

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Tereza Urbanová

**Příprava a metabolismus nanotransportérových forem inhibitorů
tyrosinkinas**

Preparation and metabolism of tyrosine kinase inhibitors
in nanotransporters

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Radek Indra, PhD.

Praha 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Abstrakt

Nádorová onemocnění jsou v současné době druhou nevýznamnější civilizační chorobou, není tedy divu, že v posledních desetiletích je jejich výzkum prioritou řady laboratoří. Problémem klasické léčby onkologických chorob, jejíž původ se datuje do počátku 40. let minulého století, je její nescificnost k nádorovým buňkám a s tím spojena celá řada vedlejších účinků. V posledních letech se objevil nový přístup k léčbě této závažné choroby, využívající nejrůznější nanotransportéry (liposomy, proteiny, ale i anorganické uhlíkové nanotrubic), které mohou cytostatika enkapsulovat a cíleně uvolnit až v okolí nádoru, to by mělo vést k minimalizaci vedlejších účinků.

V této diplomové práci byla studována enkapsulace tří cytostatik (lenvatinibu, adavosertibu a sunitinibu) do apoferritinu. Dále v této diplomové práci byl studován vliv kavity apoferritinu na biotransformaci enkapsulovaného sunitinibu; biotransformace volného i vázaného sunitinibu pomocí biotransformačních enzymů vázaných v liposomech a v neposlední řadě také kinetika uvolňování sunitinibu z apoferritinové centrální dutiny.

Bylo zjištěno, že lenvatinib není vhodným cytostatikem pro enkapsulaci do centrální dutiny apoferritinu kvůli své nízké rozpustnosti a zápornému náboji při bazickém pH. Adavosertib a sunitinib se jeví jako vhodnější alternativy pro cílenou protinádorovou léčbu pomocí vkládání do tohoto nanotransportéru. Zároveň bylo zjištěno, že kavita apoferritinu nebrání metabolisování sunitinibu jak pomocí mikrosomálních frakcí, tak i cytochromů P450 rodiny 1A1 enkapsulovaných v liposomech. V neposlední řadě pokusy provedené v této diplomové práci ukazují, že uvolňování sunitinibu z apoferritinu je rychlejší v prostředí o pH 6,5 oproti fyziologickému pH 7,4.

Klíčová slova

nanomedicína, nanotransportéry, apoferritin, liposomy, lenvatinib, adavosertib, sunitinib, biotransformace

Abstract

Cancer is currently one of the major diseases of civilization, so it is no wonder that in recent decades its research has been a priority for many laboratories. The problem of conventional treatment of oncological diseases, which dates to the beginning of the 1940s, is that it is non-specific to tumor cells and with that is connected a number of side effects. In recent years a new approach to the treatment of this serious disease has emerged that uses various nanotransporters (liposomes, proteins, but also inorganic carbon nanotubes), which can encapsulate cytostatics and release it in a targeted manner around the tumor, thus minimizing the side effects.

In this diploma thesis the encapsulation of three cytostatics (lenvatinib, adavosertib and sunitinib) into apoferritin was studied. Furthermore, the effect of the cavity of apoferritin on the biotransformation of encapsulated sunitinib; free and bound sunitinib biotransformation by liposome – bound biotransformation enzymes and last but not least, the release kinetics of sunitinib from the apoferritin central cavity were analysed.

Lenvatinib has not been shown to be a suitable cytostatic for encapsulation into the central cavity of apoferritin due to its low solubility and negative charge at basic pH. Adavosertib and sunitinib appear to be more suitable alternatives for targeted antitumor therapy by insertion into this nanotransporter. At the same time, the apoferritin cavity was found not to inhibit the metabolism of sunitinib by both microsomal fractions and cytochromes P450 family 1A1 encapsulated in liposomes. Finally, the experiments performed in this diploma thesis show that the release of sunitinib from apoferritin is faster in the environment of pH 6.5 compared to physiological pH 7.4.

Key words

nanomedicine, nanotransporters, apoferritin, liposomes, lenvatinib, adavosertib, sunitinib, biotransformation

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala panu Mgr. Radku Indrovi, PhD. za pomoc při vedení a realizování experimentální části této diplomové práce v laboratoři, při zpracovávání výsledků a psaní této diplomové práce, za trpělivost, cenné rady a všecken investovaný čas. Také děkuji celému kolektivu laboratoře 221 za příjemné pracovní prostředí. V neposlední řadě děkuji svým blízkým za podporu, kterou mi v průběhu psaní této diplomové práce poskytovali.

Práce byla vypracována za podpory grantu GAČR 17-12816S.

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Literární přehled	10
2.1 Onkologická onemocnění	10
2.2 Léčba nádorových chorob.....	12
2.3 Využití nanotransportérů v cílené protinádorové léčbě.....	13
2.3.1 Apoferritin	14
2.3.2 Liposomy	17
2.4 Metabolismus cytostatik	18
2.5 Tyrosinkinasové inhibitory	20
2.5.1 Lenvatinib	22
2.5.2 Adavosertib.....	23
2.5.3 Sunitinib.....	24
3. Cíl práce.....	26
4. Materiál a metody	27
4.1 Chemikálie	27
4.2 Přístroje.....	27
4.3 Metody	29
4.3.1 Lenvatinib	29
4.3.2 Adavosertib, sunitinib.....	32
5. Výsledky	39
5.1 ApoLenvatinib	39
5.1.1 Příprava nanočástic ApoLen.....	40
5.1.2 Kontrola přípravy ApoLen.....	43
5.1.3 Optimalizace přípravy ApoLen	45
5.1.4 Optimalizovaná příprava ApoLen	47
5.2 ApoSunitinib a ApoAdavosertib.....	50

5.2.1	Metabolismus Sun a ApoSun.....	53
5.2.2	Metabolismus Sun a ApoSun cytochromy enkapsulovanými v liposomálních nanočásticích	55
5.2.3	Kinetika uvolňování sunitinibu z apoferritinu	56
6.	Diskuze	57
7.	Závěr	60
	Seznam citované literatury.....	61

Seznam zkratek a symbolů

Ada	Adavosertib
Apo	Apoferritin
ApoAda	ApoAdavosertib, adavosertib enkapsulovaný do apoferritinu
ApoLen	ApoLenvatinib, lenvatinib enkapsulovaný do apoferritinu
ApoSun	ApoSunitinib, sunitinib enkapsulovaný do apoferritinu
CYP	Cytochromy P450
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (z <i>angl. deoxyribonucleic acid</i>)
EtOH	Ethanol
GS	Generující systém
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z <i>angl. high – performance liquid chromatography</i>)
LipCYP	Cytochromy P450 enkapsulované v liposomálních nanočásticích
MFO	Systém oxidas se smíšenou funkcí (z <i>angl. mixed function oxidase</i>)
Sun	Sunitinib

1. Úvod

Jelikož jsou nádorová onemocnění jednou z hlavních příčin předčasného úmrtí, je výzkum jejich léčby prioritou. Nevýhodou současných cytostatik je fakt, že cílí na nespecifické buněčné procesy, a tedy ovlivňují jak nádorové, tak i zdravé buňky, což je příčinou nezanedbatelných vedlejších účinků.

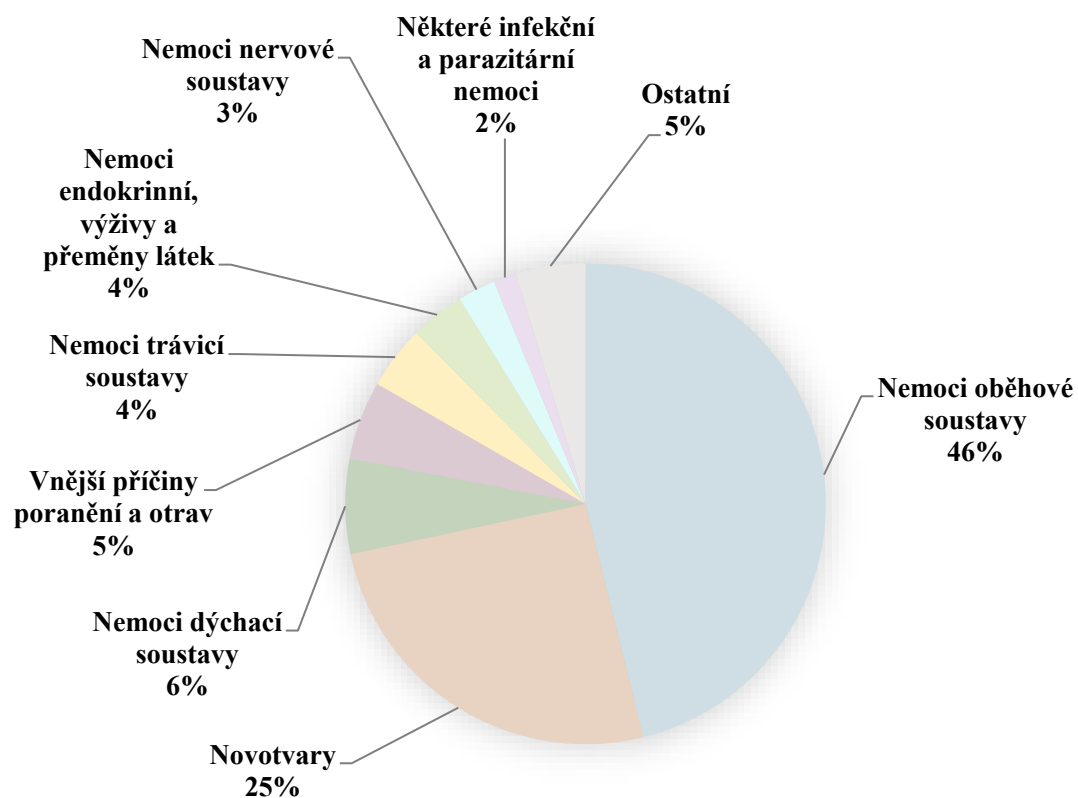
V posledních letech je studována možnost enkapsulace těchto cytostatik do nanočástic, které by specificky léčivo dopravily k nádorové tkáni a tam ho uvolnily. Tímto způsobem by došlo ke snížení negativních vedlejších účinků. Navázání cytostatik do nanočástic bylo tedy cílem i této práce.

2. Literární přehled

2.1 Onkologická onemocnění

V posledních několika desetiletích se nádorová onemocnění stala druhou nejvýznamnější civilizační chorobou hned po problémech souvisejících s kardiovaskulárním systémem. Na *Obr. 2.1* jsou znázorněny příčiny úmrtí v České republice v letech 2010–2019. Jak můžeme vidět, tak právě jedna čtvrtina úmrtí je důsledkem nádorového bujení.

Příčiny úmrtí v České republice v letech 2010 - 2019



Obr. 2.1: Příčiny úmrtí v České republice v letech 2010-2019. Graf byl vytvořen z dat zveřejněných Českým statistickým úřadem¹. Příčiny smrti jsou kategorizovány podle mezinárodní klasifikace nemocí a přidružených zdravotních problémů k datu 1.1.2020.

Proces, během kterého v organismu vznikne tkáň, která není jeho přirozenou součástí, se nazývá nádorové bujení. Tento patologický novotvar nikterak nepřispívá k zajištění životních funkcí organismu a vzniká z jedné, takzvané iniciační, buňky, ve které se objevila mutace protoonkogenů nebo tumor-supresorových genů. Mutované protoonkogeny se stávají onkogeny, které jsou zodpovědné za samotný vznik nádoru. Oproti tomu mutace v tumor-supresorových genech připraví buňku o schopnost spustit proces apoptózy, iniciovat opravu DNA nebo zastavit buněčný cyklus, a tak i schopnost

předejít vzniku nádorové tkáně. Iniciovaná buňka, a z ní vzniklý patologický klon, je díky častějšímu dělení, zvýšené odolnosti a vyšší migraci zvýhodněná oproti svému fyziologickému protějšku. Pokud dojde k mutaci mimo oblast protoonkogenů či tumor-supresorových genů (tato mutace se nazývá somatickou), tak si buňka sama spustí proces apoptózy, nebo imunitní systém ji shledá cizorodou a opět v ní spustí apoptotickou kaskádu. Tímto způsobem degenerované buňky jsou tedy oproti zdravým buňkám znevýhodněné. Přeměna buňky na buňku nádorovou je náhodný proces, ačkoli řada faktorů (genetická predispozice, expozice chemickým látkám interagujících s DNA, UV záření,...) zvyšuje celkový počet mutací genetické informace, a tak i pravděpodobnost vzniku iniciační buňky^{2,3}.

Po stádiu iniciace (vznik nádorové buňky) následuje promoce, tedy událost, kdy se iniciovaná buňka začíná dělit. Posledním stupněm vzniku nádoru je tzv. progres, při které dochází k růstu samotného novotvaru a hromadění dalších mutací. Zároveň dochází k tvorbě tzv. angiogenních faktorů, jako jsou specifické buněčné produkty a tkáňové hormony, díky kterým dochází k tvorbě nových cév a jejich prorůstání do nádorové tkáně, která díky tomu získá vlastní cévní zásobení².

Patologické novotvary rozdělujeme podle jejich invazivity na benigní – nezhoubné, nebo maligní – zhoubné. Nezhoubné nádory jsou oproti svým agresivnější protějškům zpravidla ohraničené a jejich růst je pomalejší. Naopak maligní nádory invazivně prorůstají do okolní tkáně, zakládají ložiska metastáz a jsou tedy jak smrtelnější, tak je jejich léčba problematičtější. Nově vzniklá ložiska se nemusí dlouhou dobu vůbec projevit a zároveň během jejich růstu vznikají v buňkách nové mutace, které odlišují jednotlivé metastázy od sebe navzájem – jsou heterogenní. Maligní nádory nepodléhají hormonální regulaci organismu, zpravidla se projevují kachexií (úbytek tělesné hmotnosti, nechutenství, slabost), dediferenciací buněk (produkce hormonů a proteinů, které daná tkáň fyziologicky neprodukuje), hyponatremií a tzv. Warburgovým efektem, který je důsledkem toho, že nádorová tkáň regeneruje kofaktory pomocí laktátové fermentace, a ne přes mitochondrie, které nevyužívá. To vede jednak ke snížení pH v okolí nádoru, jednak k velké spotřebě glukózy, která je pro nádorovou tkáň primárním zdrojem energie^{2,4}.

2.2 Léčba nádorových chorob

Ačkoliv variabilita léčby nádorů je veliká, tak bohužel není zárukou úspěchu. Léčbu zpravidla dělíme na fyzikální (radioterapie a chirurgický zákrok), chemickou a biologickou (zasahuje do molekulárních pochodů buňky). Konvenční chemická cytostatika působí na nescifické pochody buněk, jako je jejich proliferace nebo spuštění procesu apoptózy, čímž zasahují i zdravé buňky. Příkladem těchto léčiv jsou genotoxická cytostatika poškozující strukturu již existující DNA, antimetabolity podobající se přirozeným metabolitům replikačních enzymů a antimitotika, která inhibují průchod buňky buněčným cyklem⁵.

Jak bylo řečeno v předchozím odstavci, problém klasické protinádorové léčby spočívá v její neselektivnosti k nádorovým buňkám, a z toho pramenící celkové toxicitě a také ve vývoji rezistence na použitou léčbu⁶. Oproti tomu cílená terapie míří na geny nebo proteiny specifické pro nádorovou buňku či tkáň. Jejím cílem je efektivně uvolnit léčivo u nádoru, zatímco zdravá tkáň zůstane nezasazena. Cílená terapie používá cytostatika blokuující proliferaci buněk, spouštěcí apoptózu nebo autofagii⁷.

Využití monoklonálních protilátek v cílené protinádorové léčbě je známo od poloviny sedmdesátých let minulého století. Jedním z příkladů monoklonálních protilátek určených pro léčbu onkologických chorob je gemtuzumab, který cílí na specifické CD33 antigeny, které se nacházejí u pacientů s diagnózou akutní myeloidní leukémie⁸. Dále se mohou monoklonální protilátky využívat jako prostředek pro cílení již aktivního léčiva⁹ nebo enzymů potřebných pro aktivaci proléčiva¹⁰. Jelikož se jedná o objemné komplexy, jejich podávání je hlavně intravenózní¹¹.

Dalším typem cílené léčby je terapie pomocí proléčiv, kdy proléčivo je pomocí specifických enzymů (dodány ve formě genu, již funkčního proteinu, či jsou již přirozeně exprimovány nádorovou tkání) aktivováno až přímo v nádorové tkáni, čímž dojde k výraznému snížení toxicity pro okolní zdravou tkáň. Toho může být dosaženo dvěma způsoby: prvním je již zmíněné cílení enzymů pomocí monoklonálních protilátek, dále také jejich doručení ve formě genů (například pomocí virových částic retrovirů nebo adenovirů)⁶. Prvním krokem je tedy dodání netoxického proléčiva, a případně enzymu, do blízkosti nádoru, druhým je samotná aktivace cytostatika na jeho účinnou podobu¹². Tento typ léčby ale vyžaduje, aby jak enzym, tak proléčivo splňovalo následující kritéria. Enzym by neměl být exprimován v lidském organismu, nebo by jeho exprese ve zdravé tkáni měla být nulová či velmi nízká, zato vysoká v nádorové tkáni^{13,14}.

Dále by pro léčivo nemělo být aktivováno enzymy přítomnými ve zdravé tkáni, ale zároveň by mělo být vhodným substrátem pro metabolické enzymy v nádoru. Žádoucí je rovněž schopnost léčiva difundovat, jeho cytotoxicita po aktivaci a také jeho poločas by měl být dostatečně dlouhý, aby pro léčivo stihlo vstoupit do nádorové tkáně, ale ne zase tak dlouhý, aby se dostalo do systémové cirkulace¹⁵.

2.3 Využití nanotransportérů v cílené protinádorové léčbě

Konvenční aplikování léčiv je charakterizováno limitovanou efektivitou, špatnou distribucí a nedostatkem selektivity, čemuž se dá předejít právě jejich kontrolovaným doručováním do nádorové tkáně. Vedlejší negativní efekt na zdravé tkáně se tak minimalizuje a zároveň kontrolované doručování pomocí transportérů chrání léčivo před rychlou degradací či vylučováním a zvyšuje jeho koncentraci v cílené tkáni¹⁶. Nanočástice díky své velikosti několika stovek nanometrů jsou schopné překonávat tkáňové bariéry a stávají se tak ideálními kandidáty pro cílenou léčbu¹⁷.

Léčivo je na povrch nanočástice navázáno kovalentní vazbou, jejíž výhodou je možnost kontrolovat počet jeho navázaných molekul, nebo je do ní enkapsulováno. Používané nanočástice musí být biokompatibilní, nesmí tedy vyvolávat imunitní odpověď organismu a musí být netoxické. Nežádoucí vedlejší efekty jsou závislé na velikosti, tvaru, množství, chemické struktuře povrchu a době setrvání v krevním řečišti. Obecně platí, že menší nanočástice mají větší povrch, jsou tedy reaktivnější a v konečném důsledku toxičtější^{17,18}.

