified in the figures. The cells were then rapidly washed three times with ice-cold PBS, and released and dissolved as described above for measurement of radioactivity.

5.6. P-gp detection

Samples of cell lysates dissolved in sample lysis buffer (SLB) (15 µg of protein/15 µL) were resolved on 7.5% SDS-PAGE gels and transferred to a nitrocellulose membrane in an ice-cooled Transblot system for 1 h at 300 mA at 4 °C. Blots were incubated with the MDR H-241 anti-P-gp antibody (diluted 1000-fold) in Blotto blocking buffer with 0.05% Tween-20 overnight at 4 °C. The blots were washed five times (10 min each) with Tris-buffered saline containing 0.05% Tween-20 and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 2 h at room temperature according to Huang et al.²² The blots were then washed three times (10 min each) with Tris-buffered saline and antibody detection was performed using the ECL method (Pierce).

5.7. Statistical analysis

All experiments are expressed as means ± standard deviations (SD) of the estimates. Significant differences (**p* < 0.05 and ***p* < 0.01) in the effects of flavonoid derivatives were estimated with both-sided Student's *t*-test.

Acknowledgments

This work was supported by the following Grants: Internal Grant Agency, Ministry of Health of the Czech Republic No. 7567-3, Grant Agency of the Czech Republic, 305/04/0403, and COST OC B20.001.

References and notes

1. Ford, J. M.; Haith, W. N. *Pharmacol. Rev.* **1990**, *42*, 155.
2. Simon, S. M.; Schindler, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 3497.
3. Gottesman, M. M.; Pastan, I. *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 385.
4. Ling, V. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1997**, *40*, S3.
5. Kusunoki, N.; Takara, K.; Tanigawara, Y.; Yamauchi, A.; Ueda, K.; Komada, F.; Ku, Y.; Kuroda, Y.; Saitoh, Y.; Okumura, K. *Jpn. J. Cancer Res.* **1998**, *89*, 1220.
6. Mechetner, E.; Kyshtoobayeva, A.; Zonis, S.; Kim, H.; Stroup, R.; Garcia, R.; Parker, R. J.; Fruehauf, J. P. *Clin. Cancer Res.* **1998**, *4*, 389.
7. Wiese, M.; Pajeva, I. K. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 685.
8. Leveille-Webster, C. R.; Arias, I. M. *J. Membr. Biol.* **1995**, *143*, 89.
9. Perez-Victoria, J. M.; Chiquero, M. J.; Conseil, G.; Dayan, G.; Di Pietro, A.; Barron, D.; Castanys, S.; Gamarro, F. *Biochemistry* **1999**, *38*, 1736.
10. Di Pietro, A.; Conseil, G.; Perez-Victoria, J. M.; Dayan, G.; Baubichon-Cortay, H.; Trompier, D.; Steinfels, E.; Jault, J. M.; de Wet, H.; Maitrejean, M.; Comte, G.; Boumendjel, A.; Mariotte, A.-M.; Dumontet, C.; McIntosh, D. B.; Goffeau, A.; Castanys, S.; Gamarro, F.; Barron, D. *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 307.
11. Václavíková, R.; Horsky, S.; Simek, P.; Gut, I. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2003**, *368*, 200.
12. Middleton, E., Jr.; Kandaswami, C.; Theoharides, T. C. *Pharmacol. Rev.* **2000**, *52*, 673.
13. Conseil, G.; Baubichon-Cortay, H.; Dayan, G.; Jault, J.-M.; Barron, D.; Di Pietro, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 9831.
14. Scambia, G.; Ranellett, F. O.; Benedetti, P.; De Vincenzo, R.; Bonanno, G.; Ferrandina, G.; Piantelli, M.; Bussa, S.; Rumi, C.; Clanfriglia, M.; Manucuso, S. *Chemother. Pharmacol.* **1994**, *34*, 459.
15. Shapiro, A. B.; Ling, V. *Biochem. Pharmacol.* **1997**, *53*, 587.
16. Critchfield, J. W.; Welsh, C. J.; Phang, J. M.; Yeh, G. C. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 1437.
17. Jodoin, J.; Demeule, M.; Béliveau, R. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1542*, 149.
18. Bois, F.; Beney, C.; Boumendjel, A.; Mariotte, A.-M.; Conseil, G.; Di Pietro, A. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4161.
19. Boumendjel, A.; Bois, F.; Beney, C.; Mariotte, A.-M.; Conseil, G.; Di Pietro, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 75.
20. Boumendjel, A.; Beney, C.; Deka, N.; Mariotte, A.-M.; Lawson, M. A.; Trompier, D.; Baubichon-Cortay, H.; Di Pietro, A. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 854.
21. Boumendjel, A. A.; Di Pietro, C.; Dumontet, D.; Barron, D. *Med. Res. Rev.* **2002**, *22*, 512.
22. Huang, L.; Wring, A. W.; Woolley, J. L.; Brouwer, K. R.; Serabjit-Singh, C.; Polli, J. W. *Drug Metab. Dispos.* **2001**, *29*, 754.
23. Ehrlichová, M.; Václavíková, R.; Ojima, I.; Wu, X.; Kuznetsova, L. V.; Chen, J.; Truksa, J.; Kovar, J.; Gut, I. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2005** [Epub ahead of print].
24. Schinkel, A. H.; Jonker, J. W. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2003**, *55*, 3.
25. Hadjeri, M.; Barbier, M.; Ronot, X.; Mariotte, A.-M.; Boumendjel, A.; Boutonnat, J. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2125.
26. Levchenko, A.; Mehta, B. M.; Lee, J. B.; Humm, J. L.; Augensen, F.; Squire, O.; Kothari, P. J.; Finn, R. D.; Leonard, E. F.; Larson, S. M. *J. Nucl. Med.* **2000**, *41*, 493.

Příloha VII

Otová B., Václavíková R., Ehrlichová M., Horský S.,

Souček P., Šimek P. and Gut I.:

Antitumor Efficiency and Pharmacokinetics of

Paclitaxel and Docetaxel upon Repeated

Administration in Rats.

Předloženo k recenzi v *Eur J Pharm Sci.*

**Berta Otova · Radka Vaclavikova · Marie Ehrlichova · Stanislav Horsky · Pavel Soucek
· Petr Simek and Ivan Gut**

**Antitumor Efficiency and Pharmacokinetics of Paclitaxel and Docetaxel
upon Repeated Administration in Rats**

Berta Otova

Institute of Biology and Medical Genetics,
1st Faculty of Medicine and General Teaching Hospital Charles University,
Albertov 4, 128 00 Prague, Czech Republic

Radka Vaclavikova · Stanislav Horsky · Pavel Soucek · Ivan Gut (✉)

National Institute of Public Health,
Centre of Occupational Diseases,
Srobarova 48, 100 42 Prague 10, Czech Republic
E-mail: ivan.gut@szu.cz, Tel: +4202 6708 2765, Fax: +4202 6731 1236

Marie Ehrlichova

Cell Growth Control Laboratory,
Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic,
Videnska 1083, 142 00 Prague 4, Czech Republic

Petr Simek

Institute of Entomology,
Academy of Sciences of the Czech Republic,
Ceske Budejovice, Czech Republic

Abstract Paclitaxel and docetaxel are the presently used taxane anticancer drugs. Paclitaxel was reported to act predominantly on G2/M interphase, whereas docetaxel in the S-phase. In this study, the combined treatment with both drugs was tested as a potentially more effective therapy of spontaneous T-cell lymphomas in inbred Sprague-Dawley/Cub rats than either drug alone. Blood levels of the drugs and effect of the drugs or their combinations on their *in vitro* metabolism, body weight, survival, size and weight of lymphomas, and P-gp expression were studied. The survival of 5 untreated rats after lymphoma inoculation was 20 days, 55 days in rats given 4 weekly doses of docetaxel (10, 6, 6 and 6 mg/kg), 41 days after the same doses of paclitaxel, 41 days after 2 doses of paclitaxel followed with 2 doses of docetaxel, and 45 days after reverse order of the drugs. The first day of detectable lymphomas after inoculation/ size of lymphomas in cm² evaluated on day 34 after inoculation in untreated rats (17/23) were best influenced in the 4-dose docetaxel group (27/1.2). Markedly lower effect of paclitaxel seemed to correspond to lower blood levels and AUC after repeated dosing with paclitaxel, suggestive of enhanced metabolism, which did not occur in the docetaxel only group. However, repeated administration of paclitaxel or docetaxel to rats (10, 6, 6, 6 and 6mg/kg/week, i.p., respectively) did not significantly induce their *in vitro* metabolism. In spite of 10-fold faster metabolism – and inactivation of docetaxel than paclitaxel – observed *in vitro*, the blood levels of both drugs were similar and docetaxel exerted significantly higher antitumor effect. Repeated dosing with paclitaxel or docetaxel did not induce P-gp expression in the tumors, liver and intestines suggesting that it was not the cause of lower effects of paclitaxel as well. Thus, higher intrinsic efficiency of docetaxel was more important for its stronger effects on T-cell lymphomas than drug metabolism in rats or P-gp expression in tumors. Thus, docetaxel may be a potential anticancer drug for T-cell lymphomas treatment.

Keywords paclitaxel · docetaxel · Sprague-Dawley/Cub rats · transplantable T-cell lymphoma · drug metabolism · P-glycoprotein

Introduction

The cytostatics paclitaxel (TAXOL[®]) and docetaxel (TAXOTERE[®]) are mitotic poisons stimulating polymerization of microtubuli and inhibiting their de-polymerization in cells (Spencer and Faulds 1994), causing formation of deformed tubulin structures – asterisks and stars (Schiff et al. 1979) and inducing apoptosis (Fan 1999; Aoudjit and Vuori 2001). These drugs successfully treat breast, ovarian and lung cancer (Rowinsky et al. 1992; Klener 1995; Huizing et al. 1995).

Paclitaxel is metabolized mainly in liver and its metabolites are excreted in the bile (Monsarrat et al. 1993). Four metabolites were identified in rat liver microsomes and hepatocytes, mainly hydroxypaclitaxel at C3' of phenyl at the side chain of C13 (C3'-OHP) and less C2-OHP (Walle et al. 1993; Anderson et al. 1995). Microsomes with CYP3A1/2 induced by dexamethasone in rats Anderson et al. (1995) also formed deacetylated C2-OHP deacetylpaclitaxel, and another unknown product. Vaclavikova et al. (2003) found another hydroxypaclitaxel in rat microsomes, which was the main product in pigs and minipigs. The hydroxylated metabolites are produced by rat CYP3A1/2 (Walle et al. 1993; Anderson et al. 1995). Nine metabolites were detected *in vivo* in rat bile and C3'-OHP, C2-OHP and baccatin III were identified (Monsarrat et al. 1990). In human liver microsomes three metabolites were identified *in vitro*; 6 α -OHP with OH group on the phenyl at C6 of taxane ring, formed by CYP2C8 (Rahman et al. 1994) was the main metabolite, whereas C3'-OHP, formed by CYP3A4 was quantitatively second (Cresteil et al. 1994; Kumar et al. 1994; Harris et al., 1994a; Rahman et al. 1994). A minor di-OHP metabolite, formed by stepwise catalysis from 6 α -OHP, was found in human liver slices and microsomes (Harris et al. 1994a). In an *in vivo* study these and seven other metabolites were detected in the bile of patients, while 10-deacetylpaclitaxel, 10-deacetylbaccatin III and baccatin III were identified (Monsarrat et al. 1998). Six metabolites of paclitaxel were identified in human urine and 6 α -OHP, C3'-OHP, di-OHP and 10-deacetylpaclitaxel were also found in plasma (Monsarrat et al. 1998). Docetaxel is metabolized to the same products in humans and rats *in vitro* and in mice, rabbits and dogs *in vivo*. It is hydroxylated *in vivo* at C13 of the *tert*-butyl side chain and further oxidized and cyclized via an unstable aldehyde to two stereomeric hydroxyoxazolidinones. Hydroxydocetaxel can also be oxidized, via an unstable carboxylic acid, to oxazolidinedione (Marre et al. 1996; Royer et al., 1996; Monsarrat et al. 1997). CYP3A4/5 dominate human metabolism of docetaxel (Shou et al. 1998) indicating that their different individual expression might result in different metabolism of docetaxel *in vivo*. Metabolites of paclitaxel were significantly less active than paclitaxel in tumor cell lines *in vitro*. Human metabolite 6 α -OHP was about 30-fold less active (Harris et al. 1994b), C3'-OHP, C2-OHP and baccatin III were less cytotoxic than paclitaxel on *in vitro* L1210 leukemia growth (Monsarrat et al. 1990). Significant decrease of paclitaxel and docetaxel antitumor activity against P388 mouse leukemia cells caused by CYP3A metabolism has been proved *in vitro* (Gut et al. 2000). Metabolites of docetaxel are presumably also less active than the parent drug. Effects of paclitaxel were also diminished by P-glycoprotein, the only known multidrug resistance (MDR) transporter for its efficient efflux from tumor cells (Dantzig et al. 2001). The effect of paclitaxel can be diminished by overexpression of beta- as well as alpha tubulin isotypes (Kyu-Ho et al. 2000) and by various genes of cell cycle regulation. Paclitaxel affected tumor cells mainly in G2/M interphase, while docetaxel was more active in the S phase (Dorr 1997). Thus, the aim of this study was to investigate, whether the combined treatment with paclitaxel and docetaxel would offer a more effective therapy of spontaneous T-cell lymphomas in inbred Sprague-Dawley/Cub rats than either drug alone. We also investigated whether repeated dosing with paclitaxel or docetaxel could modulate their metabolism in rats or P-gp expression in tumors, as induction of drug metabolism in patients and P-gp expression in tumors were shown to diminish efficiency of chemotherapy.

Materials and Methods

Materials

Paclitaxel was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland) and kindly provided by Bristol-Myers Squibb, Prague as well; C3'-hydroxypaclitaxel was from Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, FRG). Docetaxel, hydroxydocetaxel, two stereomeric hydroxyoxazolidinones, oxazolidinedione and 7-epidocetaxel were a generous gift of Aventis (Paris, France). Structures of the drugs and their metabolites are displayed in Fig. 1. Human breast carcinoma cell lines MDA-MB-435 and NCI-ADR-RES, used as negative and positive controls for determination of P-gp expression, respectively, were obtained from NCI at Frederick (MD, USA).