Cílení nanočástic může být buď pasivní, kdy dochází k uvolnění léčiva na základě fyzikálního stimulu (pH, teplota, magnetické pole, ...), nebo aktivní, při kterém se využívá specifických ligandů na povrchu buněk v cílené tkáni¹⁶.

Nanočástice dělíme podle jejich původu do tří skupin – anorganické, organické a virové¹⁹. Příkladem anorganických transportérů jsou zlaté nanočástice mající schopnost vázat organické molekuly, přičemž jsou snadno detekovatelné díky svým optickým vlastnostem²⁰. Druhým typem využívaných anorganických transportérů jsou magnetické nanočástice hlavně z oxidů železa, které pomocí vnějšího magnetického pole můžeme zacílit na nádorové ložisko, avšak jejich použití je kvůli nevelké biokompatibilitě omezeno^{17,20,21}. V neposlední řadě se využívají nekovové nanočástice na bázi oxidu křemičitého či uhlíkové nanotrubičky a fullerény. Výhodou těchto uhlíkových nosičů je

možnost vázat na jejich povrch cytostatikum či kontrastní látku a také jejich nízká toxicita^{19,20,22,23}.

Virové nanočástice tvořené až tisíci molekulami proteinu mají velkou výhodu v možnosti jejich „naprogramování“ tak, že se samy sestavují a tvoří dutou kostru o přesné velikosti a tvaru, jejíž povrch je možno kovalentně modifikovat. Jelikož virové částice (například virus tabákové mozaiky) neprokazují velkou toxicitu, jsou ideálním kandidátem pro cílený transport cytostatik^{19,24}.

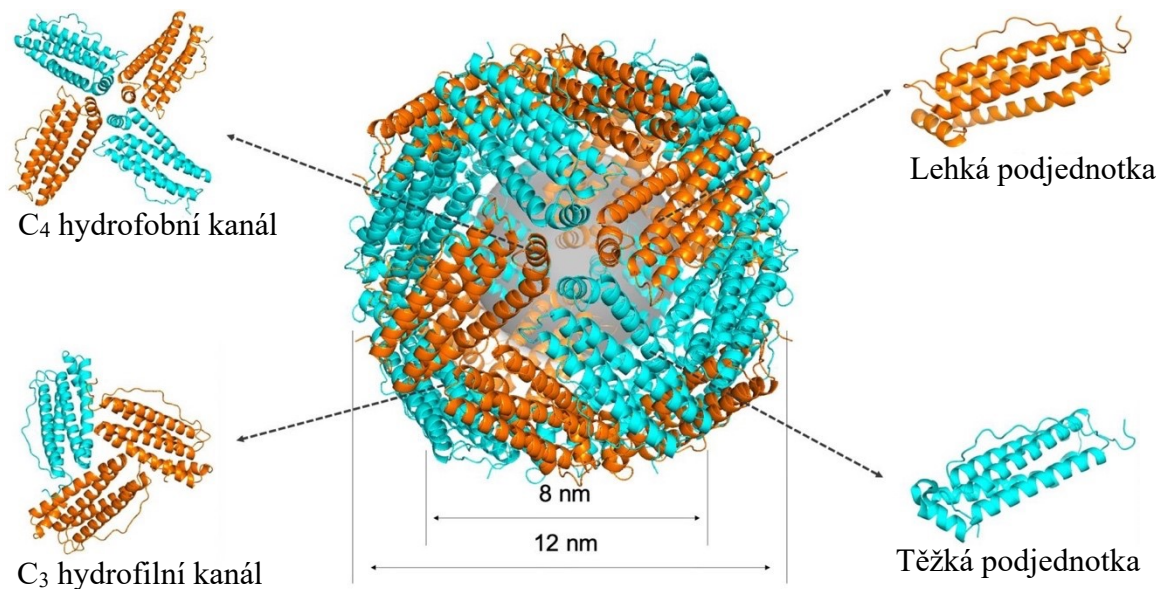
Mezi nejpoužívanější organické nanotransportéry patří hlavně liposomy, kterým je věnována samostatná kapitola 2.3.2 *Liposomy (str. 17)*²⁵. Dalšími nosiči na bázi lipidů jsou micely tvořené jednou vrstvou fosfolipidů (tedy jsou ideální pro enkapsulaci hydrofobních léčiv), nebo lipidové nanokapsule, které podporují aktivitu řady hydrofobních cytostatik²⁰. Mezi organické nanotransportéry patří také polymerní nosiče, jako jsou nanogely, dendrimery a polymerosomy, které jsou považovány poslední dobou za univerzální transportér^{20,26}. Díky své struktuře amfifilních polymerů ve dvouvrstvě obklopujících vodní prostředí mohou totiž transportovat jako hydrofilní, tak hydrofobní léčiva²⁷. V neposlední řadě do skupiny organických nanotransportérů patří proteiny, které svou biokompatibilitou a možností modifikace jsou slibnou alternativou k výše uvedeným transportérům. Mezi používané proteiny patří například elastin, albumin, mléčný protein, želatiny a apoferritin, kterému je věnována následující kapitola 2.3.1 *Apoferritin*^{28,29}.

2.3.1 Apoferritin

Ferritiny, proteiny o molekulové hmotnosti 480 kDa, jsou v organismu hlavní zásobárnou železa³⁰. Ač existuje více druhů ferritinů, tak je jejich odlišnost jen malá, a to i napříč různými organismy³¹. Jejich hlavním cílem je zabránit akumulaci železa v organismu v jeho volné podobě³². Atomy železa jsou uskladněné v centrální dutině s vnějším průměrem 12 nm a vnitřním průměrem 8 nm ve formě $5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, přičemž do jedné molekuly ferritinu se tímto způsobem vejde až 4500 atomů železitých iontů^{33–35}.

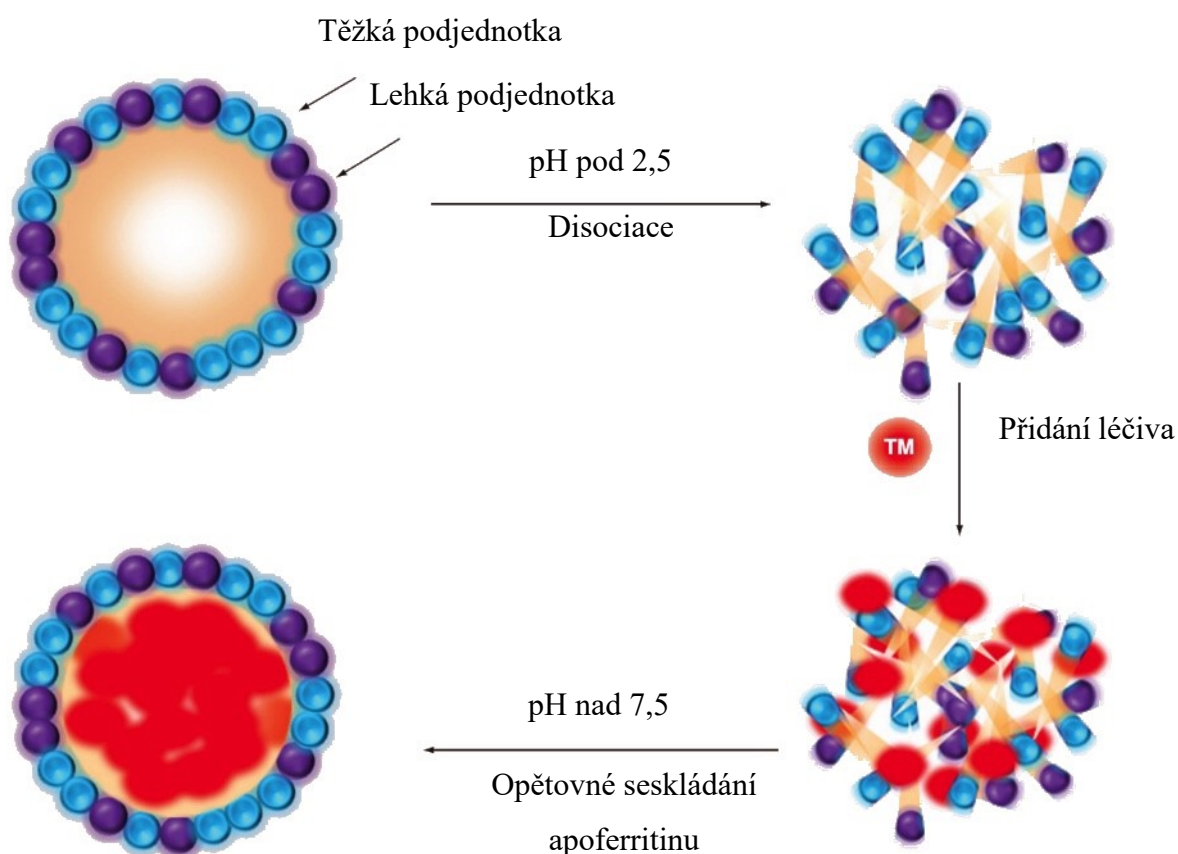
Apoferritin (dále jen *Apo*) je bílkovinnou částí ferritinu, která obklopuje anorganické jádro. Struktura apoferritinové klece obklopující záporně nabitou centrální dutinu je pozoruhodně robustní a stabilní^{36,37}. Apoferritin je stabilní v nejrůznějších denaturačních činidlech, v pH od 2,00 – 10,00 a zvládá teploty až do 70 °C, a to díky vysokému počtu vodíkových vazeb a solných můstků mezi jeho podjednotkami.

Apoferritiny jsou tvořeny 24 podjednotkami, které formují oktaedrický symetrický komplex složený ze čtyř svazků paralelních a antiparalelních α -helixů (A, B, C a D) s pátým C-terminálním helixem E^{38,39}. Podjednotky jsou dvojího typu, lehké a těžké, a vzájemně se svými funkcemi v procesu příjmu železa doplňují. Úkolem těžkých podjednotek je oxidovat železnaté ionty na ionty železité pomocí O₂ ve ferroxidasovém místě za současného vzniku H₂O₂. Lehké podjednotky tuto oxidasovou aktivitu postrádají, ale jsou vybaveny glutamátovými zbytky na vnitřním povrchu svého proteinového obalu, které usnadňují mineralizaci a oxidaci železnatých iontů v těžkých podjednotkách. Ferritiny obsahující více těžkých podjednotek mají více atomů železa ve své centrální dutině než ferritiny s nadbytkem lehkých podjednotek. Železo vstupuje do nitra ferritinu pomocí osmi hydrofilních kanálů (C₃ kanály – tvořeny třemi podjednotkami), které procházejí jeho proteinovým obalem⁴⁰. Mimo těchto C₃ kanálů existuje i šest C₄ hydrofobních kanálů tvořených čtyřmi podjednotkami, které umožňují kyslíku a malým organickým molekulám vstup do centrální dutiny³⁶. Struktura apoferritinu a jeho podjednotek je uvedena na *Obr. 2.2*.



Obr. 2.2: Struktura apoferritinu a jeho podjednotek. Apoferritin je tvořen z 24 podjednotek – těžkých (modré) a lehkých (oranžové), které jsou uspořádány tak, že tvoří dutinu o průměru 8 nm, kde jsou uchovávány železité ionty. Vnější průměr apoferritinu je 12 nm a na jeho povrchu se vyskytuje osm C₃ hydrofilních a šest C₄ hydrofobních kanálů. Převzato a upraveno dle⁴¹.

Vnější povrch apoferritinu může být chemicky nebo geneticky modifikován a centrální dutina apoferritinu může pojmout celou řadu kovů a malých molekul, tedy i cytostatik. Jeho vhodnost pro využití jakožto nanotransportéru podporuje také skutečnost, že je schopen v kyselém prostředí (okolo pH 2,5) se rozpadat na jednotlivé podjednotky a následně se samostatně složit do své nativní struktury, při zvýšení pH nad hodnotu přibližně 7,5⁴². V roce 2012 bylo poprvé enkapsulováno cytostatikum, konkrétně doxorubicin (až 28 molekul), do apoferritinu pomocí změn pH roztoku⁴³, jak je znázorněno na *Obr. 2.3*.

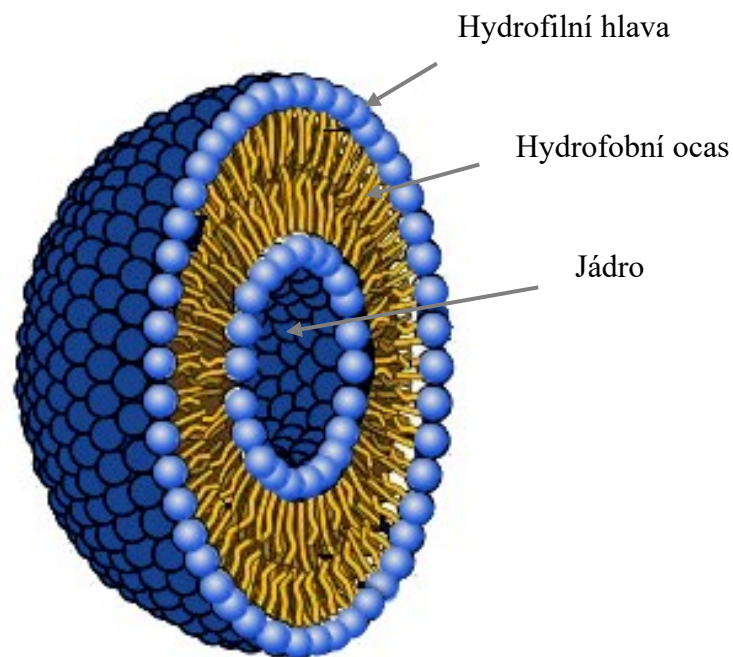


Obr. 2.3: Enkapsulace cytostatik do centrální dutiny apoferritinu. Apoferritin v roztoku je nejprve vystaven pH pod 2,5, čímž dojde k jeho disociaci na jednotlivé podjednotky. Poté dochází k přidání léčiva a k jeho náhodnému promíchání s podjednotkami. Po zvýšení pH nad hodnotu 7,5 se apoferritinové podjednotky opět skládají do své původní struktury, přičemž obklopují centrální dutinu, do které se tímto způsobem enkapsulovaly molekuly léčiva. Převzato a upraveno dle⁴⁴.

Apoferritin je tedy díky své stabilitě, možnosti modifikace povrchu a schopnosti enkapsulovat molekuly léčiv výše popsáním způsobem nadějným kandidátem nanotransportéru pro cílenou nádorovou terapii.

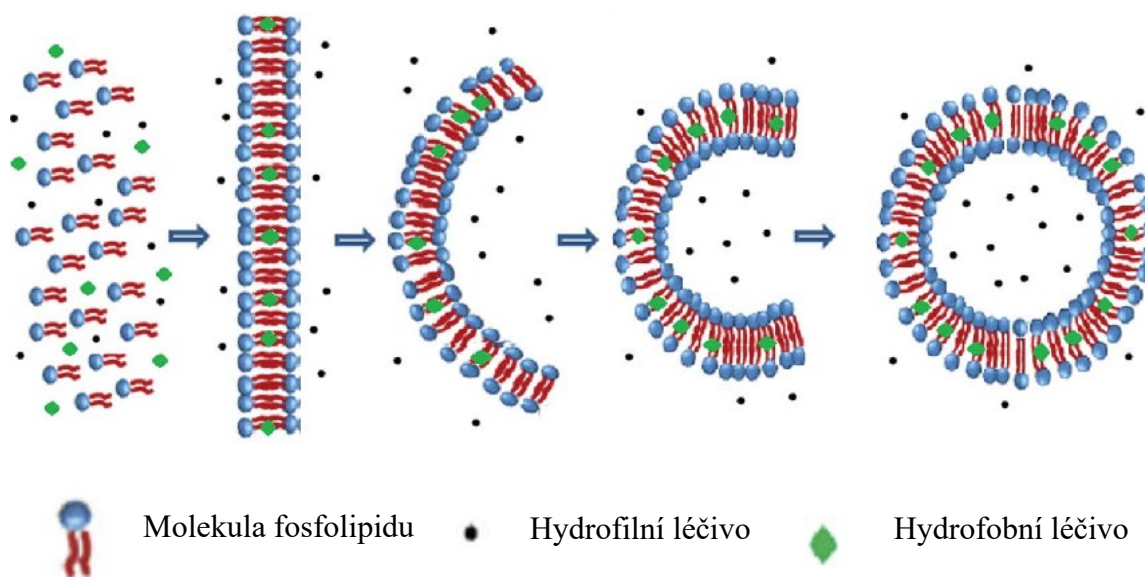
2.3.2 Liposomy

Díky své variabilitě jsou liposomy jedním z nejstudovanějších nanotransportérových systémů. Jsou tvořené fosfolipidovou dvouvrstvou, která se ve vodném prostředí formuje do kulové struktury s hydrofilním jádrem uprostřed²⁵. Struktura liposomů je znázorněna na *Obr. 2.4*. Jako fosfolipidy se nejčastěji používají glycerolfosfolipidy (například fosfatidylethanolamin nebo fosfatidylcholin), glycerolglykolipidy, glykosfingolipidy, sfingomyeliny a steroly. Podle toho, jaký typ fosfolipidu se použije, lze připravit liposomy se záporným, kladným nebo neutrálním nábojem⁴⁵.



Obr. 2.4: Struktura liposomu. Převzato a upraveno dle⁴⁶.

Liposomy jsou vhodné jak pro enkapsulaci hydrofobních, tak hydrofilních léčiv. Hydrofobní léčiva se enkapsulují přímo do fosfolipidové dvouvrstvy, zato hydrofilní léčiva do jádra, jak je znázorněno na *Obr. 2.5* (str. 18). Další velkou výhodou liposomů je jejich biokompatibilita a biodegradovatelnost^{25,47}.



Obr. 2.5: Enkapsulace hydrofilních a hydrofobních léčiv do liposomů. Převzato a upraveno dle⁴⁸.

2.4 Metabolismus cytostatik

Látky organismu cizorodé neboli xenobiotika, dělíme do dvou základních skupin – na polární a nepolární. Polární xenobiotika jsou rozpustná ve vodě a snadno eliminovatelná močí v původním nezměněném stavu. Kdežto xenobiotika nepolární jsou z organismu eliminovány jen pomalu, převážně kvůli jejich ukládání v tělesných tucích, membránách a špatné rozpustnosti ve vodných roztocích⁴⁹.