Administration of transplantable lymphoma cells to syngenic rats

Spontaneous transplantable T-cell lymphoma SD10/96 of SD/Cub rats served as a model of haematological malignancy. This unique animal model of transplantable lymphoblastic lymphoma/leukemia (leukemia eventually develops after the initial stage of demarcated subcutaneous lymphomas) is relevant to human pathology; the spontaneous lymphomas do not develop until the age of six months (Otova et al.2002). The suspension of lymphoma cells (10^6 cell/ rat) was administered to two-month healthy female rats subcutaneously. Several days later, specified below, the rats were weighted and paclitaxel or docetaxel were administered intraperitoneally.

(I) Effect of repeated administration of docetaxel or paclitaxel on their blood levels

Four groups of four rats in each of them were used. Rats in the first group received paclitaxel, 20mg/kg of body weight intraperitoneally and a series of blood samples began immediately (0, 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360 min). Second group received docetaxel in the same way. The 3rd group was given 3 weekly doses of paclitaxel, 6 mg/kg i.p. and one week after the 3rd dose another 20mg/kg and blood samples were taken in the same way. The 4th group received docetaxel weekly, three times 6mg/kg each and then the dose of 20mg/kg. Venous blood (200 μ l) was taken from the tail under light narcotan anesthesia. It was transferred into a glass test tube with 0.5ml of MQ water and 3.5 ml of distilled ethyl acetate.

(II) Effect of paclitaxel, docetaxel or their combinations on body weight, survival and lymphoma size

Five groups of Sprague-Dawley (SD/Cub) rats, five animals in each of them, participated in the experiment. First group remained without drug treatment (untreated, UT). On day 6 after inoculation of lymphoma cells, second group of rats began the treatment with four doses of paclitaxel (4P) intraperitoneally in weekly intervals (10, 6, 6 and 6 mg/kg) and third group was given the same doses of docetaxel (4D). The fourth group received, in weekly intervals, two doses of docetaxel (10 and 6 mg/kg, respectively) and then two doses of paclitaxel (6 mg/kg each) (2D/2P) and the fifth group was administered, in analogy, two doses of paclitaxel (10 and 6 mg/kg, respectively) and then two doses of docetaxel (6 mg/kg each) (2P/2D). The rats were maintained under standard conditions in animal house and body weight and areas of subcutaneous lymphomas were regularly observed intravitaly. Seventeen days after the last doses of paclitaxel or docetaxel the rats were weighted and killed in narcotan anesthesia by cervical dislocation. The weights of lymphomas were determined and lymphomas were rapidly chilled and frozen on dry ice and stored at -80°C.

(III) Effect of repeated dosing with docetaxel or paclitaxel on body weight, lymphomas size and weight, *in vitro* microsomal metabolism of the drugs and expression of P-glycoprotein

Male Sprague-Dawley/Cub rats were kept on pellet diet and tap water ad libitum permanently. On day 3 after inoculation (1.5×10^6 of SD lymphoma cells/rat) the rats remained untreated (UT) or were treated with five weekly doses of paclitaxel (5P) or docetaxel (5D) (10, 6, 6, 6, and 6mg/kg, i.p., respectively) and were killed one day after the last dose, on day 32 after inoculation in narcotized anesthesia by cervical dislocation. Moreover, two separate groups of rats were either untreated or treated for induction of CYP3A1/2 by five i.g. intubations of pregnenolone 16 α -carbonitrile (PCN), 25mg/kg in olive oil in 12h intervals during 3 days. These animals were killed 24h after the last PCN dose giving high CYP3A1/2 induction as described before (Nedelcheva et al. 1998).

Livers and tumors were rapidly excised, weighted and rinsed with ice-cold physiological saline. The intestines were thoroughly washed with physiological saline, rapidly frozen and kept at -80°C as well as the tumors.

Preparation of microsomal-plasma membrane fractions

The livers were homogenized within 4 hours after euthanasia in an ice-cold solution of 150 mM KCl/50 mM Tris-HCl, pH 7.4. The microsomal-plasma membrane fractions were prepared by differential centrifugation as described previously (Gut et al. 1993). The concentration of protein was determined according to Lowry et al. (1951) with bovine serum albumin as standard. Specific induction of CYP3A1/2 in rats by pretreatment with pregnenolone 16 α -carbonitrile (inducing higher levels than dexamethasone) was characterized immunochemically as described previously (Nedelcheva et al. 1998; Gut et al. 2000). CYP3A1/2 is the only CYP form metabolizing both drugs in rats. The tumors and intestines were thawed just before homogenization and the post-mitochondrial fractions containing microsomes and plasma membranes were prepared and protein concentration assayed in the same way for estimation of P-glycoprotein expression.

In vitro metabolism assays

The incubation mixture included 150 mM KCl/50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 1 mg/ml of microsomal protein and 10 μ M paclitaxel or docetaxel, added as 10 mM solutions in methanol (final concentration up to 0.1% v/v). Even 1% concentration of methanol did not inhibit metabolism of paclitaxel or docetaxel in our experiments (data not shown). Selection of 10 μ M concentration was close to K_m values reported before (Vaclavikova et al. 2003). The reaction was initiated by adding an NADPH-generating system (final concentrations 1 mM NADP; 10 mM glucose 6-phosphate; 10 mM MgCl₂; 0.5 U/ml of glucose 6-phosphate dehydrogenase). The samples were incubated at 37 °C for 30 min in a shaking water bath. The incubation was stopped by chilling the samples and immediate extraction with ethyl acetate. Control samples were performed in the absence of the NADPH-generating system. Only products formed in the presence of paclitaxel or docetaxel and not present in absence of either of them were considered as drug metabolites.

HPLC analysis

Paclitaxel or docetaxel and their metabolites were extracted by distilled ethyl acetate (2 x 3.5 ml). The combined ethyl acetate extracts were evaporated to dryness under mild nitrogen stream. The dry extracts were dissolved in 200 μ L of the mobile phase. We used methanol: water, 65:35, v/v for paclitaxel (Cresteil et al. 1994). The mobile phase for docetaxel (acetonitrile: methanol: tetrahydrofuran: water, 21:35:2:42, Vaclavikova et al. 2003) gave better resolution of metabolites than the often used acetonitrile: methanol: water 26:32:42, the mobile phase of methanol: water (65:35), or ammonium acetate: acetonitrile 43:57, v/v (Garg and Ackland 2000). The HPLC conditions were as follows: HPLC Agilent Series 1100 with autosampler, 20 μ L sample loop; the Macherey-Nagel column 4x250 mm with Nucleosil 10-5

C18, flow rate 1.2 ml/min, detection 232 nm (paclitaxel) and 227 nm (docetaxel). The data were analyzed by CSW software (Chromatography Station for Windows), version 1.7.

Paclitaxel metabolites were quantified with the use of paclitaxel as standard, assuming similar molar extinction coefficient. The metabolites were identified by MS analysis and by comparison with an authentic standard (C3'-OHP, Sigma, USA). Docetaxel metabolites were detected and quantified according to signal of authentic products generously provided by Aventis, France and products formed *in vivo* also by MS/MS analysis.

Identification of paclitaxel and docetaxel metabolites by MS/MS

HPLC elution fractions, representing metabolites of paclitaxel, were collected as defined peaks during HPLC analysis and dried under a mild nitrogen stream. For analysis by MS the samples were dissolved in 125 μ l of 10 mM ammonium formate/methanol (1:2), transferred into autosampler vials, and measured using an HPLC-ESI MS method, with a Luna 3 μ m C18 column, 1x150 mm, mobile phase methanol/10 mM ammonium formate (7:3, v:v). Details of MS analysis were described before (Vaclavikova et al. 2004). Structures of the taxanes and their metabolites are shown in Fig.1.

Expression of P-gp

Control samples of human cell lysates of MDA-MB-435 (negative control of P-gp expression) and NCI/ADR-RES cells (positive control of P-gp expression), microsomal/plasma membranes of rat tumors, livers and intestines dissolved in sample lysis buffer (SLB) were resolved on 7.5% SDS-PAGE gels. Samples used for SDS-PAGE were 15 μ g of protein/15 μ L of cell lysates and 30 μ g of protein/15 μ L of rat fractions. All samples were then transferred to nitrocellulose membrane in ice-cool Transblot system for 1h at 300mA at 4°C. Blots were incubated with the MDR H-241 anti-P-gp antibody (diluted 1000-fold) in Bloto blocking buffer with 0.05% Tween 20 overnight at 4°C. The blots were washed five times (10 min each) with Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 and incubated with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 2h at room temperature according to Huang et al. (2001). The blots were then washed three times (10 min each) with Tris-buffered saline and antibody detection was performed using the ECL method (Pierce).

Statistics

All data are presented as means \pm SD of estimates. Significant differences ($P < 0.05$) were estimated with Student's *t* test. Calculations were made in Excel software.

Results

(I) Blood levels of the drugs and their metabolites after intraperitoneal dosing

The blood levels of paclitaxel after single i.p. dose of 20 mg/kg reached 1.3 μM mean maximal concentration (C_{max}) in blood and 6 hours afterwards the mean paclitaxel level was still 0.5 μM (Fig.2). On the other hand, three weekly doses of paclitaxel (6 mg/kg each) caused significantly lower blood levels after the challenge dose of 20 mg/kg, reaching mean C_{max} less than 0.5 μM paclitaxel. The area under concentration vs. time curve (AUC, $\mu\text{M} \times \text{min}$) in the group of four rats was 254.2 ± 28.0 after the single dose of paclitaxel, but decreased significantly to 125.1 ± 7.3 after repeated dosing with paclitaxel. In contrast, AUC after the single dose of docetaxel (184.3 ± 71.4) did not significantly change after the repeated administration (241.2 ± 59.8). The blood levels of docetaxel reached after the single dose of 20 mg/kg were similar to those after paclitaxel (mean C_{max} 1.2 μM docetaxel). Three weekly doses of docetaxel given to rats did not markedly influence blood levels reached after the 4th dose of 20 mg/kg. Although the levels were lower from 3rd hour than after the single dose, the difference was much lower than in paclitaxel as also demonstrated in AUC. The paclitaxel and docetaxel identity were proved by collecting the peaks during HPLC analysis and determining the structure by HPLC-MS and comparing with authentic standards. There were several other regularly determined HPLC peaks throughout these 6 hours and displaying curves suggestive of paclitaxel metabolites. However, peaks of the same t_{R} values were generally present in rats given paclitaxel, docetaxel untreated animals excluding them as being products of paclitaxel or docetaxel. Three very minor peaks at levels less than 0.1% of paclitaxel contained minor quantities of C3'-hydroxypaclitaxel, deacetylpaclitaxel and a structure of molecular mass 831, where the $\text{C}_6\text{H}_5\text{COO}$ group ($m/z = 121$) was substituted with a functional group of m/z 99, corresponding to the composition of $\text{C}_5\text{H}_9\text{COO}$, which is present on the side chain of a taxane cephalomannine. In analogy, minor peaks isolated from rats given docetaxel contained low quantities of three hydroxydocetaxel metabolites of different t_{R} values in MS/MS analysis (4.6, 5.8 and 7.5 min, respectively), indicating different position of hydroxyl. These results are the first to analyze paclitaxel or docetaxel metabolites in rat blood and show their very low levels.

The repeated treatment with docetaxel caused significantly lower body weight gain than treatment with paclitaxel (data not shown). It was confirmed in more detail and compared with other treatment groups in the experiment following the size of lymphomas (See below).

(II) Effect of paclitaxel, docetaxel or their combinations on body weight, survival of rats and size of lymphomas

In the five groups of female rats, five animals each, which were subcutaneously inoculated with transplantable subcutaneous lymphoma cells (10^6 cells/ rat), one group remained untreated (UT), another group received four weekly doses of paclitaxel (4P), the other received the same doses of docetaxel (4D), the fourth was given two doses of paclitaxel followed by docetaxel (2P/2D) and the fifth group received the reverse order and doses of the drugs (2D/2P) as described in detail in Methods.

Subcutaneous lymphomas appeared in at least one rat of each group on day 13 and in all animals of the four groups on day 17 after inoculation. In contrast, the lymphomas in the 4D rats first appeared on day 27 (Fig 3A). The lymphomas steadily grew until day 34 after inoculation, when they reached the mean area/rat (cm^2) of 23 in UT animals, 18 in 4P rats, 13 in 2P/2D group, 6.5 cm^2 in 2D/2P rats, but the difference between the two latter groups was not significant. The average area of only 1.2 cm^2 was in the 4D group and remained

significantly different from UT, 2P/2D and 4P group until the end of observation on day 34. The considerable variability in the other treatment groups caused that only lymphomas in the 2D/2P group were significantly smaller than in the UT group.

The effect of treatment on body weight and lymphoma size. On day 20 when all animals still survived (Fig 3B), UT rats gained 13% of starting weight and the lymphomas (mean 4.3 cm²/rat, i.e. about 19g/ kg b.w., i.e. 1.9% of b.w. assuming 1 cm² being equal to 1 g), did not increase body weight substantially. The mean weight gain in the 4P group was 11% and the influence of lymphomas on body weight was even less than in UT rats. The 4D rats gained on average 9% body weight; lymphomas were still absent. In the 2P/2D rats, the mean weight gain was 11% and lymphomas were estimated to make up 1.1% b.w. The lower weight gain showed stronger response than the in 4P group, but weaker than in 4D rats. The mean weight gain in the 2D/2P rats was 7%. The weight increments in the 4D and 2D/2P groups were significantly less than in UT rats from day 24 to 34 and corresponded to greater therapeutic efficiency.

When the survival was investigated, all UT rats lived 20 days and the last one died on day 48. (Table1). All treated rats survived significantly longer than UT rats, but the 4D rats performed best and the efficiency of treatment decreased in the following order: 4D > 2D/2P = 2P/2D > 4P.

(III) Effect of paclitaxel or docetaxel on body weight, size and weight of lymphomas, *in vitro* hepatic microsomal metabolism of paclitaxel and docetaxel and P-gp expression in livers, intestines and lymphomas

The palpable lymphomas appeared on day 17 after inoculation in all six untreated (UT) rats (day 17±0, mean ± S.D.), on day 17 - 20 in the rats dosed 5-times with paclitaxel (5P) (day 18.3 ± 1.5) and on day 17 in only two out of six rats dosed with docetaxel (5D), while the other four were without palpable lymphomas until sacrifice on day 32 (day 5.7 ± 8.8), the occurrence being significantly different from the UT and 5P rats.

The body weight significantly increased during the 32 days after inoculation in the untreated (UT) rats (by 20% from 194 to 233.6), but it did not increase significantly in the 5P rats (by 5.7% from 242 to 256) and in the 5D rats (by 5% from 217 to 228g).

The lymphoma weights on day 32 after inoculation were 10.3 ± 2.1g (8.3-12.4) in the UT rats, significantly less in the 5P rats (4.7 ± 2.2, 1-6.7, P<0.05) and still less in the 5D rats (2.4 ± 3.2, 0-6.2, P<0.05), where 4 out of 6 rats had no lymphomas. The mean lymphoma weights between the two treated groups did not differ significantly, but the fact that 2/3 of rats given docetaxel lacked any lymphomas proved a better effect of docetaxel. The expression of P-gp protein in tumors, intestines and livers of rats measured by immunohistochemistry was below the level of detection, although the positive control of NCI/ADR-RES cells showed a well detectable level (Fig.4).

In vitro metabolism of paclitaxel and docetaxel

The lower blood levels of paclitaxel, but not docetaxel upon repeated administration described above could be related to induction of CYP enzyme activity by paclitaxel, but not docetaxel. Thus, *in vitro* hepatic microsomal metabolism of both drugs was determined in untreated rats, rats intraperitoneally pretreated with paclitaxel or docetaxel (10, 6, 6, 6 and 6mg/kg, respectively) and compared with metabolic rates in our reference untreated rats and rats pretreated with pregnenolone 16^α-carbonitrile, which highly induced the microsomal level of CYP3A4, the only significant CYP enzyme of paclitaxel and docetaxel metabolism in rats (Table 2). The almost 30% higher paclitaxel metabolism to C3'OHP and other metabolites

after the pretreatment with paclitaxel as well as slightly lower docetaxel metabolism to OH-D and other metabolites after pretreatment with docetaxel were not significantly different from untreated animals. It also indicated that neither pretreatment significantly influenced CYP3A1/2 levels in contrast to 9-fold increase of paclitaxel metabolism and 2.7-increase of docetaxel metabolism by CYP3A1/2 induction with pregnenolone 16 α -carbonitrile. Metabolite with t_R being 36% of PCT was characterized by presence in microsomes with paclitaxel and NADPH and absence when either of them was missing. It was quantitatively significant in PCN microsomes.

Expression of P-glycoprotein in tumors, intestines and livers of taxane-pretreated rats

The liver postmitochondrial fraction containing microsomes and plasma membranes, whole homogenates of subcutaneous lymphomas as well those of intestines did not express detectable levels of P-glycoprotein using specific MAb antibodies, although positive controls of homogenates of NCI/ADR-RES breast cancer cell line gave well detectable P-glycoprotein expression. Our results suggested that P-gp protein levels were too low for successful detection by immunohistochemistry in rat livers, intestines or tumors. Therefore the lower antitumor effect of paclitaxel than docetaxel was not related to induction of P-gp expression and related efflux of paclitaxel from tumor cells by pretreatment with the drug.

Discussion

The report that docetaxel and paclitaxel primarily affected different phases of the HeLa cells cycle (Dorr 1997) led to our hypothesis that their combined action might be more effective than either of the drugs alone. Such therapy has not been attempted yet. However, the survival of rats was most favorable in the docetaxel only group, paclitaxel acting significantly less and the combined treatment having intermediate action. Likewise, docetaxel only treatment most effectively delayed the first day of lymphoma appearance and decreased size and weight of lymphomas in postmortem examination. The results support our previous study (Bobkova et al. 2001), where docetaxel treatment was very effective in this type of tumor. The highest efficiency of docetaxel is also supported by the intermediate effects of combined administration of both drugs.

Drug metabolism and its induction have been shown to decrease efficiency of many drugs and high levels or induction of P-glycoprotein may cause multi-drug resistance of tumors. Paclitaxel is an established substrate of P-glycoprotein. Thus, the other experiments were aimed at analysis, whether differences in metabolism of paclitaxel and docetaxel or induction of P-glycoprotein significantly participated in their different effects. Repeated administration of paclitaxel caused decreased levels of the drug after a challenge dose indicating substantiation of the hypothesis, whereas repeated administration of docetaxel did not influence its blood levels. However, the decrease of paclitaxel blood levels, although significant, was not great and was diminishing in the 6-hour observation. It was also reflected in insignificant enhancement of metabolism of paclitaxel *in vitro* after repeated administration of the drug. The *in vitro* metabolism of docetaxel was almost 10-fold faster than metabolism of paclitaxel, implying faster metabolism of docetaxel *in vivo*, which did not take place, though. It is probably partly related to the fact that only 4 of the 10 known metabolites of paclitaxel have been found in the *in vitro* studies. Moreover, blood levels of the drugs and especially their metabolites are also influenced by elimination via bile, which explains the very low levels of metabolites in blood.

The 10-fold faster metabolism of docetaxel than paclitaxel in the *in vitro* assays suggested that docetaxel could exert lower antitumor activity, but similar blood levels of paclitaxel and docetaxel, which are responsible for the antitumor effects, did not confirm this assumption.

Neither drug induced P-glycoprotein expression in the subcutaneous lymphomas and the hypothesis that paclitaxel may have a lower antitumor action due to induction of P-glycoprotein was therefore not substantiated.

Intraperitoneal administration of docetaxel and paclitaxel resulted in their favorable bioavailability and indicated that significant and long-lasting blood levels can be reached after an intraperitoneal injection, which has been so far used only in gynecological malignancies.

The significantly higher antitumor action of docetaxel on the SD10/Cub lymphomas obviously does not compromise the fact that Taxol® is one of the most effective anticancer drugs in the therapy of advanced breast cancer, ovary cancer and non-small cell lung cancer of the last decade and exploration of other indications continues in literature and in the clinic.

Thus, the higher antitumor activity of docetaxel was apparently caused by its higher intrinsic activity against SD10/Cub subcutaneous lymphomas as compared with paclitaxel. It was not caused by more rapid metabolism of paclitaxel leading to lower blood levels or induction P-glycoprotein in tumors. It complies with the higher efficiency of docetaxel for various tumor cell lines (Dorr 1997). In conclusion, docetaxel was a more effective drug for the therapy of subcutaneous lymphomas than paclitaxel or combined treatment with both drugs.

Acknowledgements: this work was supported by grant No 7567-3 of the Ministry of Health, Czech Republic and a grant from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic 0021620808. The authors gratefully acknowledge the generous gift of Taxol® for infusion from Bristol Myers Squibb, which made the study possible and gratefully acknowledge that docetaxel, hydroxydocetaxel, two stereomeric hydroxyoxazolidinones, oxazolidinedione and 7-epidocetaxel were a generous gift of Aventis (Paris, France).

References

- Anderson CD, Wang J, Kumar GN, McMillan JM, Walle UK, Walle T (1995) Dexamethasone induction of taxol metabolism in the rat. *Drug Metab Dispos* 23: 1286-1290
- Aoudjit F, Vuori K (2001) Integrin signalling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* 20: 4995-5004
- Bobková K, Gut I, Mandys V, Holý A, Votruba I, Otová B (2001) Antitumor activity of combined treatment with PMEDAP and docetaxel in the Prague inbred Sprague-Dawley/cub rat strain bearing T-cell lymphoma. *Anticancer Research* 21: 2725-2732
- Cresteil T, Monsarrat B, Alvinerie P, Tréluyer JM, Vieira I, Wright M (1994) Taxol metabolism by human liver microsomes: Identification of cytochromes P450 isozymes involved in its biotransformation. *Cancer Res* 54: 386-392
- Dantzig AH, Law KL, Cao J, Starling JJ (2001) Reversal of multidrug resistance by the P-glycoprotein modulator, LY335979, from the bench to the clinic. *Curr Med Chem* 8(1): 39-50. Review
- Dorr RT (1997) Pharmacology of the taxanes. *Pharmacotherapy* 17 (5 Pt 2): 96S - 104S
- Fan W (1999) Possible mechanisms of paclitaxel-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol* 57: 1215-1221
- Garg MB, Ackland SP (2000) Simple and sensitive high-performance liquid chromatography. Method for determination of docetaxel in human plasma or urine. *J Chromatog B* 748: 383-388
- Gut I, Danielová V, Holubová J, Souček P, Klučková H (2000) Cytotoxicity of cyclophosphamide, paclitaxel and docetaxel for tumor cell lines *in vitro*: effects of concentration, time and CYP-catalyzed metabolism. *Arch. Toxicol* 74: 437-46
- Gut I, Terelius Y, Frantík E, Linhart I, Souček P, Filipcová B, Klučková H (1993) Exposure to various benzene derivatives differently induces cytochromes P450 2B1 and 2E1 in the rat liver. *Arch Toxicol* 67: 237-243
- Harris JW, Rahman A, Kim B-R, Guengerich FP, Collins JM (1994a) Metabolism of taxol by human hepatic microsomes and liver slices: Participation of cytochrome P450 3A4 and an unknown P450 enzyme. *Cancer Res* 54: 4026-4035
- Harris JW, Katki A, Anderson LW, Chmurny GN, Paukstelis JV, Collins JM (1994b) Isolation, structural determination, and biological activity 6 α -hydroxytaxol, the principal human metabolite of taxol. *J Med Chem* 37: 706-709
- Huang L, Wring SA, Woolley JL, Brouwer KR, Serabjit-Singh C and Polli JW (2001) Induction of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A by HIV protease inhibitors. *Drug Metab Dispos* 29: 754-760
- Huizing MT, Sewberath Misser VH, Pieters RC, ten Bokkel Huinink WW, Veenhof CHN, Vermorken JB, Pinedo HM, Beijnen JH (1995) Taxanes: a new class of antitumor agents. *Cancer Invest* 13: 381-404
- Klener P: Taxanes – New class of antitumor chemotherapeutics [in Czech] (1995) *Remedia* 5: 154-160
- Kumar GN, Walle UK, Walle T (1994) Cytochrome P450 3A-mediated human liver microsomal taxol 6 α -hydroxylation. *J Pharm Exp Ther* 268: 1160-1165

- Kyu-Ho Han E, Gehrke L, Tahir SK, Credo RB, Cherian SP, Sham H, Rosenberg SH, Ng S (2000) Modulation of drug resistance by alpha-tubulin in paclitaxel-resistant human lung cancer cell lines. *Eur J Cancer*. 36(12): 1565-71
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275
- Marre F, Sanderink GJ, de Sousa G, Gaillard C, Martinet M, Rahmani R (1996) Biotransformation of docetaxel (Taxotere) *in vitro*: involvement of the CYP3A subfamily in humans. *Cancer Res* 56 :1296-1302
- Monsarrat B, Mariel E, Cros S, Garés M, Guénard D, Gueritte-Voegelein F, Wright M (1990) Isolation and identification of three major metabolites of taxol in rat bile. *Drug Metab Dispos* 18: 895-901
- Monsarrat B, Alvinerie P, Wright M, Dubois J, Gueritte-Voegelein F, Guenard D, Donehower RC, Rowinsky EK (1993) Hepatic metabolism and biliary excretion of taxol in rats and humans. *J Natl Cancer Inst Monogr* 15: 39-46
- Monsarrat B, Royer I, Wright M, Cresteil T (1997) Biotransformation of taxoids by human cytochromes P450: structure-activity relationship. *Bull Cancer* 84: 125-133
- Monsarrat B, Chtelut E, Royer I, Alvinerie P, Dubois J, Dezeuse A, Roche H, Cros S, Wright M, Canal P (1998) Modification of paclitaxel metabolism in a cancer patient by induction of cytochrome P450 3A4. *Drug Metab Dispos* 26: 229-233
- Nedelcheva V, Gut I, Soucek P, Frantik E (1998) Cytochrome P450 catalyzed oxidation of monochlorobenzene, 1,2- and 1,4-dichlorobenzene in rat, mouse and human liver microsomes. *Chem Biol Interact* 115:53-70
- Otová B, Sladká M, Damoiseaux J, Panczak A, Mandys V, Marinov I (2002) Relevant Animal Model of Human Lymphoblastic Leukaemia/Lymphoma - Spontaneous T- Cell Lymphomas in an Inbred Sprague-Dawley Rat Strain (SD/Cub) - Review. *Folia Biologica (Praha)* 48: 213-226
- Rahman A, Korzekwa KR, Grogan J, Gonzalez J, Harris JW (1994) Selective biotransformation of taxol to 6 α -hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8. *Cancer Res* 54: 5543-5546
- Rowinsky EK, Onetto N, Canetta RM, Arbuck SG (1992) Taxol: the first of the taxanes, an important new class of antitumor agents. *Semin Oncol* 19: 646-662
- Royer I, Monsarrat B, Sonnier M, Wright M, Cresteil T (1996) Metabolism of docetaxel by human cytochromes P450: interactions with paclitaxel and other antineoplastic drugs. *Cancer Res* 56: 58-65
- Schiff PB, Fant J, Horwitz SB (1979) Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. *Nature* 22: 665-667
- Shou M, Korzekwa KR, Krausz KW, Gonzalez FJ, Gelboin HV (1998) Role of human cytochrome P450 3A4 and 3A5 in the metabolism of Taxotere and its derivatives: enzyme specificity, interindividual distribution and metabolic contribution in human liver. *Pharmacogenetics* 8: 391-401
- Spencer MC, Faulds D (1994) Paclitaxel: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the treatment of cancer *Drugs* 48: 795-845

- Vaclavikova R, Horsky S, Simek P, and Gut I (2003) Paclitaxel metabolism in rat and human liver microsomes is inhibited by phenolic antioxidants. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 368: 200-209
- Vaclavikova R, Soucek P, Svobodova L, Anzenbacher P, Simek P, Guengerich FP, Gut I (2004) Different *in vitro* metabolism of paclitaxel and docetaxel in humans, rats, minipigs and regular pigs. *Drug Metabolism and Disposition* 32: 666-674,.
- Walle T, Kumar GN, McMillan JM, Thornburg KR, Walle UK (1993) Taxol metabolism in rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 46: 1661-1664

Table 1 Survival of rats inoculated with subcutaneous lymphoma cells (days)

| Group^a | Number of tested rats | More days of survival than UT rats | Last rat died | More days of last rat survival than UT rats | Significant difference* of the survival in days between groups |
|--------------------------|------------------------------|---|---|--|---|
| UT | 20 | - | 48 | - | - |
| 4P | 41 | 21 | 66 | 18 | UT, P=0.05 |
| 4D | 55 | 35 (14 vs. 4P) | Two till 91, last killed day180 ^b | 43 (132) | UT, P=0.01; 4P P=0.04; 2P-2D, P=0.05; 2D-2P, P=0.05 |
| 2P/2D | 41 | 21 | One till day 77 | 29 | UT, P=0.06 |
| 2D/2P | 45 | 25 | Two till 91, last killed day 180 ^b | 43 (132) | UT, P=0.05, not different from 2P-2D |

^aUT = untreated rats, 4P = four doses of paclitaxel, 4D = four doses of docetaxel, 2P/2D = two doses of paclitaxel followed by two doses of docetaxel, 2D/2P = two doses of docetaxel followed by two doses of paclitaxel

^bthese last rats were still healthy and without any lymphomas

*Significant difference of the survival was calculated by both-sided student's t-test.