Biotransformace je chemická přeměna, probíhající především v játrech, nepolární molekuly xenobiotika na více hydrofilní sloučeniny, které jsou snáze eliminovatelné. Vytvořené metabolity mohou vykazovat rozdílné farmakologické účinky. Během biotransformace může docházet jak k jejich deaktivaci na méně toxické látky, tak k aktivaci na toxičtější sloučeniny⁵⁰. Biotransformace se dělí do tří fází – derivatizační, konjugační a transportní⁵¹.

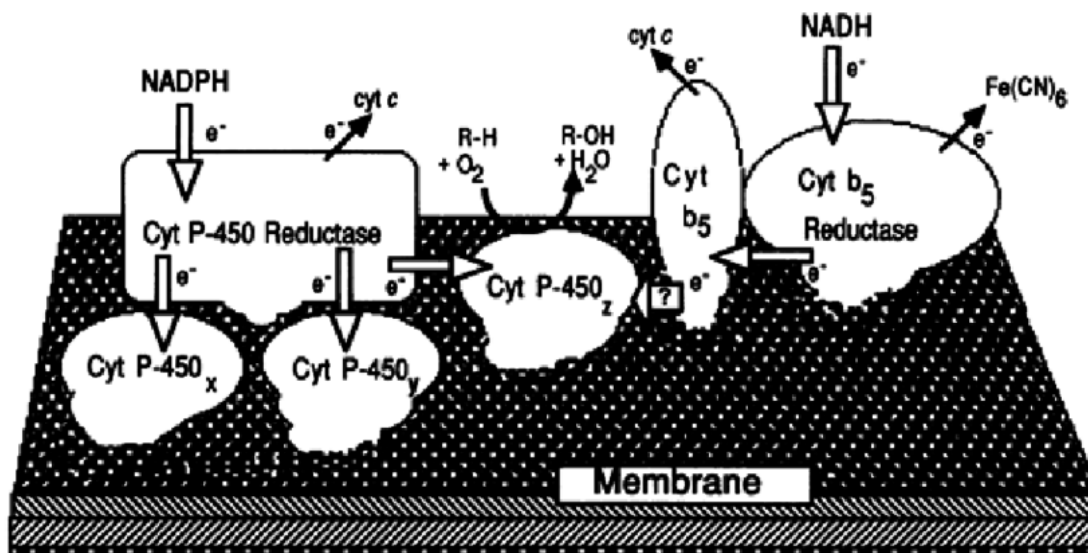
V první fázi biotransformace, tzv. derivatizační fázi, dochází k zavedení (případně demaskování) funkčních skupin zvyšujících polaritu xenobiotik. Zároveň může docházet k vytvoření míst pro následnou konjugaci během druhé biotransformační fáze. V této první fázi dochází k oxidačním, redukčním nebo hydrolytickým reakcím, přičemž enzymy, které se těchto biotransformačních kroků účastní mají širokou substrátovou specifitu, která se mezi jednotlivými enzymy překrývá. Mezi hlavní enzymy účastníci se

první biotransformační fáze patří především cytochromy P450, dále oxidasy a oxygenasy, peroxidasy, esterasy, aj^{49,51}.

Ve druhé biotransformační fázi dochází k vazbě vysoce endogenní polární látky na xenobiotikum, čímž dojde k nárůstu hydrofility a snazšímu vyloučení z těla. Konjugační činidlo musí být aktivováno vazbou s makroergickým faktorem před samotným procesem konjugace. Mezi konjugační činidla patří například kyselina glukuronová, aktivní sulfát, glutathion nebo aminokyseliny^{49,51}.

Třetí biotransformační fáze je u živočichů fází čistě transportní, kdy dochází k přenosu konjugátů z buňky proti koncentračnímu gradientu. U rostlin oproti tomu probíhá sekundární konjugace, ukládání do vakuol či inkorporace xenobiotik do buněčné stěny⁴⁹.

Systém oxidas se smíšenou funkcí (dále jen *MFO systém*, z *angl. mixed function oxidase*) obsahuje cytochromy P450 jakožto terminální oxidasy, NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasu, cytochromem b₅, NADH:cytochrom b₅ reduktasu a membránu endoplazmatického retikula. Struktura MFO systému, který se účastní první biotransformační fáze, je uvedena na *Obr. 2.6*. MFO systém katalyzuje hydroxylace, redukce a zároveň může produkovat peroxid vodíku⁵².

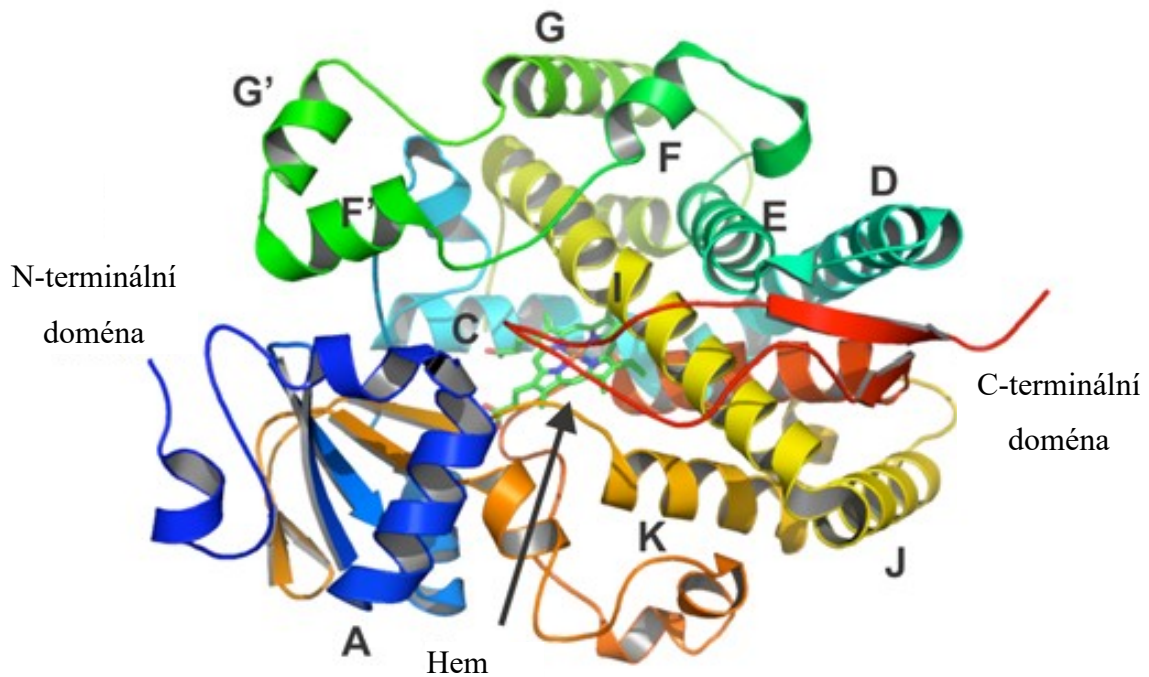


Obr. 2.6: Schéma MFO systému na membráně endoplazmatického retikula. Převzato z⁵³.

Cytochromy P450 (dále jen *CYP*) jsou hemoproteiny o molekulové hmotnosti 55 kDa, které se dělí do 18 rodin podle své sekvenční podobnosti^{54,55}. Vyskytují se především v játrech, ale jejich exprese probíhá taktéž v dalších orgánech, jako jsou

například plíce nebo ledviny⁵⁶. Tyto enzymy katalyzují velké množství reakcí jako dealkylace, hydroxylace, oxidace, ...⁵⁷.

Všechny CYP mají podobné prostorové uspořádání, viz *Obr. 2.7*. Skládají se z konzervované oblasti tvořené helixy v okolí aktivního centra, C-terminální katalytické domény a N-terminální kotvy, která však pro katalytický účinek CYP není nezbytná (prokaryota, na rozdíl od eukaryot, tuto hydrofobní kotvu postrádají)⁴⁹.



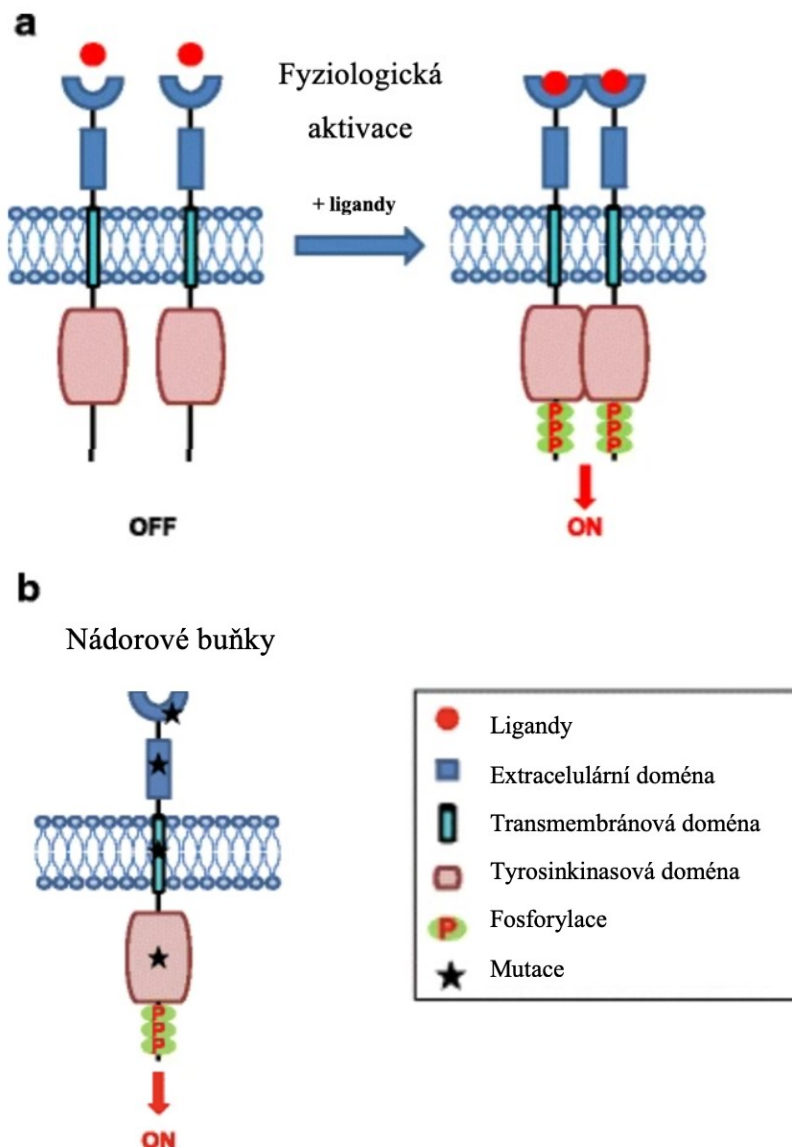
Obr. 2.7: Struktura cytochromu P450. Konkrétně je znázorněn CYP 3A4. Převzato a upraveno dle⁵⁸.

2.5 Tyrosinkinasové inhibitory

Tyrosinkinasy jsou důležitými mediátory signálních drah regulujících proliferaci, diferenciaci, migraci, metabolismus a apoptózu buněk. Rodina těchto enzymů katalyzuje fosforylaci tyrosinových zbytků v cílových proteinech pomocí ATP, čímž pomáhá udržet homeostázu organismu. Tyto dráhy jsou často v nádorových buňkách geneticky či epigeneticky modifikovány, proto jejich inhibice je jedním z cílů protinádorové léčby^{59–61}.

Receptorové tyrosinkinasy jsou podskupinou tyrosinkinas. Přestože existují desítky receptorových tyrosinkinas, mají podobnou proteinovou strukturu složenou z extracelulární receptor-vázající domény, transmembránového helixu a intracelulární katalytické domény^{62,63}. Receptorové tyrosinkinasy jsou aktivovány vazbou růstového faktoru na extracelulární doménu, čímž dojde k dimerizaci receptoru, autofosforylaci

tyrosinových zbytků na intracelulární doméně, změně konformace a následné aktivaci signálních drah G-proteinů⁶⁰. Oproti tomu v nádorových buňkách jsou kvůli mutacím v genech receptorových tyrosinkinás tyto enzymy nepřetržitě aktivní a dochází tedy k disregulaci této signální dráhy⁶⁴. Mechanismus fyziologické a nádorové aktivace receptorových tyrosinkinás je uveden na *Obr. 2.8*.

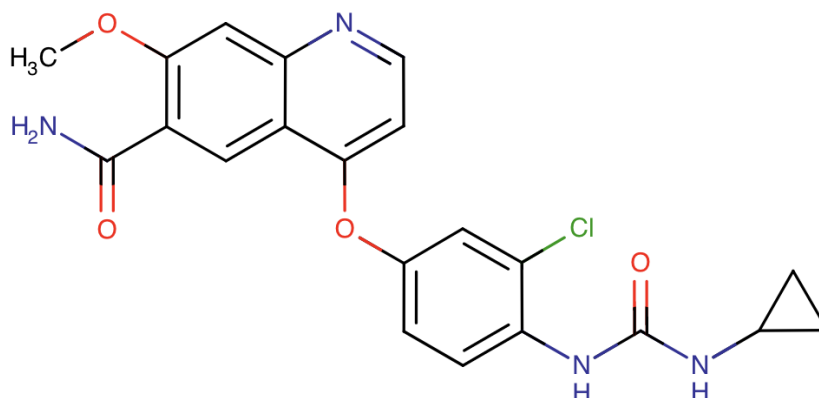


Obr. 2.8: Mechanismus fyziologické a onkologické aktivace receptorových tyrosinkinás. Fyziologicky jsou receptorové tyrosinkinasy aktivovány navázáním ligandu (a), oproti tomu v nádorových buňkách jsou kvůli mutacím aktivní stále bez ohledu na přítomnost ligandu (b). Převzato a upraveno dle⁶⁴.

Tyrosinkinásové inhibitory fungují mimo jiné na principu kompetice o ATP, tedy se kovalentně naváží do vazného místa pro ATP, čímž zabrání fosforylaci intracelulární domény a přenosu signálu⁶⁵.

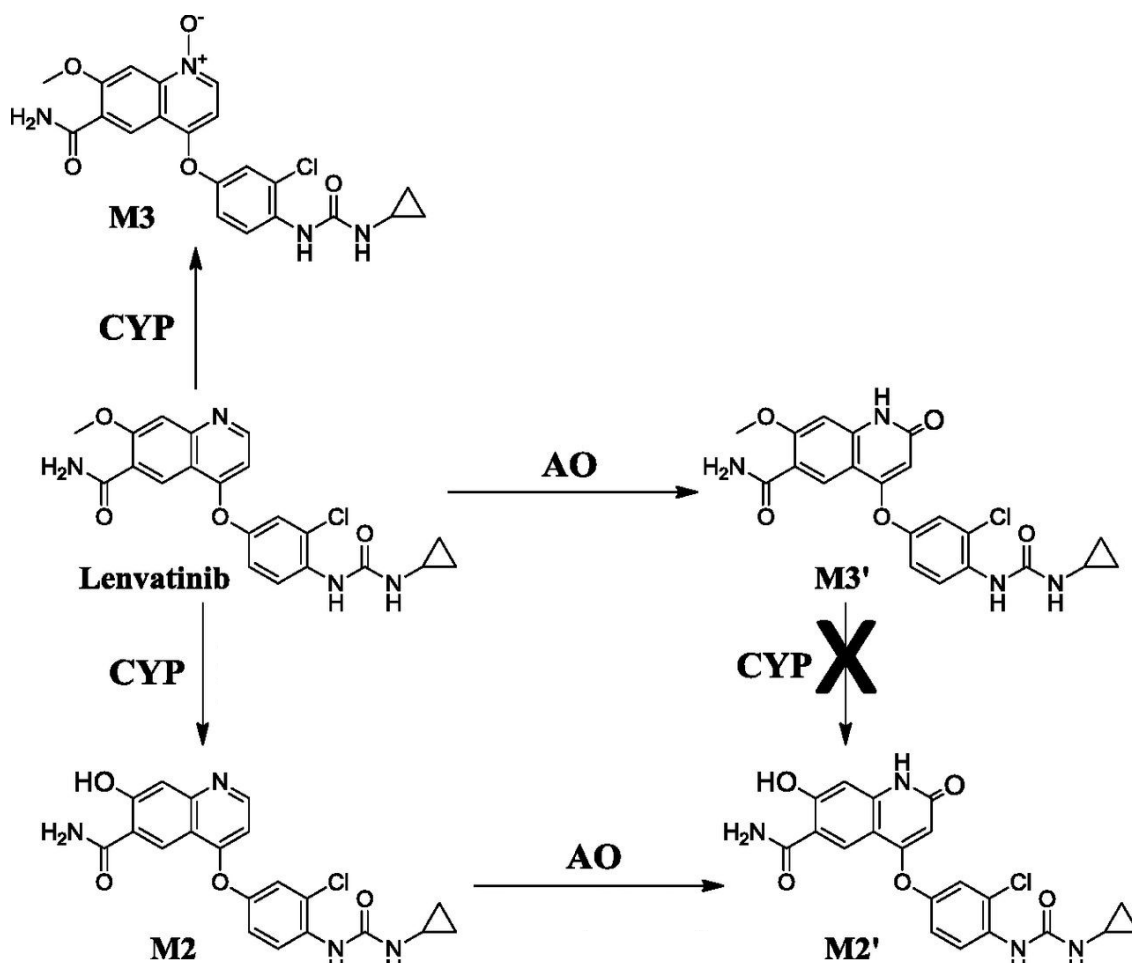
2.5.1 Lenvatinib

Lenvatinib, jehož struktura je uvedena na *Obr. 2.9*, je inhibítozem receptorových tyrosinkinas schválený v roce 2015 k léčbě rakoviny štítné žlázy, která již neodpovídá na léčbu radioaktivním jódem⁶⁶. Jakož i u ostatních cytostatik jsou nevýhodou lenvatinibu jeho vedlejší účinky, jako je hypertenze, průjem, nechutenství, nevolnost, bolest svalů a kostí⁶⁷.



Obr. 2.9 Struktura lenvatinibu. Molekula lenvatinibu má $pK_a = 5.05$. Převzato z⁶⁸.

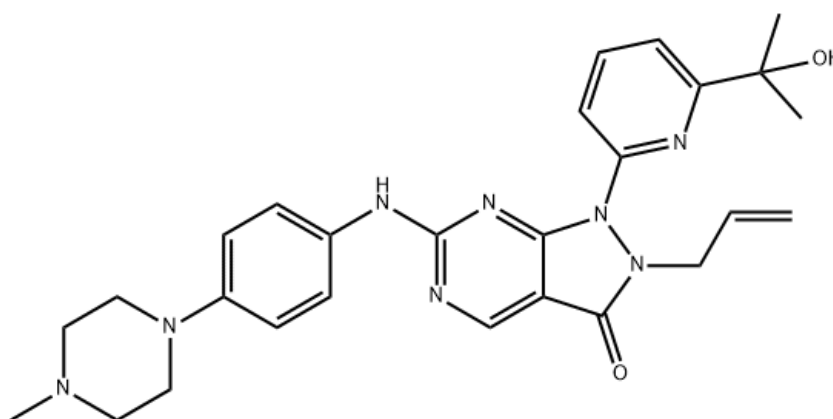
Jedná se o vícenásobný kinasový inhibitor inhibující především vaskulární endoteliální receptory růstových faktorů, fibroblastní receptory růstových faktorů a RET protoonkogeny kódující receptorové tyrosinkinasy⁶⁹. Lenvatinib je metabolisován cytochromy P450 (rodina CYP 3A4) a aldehydoxidasami⁷⁰. Jeho metabolismus je znázorněn na *Obr. 2.10* (str. 23).