Table 2 Metabolism of paclitaxel and docetaxel in liver microsomes of rats untreated or pretreated with paclitaxel, docetaxel or pregnenolone 16 α -carbonitrile (PCN)

| Microsomes | Metabolites of paclitaxel (pmol/mg protein/min \pm SD) | | | | | |
|----------------------|--|-----------------|-------------------|------------------|------------------|----------|
| | 36%RT | diOHP | C3'OHP | C2OHP | OHP (81%) | Σ |
| Untreated | 1.29 \pm 0.55 | - | 3.28 \pm 0.86 | - | 0.19 \pm 0.04 | 4.76 |
| Paclitaxel treatment | 2.17 \pm 1.00 | - | 3.70 \pm 0.48 | - | 0.24 \pm 0.09 | 6.11 |
| Docetaxel treatment | 3.44 \pm 1.32* | 0.36 \pm 0.13 | 2.19 \pm 0.75 | - | 0.14 \pm 0.14 | 6.13 |
| Reference untreated | 0.39 \pm 0.12 | 0.08 | 3.16 \pm 0.35 | 0.41 \pm 0.02 | - | 4.04 |
| PCN-pretreated | 4.75 \pm 0.64* | 1.8 \pm 0.04 | 21.58 \pm 1.15* | 4.41 \pm 0.31* | 3.73 \pm 0.22* | 36.27* |

| Microsomes | Metabolites of docetaxel (pmol/mg protein/min \pm SD) | | | | | |
|----------------------|---|-------------------|-------------------|------------------|-----------------|----------|
| | OH-OXZDN1 | OH-OXZDN2 | OH-D | D | 7-epiD | Σ |
| Untreated | 1.53 \pm 0.23 | - | 50.85 \pm 6.53 | 7.85 \pm 0.47 | 5.13 \pm 1.95 | 65.36 |
| Paclitaxel treatment | 2.82 \pm 0.36* | - | 59.84 \pm 4.06 | 6.93 \pm 0.34 | 4.81 \pm 0.46 | 74.40 |
| Docetaxel treatment | 1.84 \pm 0.79 | - | 40.14 \pm 15.45 | 7.82 \pm 0.29 | 7.26 \pm 2.44 | 57.06 |
| Reference untreated | 4.63 \pm 0.22 | - | 70.94 \pm 0.06 | 6.07 \pm 0.07 | 0.88 | 82.52 |
| PCN-pretreated | 75.40 \pm 0.77* | 97.89 \pm 0.55* | -* | 0.11 \pm 0.06* | 2.87 | 176.27* |

Microsomes were from male SD/cub rats without treatment (untreated) or rats treated weekly with paclitaxel or docetaxel (10, 6, 6, 6, and 6mg/kg, i.p., respectively) and killed 24h after the last dose. Microsomes from rats pretreated with pregnenolone 16 α -carbonitrile have high levels of CYP3A1/2. The main metabolite of paclitaxel as well as main metabolites of docetaxel were defined by comparing with authentic standard. The other metabolites of paclitaxel were characterized by MS/MS or by presence in microsomes with NADPH and paclitaxel and not in absence of either of them (36%RT). Metabolites of docetaxel were defined by comparing with authentic standards. Reference controls were microsomes from rats of the same batch as the PCN-pretreated ones. For details see Materials and Methods. N \geq 3, * significant difference from untreated rats (p<0.05) calculated by Student t-test

Legends for figures

Fig.1. Structures of paclitaxel, docetaxel and their metabolites in SD/cub rats *in vitro* and *in vivo*

| Structure | Structure formulae of paclitaxel and detected metabolites | | | | <i>in vitro</i> | <i>in vivo</i> |
|-------------------------------------|---|----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|
| | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | | |
| paclitaxel | H | H | H | acetyl | + | + |
| 6 α -hydroxypaclitaxel | H | OH | H | acetyl | + | - |
| 3'p-hydroxypaclitaxel | OH | H | H | acetyl | + | + |
| 2-m-hydroxypaclitaxel | H | H | OH | acetyl | + | - |
| 6 α ,3'p-dihydroxypaclitaxel | OH | OH | H | acetyl | + | - |
| Unknown hydroxypaclitaxel | n.a. ^a | n.a. | | acetyl | + | - |
| 4-deacetyl paclitaxel | H | H | H | H | - | + |

^a n.a., position of the hydroxyl group could not be assigned by mass spectrometry (Vaclavikova et al. 2003)

Structure formulae of docetaxel and detected metabolites

| Structure | R ₁ | R ₂ | R ₃ | <i>in vitro</i> | <i>in vivo</i> |
|------------------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|
| Docetaxel | H | H | acetyl | + | + |
| 3'-hydroxydocetaxel | OH | H | acetyl | + | + |
| Dihydroxydocetaxel | OH | OH | acetyl | - | + |
| Oxazolidinedione (R,S) | H | H | acetyl | + | - |
| 4-deacetyldocetaxel | H | H | H | - | + |

Fig.2. Blood levels of paclitaxel or docetaxel after single or repeated administration to rats

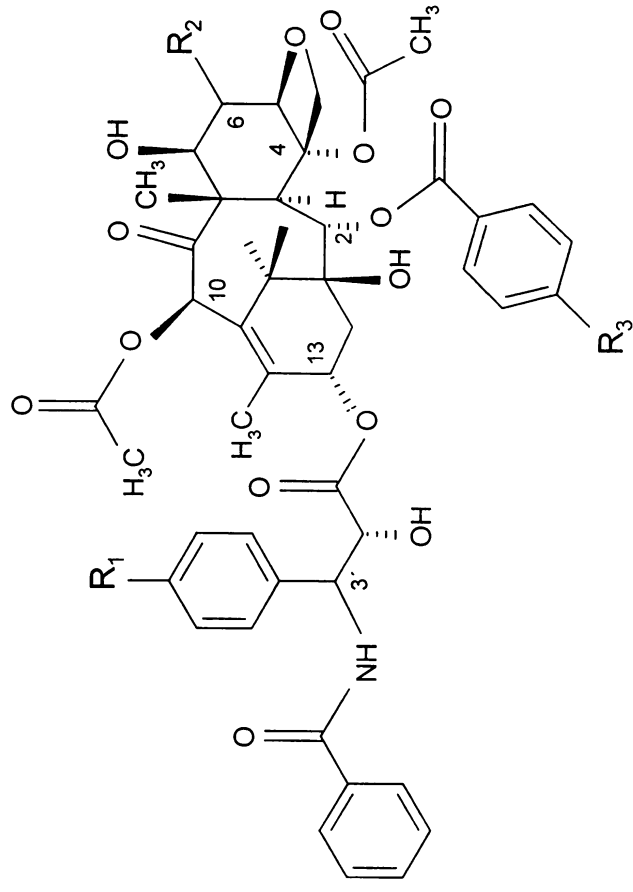
Four rats in each group were administered either paclitaxel or docetaxel (20mg/mg intraperitoneally) as a single dose or after three weekly doses of the same drug (6mg/kg each) and blood levels were determined by HPLC. Data are shown as means \pm SD from 4 measurements.

Fig.3. Effect of paclitaxel, docetaxel or their combinations on SD/cub rats bearing subcutaneous lymphomas. The SD/cub rats were inoculated with subcutaneous lymphoma cells and subsequently untreated or treated with four weekly doses of docetaxel (4D), two doses of docetaxel followed by two of paclitaxel (2D/2P), two doses of paclitaxel followed by two of docetaxel (2P/2D) or four weekly doses of paclitaxel (4P). (A) Lymphoma size: Significance of differences among the groups is described in the text. (B) Body weight: From day 24 the body weights of the 4D and 2D/2P groups were significantly different from the untreated group

Fig.4. Expression of P-glycoprotein in MDA-MB-435 and NCI/ADR-RES cells used as negative and positive controls for P-gp expression.

Figure 1

Paclitaxel



Docetaxel

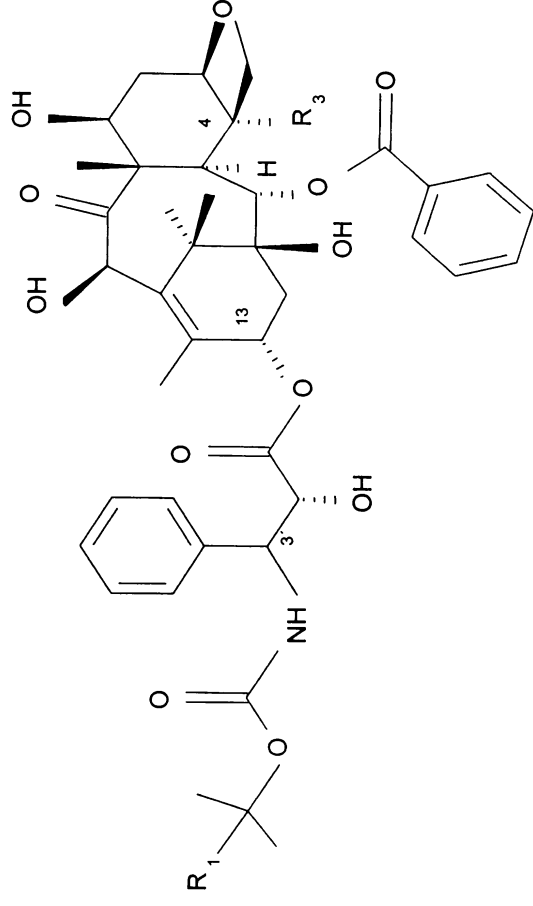
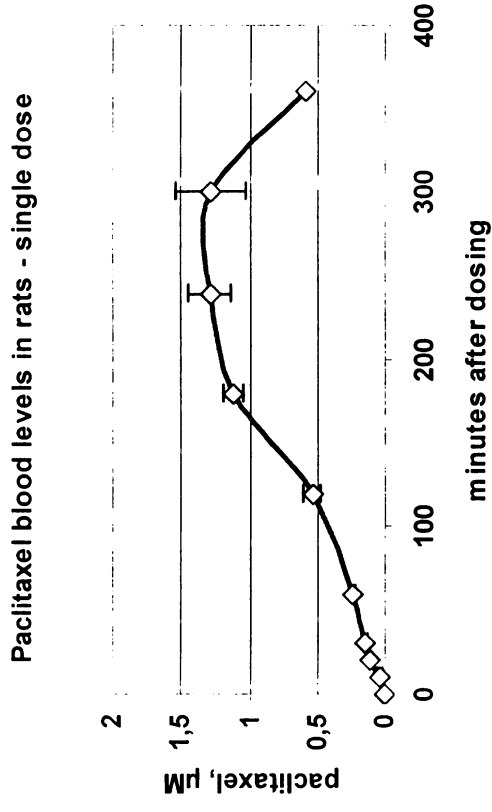
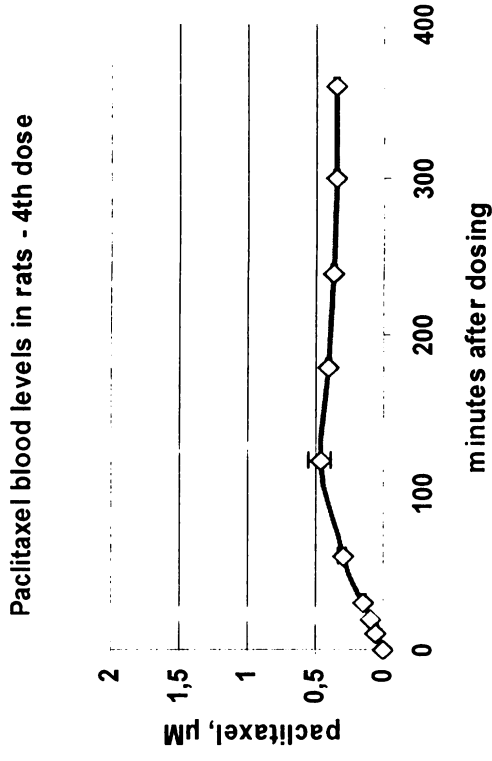