Obr. 2.10: Metabolismus lenvatinibu. Lenvatinib je metabolisován cytochromy P450 (CYP) a aldehydoxidasami (AO). Převzato a upraveno dle⁷⁰.

2.5.2 Adavosertib

Adavosertib je malou molekulou inhibující tyrosinkinasu WEE1 s potenciální protinádorovou aktivitou. V současnosti je adavosertib zkoumán jakožto léčivo, mimo jiné, na karcinomu vaječníků, jazyka a adultních glyoblastomů⁷¹. Struktura této molekuly je uvedena na *Obr. 2.11*.

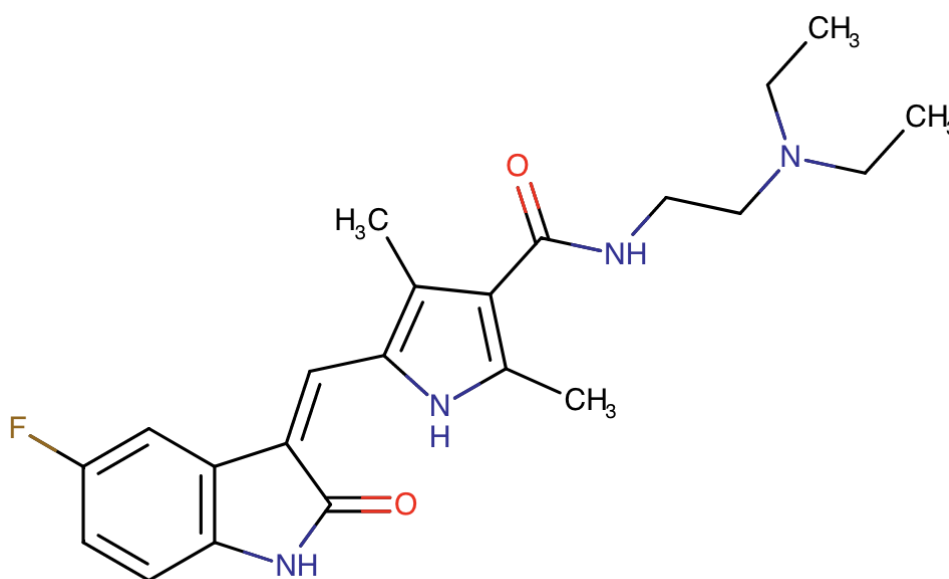


Obr. 2.11: Struktura adavosertibu. Molekula adavosertibu má $pK_a = 13,27$. Převzato z⁷¹.

WEE1 kinasa fosforyluje cyklin-dependentní kinasu, čím dochází k inaktivaci komplexu cyklin-dependentní kinasy 1 s cyklinem B⁷². V případě poškození DNA je buňka zastavena v G₂ fázi buněčného cyklu a nevstupuje to mitózy, dokud nedojde k opravě DNA. Pokud dojde k inhibici WEE1 kinasy nedochází k zadržení buňky v kontrolním bodě, nenastane oprava poškozené DNA a buňka pokračuje v průchodu buněčným cyklem, čímž dojde k nahromadění mutací, které jsou pro buňku neslučitelné se životem. Inhibice opravných procesů DNA, tedy i inhibice WEE1 kinasy, je jedním ze způsobů cílené protinádorové léčby⁷³.

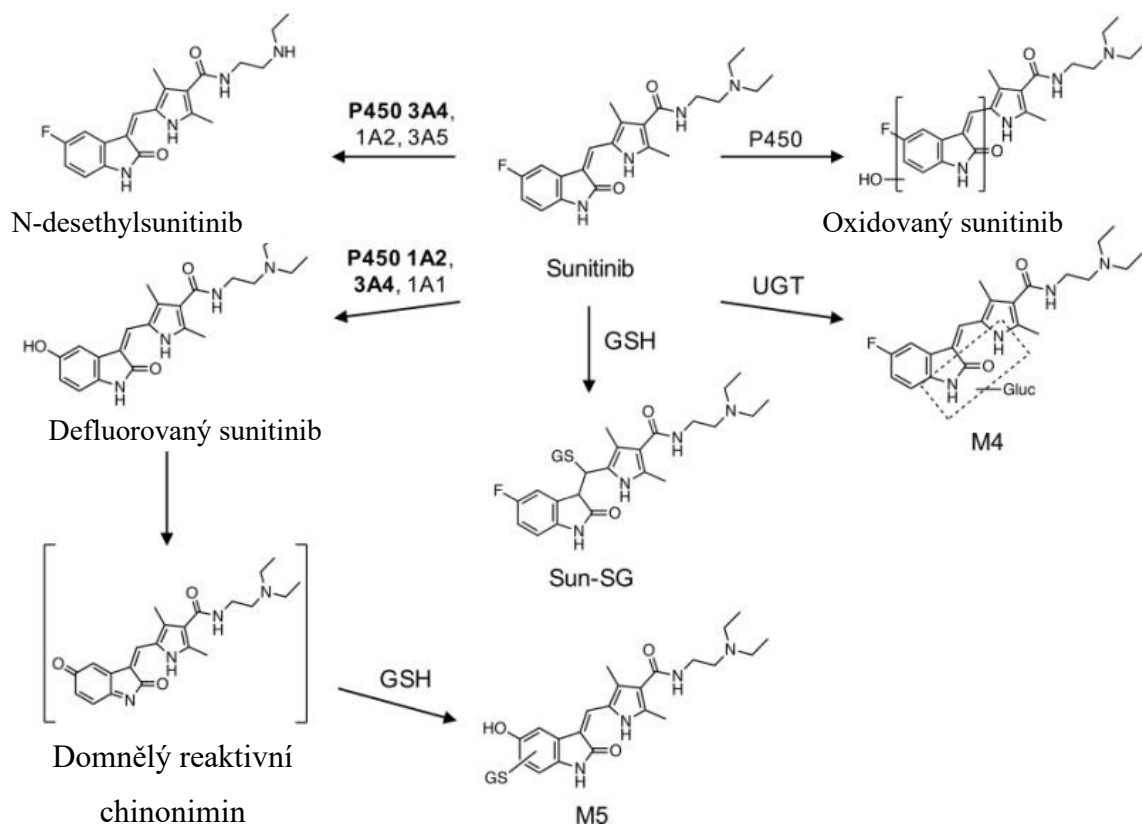
2.5.3 Sunitinib

Sunitinib je tyrosinkinasovým inhibítorem schváleným pro léčbu metastatického renálního karcinomu, gastrointestinálního stromálního tumoru a pankreatického neuroendokrinního nádoru. Mezi nežádoucí účinky tohoto cytostatika patří hypertenze, únava, trombocytopenie nebo neuropenie⁷⁴. Zároveň, byť vzácně, může docházet v důsledky léčby sunitinibem k selhání nebo poškození jater. Mechanismus tohoto poškození je však dosud neznámý⁷⁵. Struktura sunitinibu je uvedena na *Obr. 2.12*.



Obr. 2.12: Struktura sunitinibu. Molekula lenvatinibu má $pK_a = 8,95$. Převzato z⁷⁶.

Metabolismus tohoto tyrosinkinasového inhibítora je znázorněn na *Obr. 2.13* (str. 25). Sunitinib je primárně metabolisovaný pomocí cytochromů P450, dále také uridyl-glukuronyl transferasami a glutathion-S-transferasou⁷⁷.



Obr. 2.13: Metabolismus sunitinibu. Převzato a upraveno dle⁷⁸.

3. Cíl práce

Cílem diplomové práce byla příprava nanotransportérových forem inhibitorů tyrosinkinas. Dále pak enkapsulace biotransformačních enzymů v přírodních nanočásticích a analýza účinnosti enkapsulovaných enzymů metabolisovat léčiva ve formě nanotransportérů.

4. Materiál a metody

4.1 Chemikálie

Lach-Ner (ČR): NaCl, NaOH, HCl; DMSO, ethanol, acetonitril, methanol, ethylacetát

PENTA s.r.o. (ČR): octan amonný, dihydrogenfosforečnan draselný

Scintila s.r.o. (ČR): adavosertib, sunitinib

Sigma, Aldrich (USA): apoferritin (equine spleen; 50 mg/ml; 0,135 M NaCl), fenacetin

LC Laboratories (USA): lenvatinib

Připraveno laboratoří 221, Katedra Biochemie, PřF UK:

Mikrosomální frakce:

Potkan (2010; 36,53 mg/ml)

Sudan I (2011; 30 mg/ml)

PB (2011; 29,3 mg/ml)

EtOH (2009; 21,5 mg/ml)

PCN (2009 52,8 mg/ml)

Generující systém:

Sigma, Aldrich (USA): 1 mM NADP⁺;

10 mM glukosa-6-fosfát;

1 U glukosa-6-fosfát dehydrogenáza

PENTA s.r.o. (ČR): 10 mM MgCl₂

NADPH:CYP reduktasa (izolováno z králíka R. Indrou a V. Hromkem⁷⁹⁾)

CYP 1A1 (52,7 μM, rekombinantně připraven a izolován J. Milichovským⁸⁰⁾)

4.2 Přístroje

analytické váhy Discovery, Ohaus (Švýcarsko)

centrifugy

Centrifuge 5418, úhlový rotor, Eppendorf (Německo);

Centrifuge HWLAB (Čína);

Centrifuge Allegra X-306, výkyvný rotor, Beckman coulter (USA)

filtrační mikrozkušavky

Amicon Ultra-0,5, 3K 96pk, Millipore (Německo);

Amicon Ultra-4, 3K 96pk, Millipore (Německo)

filtrační systém MiliPore DuraporeTM, 0,22 μm, Merck (USA)

Systém HPLC UltiMate 3000, Thermo scientific Dionex (*USA*)

mikrozkumavky 0,5ml, 1,5ml a 2ml, VWR North American (*USA*)

pH-metry

pH metr ATI Orion 370 s kombinovanou elektrodou, Thermo scientific (*USA*);

HI 2211 pH/ORP Meter, Hanna instruments (*Itálie*)

pipety Research plus, Eppendorf (*Německo*)

předvážky Kern 440-35A, Sigma, Aldrich (*USA*)

rotační vakuová odparka Labconco, CentriVap Concentrator (*USA*)

sonikátor Elmasonic E (30)H, Elma Schmidbauer GmbH (*Německo*)

špičky do pipet

10 µl špičky, VWR North American (*USA*);

200 µl špičky, CAPP Denmark (*Dánsko*);

1000 µl špičky, VWR North American (*USA*);

5 ml špičky, VWR North American (*USA*)

třepací vodní lázeň Schoeller BS-11 (*ČR*)

třepačka Thermomixer Eppendorf compact, Eppendorf (*Německo*)

vakuová pumpa Kd Scientific (*USA*)

4.3 Metody

4.3.1 Lenvatinib

Byly připraveny zásobní roztoky lenvatinibu v DMSO (*10 mg/ml, 5 mg/ml, 2,5 mg/ml, 1,25 mg/ml*) a v EtOH (*1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml*). Takto připravené zásobní roztoky byly uchovávány v mrazáku při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3.1.1 Příprava nanočástic ApoLen

Vzorky byly připraveny do mikrozkušavek pipetováním 20 μl apoferritinu (*50 mg/ml*), 1 μl 1 M HCl, 10 μl zásobního roztoku lenvatinibu v DMSO (*10 mg/ml, 5 mg/ml, 2,5 mg/ml a 1,25 mg/ml*) nebo 100 μl zásobního roztoku lenvatinibu v EtOH (*1 mg/ml, 0,5 mg/ml*). Takto připravené vzorky byly deionizovanou vodou doplněny na celkový objem 320 μl .

Následně bylo upraveno pH pomocí 1 M HCl na hodnotu 2,70 - 3,20 a vzorky byly ponechány inkubovat za současného třepání (*450 RPM; laboratorní teplota; 10 min*), během kteréhož dochází k disociaci apoferritinu na podjednotky. Následně bylo pH opraveno pomocí 1 M NaOH na bazické a byla opět provedena inkubace vzorků za současného třepání, aby mohlo dojít ke znovusložení apoferritinu a enkapsulaci lenvatinibu (*450 RPM; laboratorní teplota; 10 min*). Vzorky byly centrifugovány (Eppendorf; *7500 g; 2,5 min*), supernatant přenesen do filtračních mikrozkušavek s maximální propustností 3 kDa a stočen (Eppendorf; *15 000 g; 5 min*). První průtok byl odebrán, do filtru bylo přidáno 300 μl deionizované vody a vzorky byly opět centrifugovány za stejných podmínek. Byl odebrán i druhý průtok, znovu přidáno 300 μl deionizované vody a naposledy byla provedena filtrace a obsah filtru byl odebrán. Tímto způsobem byl odfiltrován neenkapsulovaný lenvatinib.

Do violek pro HPLC bylo pipetováno 25 μl daného vzorku (pro každý vzorek měřeny dva průtoky a filtr) a k němu přidáno 25 μl acetonitrilu. Vzorky byly měřeny pomocí HPLC s reverzní fází (kolona 150/4; průtok 1 ml/min, nástřík 5 μl ; detekční vlnová délka 247 nm) s mobilní fází 10 mM octan amonný : methanol (40:60). Pro přepočítání plochy píku na koncentraci lenvatinibu ve vzorku byla použita kalibrační přímka, uvedená v kapitole 5.1 *ApoLenvatinib* (str. 39), která byla připravena ze zásobního roztoku lenvatinibu v EtOH (*1 mg/ml*) dvojkovým ředěním acetonitrem.

(koncentrace $1 \text{ mg/ml} - 0,0313 \text{ mg/ml}$). Koncentrace lenvatinibu v jednotlivých vzorcích jsou uvedeny v kapitole 5.1.1 *Příprava nanočástic ApoLen* (str. 40).

4.3.1.2 Kontrola přípravy ApoLen

Byly připraveny dvě série vzorků (zásobní roztok lenvatinibu v DMSO a v EtOH), každá o čtyřech sadách (vzorek a tři druhy kontrol). U první série bylo do mikrozkušavek pipetováno 20 μl apoferritinu (50 mg/ml) (mimo kontrolu č. 2), 10 μl zásobního roztoku lenvatinibu v DMSO (5 mg/ml) a deionizovaná voda doplňující celkový objem 320 μl . Druhá série vzorků byla připravena obdobně, s tím rozdílem, že místo zásobního roztoku lenvatinibu v DMSO bylo přidáno 100 μl zásobního roztoku lenvatinibu v EtOH ($0,5 \text{ mg/ml}$).

Následně bylo upraveno pH pomocí 1 M HCl na hodnotu 2,70 - 3,20 (mimo kontroly č. 3) a vzorky byly ponechány inkubovat za současného třepání (450 RPM ; laboratorní teplota; 10 min). Pomocí 1 M NaOH bylo upraveno pH na bazické (mimo kontrolu č. 1) a vzorky byly dány na třepačku (450 RPM ; laboratorní teplota; 10 min). Po centrifugaci vzorků (Eppendorf; 7500 g ; 2,5 min) byl supernatant přenesen do filtračních mikrozkušavek s maximální propustností 3 kDa a byla provedena první filtrace (Eppendorf; $15\,000 \text{ g}$; 5 min). První průtok byl odebrán, filtr doplněn 300 μl deionizované vody a znovu stočen za stejných podmínek. Po odebrání druhého průtoku bylo znovu přidáno 300 μl deionizované vody a po poslední filtraci (opět za stejných podmínek) byl odebrán obsah filtru. Vzorky byly analyzovány pomocí HPLC tak, jak je uvedeno v předchozí kapitole.

První kontrola byla tedy bez přídavku NaOH, které by zvýšilo pH roztoku a umožnilo znovusložení apoferritinu a enkapsulaci lenvatinibu. Ve druhé kontrole nebyl přítomen žádný apoferritin, do kterého by se léčivo mohlo enkapsulovat, mělo by tedy být odmyto během filtrace. Poslední kontrola byla připravena bez přídavku HCl, apoferritin tedy nedisocioval na podjednotky. Výsledky jsou uvedeny v kapitole 5.1.2 *Kontrola přípravy ApoLen* (str. 43).

4.3.1.3 Optimalizace přípravy ApoLen

Byla provedena série pokusů optimalizující přípravu nanočástic ApoLen. Jako první byla zkoumána efektivita enkapsulace lenvatinibu (5 mg/ml v DMSO) v závislosti na způsobu zvyšování pH do bazických hodnot. Do mikrozkušavek bylo pipetováno 20 μl apoferritinu (50 mg/ml), 1 μl 1 M HCl, 10 μl zásobního roztoku lenvatinibu

v DMSO (5 mg/ml) a deionizovanou vodou byly vzorky doplněny na celkový objem 320 µl. Bylo upraveno pH pomocí 1 M HCl na hodnotu 2,50 a vzorky byly ponechány inkubovat za současného třepání (450 RPM; laboratorní teplota; 10 min). Dále bylo provedeno zvyšování pH ve vzorcích: u první sady vzorků bylo pH zvýšeno pouze na hodnotu pH = 4, u druhé nejprve na hodnotu pH = 4, ponecháno inkubovat za současného třepání (450 RPM; laboratorní teplota; 10 min) a poté zvýšeno nad pH > 8. Třetí sada vzorků byla připravena okamžitým zvýšením pH > 8. Vzorky byly stočeny (Eppendorf; 7500 g; 2,5 min), supernatant přenesen do filtračních mikrozkuvek s maximální propustností 3 kDa a byla provedena filtrace (Eppendorf; 15 000 g; 5 min). Po odebrání prvního průtoku bylo do filtru přidáno 300 µl deionizované vody a vzorky byly opět stočeny za stejných podmínek. Byl odebrán i druhý průtok, přidáno 300 µl deionizované vody, provedena filtrace a obsah filtru byl odebrán. Vzorky byly analyzovány na HPLC tak, jak je uvedeno v kapitole 4.3.1.1 Příprava nanočástic ApoLen (str. 29). Získané hodnoty jsou uvedeny v kapitole 5.1.3 Optimalizace přípravy ApoLen (str. 45).

Jelikož neefektivnější enkapsulace lenvatinibu byla ve vzorcích, kde docházelo ke zvyšování pH ve dvou krocích (nejprve na pH 4, po inkubaci na pH 8), tak v rámci druhé série pokusů byl zkoumán vliv délky inkubace při pH = 4 před jeho zvýšením. Vzorky, připravené stejným způsobem, jak je popsáno v předchozím odstavci, byly ponechány inkubovat 15 min, 30 min a 60 min při pH 4. Následně bylo pH upraveno na hodnotu pH > 8 a dále byl postup stejný, jak je uvedeno výše. Vliv závislosti délky inkubace při pH 4 na efektivitu enkapsulace lenvatinibu do apoferritinových nanočástic je uveden v kapitole 5.1.3 Optimalizace přípravy ApoLen (str. 45).

4.3.1.4 Optimalizovaná příprava ApoLen

Do mikrozkuvek byly připraveny vzorky pipetováním následujících reagentů: 20 µl apoferritinu (50 mg/ml), 1 µl 1 M HCl, 10 µl zásobního roztoku lenvatinibu v DMSO (5 mg/ml, 2,5 mg/ml a 1,25 mg/ml) nebo 100 µl zásobního roztoku lenvatinibu v EtOH (0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml a 0,125 mg/ml) a deionizovaná voda tak, aby celkový objem reakční směsi byl 320 µl.

Bylo upraveno pH na hodnotu 2,60 pomocí 1 M HCl a vzorky byly dány inkubovat na třepačku (450 RPM; laboratorní teplota; 10 min). Dále bylo pH zvýšeno přidávkem 1 M NaOH na pH 4 a vzorky byly dány inkubovat (450 RPM; laboratorní teplota; 60 min). Následně bylo pH zvýšeno na hodnoty 9,50 – 11,40 a opět nechány

na třepačce (*450 RPM; laboratorní teplota; 10 min*). Byla provedena centrifugace vzorků (Eppendorf; *7500 g; 2,5 min*), supernatant přenesen do filtračních mikrozkmavek s maximální propustností 3 kDa a stočen (Eppendorf; *15 000 g; 5 min*). Po odebrání prvního průtoku bylo přidáno do filtru 300 μ l deionizované vody a vzorky byly opět stočeny za stejných podmínek. Byl odebrán druhý průtok, přidáno 300 μ l deionizované vody a naposledy byla provedena filtrace a obsah filtru byl odebrán. Vzorky byly analyzovány na HPLC stejně, jak je uvedeno v kapitole 4.3.1.1 *Příprava nanočástic ApoLen* (str. 29). Získané hodnoty jsou uvedeny v kapitole 5.1.4 *Optimalizovaná příprava ApoLen* (str. 47).

4.3.2 Adavosertib, sunitinib

Jelikož lenvatinib nebyl vhodným léčivem pro enkapsulaci do apoferritinu, byly vybrány další dva druhy léčiv (adavosertib a sunitinib) pro enkapsulaci.

4.3.2.1 Aktivní enkapsulace

Byly připraveny zásobní roztoky adavosertibu a sunitinibu v DMSO o koncentracích 10 mg/ml. Takto připravené zásobní roztoky byly uchovávány v mrazáku při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Do mikrozkmavek bylo pipetováno 20 μ l apoferritinu (*50 mg/ml*), 1 μ l 1 M HCl a 10 μ l zásobního roztoku daného léčiva rozpuštěného v DMSO (*10 mg/ml*). Takto připravené vzorky byly deionizovanou vodou doplněny na celkový objem 320 μ l.

Pomocí 1 M HCl bylo upraveno pH na hodnotu 2,70 a vzorky byly ponechány inkubovat za současného třepání (*450 RPM; laboratorní teplota; 15 min*), takže došlo k disociaci apoferritinu na podjednotky. Pomocí 1 M NaOH bylo pH upraveno na bazické hodnoty a opět byla provedena inkubace vzorků za současného třepání (*450 RPM; laboratorní teplota; 15 min*). Vzorky byly zcentrifugovány (Eppendorf; *7500 g; 2,5 min*), veškerý supernatant přenesen do filtračních mikrozkmavek (maximální propustnost 3 kDa) a byla provedena první filtrace (Eppendorf; *15 000 g; 5 min*). První průtok byl odebrán, do filtru bylo přidáno 300 μ l deionizované vody a vzorky byly stočeny za stejných podmínek. Po odebrání druhého průtoku bylo znovu přidáno 300 μ l deionizované vody a naposledy byla provedena filtrace a obsah filtru byl odebrán. Tímto způsobem bylo odfiltrováno neenkapsulované léčivo.

Do violek pro HPLC bylo pipetováno 25 μ l daného vzorku (pro každý vzorek měřeny dva průtoky a filtr) a k němu přidáno 25 μ l acetonitrilu. Vzorky byly měřeny pomocí HPLC s reverzní fází (kolona 150/4,6; průtok 1 ml/min, nástřik 5 μ l; detekční vlnová délka 340 nm pro adavosertib, 431 nm pro sunitinib) s mobilní fází 20 mM octan amonný (pH=3) : acetonitril (50:50). Pro přepočet plochy píku na koncentraci léčiva ve vzorku byly použity kalibrační přímky, uvedeny v kapitole 5.2 *ApoSunitinib a ApoAdavosertib* (str. 50), připravené ze zásobního roztoku daného léčiva (10 mg/ml). Koncentrace léčiv enkapsulovaných do apoferritinu v jednotlivých vzorcích jsou uvedeny v kapitole 5.2 *ApoSunitinib a ApoAdavosertib* (str. 50).

4.3.2.2 Pasivní enkapsulace

Byly připraveny zásobní roztoky adavosertibu a sunitinibu v DMSO o koncentracích 1 mg/ml. Zásobní roztoky byly uchovávány v mrazáku při -20 °C.

Do mikrozkušavek bylo pipetováno 200 μ l deionizované vody, 20 μ l apoferritinu (50 mg/ml), 1 μ l 1 M HCl a 100 μ l zásobního roztoku daného léčiva rozpuštěného v DMSO (1 mg/ml). Takto připravené vzorky byly umístěny na třepačku (450 RPM; laboratorní teplota; 24 hod) a zakryty, aby nebyly vystaveny slunečnímu světlu.

Vzorky byly dány na centrifugu (Eppendorf; 7500 g; 2,5 min), veškerý supernatant byl přenesen do filtračních mikrozkušavek s maximální propustností 3 kDa a následně byla provedena filtrace (Eppendorf; 15 000 g; 5 min). První průtok byl odebrán, do filtru bylo přidáno 300 μ l deionizované vody a vzorky byly centrifugovány za stejných podmínek. Byl odebrán i druhý průtok, bylo znovu přidáno 300 μ l deionizované vody a byla provedena poslední filtrace a obsah filtru byl odebrán.

Vzorky byly analyzovány na HPLC stejným způsobem, jak je uvedeno v kapitole 4.3.2.1 *Aktivní enkapsulace* (str. 32). Koncentrace léčiv pasivně enkapsulovaných do apoferritinu v jednotlivých vzorcích jsou uvedeny v kapitole 5.2 *ApoSunitinib a ApoAdavosertib* (str. 50).

4.3.2.3 Metabolismus Sun a ApoSun

Nejprve byla provedena série pokusů zaměřených na zkoumání metabolismu sunitinibu pomocí různých druhů mikrosomů. Do dvoumililitrových mikrozkušavek byl pipetován v tomto pořadí: fosfátový pufr (0,1 M KH₂PO₄; pH = 7,4); 2 μ l zásobního roztoku sunitinibu v DMSO (10 mg/ml) – v každém vzorku bylo tedy 0,02 mg sunitinibu; mikrosomální frakce a generující systém (dále jen GS). Pipetované objemy pufru,

mikrosomů a GS pro jednotlivé druhy mikrosomální frakce (inkubační i kontrolní vzorky) jsou uvedeny v *Tab. 4.1.*

Tab. 4.1.: Složení inkubačních a kontrolních směsí pro studium metabolismu sunitinibu.
Do každé reakční směsi byly pipetovány také 2 μ l zásobního roztoku sunitinibu.

Druh mikrosomální frakce	Druh vzorku	Fosfátový pufr [μ l]	Mikrosomální frakce [μ l]	GS [μ l]
Potkan	Kontrola	491	6,8	0
	Inkubační vzorek	441	6,8	50
Sudan I	Kontrola	490	8,3	0
	Inkubační vzorek	440	8,3	50
PB	Kontrola	490	8,5	0
	Inkubační vzorek	440	8,5	50
EtOH	Kontrola	487	11,6	0
	Inkubační vzorek	437	11,6	50
PCN	Kontrola	493	4,7	0
	Inkubační vzorek	443	4,7	50

* informace o mikrosomálních frakcích a GS včetně koncentrací jsou uvedeny v kapitole 4.1 *Chemikálie (str. 27).*

Po přidání GS byly vzorky okamžitě dány inkubovat na třepačku (450 RPM; 37 °C; 20 min) s přístupem kyslíku. Následně byla reakce zastavena přidáním 1 ml ethylacetátu coby extrakčního činidla. Byla provedena první extrakce: 2 min třepání (1400 RPM; laboratorní teplota), 5 min centrifugace (Eppendorf; 15 000 g). Bylo odebráno 750 μ l horní fáze, která obsahovala extrakční činidlo s extrahovanými metabolity, a přeneseno do 1,5 ml mikrozkušavky. Ke zbytku byl přidán 1 ml ethylacetátu a byla provedena extrakce stejným způsobem, jak je uvedeno výše. Opět bylo odebráno 750 μ l horní fáze s extrahovanými metabolity a přeneseno do 1,5 ml mikrozkušavky ke dříve odebraným. Ethylacetát byl následně odpařen na odparce při 37 °C, k sušinám bylo přidáno 50 μ l mobilní fáze (20 mM octan amonný (pH=3) : acetonitril (50:50)), promícháno a přeneseno do violek pro HPLC.

Takto připravené vzorky byly měřeny na HPLC (kolona s reverzní fází 150/4,6; průtok 1 ml/min, nástřik 10 μ l; detekční vlnová délka 431 nm). Získané hodnoty jsou vedeny v kapitole 5.2.1 *Metabolismus Sun a ApoSun (str. 53).*

Druhá série pokusů byla zaměřena na studium metabolismu sunitinibu ve formě ApoSun. V rámci dvou měření byly připraveny nanočástice ApoSun způsobem popsaným v kapitole 4.3.2.2 *Pasivní enkapsulace (str. 33).* Následně byla změřena koncentrace sunitinibu enkapsulovaného do apoferritinu (0,47 mg/ml a 0,69 mg/ml) a byl

vypočítán objem, který bylo potřeba pipetovat do jednotlivých vzorků, aby v každém vzorku bylo přítomno 0,02 mg sunitinibu ve formě ApoSun. Do mikrozkušavek o objemu 2 ml byl pipetován v následujícím pořadí: fosfátový pufr, příslušný objem roztoku ApoSun, mikrosomální frakce a GS. Pipetované objemy jsou uvedeny v *Tab. 4.2.*

Tab. 4.2.: Složení inkubačních a kontrolních směsí pro studium metabolismu ApoSun.

-	Druh mikrosomální frakce	Druh vzorku	Fosfátový pufr [μl]	ApoSun [μl]	Mikrosomální frakce [μl]	GS [μl]
ApoSun I	Potkan	Kontrola	451	42,2	6,8	0
		Inkubační vzorek	401	42,2	6,8	50
	Sudan I	Kontrola	450	42,2	8,3	0
		Inkubační vzorek	400	42,2	8,3	50
	PB	Kontrola	449	42,2	8,5	0
		Inkubační vzorek	399	42,2	8,5	50
	EtOH	Kontrola	446	42,2	11,6	0
		Inkubační vzorek	396	42,2	11,6	50
	PCN	Kontrola	453	42,2	4,7	0
		Inkubační vzorek	403	42,2	4,7	50
ApoSun II	Potkan	Inkubační vzorek	414	29	6,8	50
	Sudan I	Inkubační vzorek	413	29	8,3	50
	PB	Inkubační vzorek	413	29	8,5	50
	EtOH	Inkubační vzorek	409	29	11,6	50
	PCN	Inkubační vzorek	416	29	4,7	50

* informace o mikrosomálních frakcích a GS včetně koncentrací jsou uvedeny v kapitole 4.1 *Chemikálie (str. 27)*.

Vzorky byly dány inkubovat za současného třepání s přístupem kyslíku (450 RPM; 37 °C; 20 min). Reakce byla zastavena přidáním 1 ml ethylacetátu a byla provedena první extrakce - 2 min třepání (1400 RPM; laboratorní teplota), 5 min centrifugace (Eppendorf; 15 000 g). Z horní fáze obsahující metabolity sunitinibu bylo odebráno 750 μl a přeneseno do 1,5 ml mikrozkušavky. Ke zbytku byl přidán 1 ml ethylacetátu a byla provedena druhá extrakce stejným způsobem uvedeným výše.

Znovu bylo odebráno 750 μl fáze s extrahovanými metabolity a přeneseno do stejné 1,5 ml mikrozkušavky. Ethylacetát byl odpařen při 37 °C, k sušinám bylo přidáno 50 μl mobilní fáze (20 mM octan amonný (pH=3) : acetonitril (50:50)), promícháno a přeneseno do violek pro HPLC. Měření metabolitů bylo provedeno na HPLC za výše uvedených podmínek. Získané hodnoty jsou uvedeny v kapitole 5.2.1 *Metabolismus Sun a ApoSun (str. 53)*.

4.3.2.4 Metabolismus Sun a ApoSun cytochromy enkapsulovanými v liposomálních nanočásticích

Byly připraveny nanočástice ApoSun způsobem popsaným v kapitole 4.3.2.2 *Pasivní enkapsulace (str. 33)*, byla zjištěna koncentrace sunitinibu enkapsulovaného do apoferritinu (0,71 mg/ml) a byl vypočítán objem, který bylo potřeba pipetovat do jednotlivých vzorků, aby v každém vzorku bylo přítomno 0,01 mg sunitinibu ve formě ApoSun ($V = 14,1 \mu\text{l}$). Dále byl připraven zásobní roztok sunitinibu v deionizované vodě o koncentraci 1 mg/ml s přídavkem 1 M HCl v poměru k objemu deionizované vody 150:1 ($V_{\text{dH}_2\text{O}}:V_{\text{HCl}}$).

Dále byly připraveny liposomy nesoucí CYP 1A1. Do skleněné zkumavky bylo pipetováno 128 μl DPLC (5 mg/ml v chloroformu) a následně organické rozpouštědlo odpařeno pod atmosférou dusíku. Dále bylo přidáno 64 μl CHAPS detergentu (0,5 mg/ml v HEPES pufru (500 mM; pH = 7,4)) a 64 μl glutathionu (30 mM). Směs byla sonikována dvakrát po dobu 2 min. Následně bylo přidáno 12,6 μl CYP 1A1 (52,7 μM) a 18,6 μl NADPH:CYP reductasy a byla provedena inkubace při současném třepání (450 RPM; laboratorní teplota; 10 min). Následně bylo do zkumavky přidáno 480 μl fosfátového pufru (0,1 M KH_2PO_4 ; pH = 7,4). Konečná koncentrace takto enkapsulovaných CYP 1A1 (dále jen *LipCYP*) byla 200 nM.

Do dvoumilitrových mikrozkušavek byl pipetován v tomto pořadí: fosfátový pufr (0,1 M KH_2PO_4 ; pH = 7,4); příslušný objem zásobních roztoků léčiva (zásobní roztok sunitinibu v dH_2O (1 mg/ml) nebo roztok ApoSun (0,71 mg/ml) – aby v každém vzorku byl 0,01 mg sunitinibu; 50 μl LipCYP a GS. Pipetované objemy pufru, léčiva a GS pro inkubační i kontrolní vzorky jsou uvedeny v Tab. 4.3 (str. 37).

Tab. 4.3.: Složení směsí pro studium metabolismu Sun a ApoSun enzymy enkapsulovanými v liposomech. Do každé rekční směsi bylo pipetováno také 50 μ l LipCYP.

Druh léčiva	Druh vzorku	Fosfátový pufr [μ l]	Zásobní roztok léčiva [μ l]	GS* [μ l]
Sun	Kontrola	175	10	0
	Inkubační vzorek	200	10	25
ApoSun	Kontrola	160,9	14,1	0
	Inkubační vzorek	185,9	14,1	25

* informace GS včetně koncentrací jsou uvedeny v kapitole 4.1 *Chemikálie* (str. 27).

Vzorky se nechaly inkubovat za současného třepání s přístupem kyslíku (450 RPM; 37 °C; 20 min). Poté byla reakce byla zastavena přidáním 1 ml ethylacetátu a provedena první extrakce - 2 min třepání (1400 RPM; laboratorní teplota), 5 min centrifugace (Eppendorf; 15 000 g). Z horní fáze obsahující metabolity léčiva bylo odebráno 750 μ l a přeneseno do 1,5 ml mikrozkuhavky. Ke zbytku byl přidán 1 ml ethylacetátu a byla provedena druhá extrakce stejným způsobem. Znovu bylo odebráno 750 μ l fáze s extrahovanými metabolity a přeneseno do stejné 1,5 ml mikrozkuhavky. Následně byl ethylacetát odpařen při 37 °C, k sušinám bylo přidáno 50 μ l mobilní fáze (20 mM octan amonný (pH=3) : acetonitril (50:50)), promícháno a přeneseno do violek pro HPLC. Měření metabolitů bylo provedeno na HPLC za výše uvedených podmínek. Získané hodnoty jsou uvedeny v kapitole 5.2.2 *Metabolismus Sun a ApoSun cytochromy enkapsulovanými v liposomálních nanočásticích* (str. 55).

4.3.2.5 Studium kinetiky uvolňování sunitinibu z ApoSun

Byly připraveny nanočástice ApoSun způsobem popsaným v kapitole 4.3.2.2 *Pasivní enkapsulace* (str. 33). Byly připraveny dva fosfátové pufrы o odlišném pH (0,1 M KH_2PO_4 ; pH = 7,4 a pH = 6,5) a dány temperovat do vodní lázně při 37 °C.