Figure 2

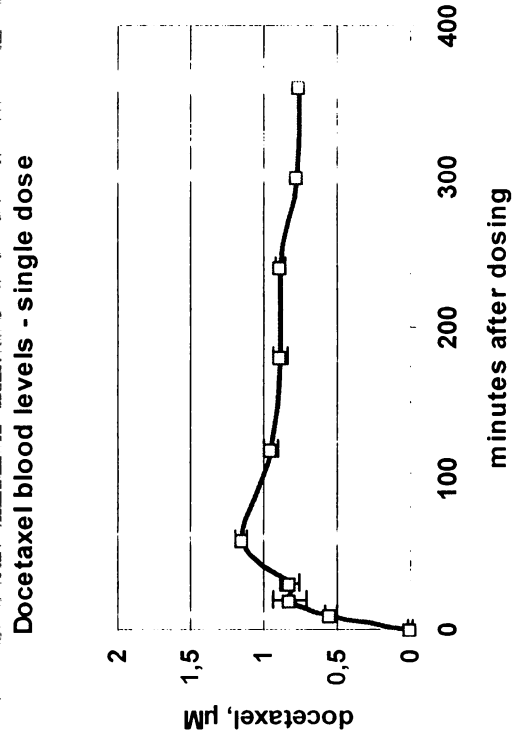
A



B



C



D

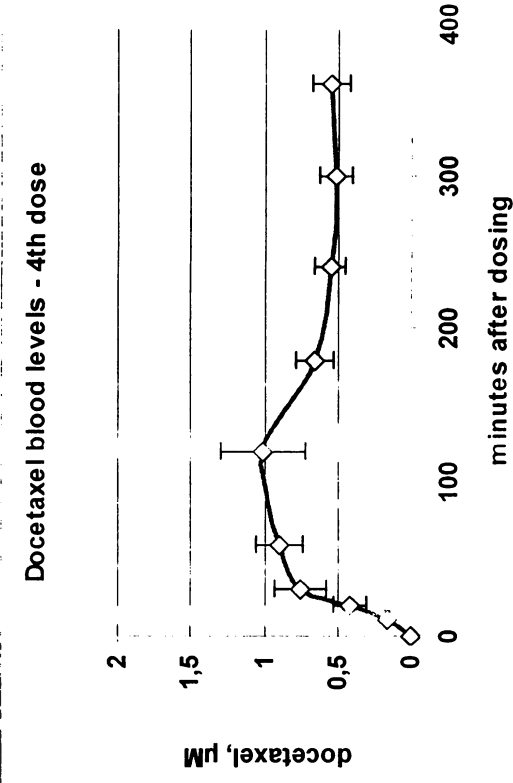


Figure 3a

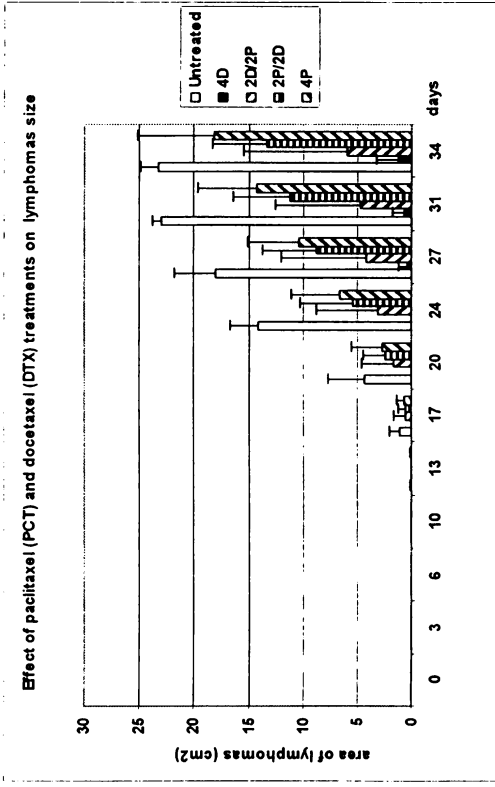


Figure 3b

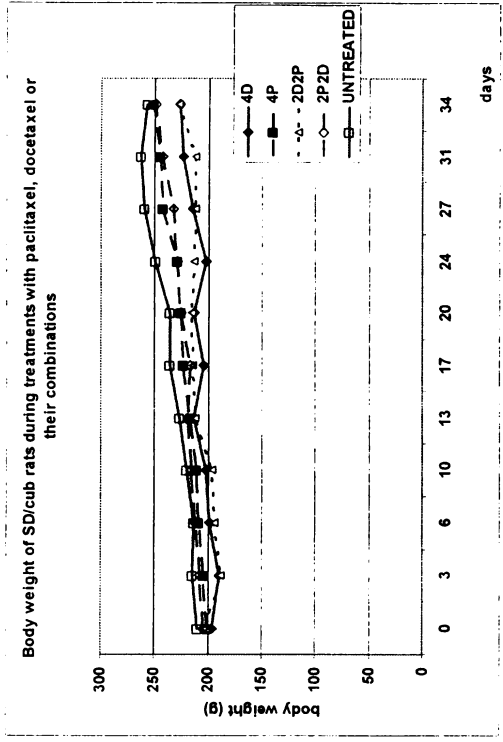
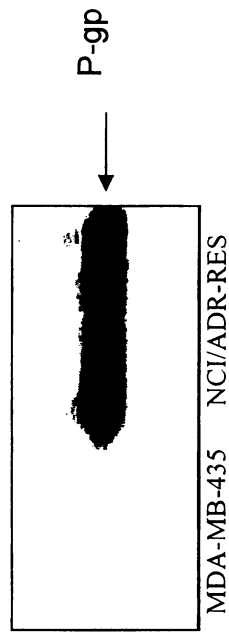


Figure.4



Příloha VIII

Ehrlichová M, Koc M., Truksa J., Nad'ová Z.,

Václavíková R. and Kovář J.:

Cell death induced by taxanes in breast cancer cells:
cytochrome C is released in resistant but not in
sensitive cells.

Anticancer Res **25(6B)**: 4215-4224, 2005.

Cell Death Induced by Taxanes in Breast Cancer Cells: Cytochrome c is Released in Resistant but not in Sensitive Cells

MARIE EHRLIHOVÁ¹, MICHAL KOC¹, JAROSLAV TRUKSA¹,
ZUZANA NALĐOVÁ¹, RADKA VÁCLAVÍKOVÁ² and JAN KOVÁŘ^{1,3}

¹Cell Growth Control Laboratory, Institute of Molecular Genetics,
Academy of Sciences of the Czech Republic, 142 20 Prague;

²Center of Occupational Diseases, National Institute of Public Health, 100 42 Prague;

³Department of Cell and Molecular Biology, Third Medical Faculty, Charles University, 100 00 Prague, Czech Republic

Abstract. *Background:* The aim of the study was to contribute to our understanding of the mechanisms responsible for the resistance of breast cancer cells to taxanes. *Materials and Methods:* Cell cycle characteristics, DNA fragmentation, p53 and p21^{WAF1/CIP1} expression, caspase-3 and caspase-9 activity, cytochrome c release from mitochondria during cell death induction by the taxanes paclitaxel and docetaxel in highly-sensitive MDA-MB-435 and highly-resistant NCI-ADR-RES human breast cancer cells were compared. *Results:* Approximately 300-fold higher concentrations of the taxanes were required to induce death in resistant NCI-ADR-RES cells than in sensitive MDA-MB-435 cells. Cell death induced by the taxanes in both sensitive and resistant cells was preceded by the accumulation of cells in the G₂/M-phase. Neither cell type produced any DNA fragmentation (DNA ladder) typical of regular apoptosis. The p53 and the p21^{WAF1/CIP1} levels did not change in sensitive or in resistant cells during cell death induction by the taxanes. The activity of the executioner caspase-3 increased significantly (2 to 2.5-fold) and, similarly, the activity of caspase-9 increased significantly (2-3.5-fold) in both cell types. However, cytochrome c was found to be released from mitochondria into the cytosol only in the resistant NCI-ADR-RES cells, but not in the sensitive MDA-MB-435 cells. *Conclusion:* The death induced by the taxanes in the studied breast cancer cells can be characterized as an apoptosis-like death, including caspase-3 and caspase-9 activation but not oligonucleosomal DNA fragmentation. However, the mechanisms of death induction by

the taxanes in sensitive MDA-MB-435 cells and resistant NCI-ADR-RES cells differ. Cytochrome c is released from the mitochondria in resistant but not in sensitive cells.

The taxanes represent a relatively new class of anticancer drugs. There are two taxanes used in cancer therapy, *i.e.* paclitaxel and docetaxel (1). Paclitaxel (Taxol[®]) was originally isolated from the bark of the Pacific Yew (*Taxus brevifolia*) and is now manufactured in a partly synthetic process (2). Docetaxel (Taxotere[®]) is a semi-synthetic taxane which does not occur naturally. Its precursor is isolated from the needles of the European Yew (*Taxus baccata*) (3). Both taxanes have been used in the therapy of breast, ovarian, lung, esophageal and head and neck cancers (2, 4, 5).

Taxanes are mitotic poisons. They bind to the β subunit of the tubulin heterodimer. This interaction accelerates the polymerization of tubulin, stabilizes the resulting microtubules and inhibits their depolymerization (2, 6). It results in the formation of microtubule bundles in interphase cells and in the formation of deformed microtubule structures called asters, instead of mitotic spindles, during mitosis (7, 8). In this way, the taxanes block progression through the M-phase of the cell cycle (9).

Taxanes induce cell death, supposedly by apoptosis (10, 11). However, the molecular mechanism of cell death induction by the taxanes remains obscure. The relationship between cell death induction and mitotic arrest is unclear (11, 12). Similarly, the role of phosphorylation of the Bcl-2 protein in cell death induction by the taxanes is unclear. Bcl-2 phosphorylation is a hallmark of taxane effects, but it might be related to mitotic arrest rather than to cell death induction (13-15). It has been shown, by several authors (13, 16, 17), that cell death induced by the taxanes is p53-independent. On the other hand, several recent findings concerning cytochrome c release, caspase-9 activation and caspase-3 activation (10, 18-25) support the suggestion that

Correspondence to: Dr. Jan Kovář, Cell Growth Control Laboratory, Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 14220 Prague 4, Czech Republic. Tel: +420-241062637, Fax: +420-244471707, e-mail: kovar@biomed.cas.cz

Key Words: Cell death, paclitaxel, docetaxel, breast cancer cells, DNA fragmentation, caspase activation, cytochrome c release.

the apoptotic mitochondrial pathway is involved in cell death induction by the taxanes, including cell death induction in breast cancer cells.

The aim of the present study was to contribute to our understanding of the mechanisms involved in the cell death induced by taxanes in breast cancer cells and, particularly, to contribute to a better understanding of the mechanisms responsible for the resistance of these cells to the taxanes. The characteristics of cell death induced by the taxanes paclitaxel and docetaxel were compared in human breast cancer cells MDA-MB-435, which were found to be highly sensitive to taxanes, and in human breast cancer cells NCI-ADR-RES, which were found to be highly resistant to taxanes. The cell death induced by paclitaxel or by docetaxel in both types of cells had the characteristics of apoptosis-like death. However, the mechanisms of death induction by the taxanes in sensitive MDA-MB-435 cells and resistant NCI-ADR-RES cells differ, since cytochrome c is released from mitochondria only in resistant NCI-ADR-RES but not in sensitive MDA-MB-435 cells.

Materials and Methods

Materials. Paclitaxel was obtained from Bristol-Myers Squibb (Princeton, NJ, USA) and docetaxel from Rhone-Poulenc-Rorer (Vitry sur Seine, France). The mouse monoclonal antibody Pab 240 against human p53 and the mouse monoclonal antibody HZ52 against human p21^{WAF1/CIP1} from Neo Markers (Fremont, CA, USA), and mouse monoclonal antibodies 7H8.2C12 from Zymed Laboratories (San Francisco, CA, USA) and 6H2 B4 from Pharmingen (San Diego, CA, USA) against human cytochrome c were used.

Cells and culture conditions. The human breast carcinoma cell lines MDA-MB-435 and NCI-ADR-RES were obtained from the National Cancer Institute (Frederick, MD, USA). The cells were maintained in a culture medium at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. The culture medium represents a basic medium supplemented with 10% fetal bovine serum (J. Kysilka, Brno, Czech Republic). The basic medium was RPMI 1640 medium containing extra L-glutamine (300 µg/ml), sodium pyruvate (110 µg/ml), HEPES (15 mM), penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml), as described previously (26). For the experiments, cells were harvested employing trypsin (0.2%) + EDTA (0.02%) in PBS.

Cell growth and survival experiments. Cells maintained in the culture medium were harvested by low-speed centrifugation, washed with the culture medium and then seeded at 1x10⁴ cells/100 µl of medium into wells of a 96-well plastic plate. Cell growth and survival were evaluated after 96 h of incubation in the culture medium without taxane (control) and with various concentrations of paclitaxel or docetaxel. The number of living cells was determined by hemacytometer counting after staining with trypan blue (27).

Propidium iodide staining analysis. Cells grown in the culture medium were harvested by low-speed centrifugation, washed with

the culture medium and seeded at 5x10⁶ cells/25 ml of medium into plastic culture flasks. After the required incubation period (24, 48, 72, 96 h) in the culture medium without taxane (control) and with selected concentrations of paclitaxel or docetaxel, the cells were harvested by low-speed centrifugation, stained and analyzed as described previously (27).

DNA fragmentation analysis. Cells previously grown in the culture medium were harvested by low-speed centrifugation, washed with the culture medium and seeded at 5x10⁶ cells/25 ml of medium into plastic culture flasks. After 72 h of incubation in the culture medium without taxane (control) and with effective concentrations of paclitaxel or docetaxel, the cells were harvested by low-speed centrifugation and analyzed employing agarose gel electrophoresis, as described previously (27).

Indirect immunofluorescence analysis. Harvested cells were seeded at 5x10⁶ cells/25 ml, as described above. After 24 h of incubation in the culture medium without taxane (control) and with effective concentrations of paclitaxel or docetaxel, the cells were harvested and stained as described previously (28). Mouse monoclonal antibodies (IgG) Pab 240 against human p53 and HZ52 against human p21^{WAF1/CIP1} were used as primary antibodies. Anti-mouse FITC-conjugated goat antibody (Sigma, St. Louis, MO, USA) was used as the secondary antibody.

Measurement of caspase-3 and caspase-9 activities. Harvested cells were seeded at 5x10⁶ cells/25 ml, as described above. After 24 h of incubation in the culture medium without taxane (control) and with effective concentrations of paclitaxel or docetaxel, the cells were harvested by low-speed centrifugation and analyzed. Commercial colorimetric kits Caspase-3 Assay Kit from Sigma and ApoTarget™ Caspase-9/Mch6/Apaf-3 from Biosource (Camarillo, CA, USA) were used as described previously (29). The total protein content in samples was determined by the bicinchoninic acid assay (30).

Confocal microscopy. Harvested cells were seeded at 1x10⁶ cells/5 ml of medium over glass coverslip coated with poly-L-lysine from Sigma. After 24 h of incubation in the culture medium without taxane (control) and with effective concentrations of paclitaxel or docetaxel, the cells on the coverslip were incubated with 300 nM MitoTracker Red from Molecular Probes (Eugene, OR, USA) at 37°C for 20 min. The cells were washed with the culture medium and fixed in 3.7% formaldehyde for 15 min at 37°C. Fixed cells were washed with PBS and permeabilized with cold (-20°C) acetone for 4 min. After washing with PBS, the cells were incubated with 150 µl of the mouse monoclonal antibody 6H2 B4 against human cytochrome c (6 µg/ml of PBS). After overnight incubation with the primary antibody at 4°C, the cells were washed with PBS and incubated with 150 µl of FITC-conjugated secondary antibody from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) or FITC-conjugated secondary antibody from Jackson ImmunoResearch Laboratories (Bar Harbor, MA, USA). After 1 h of incubation with the secondary antibody at room temperature, the cells were washed again with PBS. Stained cells were allowed to dry, overlaid with 15 µl of vectashield from Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA) and placed on a glass slide. The samples were analyzed with a confocal microscope Leica TCS-SP from Leica (Bannockburn, IL, USA) with Argon (458 nm) and HeNe (543 nm, 633 nm) lasers and with a 100x objective.

Cell fractionation and Western blot analysis. Harvested cells were seeded at 5×10^6 cells/25 ml, as described above. After 24-h incubation in the culture medium without taxane (control) and with effective concentrations of paclitaxel or docetaxel, the cells (approximately 2×10^7 cell per sample) were harvested by low-speed centrifugation and washed with PBS. The cell pellet was resuspended in STEA medium (250 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 0.05% BSA, pH 7.4) supplemented with protease inhibitors (20 μ M leupeptin, 1 μ M pepstatin A, 1 mM PMSF) and incubated on ice for 5 min. The cells were mechanically homogenized using a syringe needle (diameter 0.3 mm). Nuclei and unbroken cells were removed by centrifugation at 800 \times g for 10 min. The supernatant was collected into a new Eppendorf tube and centrifuged at 20,000 \times g for 15 min at 4°C. The supernatant (cytosolic fraction) was collected into another new Eppendorf tube and the pellet (mitochondrial fraction) was resuspended in 40 μ l of Triton lysis buffer (1% Triton X-100, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 30 mM NaF, 0.2 μ M leupeptin, 1 mM PMSF, pH 7.6) or SDS lysis buffer. Cytosolic and mitochondrial fractions were homogenized using an ultrasonic homogenizer CP501 (Cole Parmer) and stored at -80°C. The total protein content in both fractions was determined by the bicinchoninic acid protein assay (30). Protein samples (80 μ g) were heated for 5 min at 100°C in the sample loading buffer (SDS lysis buffer containing 5% 2-mercaptoethanol and 0.05% bromophenol blue) and then quickly cooled on ice. SDS-PAGE was performed according to Laemmli (31). Samples were run at a constant current of 30 mA for 90 min, employing mini-Protean 3 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), on 12% polyacrylamide gel (4% polyacrylamide stacking gel). Proteins separated by SDS-PAGE were blotted, according to the modified method of Kyhse-Andersen (32) on to 0.2 μ m Protran nitrocellulose membrane from Schleicher & Schuell BioScience (Dassel, Germany) for 2 h at a constant current of 0.2 A using Mini Trans-Blot Cell from Bio-Rad Laboratories. The membrane was blocked with 5% non-fat milk in TBS for 30 min at 4°C and then washed with 0.1% Tween/TBS 3 times. The washed membrane was incubated overnight at 4°C with the primary antibody (0.5 μ g/ml of TBS containing 1% non-fat milk and 0.3% Tween). The mouse monoclonal antibody 7H8.2C12 against human cytochrome c was used as the primary antibody. After the incubation, the membrane was washed with 0.1% Tween/TBS 3 times. The washed membrane was incubated for 1 h with corresponding horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody from Bio-Rad Laboratories (1:10,000 in TBS containing 1% non-fat milk and 0.3% Tween). The membrane was then washed with 0.1% Tween/TBS 3 times. The horseradish peroxidase-conjugated antibody was detected by enhanced chemiluminescence using the ECL chemiluminescence reagent from Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA) and CCD camera LAS1000 (Fuji).

Statistical analysis. Statistical significance of differences was determined using one-way ANOVA and the Student-Newman-Keuls tests.

Results

Effect of taxanes on growth and survival. The effect of the taxanes, paclitaxel and docetaxel, were tested in a wide range of concentrations (0.1-3000 nM) on the growth and survival of several human breast cancer cell lines (MCF-7,

MDA-MB-231, MDA-MB-435, NCI-ADR-RES, SK-BR-3). MDA-MB-435 cells were found to be the most sensitive and NCI-ADR-RES cells the most resistant to cell death induced by the taxanes.

Paclitaxel, at a concentration of 3 nM and higher concentrations, induced death of MDA-MB-435 cells over 96 h of incubation. Docetaxel induced death of MDA-MB-435 cells at a concentration of 1 nM higher concentration during the same incubation period. The D_{50} (dose of taxane producing 50% of living cells in comparison with the control after 96 h of incubation) of paclitaxel was approximately 1 nM and the D_{50} of docetaxel approximately 0.3 nM. On the other hand, paclitaxel induced death of NCI-ADR-RES cells at a concentration of 1000 nM and higher and docetaxel induced death of NCI-ADR-RES cells at concentrations higher than 300 nM. The D_{50} of paclitaxel and docetaxel was approximately 300 nM and 200 nM, respectively (Figure 1). The data showed that approximately 300-fold higher concentrations of paclitaxel or docetaxel were required to induce death in resistant NCI-ADR-RES cells than in sensitive MDA-MB-435 cells. Flow cytometric analysis, after propidium iodide staining, detected a significant accumulation of particles with hypodiploid DNA content in the population of tested cells during 72 h of incubation with death-inducing concentrations of a taxane. In the case of sensitive MDA-MB-435 cells, the accumulation of particles with hypodiploid DNA content was detected for 3 nM and higher concentrations of paclitaxel and for 1 nM and higher concentrations of docetaxel. Relevant data were obtained for the resistant NCI-ADR-RES cells (data not shown).

On the basis of the data presented above, we selected 30 nM paclitaxel and 10 nM docetaxel, for sensitive MDA-MB-435 cells, and 3000 nM paclitaxel and 1000 nM docetaxel, for resistant NCI-ADR-RES cells, as employed effective concentrations, *i.e.* the lowest concentrations with full death-inducing effect. These concentrations of paclitaxel and docetaxel were used in further studies with the sensitive MDA-MB-435 cells and resistant NCI-ADR-RES cells.

Effect of taxanes on DNA content and fragmentation. Flow cytometric analysis, after propidium iodide staining, showed a significant accumulation of particles with hypodiploid DNA content after 48 h of incubation of the sensitive MDA-MB-435 cells as well as the resistant NCI-ADR-RES cells with effective concentrations (30 nM, 3000 nM) of paclitaxel. This accumulation was connected with induced cell death as demonstrated above. DNA histograms also showed a significant accumulation of cells in the G2/M-phase of the cell cycle detectable after 24 h of incubation with the effective concentrations of the taxanes (Figure 2). This finding demonstrated that cell death induced by the taxanes in both sensitive and resistant cells was preceded by

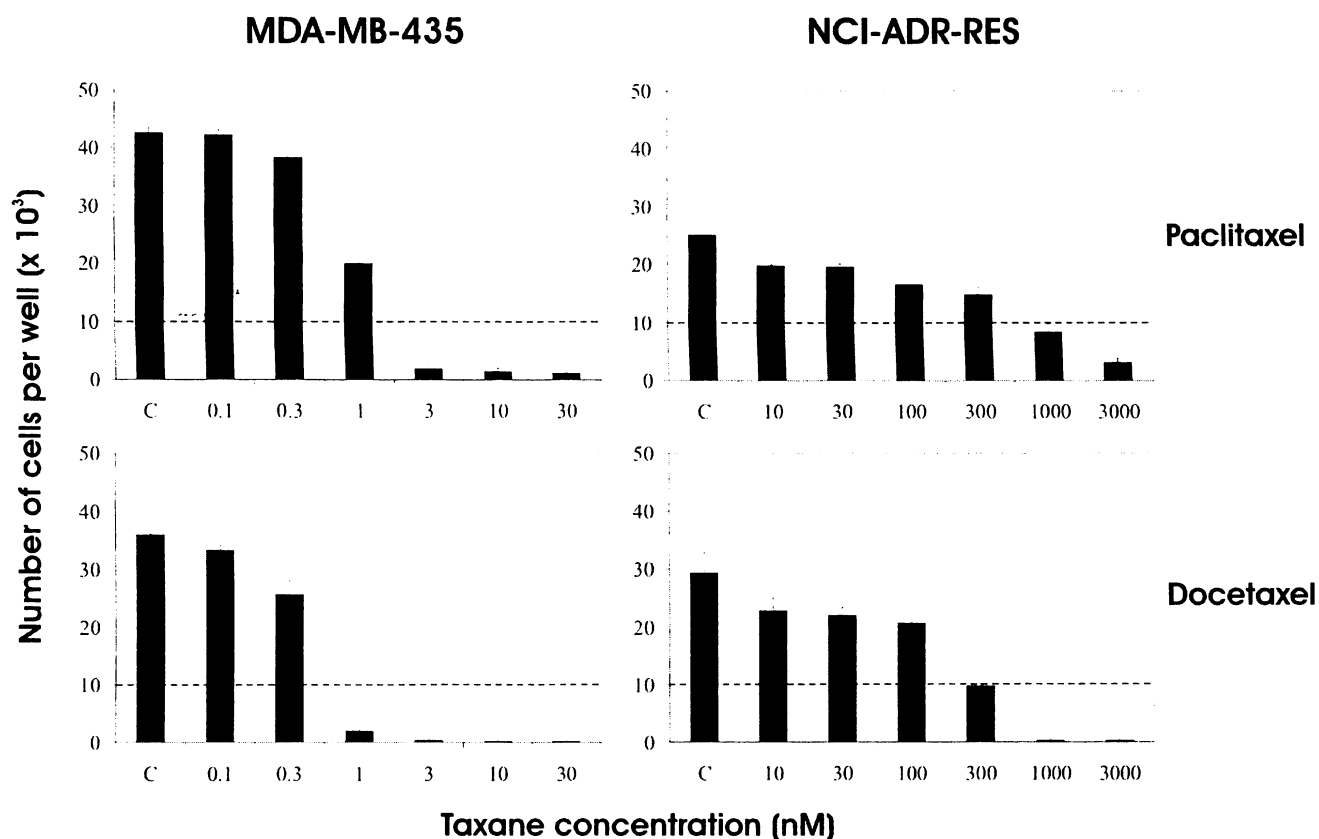


Figure 1. Effect of paclitaxel and docetaxel (0.1-3000 nM) on the growth and survival of MDA-MB-435 and NCI-ADR-RES cells. Control cells (C) were incubated without taxane. The cells were seeded at 10×10^3 cells/100 μ l of medium in the well. The number of cells of the inoculum is shown as a dotted line. The number of living cells was determined (see "Materials and Methods") after 96 h of incubation. Each column represents the mean of 8 separate cultures \pm SEM.

the accumulation or block of cells in the G₂/M-phase. However, in the case of resistant NCI-ADR-RES cells even after 96 h of incubation with the taxanes at the effective concentrations, when nearly all cells were dead (see Figure 1), a significant number of cells was still detected with regular cell cycle DNA content. Similar data were obtained with effective concentrations (10 nM, 1000 nM) of docetaxel (data not shown).

Particles with hypodiploid DNA content, detected by flow cytometric analysis, did not form a typical apoptotic peak of cells with hypodiploid DNA content. Therefore, in order to characterize the cell death induced by the taxanes, we employed DNA fragmentation analysis. DNA fragmentation analysis by agarose gel electrophoresis showed that both sensitive MDA-MB-435 and resistant NCI-ADR-RES cells, after 96 h of incubation with the effective concentrations of paclitaxel or docetaxel, did not produce any DNA fragmentation (ladder) typical of regular apoptosis (Figure 3).

Effect of taxanes on p53 and p21^{WAF1/CIP1} expression. Changes in the expression of p53 in relation to the cell death induced by the taxanes in the sensitive MDA-MB-435 cells and resistant NCI-ADR-RES cells were assessed. The activation of p53 was also assessed by the induction of p21^{WAF1/CIP1} expression. However, indirect immunofluorescence analysis showed that 24-h incubation with the effective concentrations of paclitaxel or docetaxel did not significantly change either the p53 level or that of p21^{WAF1/CIP1} in the sensitive as well as in the resistant cells (data not shown).

Effect of taxanes on caspase-3 and caspase-9 activities. In order to further characterize the cell death induced by the taxanes in sensitive and resistant cells, the activation of the key executioner caspase-3 and the activation of upstream caspase-9 were tested. The employed colorimetric assay showed that the basal activity of caspase-3 in the sensitive MDA-MB-435 cells and resistant NCI-ADR-RES cells was similar. After 24 h of incubation with the effective

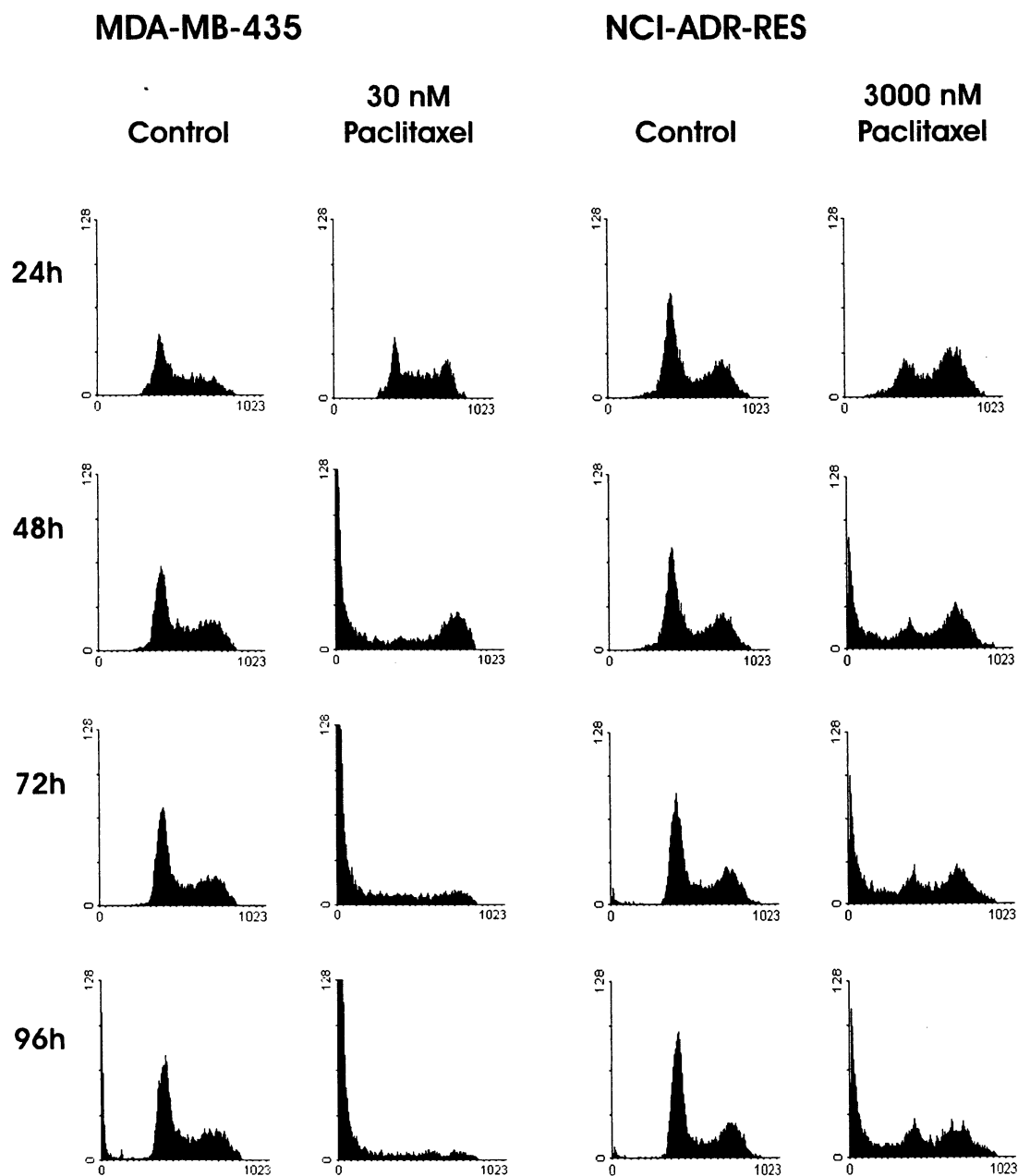


Figure 2. Effect of effective concentrations of paclitaxel (30 nM and 3000 nM) on the DNA histogram of sensitive MDA-MB-435 and resistant NCI-ADR-RES cells. Control cells were incubated without taxane. After the incubation period (24, 48, 72, 96 h), the cells were stained with propidium iodide (see "Materials and Methods") and analyzed by flow cytometry.

concentrations of paclitaxel or docetaxel, the activity of caspase-3 in both sensitive and resistant cells increased significantly (approximately 2 to 2.5-fold). The effective concentrations of paclitaxel (30 nM) and docetaxel (10 nM) for the sensitive MDA-MB-435 cells did not produce any increase of caspase-3 activity in the resistant NCI-ADR-RES cells (Figure 4).