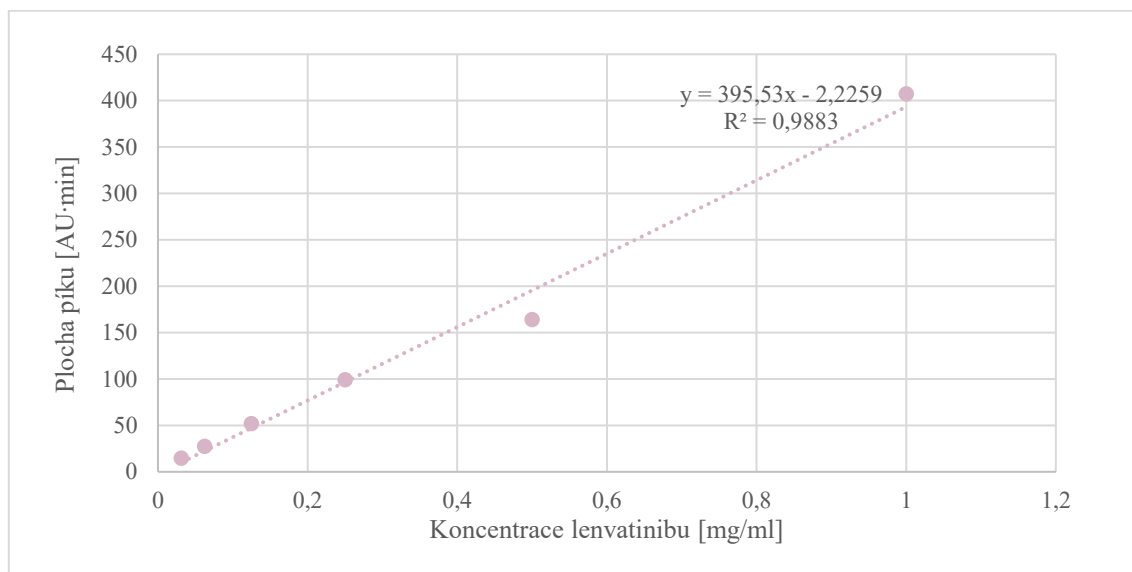
Do dialyzačních zkumavek bylo pipetováno 14,5 ml příslušného fosfátového pufru (dva triplety) a do dialyzační cely pipetováno 0,5 ml roztoku ApoSun. Takto připravené vzorky byly dány inkubovat při 37 °C do vodní lázně. V příslušných časech (0 min, 30 min, 1 hod, 2 hod, 3 hod, 6 hod, 9 hod, 12 hod a 24 hod) byl z dolní části dialyzační zkumavky odebrán 0,5 ml, přenesen do dvoumilitrové mikrozkuhavky a do dialyzační zkumavky přidáno 0,5 ml příslušného fosfátového pufru. Po konci měření byl obsah dialyzační cely přelit do dialyzační zkumavky, promíchán a odebrán poslední konečný vzorek.

K odebraným vzorkům ve dvoumilitrových mikrozkuvkách bylo přidáno 5 μ l fenacetinu, jakožto standartu pro vyhodnocení výsledků, a 1,2 ml ethylacetátu. Byla provedena první extrakce - 2 min třepání (1400 RPM; laboratorní teplota), 5 min centrifugace (Eppendorf; 15 000 g). Z horní fáze byl odebrán 1 ml s extrahovaným léčivem a přeneseno do 1,5 ml mikrozkuvky. Ethylacetát byl odpařen při 37 °C, k sušinám bylo přidáno 50 μ l mobilní fáze (20 mM octan amonný (pH=3) : acetonitril (50:50)), promícháno a přeneseno do violek pro HPLC. Měření bylo provedeno na HPLC za výše uvedených podmínek. Získané hodnoty jsou uvedeny v kapitole 5.2.3 *Studium kinetiky uvolňování sunitinibu z ApoSun (str. 56)*.

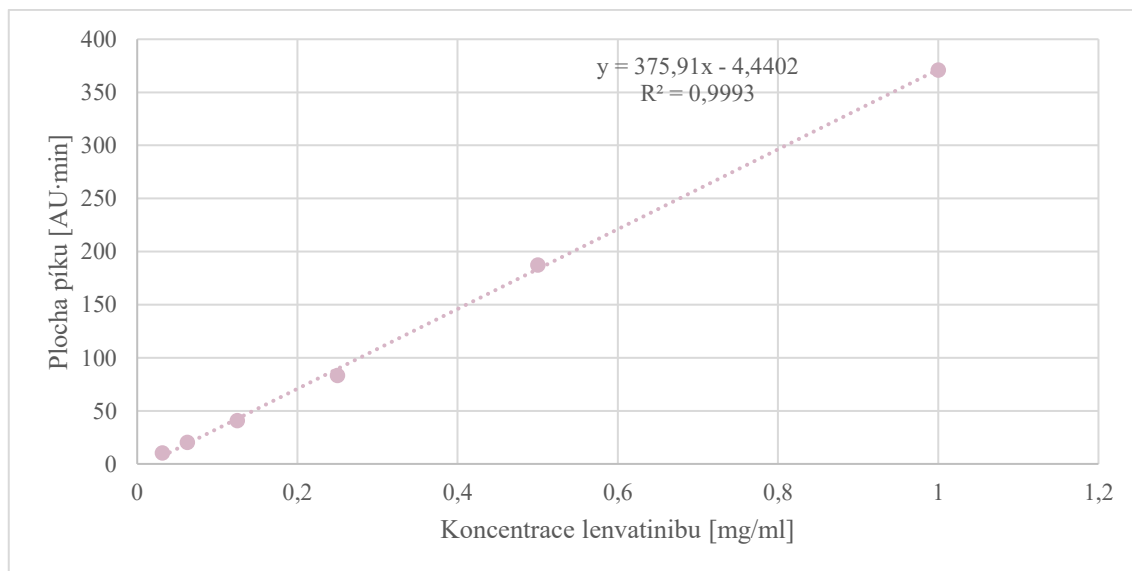
5. Výsledky

5.1 ApoLenvatinib

V kapitole 4.3.1.1 *Příprava nanočástic ApoLen (str. 29)* je uveden postup přípravy kalibračních roztoků potřebných pro sestrojení kalibrační přímky. V průběhu pokusů byly sestrojeny celkem dvě kalibrační přímky, podle nichž byly vypočítány koncentrace lenvatinibu ve vzorcích. Kalibrační přímky jsou uvedeny na *Obr. 5.1* a *5.2*.



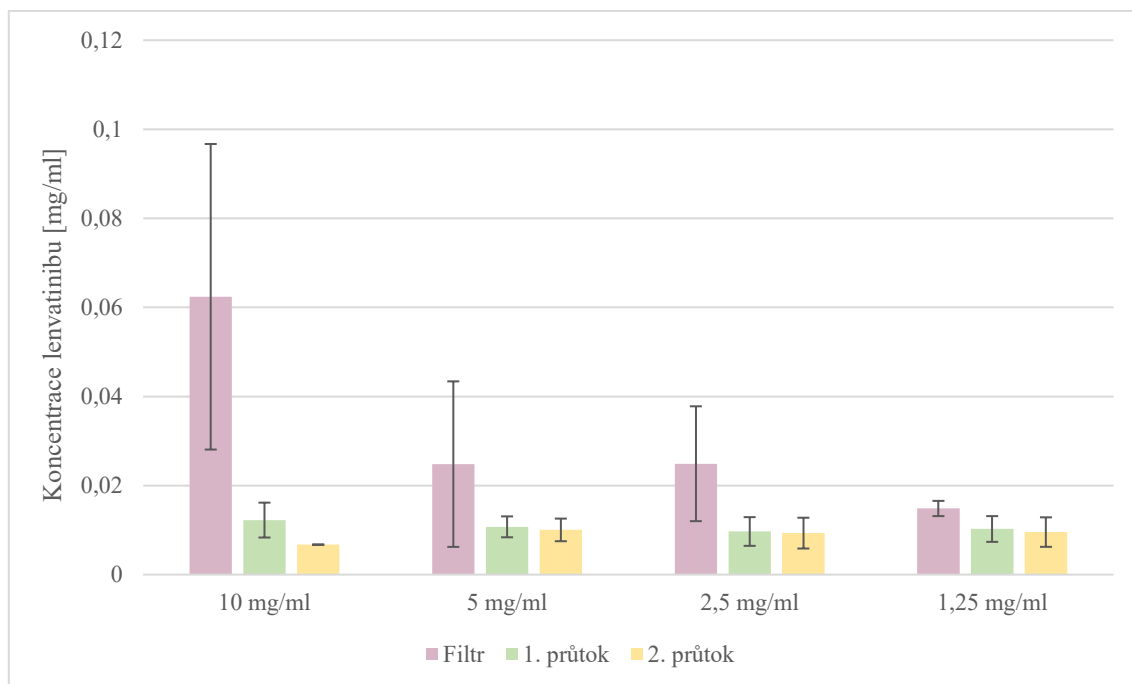
Obr. 5.1: První kalibrační přímka roztoku lenvatinibu v EtOH. Závislost absorbance lenvatinibu na jeho hmotnostní koncentraci.



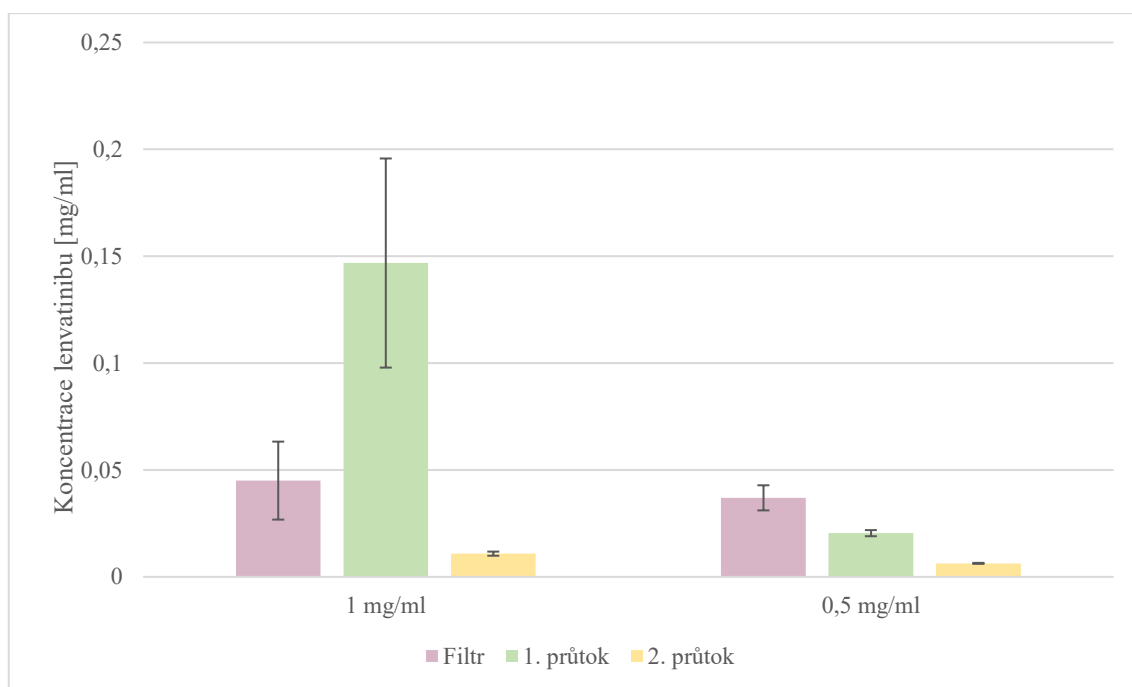
Obr. 5.2: Druhá kalibrační přímka roztoku lenvatinibu v EtOH. Závislost absorbance lenvatinibu na jeho hmotnostní koncentraci.

5.1.1 Příprava nanočástic ApoLen

Postupem uvedeným v kapitole 4.3.1.1 *Příprava nanočástic ApoLen (str. 29)* byla připravena série vzorků o různých koncentracích zásobních roztoků. Na *Obr. 5.3* je znázorněna koncentrace lenvatinibu enkapsulovaného do apoferritinu na použité koncentraci zásobního roztoku lenvatinibu v DMSO. Na *Obr. 5.4 (str. 41)* jsou uvedeny koncentrace lenvatinibu ve formě ApoLen, a to v závislosti na koncentraci zásobního roztoku lenvatinibu v EtOH.



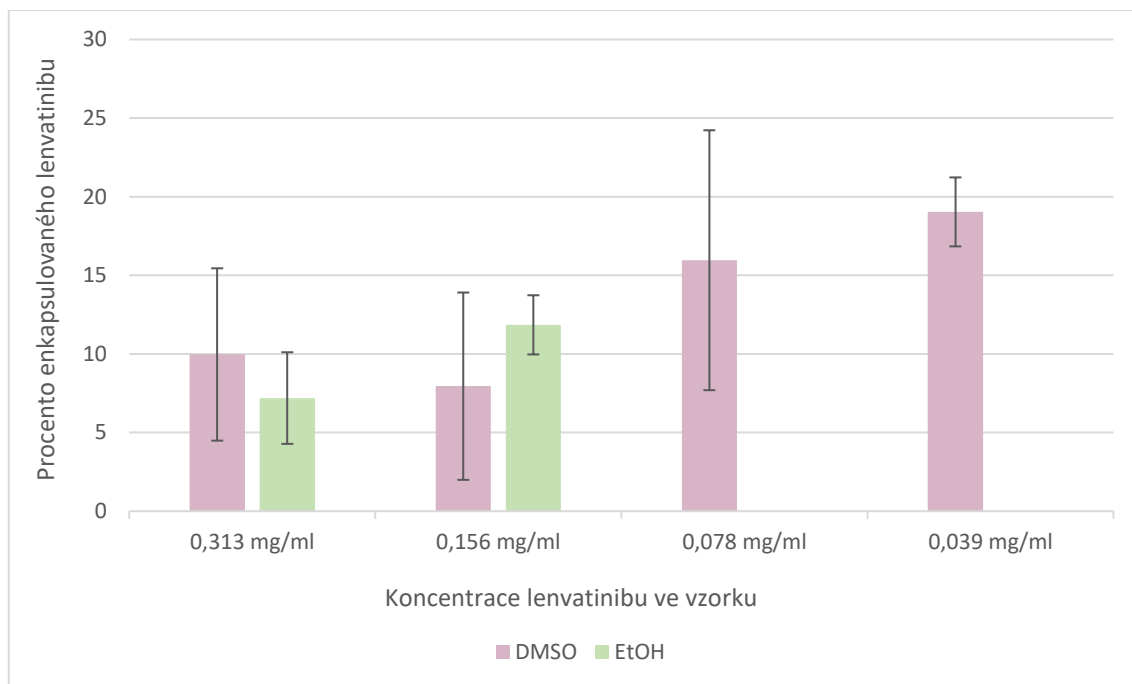
Obr. 5.3: Koncentrace lenvatinibu v nanočásticích ApoLen v závislosti na koncentraci zásobních roztoků lenvatinibu rozpuštěného v DMSO. Růžovou barvou jsou znázorněny koncentrace lenvatinibu, který zůstal ve filtr, tedy byl enkapsulován v apoferritinu. Průtoky (značeny zelenou a žlutou barvou) naopak znázorňují lenvatinib, který filtrem prošel, byl tedy volný a do apoferritinu se neenkapsuloval.



Obr. 5.4: Koncentrace lenvatinibu v nanočásticích ApoLen v závislosti na koncentraci zásobních roztoků lenvatinibu rozpuštěného v EtOH. Růžová barva odpovídá koncentraci lenvatinibu, který zůstal ve filtru, tedy je ve formě ApoLen. Průtoky (značeny zelenou a žlutou barvou) naopak znázorňují lenvatinib neenkapsulovaný do apoferritinu, tedy volný a filtrem průchozí.

Z Obr. 5.3 (str. 40) a Obr. 5.4 je patrné, že nejvíce lenvatinibu se vyskytuje ve filtru, je tedy navázán na apoferritin. Výjimku tvoří vzorky připravené z lenvatinibu rozpuštěného v EtOH o koncentraci 1 mg/ml, zde se největší množství léčiva vyskytuje v prvním průtoku.

Teoretická celková koncentrace lenvatinibu ve vzorcích, které byly připraveny ze zásobního roztoku lenvatinibu v DMSO (v EtOH) o koncentraci 10 mg/ml (1 mg/ml), pokud by došlo k jeho 100 % enkapsulaci, by byla 0,313 mg/ml, o koncentraci 5 mg/ml (0,5 mg/ml) by byla 0,156 mg/ml, o koncentraci 2,5 mg/ml (0,25 mg/ml) 0,078 mg/ml a o koncentraci 1,25 mg/ml (0,125 mg/ml) 0,039 mg/ml. Pokud tedy vydělíme koncentraci lenvatinibu enkapsulovaného v apoferritinu celkovou koncentrací lenvatinibu, která byla ve vzorcích, získáme hodnoty, které po vynásobení stem budou udávat a vydělení dvěma (jelikož ve filtru je přibližně poloviční objem oproti primárním vzorkům), kolik procent lenvatinibu bylo přibližně enkapsulováno. Tyto hodnoty jsou uvedeny na Obr. 5.5 (str. 42).

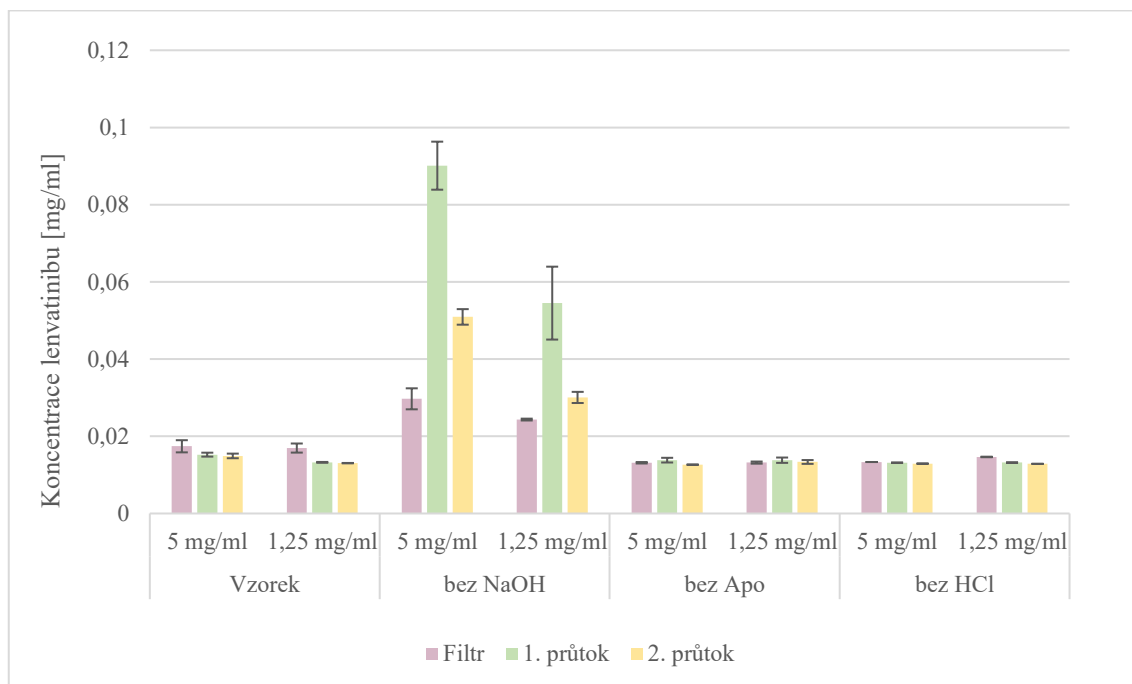


Obr. 5.5: Účinnost enkapsulace lenvatinibu do apoferritinových nanočástic v závislosti na výchozí koncentraci lenvatinibu ve vzorku a jeho rozpouštědla. Růžovou barvou jsou vyneseny hodnoty účinnosti enkapsulace lenvatinibu rozpuštěného v DMSO. Zelenou barvou jsou hodnoty pro lenvatinib rozpuštěný v EtOH.