The employed colorimetric assay showed that the basal activity of caspase-9 in sensitive and resistant cells was also similar. The activity of caspase-9 in the sensitive MDA-MB-435 cells increased significantly (approximately 3 to 3.5-fold) after 24-h incubation with the effective concentrations of paclitaxel or docetaxel. In the resistant NCI-ADR-RES cells, a significant increase in caspase-9 activity

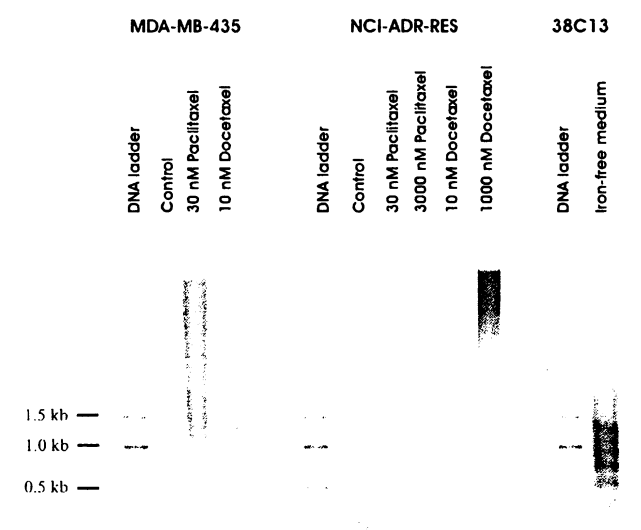


Figure 3. Effect of paclitaxel and docetaxel at effective concentrations on DNA fragmentation in sensitive MDA-MB-435 and resistant NCI-ADR-RES cells. Control cells were incubated without taxane. DNA fragmentation was determined (see "Materials and Methods") after 96 h of incubation. Control DNA ladder and typical apoptotic DNA fragmentation in 38C13 cells (induced by iron deprivation) are shown.

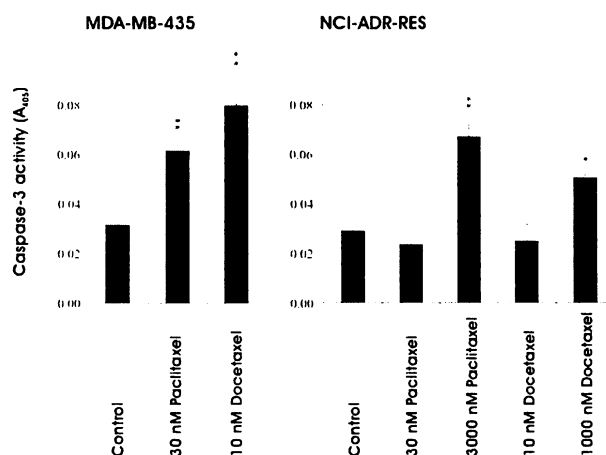


Figure 4. Effect of paclitaxel and docetaxel at effective concentrations on caspase-3 activity in sensitive MDA-MB-435 and resistant NCI-ADR-RES cells. Control cells were incubated without taxane. After 24 h of incubation, the activity of caspase-3 was measured as the absorbance of the cleaved product of a caspase-3 chromogenic substrate at 405 nm, employing a commercial colorimetric kit (see "Materials and Methods"). Each column represents the mean of 2 experimental values \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with control values.

(approximately 2 to 2.5-fold) was also detected. It seemed that the increase in caspase-9 activity was less pronounced in the resistant than in the sensitive cells (Figure 5), as in the case of caspase-3 activity (Figure 4).

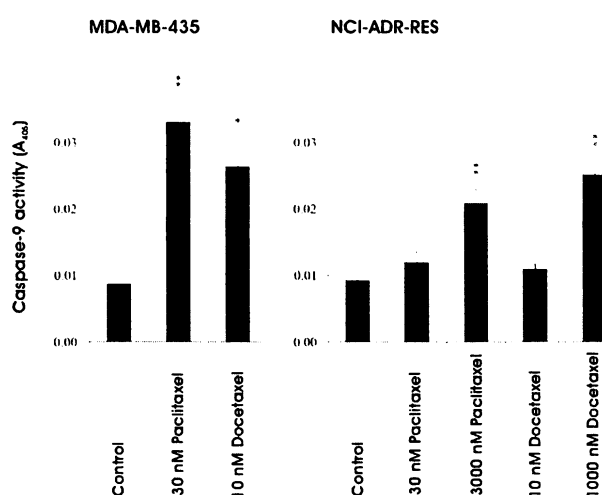


Figure 5. Effect of paclitaxel and docetaxel at effective concentrations on caspase-9 activity in sensitive MDA-MB-435 and resistant NCI-ADR-RES cells. Control cells were incubated without taxane. After 24 h of incubation, the activity of caspase-9 was measured as the absorbance of the cleaved product of a caspase-9 chromogenic substrate at 405 nm, employing a commercial colorimetric kit (see "Materials and Methods"). Each column represents the mean of 3 experimental values \pm SEM. * $p < 0.5$, ** $p < 0.01$ compared with control values.

Effect of taxanes on cytochrome c release. In order to complete the information on caspase-3 and caspase-9 activation during the cell death induced by taxanes in the sensitive MDA-MB-435 cells and resistant NCI-ADR-RES cells, the cellular distribution of cytochrome c was assessed. Confocal microscopy, after indirect immunofluorescence staining, showed (Figure 6) that cytochrome c was, under the control conditions, *i.e.* incubation without taxane, localized in the mitochondria in both sensitive and resistant cells. After 24 h of incubation with the effective concentrations of paclitaxel, cytochrome c was found to be released from the mitochondria into the cytosol in the resistant NCI-ADR-RES cells but, surprisingly, was not found to be released in the sensitive MDA-MB-435 cells. The effective concentration of paclitaxel (30 nM) for the sensitive MDA-MB-435 cells did not lead to cytochrome c release in the resistant NCI-ADR-RES cells. Similar data were obtained with effective concentrations of docetaxel (data not shown). These data were confirmed by Western blot analysis after cell fractionation (Figure 7). Cytochrome c was detected solely in the mitochondrial fraction in sensitive as well as in resistant cells under the control conditions. In the resistant NCI-ADR-RES cells incubated 24 h with the effective concentrations of paclitaxel or docetaxel, cytochrome c was also detected in the cytosolic fraction, while in the sensitive MDA-MB-435 cells incubated with the effective concentrations of paclitaxel or docetaxel, cytochrome c stayed in the mitochondria.

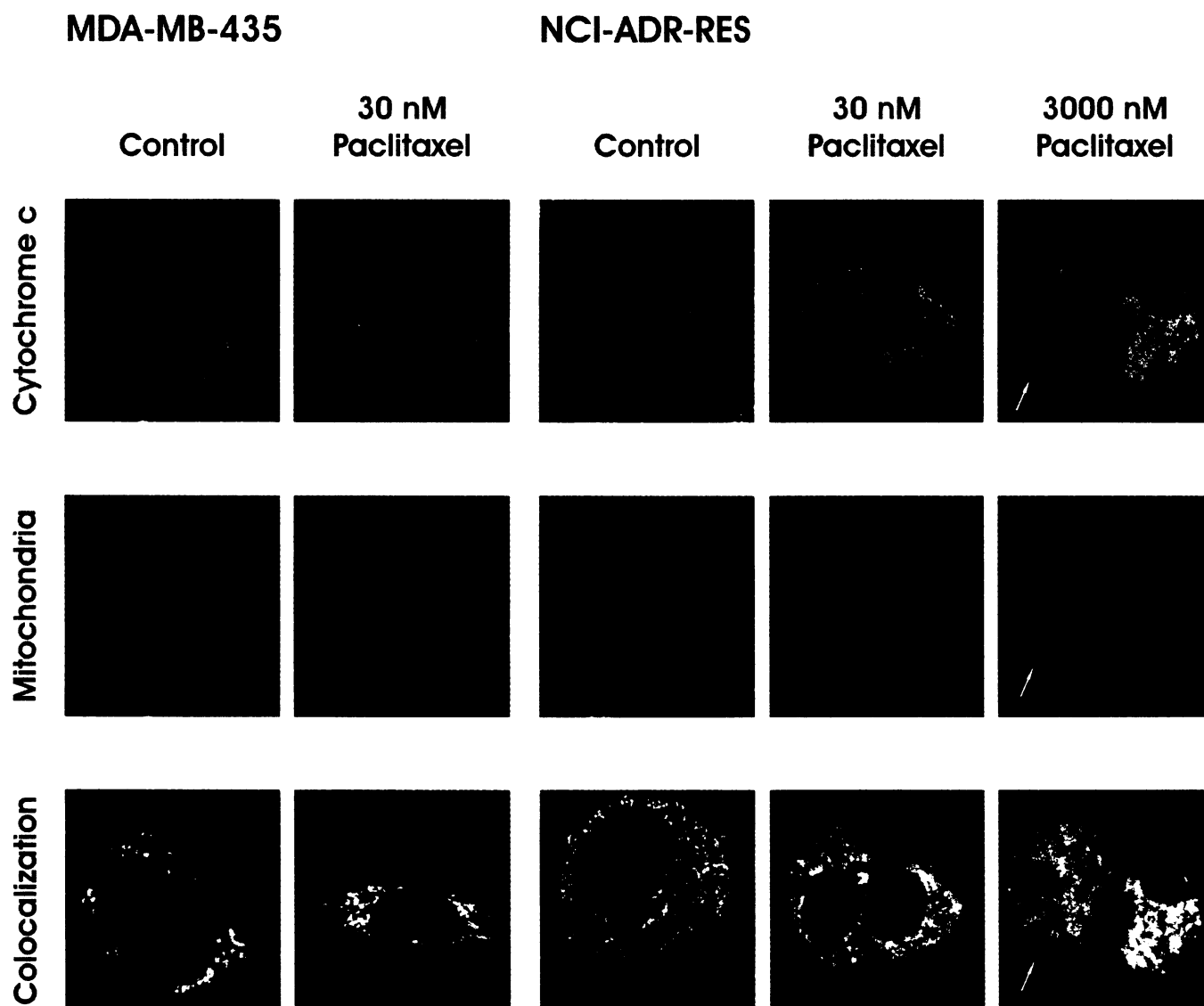


Figure 6. Effect of paclitaxel at effective concentrations on cellular distribution of cytochrome *c* in sensitive MDA-MB-435 and resistant NCI-ADR-RES cells. Control cells were incubated without taxane. After 24 h of incubation, the localization of cytochrome *c* and the position of mitochondria were detected by confocal microscopy, following staining with MitoTracker Red (mitochondria) and indirect immunofluorescence staining (cytochrome *c*) with monoclonal antibody 6H2 B4 against human cytochrome *c* (see "Materials and Methods"). The localization of cytochrome *c* (green), of mitochondria (red) and the co-localization of cytochrome *c* and mitochondria within the cell are shown. The presented cell with released cytochrome *c* is indicated by an arrow. The data shown were obtained in 1 representative experiment of 2 independent experiments.

Discussion

In order to contribute to our better understanding of the mechanisms involved in the cell death induced by taxanes in breast cancer cells, and particularly to contribute to our understanding of the mechanisms responsible for the resistance of breast cancer cells to taxanes, we studied cell death induced by the taxanes paclitaxel and docetaxel in the human breast cancer cell lines MDA-MB-435 and NCI-ADR-RES. MDA-MB-435 cells are highly sensitive, while NCI-ADR-RES cells are highly resistant to death induction by the taxanes.

The dose-response effect of paclitaxel and docetaxel showed that approximately 300 times higher concentrations of the taxanes are required to induce death in the resistant NCI-ADR-RES cells than in the sensitive MDA-MB-435 cells (see Figure 1). Thus, highly sensitive MDA-MB-435 cells and highly resistant NCI-ADR-RES cells represent a good model for studies concerning the mechanisms of cell death induction by the taxanes, as well as the mechanisms of resistance to death induction by the taxanes. As employed effective concentrations, *i.e.* the lowest concentrations with full death-inducing effect, we here selected 30 nM paclitaxel

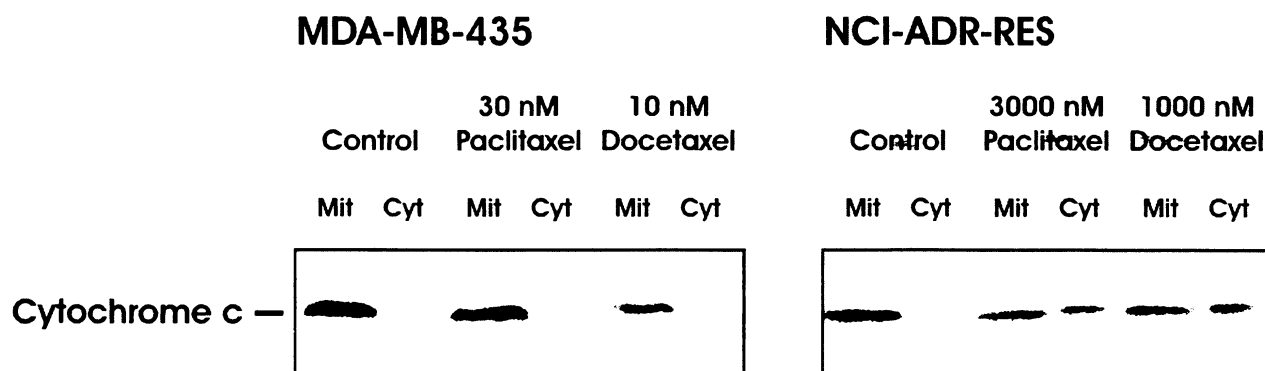


Figure 7. Effect of paclitaxel and docetaxel at effective concentrations on cytochrome c release from mitochondria in sensitive MDA-MB-435 and resistant NCI-ADR-RES cells. Control cells were incubated without taxane. After 24 h of incubation, the level of cytochrome c was determined by Western blot analysis, employing the specific monoclonal antibody 7H8.2C12 against human cytochrome c, (see "Material and Methods") in mitochondrial (Mit) and cytosolic (Cyt) fractions. The data shown were obtained in 1 representative experiment of 2 independent experiments.

and 10 nM docetaxel for the sensitive MDA-MB-435 cells and 3000 nM paclitaxel and 1000 nM docetaxel for the resistant NCI-ADR-RES cells (see Figure 1).

Docetaxel was found to be more effective than paclitaxel in both sensitive and resistant cells. Approximately 3 times higher concentrations of paclitaxel were required to induce death (see Figure 1). This finding is in agreement with some clinical experiences (33). However, the difference found under *in vitro* conditions does not necessarily reflect the situation under *in vivo* conditions, because other factors are involved under *in vivo* conditions. On the other hand, on the basis of our data, it seems highly probable that the mechanisms of death induction in breast cancer cells by paclitaxel and docetaxel are the same or very similar.

The key executioner caspase-3 and upstream caspase-9 are activated in both sensitive MDA-MB-435 and resistant NCI-ADR-RES cells when death is induced by the taxanes (see Figures 4 and 5). This fact strongly supports the suggestion that apoptotic death is involved. However, flow cytometric analysis after propidium iodide staining, as well as DNA fragmentation analysis by agarose gel electrophoresis, did not show typical apoptotic oligonucleosomal fragmentation of the DNA (see Figure 2 and 3). Therefore, the cell death induced by the taxanes in sensitive as well as in resistant breast cancer cells has rather the characteristics of an apoptosis-like death. Our finding, that the accumulation of cells in the G₂/M-phase of the cell cycle precedes the appearance of dead cells, supports the suggestion that the mitotic arrest (9) resulting from taxane application could be involved in the initial stages of death induction in breast cancer cells by these drugs.

Our data, concerning the expression of p53 and p53-regulated p21^{WAF1/CIP1}, strongly support the suggestion of other reports (13, 16, 17) that p53 is not involved in taxane-induced cell death. Concerning the mechanisms of the cell

death induced by the taxanes in the breast cancer cells, one can consider the involvement of the apoptotic mitochondrial pathway when taking into account the activation of caspase-9 and caspase-3 in sensitive MDA-MB-435 cells, as well as in resistant NCI-ADR-RES cells (see Figure 4, Figure 5). The activation of caspase-9 by paclitaxel was detected by Kottke *et al.* (20) and Razandi *et al.* (22) in several breast cancer cell lines. Similarly, the activation of caspase-3 by paclitaxel and paclitaxel analogs was detected by several groups (20, 21, 23) in several breast cancer cell lines, including the studied NCI-ADR-RES cells (25). On the other hand, Ofir *et al.* (34) demonstrated that cell death induced by paclitaxel in MCF-7 breast cancer cells is caspase-9- and caspase-3-independent.

Taking into account the data concerning the activation of caspase-9 and caspase-3, one could suppose that the mechanisms of death induction by the taxanes in the sensitive MDA-MB-435 and resistant NCI-ADR-RES cells are similar. In this case, the resistance of NCI-ADR-RES cells is not related to the cellular mechanism of death induction, and it therefore seems probable that the resistance is mainly based on the expression of the multidrug resistance (MDR) transporter P-glycoprotein representing an efflux pump (35-38).

The application of effective concentrations of both taxanes led to cytochrome c release from the mitochondria into the cytosol in resistant NCI-ADR-RES cells. It demonstrated that the apoptotic mitochondrial pathway of cell death induction, concerning cytochrome c release and subsequent caspase-9 and caspase-3 activation, is probably involved here. However, cytochrome c was not released when cell death was induced by effective concentrations of both the taxanes in the sensitive MDA-MB-435 cells. This really surprising finding was confirmed by two independent methods (confocal microscopy and Western blot analysis). Cytochrome c release

after paclitaxel treatment was demonstrated in several breast cancer cell lines (10, 20, 24). Audjit and Vuori (10) also mentioned cytochrome c release after paclitaxel treatment in MDA-MB-435 cells, however, relevant data were not shown in their paper. Our data concerning cytochrome c release strongly support the suggestion that the mechanisms involved in cell death induced by taxanes in the sensitive MDA-MB-435 cells and resistant NCI-ADR-RES cells differ. There is a possibility that the activation of caspase-9 is not decisive for the death induction by taxanes in the sensitive MDA-MB-435 cells and that the activation of caspase-9 just represents an accompanying effect.

Taken together, we conclude that the death induced by the taxanes paclitaxel and docetaxel in both studied breast cancer cell lines can be characterized as an apoptosis-like death including the activation of caspase-9 and caspase-3, but not oligonucleosomal DNA fragmentation. However, the mechanisms of death induction by the taxanes in the sensitive MDA-MB-435 cells and resistant NCI-ADR-RES cells differ. Cytochrome c is released from the mitochondria in the resistant NCI-ADR-RES cells but not in the sensitive MDA-MB-435 cells. The apoptotic mitochondrial pathway, involving cytochrome c release from the mitochondria and subsequent activation of caspase-9 and caspase-3, is considered in the case of the death induction in the resistant NCI-ADR-RES cells. The mechanism of the death induction in the sensitive MDA-MB-435 cells remains obscure. In order to answer the question, whether differing mechanisms of death induction by taxanes in breast cancer cells produce differing sensitivity/resistance of the cells to taxanes, further studies are required.

Acknowledgements

This work was supported by grant NL7567-3/2003 from the IGA, Ministry of Health of the Czech Republic. We thank Mrs. Simona Benešová for her excellent technical assistance.

References

- Geney R, Ungureanu M, Li D and Ojima I: Overcoming multidrug resistance in taxane chemotherapy. *Clin Chem Lab Med* 40: 918-925, 2002.
- Miller ML and Ojima I: Chemistry and chemical biology of taxane anticancer agents. *Chem Record* 7: 195-211, 2001.
- Vaishampayan U, Parchment RE, Jasti BR and Hussain M: Taxanes: an overview of the pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Urology* 54: 22-29, 1999.
- Choy H: Taxanes in combined modality therapy for solid tumors. *Crit Rev Oncol Hematol* 37: 237-247, 2001.
- Rowinsky EK: The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents. *Annu Rev Med* 48: 353-374, 1997.
- Spencer MC and Faulds D: Paclitaxel: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the treatment of cancer. *Drugs* 48: 795-845, 1994.
- Sackett D and Fojo T: Taxanes. *Cancer Chemother Biol Response Modif* 17: 59-79, 1997.
- Schiff PB, Fant J and Horwitz SB: Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. *Nature* 22: 665-667, 1979.
- Jordan MA, Ojima I, Rosas F, Distefano M, Wilson L, Scambia G and Ferlini C: Effects of novel taxanes SB-T-1213 and IDN5109 on tubulin polymerization and mitosis. *Chem Biol* 9: 93-101, 2002.
- Aoudjit F and Vuori K: Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* 20: 4995-5004, 2001.
- Fan W: Possible mechanisms of paclitaxel-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol* 57: 1215-1221, 1999.
- Wang T-H, Wang, H-S and Soong Y-K: Paclitaxel-induced cell death. *Cancer* 88: 2619-2628, 2000.
- Blagosklonny MV and Fojo T: Molecular effects of paclitaxel: myths and reality (a critical review). *Int J Cancer* 83: 151-156, 1999.
- Brichese L, Barboule N, Heliez C and Valette A: Bcl-2 phosphorylation and proteasome-dependent degradation induced by paclitaxel treatment: consequences on sensitivity of isolated mitochondria to Bid. *Exp Cell Res* 278: 101-111, 2002.
- Haldar S, Basu A and Croce CM: Bcl2 is the guardian of microtubule integrity. *Cancer Res* 57: 229-233, 1997.
- Das GC, Holiday D, Gallardo R and Haas C: Taxol-induced cell cycle arrest and apoptosis: dose-response relationship in lung cancer cells of different wild-type p53 status and under isogenic condition. *Cancer Lett* 165: 147-153, 2001.
- Wahl AF, Donaldson KL, Fairchild C, Lee FY, Foster SA, Demers GW and Galloway DA: Loss of normal p53 function confers sensitization to Taxol by increasing G2/M arrest and apoptosis. *Nat Med* 2: 72-79, 1996.
- André N, Carré M, Brasseur G, Pourroy B, Kovacic H, Briand C and Braguer D: Paclitaxel targets mitochondria upstream of caspase activation in intact human neuroblastoma cells. *FEBS Lett* 532: 256-260, 2002.
- Kolfschoten G, Hulscher TM, Duynham MCA, Pinedo HM and Boven E: Variation in the kinetics of caspase-3 activation, Bcl-2 phosphorylation and apoptotic morphology in unselected human ovarian cancer cell lines as a response to docetaxel. *Biochem Pharmacol* 63: 733-743, 2002.
- Kottke TJ, Blajeski AL, Martins LM, Mesner PW Jr, Davidson NE, Earnshaw WC, Armstrong DK and Kaufmann SH: Comparison of paclitaxel-, 5-fluoro-2'-deoxyuridine-, and epidermal growth factor (EGF)- induced apoptosis. Evidence for EGF-induced anokis. *J Biol Chem* 274: 15927-15936, 1999.
- Fowler CA, Perks CM, Newcomb PV, Savage PB, Farndon JR and Holly JM: Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) potentiates paclitaxel-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Int J Cancer* 88: 448-453, 2000.
- Razandi M, Pedram A and Levin ER: Plasma membrane estrogen receptors signal to antiapoptosis in breast cancer. *Mol Endocrinol* 14: 1434-1447, 2000.
- Friedrich K, Wieder T, Von Haefen C, Radetzki S, Janicke R, Schulze-Osthoff K, Dorken B and Daniel PT: Overexpression of caspase-3 restores sensitivity for drug-induced apoptosis in breast cancer cell lines with acquired drug resistance. *Oncogene* 20: 2749-2760, 2001.

- 24 Kottke TJ, Blajeski AL, Meng XW, Svingen PA, Ruchaud S, Mesner PW Jr, Boerner SA, Samejima K, Henriquez NV, Chilcote TJ, Lord J, Salmon M, Earnshaw WC and Kaufmann SH: Lack of correlation between caspase activation and caspase activity assays in paclitaxel-treated MCF-7 breast cancer cells. *J Biol Chem* 277: 804-815, 2002.
- 25 Yang LX, Zhu J, Wang HJ and Holton RA: Enhanced apoptotic effects of novel paclitaxel analogs on NCI/ADR-RES breast cancer cells. *Anticancer Res* 23: 3295-3301, 2003.
- 26 Musílková J and Kovář J: Additive stimulatory effect of extracellular calcium and potassium on non-transferrin ferric iron uptake by HeLa and K562 cells. *Biochim Biophys Acta* 1514: 117-126, 2001.
- 27 Kovář J, Valenta T and Šrýbřová H: Differing sensitivity of tumor cells to apoptosis induced by iron deprivation *in vitro*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 37: 450-458, 2001.
- 28 Truksa J, Kovář J, Valenta T, Ehrlichová M, Polák J and Naumann PW: Iron deprivation induces apoptosis independently of p53 in human and murine tumour cells. *Cell Prolif* 36: 199-213, 2003.
- 29 Koc M, Nad'ová Z, Truksa J, Ehrlichová M and Kovář J: Iron deprivation induces apoptosis *via* mitochondrial changes related to Bax translocation. *Apoptosis* 10: 381-393, 2005.
- 30 Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ and Klenk DC: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85, 1985.
- 31 Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
- 32 Kyhse-Andersen J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins. *J Biochem Biophys Methods* 10: 203-209, 1984.
- 33 Witters LM, Santala SM, Engle L, Chinchilli V and Lipton A: Decreased response to paclitaxel *versus* docetaxel in HER-2/neu transfected human breast cancer cells. *Am J Clin Oncol* 26: 50-54, 2003.
- 34 Ofir R, Seidman R, Rabinski T, Krup M, Yavelky V, Weinstein Y and Wolfson M: Taxol-induced apoptosis in human SKOV3 ovarian and MCF7 breast carcinoma cells is caspase-3 and caspase-9 independent. *Cell Death Differ* 9: 636-42, 2002.
- 35 Chevillard S, Pouillard P, Beldjord C, Asselain B, Beuzebec P, Magdeland H and Vielh P: Sequential assessment of multidrug resistance phenotype and measurement of S-phase fraction as predictive markers of breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy. *Cancer* 77: 292-300, 1996.
- 36 Horwitz SB, Cohen D, Rao S, Ringel I, Shen HJ and Yang CP: Taxol: mechanisms of action and resistance. *J Natl Cancer Inst Monogr*, pp. 55-61, 1993.
- 37 Mechetner E, Kyshtoobayeva A, Zonin S, Kim H, Stroup R, Garcia R, Parker RJ and Fruehauf JP: Levels of multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein expression by human breast cancer correlate with *in vitro* resistance to taxol and doxorubicin. *Clin Cancer Res* 4: 389-398, 1998.
- 38 Yang JM, Xu Z, Wu H, Zhu H, Wu X and Hait WN: Overexpression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in multidrug resistant cancer cells. *Mol Cancer Res* 1: 420-427, 2003.

Received May 23, 2005
Accepted August 30, 2005