Z Obr. 5.5 je zřejmé, že lenvatinib není vhodným cytostatikem pro enkapsulaci do apoferritinových nanočástic, jelikož účinnost jeho enkapsulace nedosahuje v průměru ani 20 %. Obecně vyšší účinnost enkapsulace vykazují vzorky s použitím DMSO, jakožto rozpouštědla pro lenvatinib. Zároveň z měření vidíme, že získané hodnoty mají veliké směrodatné odchylky, které naznačují, že tvorba ApoLen je spíše náhodným procesem než pravidlem.

5.1.2 Kontrola přípravy ApoLen

Jak bylo uvedeno v předchozí kapitole, lenvatinib se nezdá býti vhodnou molekulou pro enkapsulaci do apoferritinu. Byla tedy provedena série kontrol, viz kapitola 4.3.1.2 *Kontrola přípravy ApoLen (str. 30)*. Získané výsledky jsou znázorněny na Obr. 5.6.



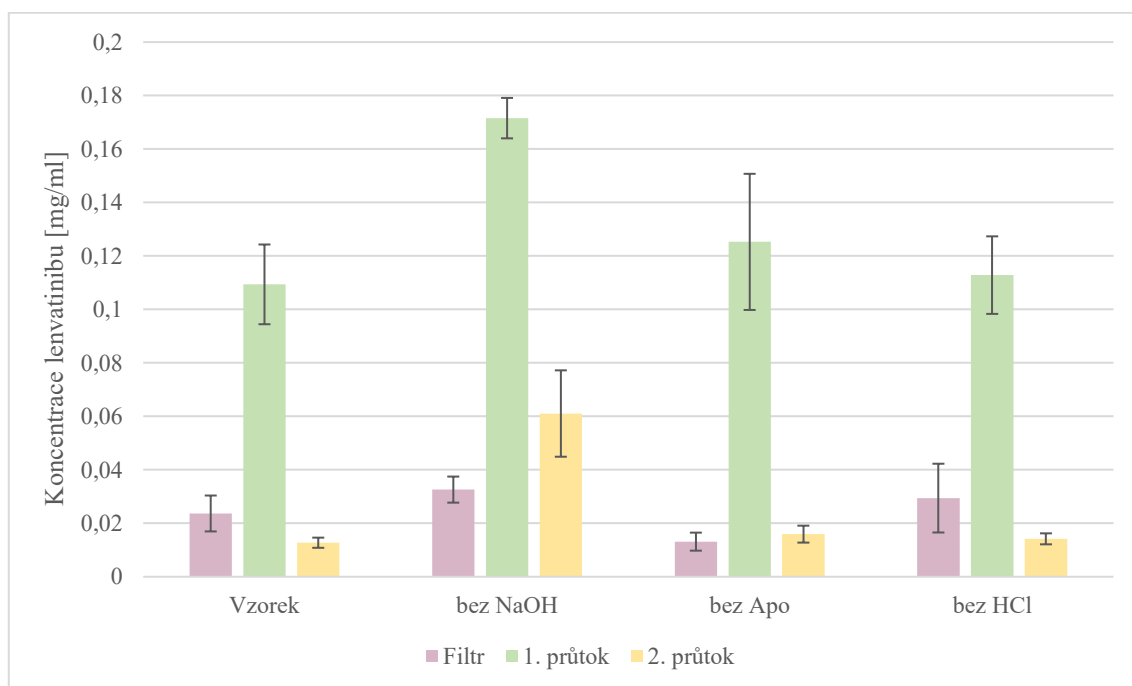
Obr.: 5.6: Kontroly enkapsulace lenvatinibu rozpuštěného v DMSO do apoferritinu. Jako zásobní roztok byl použit lenvatinib rozpuštěný v DMSO o koncentracích 5 a 1,25 mg/ml. V první kontrole nebyl přidán hydroxid sodný, tedy nedošlo ke zvýšení pH roztoku disociovaný apoferritin se neseskládal do nativní struktury tvořící centrální dutinu. V kontrole č. 2 nebyl přítomný žádný apoferritin, tedy lenvatinib se nemá kam enkapsulovat. Třetí kontrola byla bez přídavku kyseliny chlorovodíkové, tedy nedošlo ke snížení pH a apoferritin nedisocioval na podjednotky. Hodnoty znázorněné růžovou barvou odpovídají lenvatinibu, který nebyl přefiltrován, tedy byl navázaný na apoferritinové nanočástice. Zelené a žluté hodnoty značí průtoky, tedy koncentraci lenvatinibu, který filtrační membránou prošel a nebyl navázán na apoferritin.

Na Obr. 5.6 vidíme, že nejvíce lenvatinibu se navázalo na apoferritin, když nebylo zvýšeno pH na bazické hodnoty, tedy když se apoferritin neseskládal zpět do své nativní struktury. Dokonce tato první kontrola vykazuje vyšší účinnost navázání léčiva než kompletní vzorek. Prvním vysvětlením mohou být elektrostatické interakce mezi lenvatinibem, $pK_a = 5,05$, a záporně nabitou centrální dutinou. Druhým vysvětlením může být skutečnost, že v tomto vzorku nedochází k vysrážení lenvatinibu, a tedy je zde jeho zdánlivá koncentrace vyšší než v ostatních vzorcích, kde kvůli vyššímu pH k vysrážení došlo.

Při zvýšení pH na bazické hodnoty pomocí NaOH dochází tedy sice k seskládání podjednotek apoferritinu a tvorbě kompletní centrální dutiny, ale zároveň při tomto pH je lenvatinib záporně nabitý. Záporný náboj lenvatinibu a záporný náboj centrální dutiny apoferritinu se tedy odpuzují a lenvatinib se jen neochotně enkapsuluje.

Oproti tomu, při kyselém pH okolo 2,5, kdy dochází k disociaci apoferritinu na podjednotky, je lenvatinib kladně nabitý. Pokud tedy nepřidáme NaOH a nezvýšíme pH roztoku, dojde ke tvorbě elektrostatických interakcí mezi kladně nabitým lenvatinibem a záporně nabitou částí podjednotky, která v nativní struktuře apoferritinu směřuje do centrální dutiny.

Na *Obr. 5.7* jsou výsledky kontrol, při kterých byl jako zásobní roztok použit lenvatinib rozpuštěný v EtOH o koncentraci 0,5 mg/ml. I zde vidíme, že kompletní vzorek nevykazuje výrazně vyšší účinnost enkapsulace lenvatinibu, oproti kontrolám.

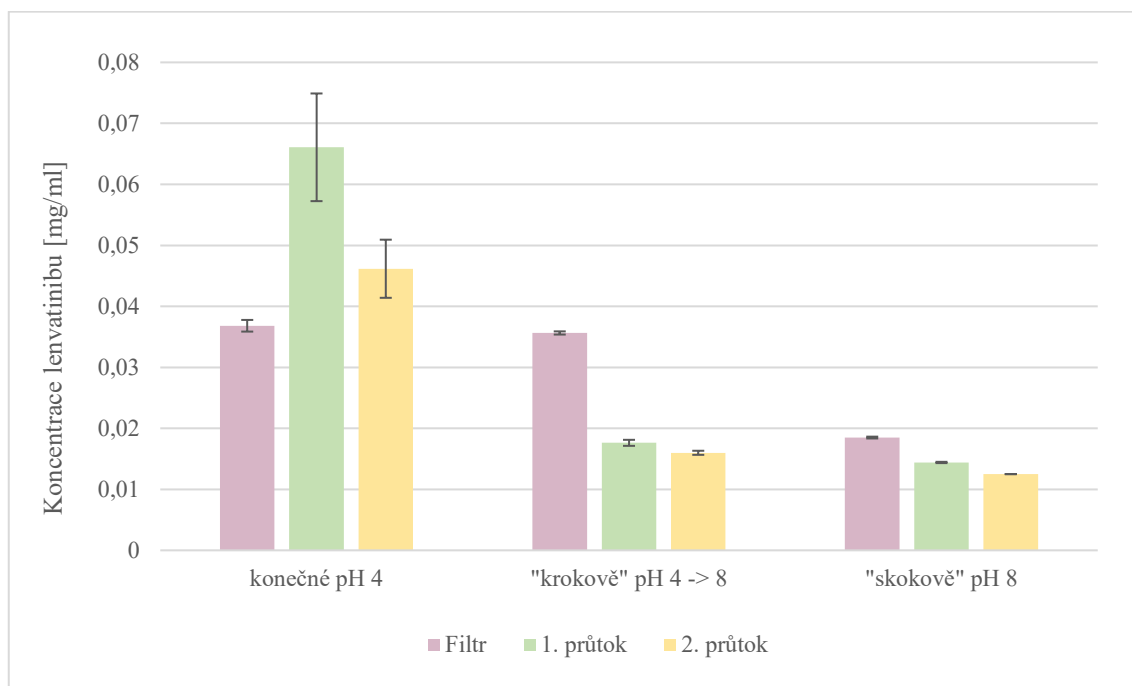


Obr: 5.7: Kontroly enkapsulace lenvatinibu rozpuštěného v EtOH do apoferritinu.

Jako zásobní roztok byl použit lenvatinib rozpuštěný v EtOH o koncentraci 0,5 mg/ml. Do první kontroly nebyl přidán NaOH, pH roztoku nebylo zvýšeno a disociovaný apoferritin se neseskládal, nevytvořila se tedy centrální dutina, ve které by bylo léčivo enkapsulováno. Ve druhé kontrole nebyl apoferritin přítomný. Třetí kontrola byla bez přídavku HCl, nedošlo tak ke snížení pH a disociaci apoferritinu na podjednotky. Růžovou barvou znázorněné hodnoty odpovídají lenvatinibu, který neprošel přes filtrační membrány, tedy byl vázán na apoferritinové nanočástice. Průtoky (zelená a žlutá) značí hodnoty koncentrací lenvatinibu, nebyl navázán na apoferritin a v průběhu filtrace prošel přes membránu.

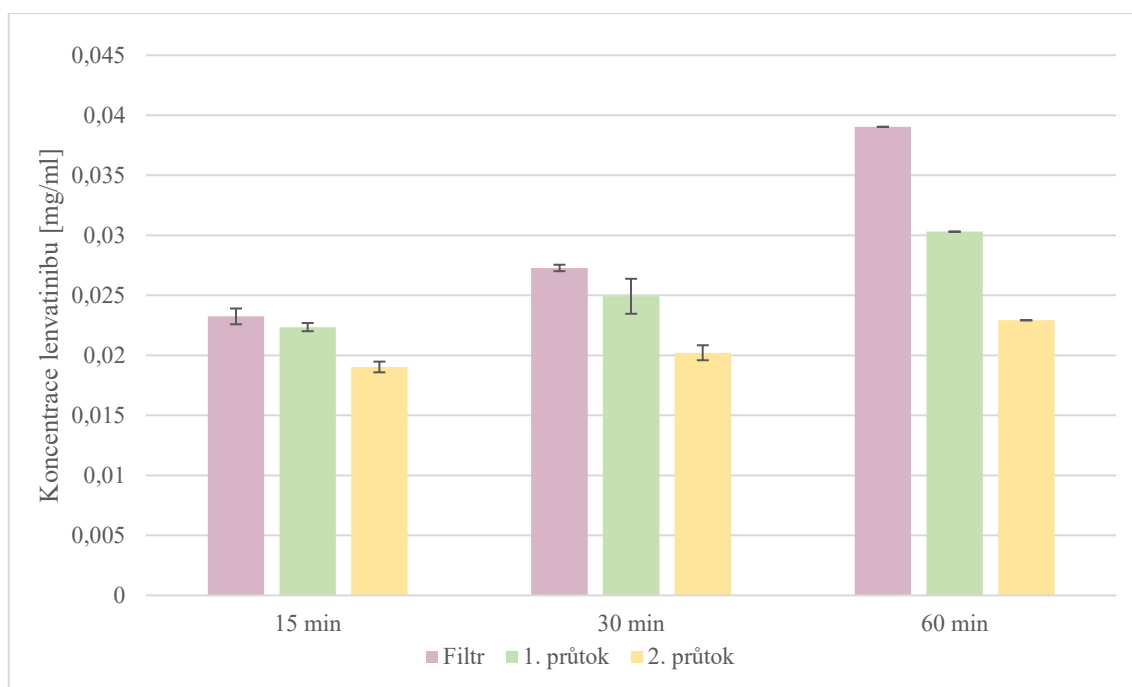
5.1.3 Optimalizace přípravy ApoLen

Jak je uvedeno v předcházející kapitole, tak lenvatinib kvůli svému náboji při bazickém pH se jen neochotně enkapsuluje do centrální dutiny apoferritinu, kvůli jejímu, taktéž zápornému, náboji. Proto byla provedena série optimalizačních pokusů, jak je uvedeno v kapitole 4.3.1.3 *Optimalizace přípravy ApoLen (str. 30)*. Nejprve byl testován způsob zvyšování pH, který by byl nejvhodnější pro enkapsulaci lenvatinibu, viz. *Obr. 5.8*.



Obr. 5.8: Optimalizace způsobu zvyšování pH při enkapsulaci lenvatinibu do apoferritinových nanočástic. Jako zásobní roztok byl použit lenvatinib v DMSO (5 mg/ml). V první sadě vzorků bylo jako konečné pH zvoleno pH=4, tedy taková hodnota, při které je lenvatinib stále kladně nabitý a zároveň apoferritin se začíná pomalu seskládat. V druhé sadě vzorků bylo pH zvýšeno na hodnotu 4 a po patnáctiminutové inkubaci zvýšeno do bazických hodnot. Ve třetí sadě bylo pH zvýšeno rovnou na bazické hodnoty. Růžovou barvou jsou znázorněny koncentrace lenvatinibu, který zůstal ve filtru, tedy byl enkapsulován do apoferritinu. Průtoky (značeny zelenou a žlutou barvou) naopak znázorňují lenvatinib, který filtrem prošel, byl tedy volný a do apoferritinu se neenkapsuloval.

Jak je na *Obr. 5.8* vidět, tak více lenvatinibu bylo do apoferritinu enkapsulováno při „krokové“ změně pH a při konečném pH 4 než při „skokovém“ zvýšení pH na hodnotu pH = 8. V další sérii pokusů se proto zkoumala závislost efektivity enkapsulace na délce inkubace vzorků při pH = 4. Získané hodnoty jsou uvedeny na *Obr. 5.9 (str. 46)*.



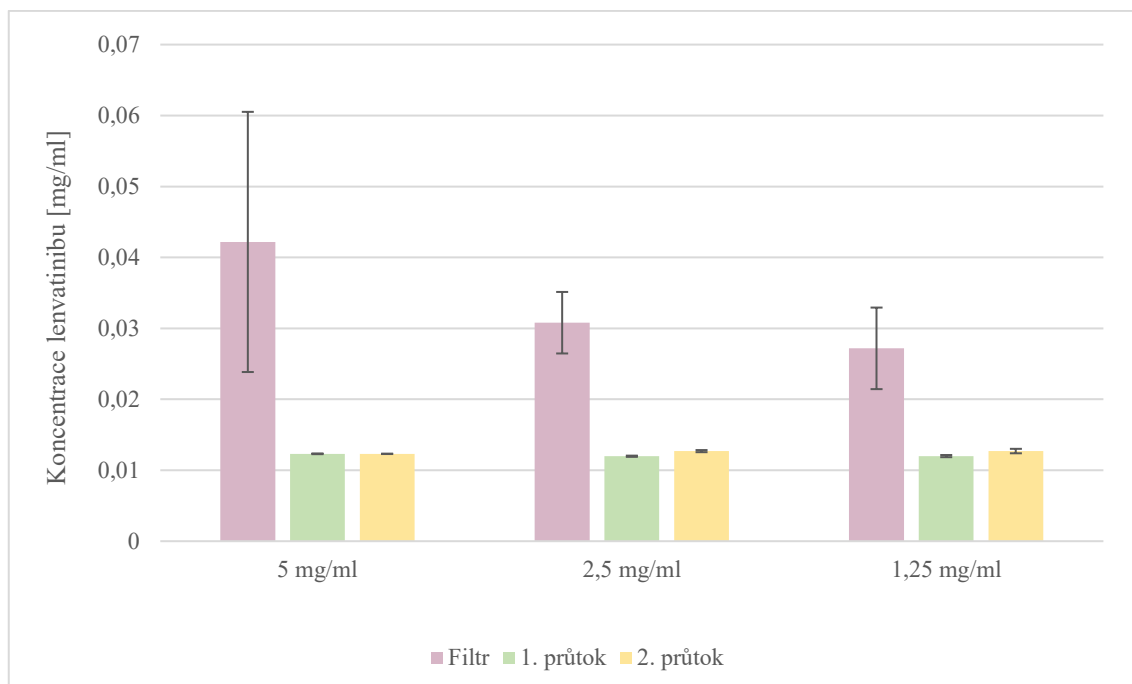
Obr. 5.9: Optimalizace délky inkubace vzorků při pH = 4 před jeho zvýšením do bazických hodnot. Jako zásobní roztok byl použit roztok lenvatinibu v DMSO (5 mg/ml). První sada vzorků byla ponechána inkubovat 15 min při pH=4, druhá sada 30 min a třetí 60 min. Růžovou barvou jsou znázorněny koncentrace lenvatinibu ve filtr, tedy lenvatinibu enkapsulovaného do apoferritinu. Průtoky (značeny zelenou a žlutou barvou) znázorňují lenvatinib volný, který se do apoferritinu se neenkapsuloval.

Z Obr. 5.9 vidíme, že nejvíce lenvatinibu bylo enkapsulováno do apoferritinových nanočástic při 60 min inkubaci při pH = 4, apoferritin má tedy dostatek času se začít skládat, přestože ještě nevytvoří svou nativní strukturu, ale lenvatinib není s kladným nábojem centrální dutinou apoferritinu odpuzován.

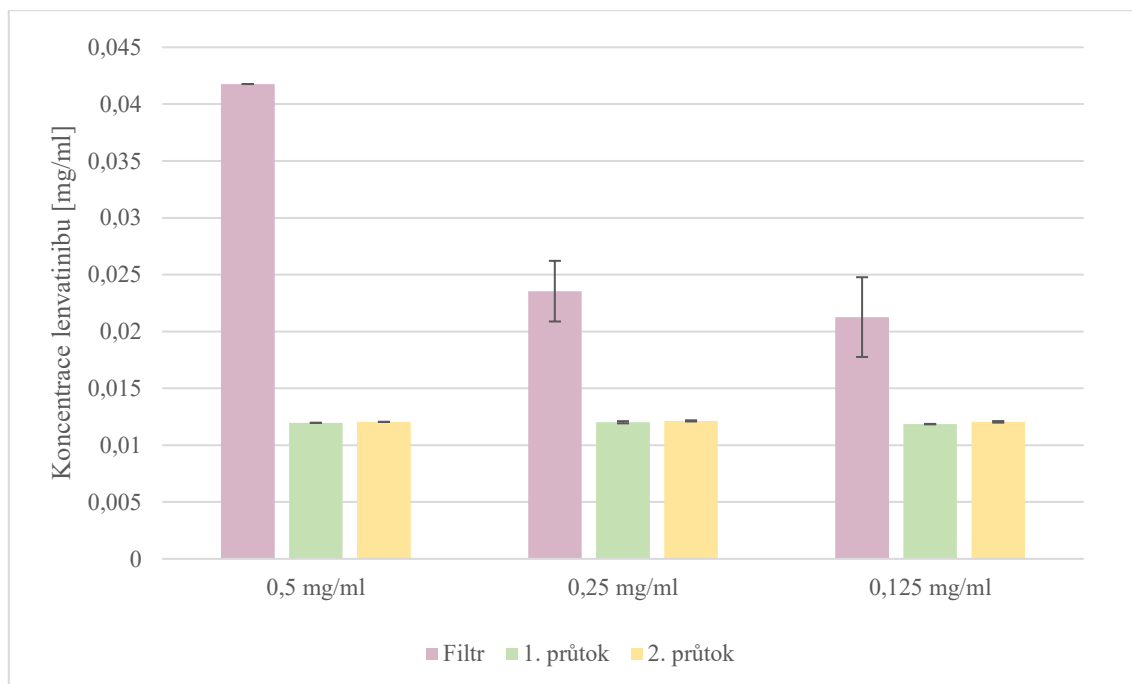
Jakožto optimalizovaná příprava byla vybrána ta, kdy se pH ve vzorcích zvyšuje „krokově“, nejprve tedy na pH = 4, kde se nechají vzorky 60 min inkubovat, a následně na pH = 8.

5.1.4 Optimalizovaná příprava ApoLen

Po optimalizaci přípravy ApoLen byly provedeny série pokusů zaměřené pro zjištění závislosti mezi mírou enkapsulace lenvatinibu do apoferritinu na koncentraci zásobního roztoku lenvatinibu, viz kapitola 4.3.1.4 *Optimalizovaná příprava ApoLen (str. 31)*. Na *Obr. 5.10* jsou uvedeny výsledky pro zásobní roztoky lenvatinibu rozpuštěného v DMSO o různých koncentracích, na *Obr. 5.11 (str. 48)* výsledky pro zásobní roztoky lenvatinibu rozpuštěného v EtOH o různých koncentracích.

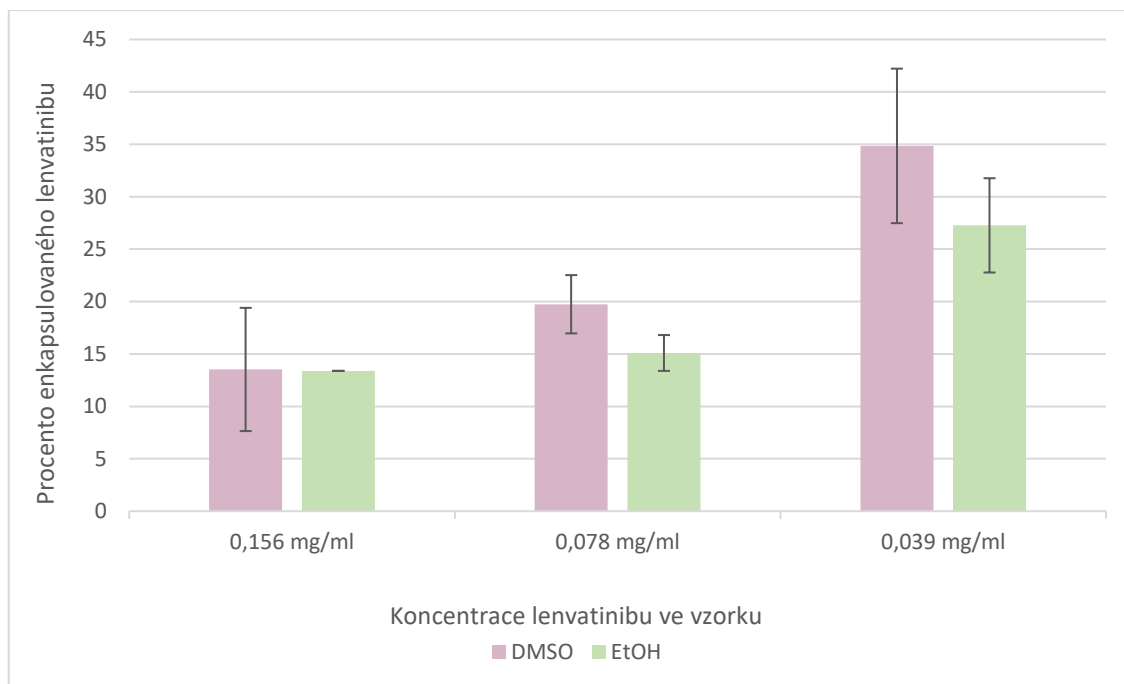


Obr. 5.10: Koncentrace lenvatinibu v ApoLen v závislosti na koncentraci zásobních roztoků lenvatinibu rozpuštěného v DMSO. Teoretická celková koncentrace lenvatinibu ve vzorcích, které byly připraveny ze zásobního roztoku lenvatinibu v DMSO o koncentraci 5 mg/ml by byla 0,156 mg/ml, o koncentraci 2,5 mg/ml by byla 0,078 mg/ml a o koncentraci 1,25 mg/ml 0,039 mg/ml. Koncentrace lenvatinibu znázorněné růžovou barvou odpovídají lenvatinibu enkapsulovaného do apoferritinu. Průtoky (zelená a žlutá barva) naopak znázorňují lenvatinib, který byl volný a do apoferritinu se neenkapsuloval.



Obr.: 5.11: Koncentrace lenvatinibu v ApoLen v závislosti na koncentraci zásobních roztoků lenvatinibu rozpuštěného v EtOH. Teoretická celková koncentrace lenvatinibu ve vzorcích, které byly připraveny ze zásobního roztoku lenvatinibu v EtOH o koncentraci 0,5 mg/ml by byla 0,156 mg/ml, o koncentraci 0,25 mg/ml by byla 0,078 mg/ml a o koncentraci 0,125 mg/ml 0,039 mg/ml. Růžové hodnoty znázorňují koncentraci lenvatinibu v apoferritinových nanočásticích. Zelené a žluté hodnoty odpovídají koncentracím lenvatinibu v průtocích, tedy neenkapsulovanému lenvatinibu.

Ze získaných koncentrací byla způsobem uvedeným v kapitole 5.1.1 *Příprava nanočástic ApoLen (str. 40)* vypočítána procentuální úspěšnost enkapsulace lenvatinibu do apoferritinu. Tyto hodnoty jsou uvedeny na Obr. 5.12 (str. 49).

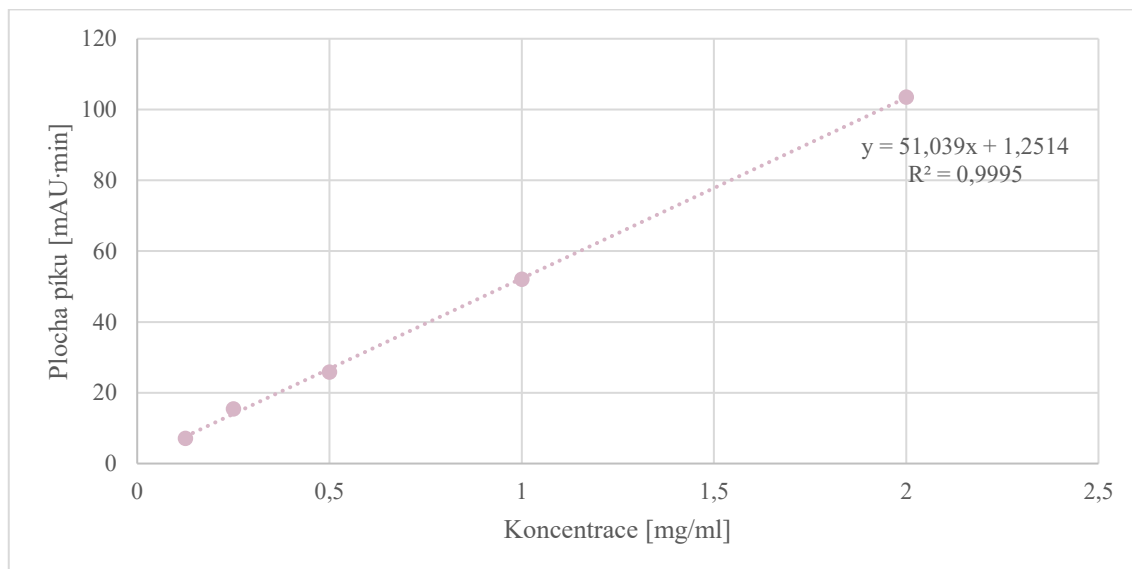


Obr. 5.12: Účinnost enkapsulace lenvatinibu do apoferritinových nanočástic v závislosti na výchozí koncentraci lenvatinibu ve vzorku a jeho rozpouštědla po optimalizaci přípravy ApoLen. Růžovou barvou vynesené hodnoty odpovídají účinnosti enkapsulace lenvatinibu rozpuštěného v DMSO. Zelenou barvou jsou hodnoty pro lenvatinib rozpuštěný v EtOH.

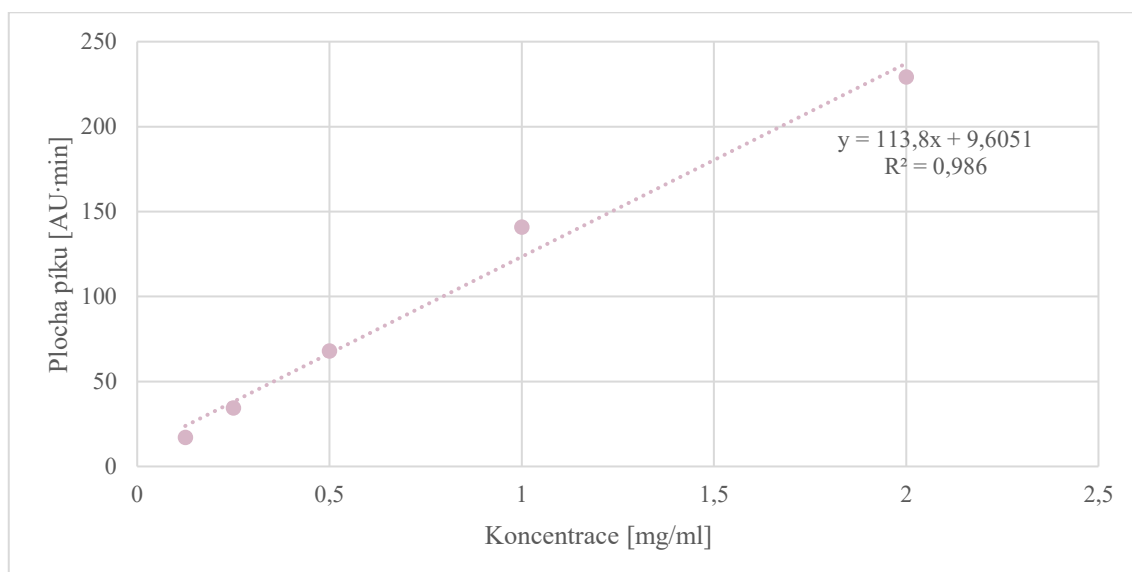
V porovnání s *Obr. 5.5 (str. 42)* vidíme, že účinnost enkapsulace lenvatinibu do apoferritinových nanočástic se po optimalizaci jejich přípravy zvýšila, a to až na dvojnásobnou hodnotu v případě nejnižší použité koncentrace, nicméně stále nedosahuje dostatečně vysokých hodnot.

5.2 ApoSunitinib a ApoAdavosertib

V kapitole 4.3.2.1 *Aktivní enkapsulace (str. 32)* je uveden postup přípravy kalibračních roztoků potřebných pro sestavení kalibračních přímek. Kalibrační přímeky jsou uvedeny na Obr. 5.13 a 5.14.

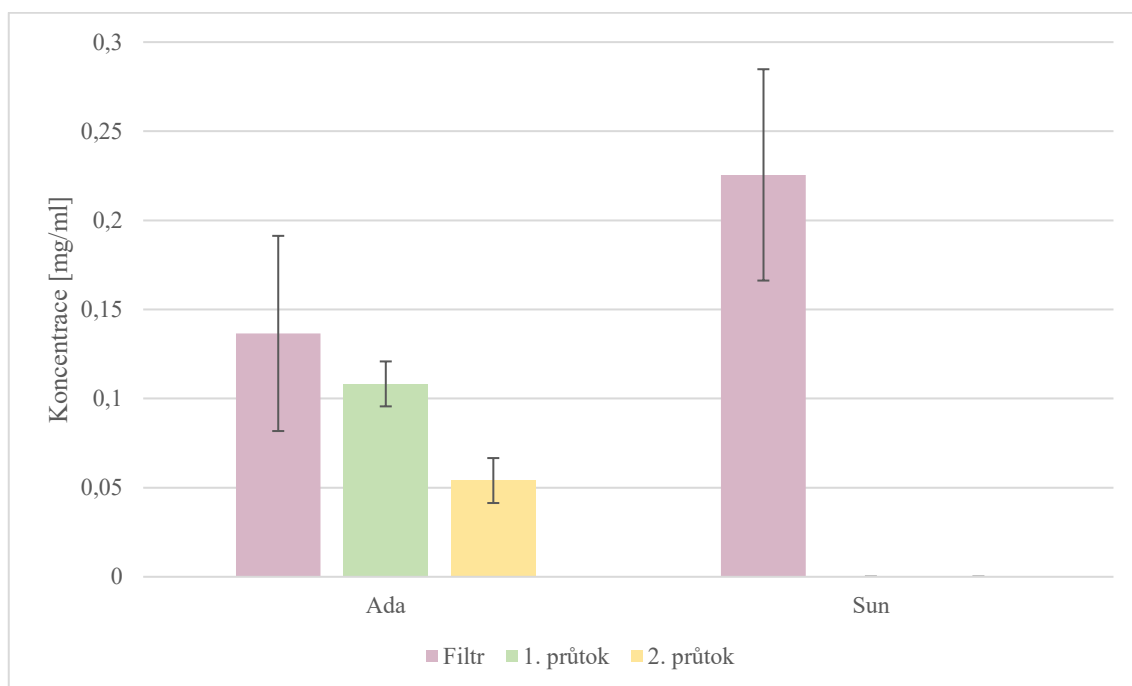


Obr. 5.13: Kalibrační přímková závislost absorbance adavosertibu na jeho hmotnostní koncentraci.



Obr. 5.14: Kalibrační přímková závislost absorbance sunitinibu na jeho hmotnostní koncentraci.

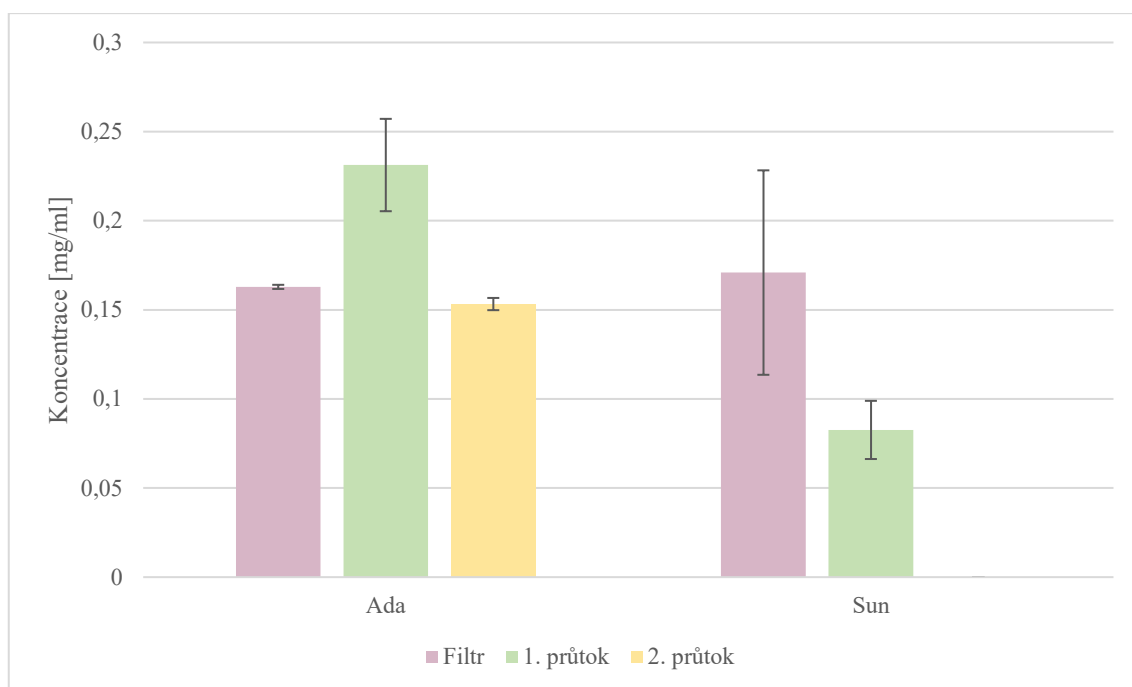
Postupem, který je uveden v kapitole 4.3.2.1 *Aktivní enkapsulace (str. 32)* byly připraveny částice ApoAdavosertibu a Apo Sunitinibu. Koncentrace obou léčiv enkapsulovaných do apoferritinových nanočástic jsou uvedeny na *Obr. 5.15*.



Obr. 5.15: Koncentrace adavosertibu a sunitinibu v nanočásticích ApoAda a ApoSun připravených aktivní enkapsulací. Teoretická celková koncentrace daného léčiva ve vzorku by byla rovna 0,313 mg/ml. Růžovou barvou jsou znázorněny koncentrace léčiva, které zůstalo ve filtru, tedy bylo enkapsulováno do apoferritinu. Průtoky (značeny zelenou a žlutou barvou) znázorňují léčivo, které filtrem prošel, do apoferritinu se tedy neenkapsulovalo.

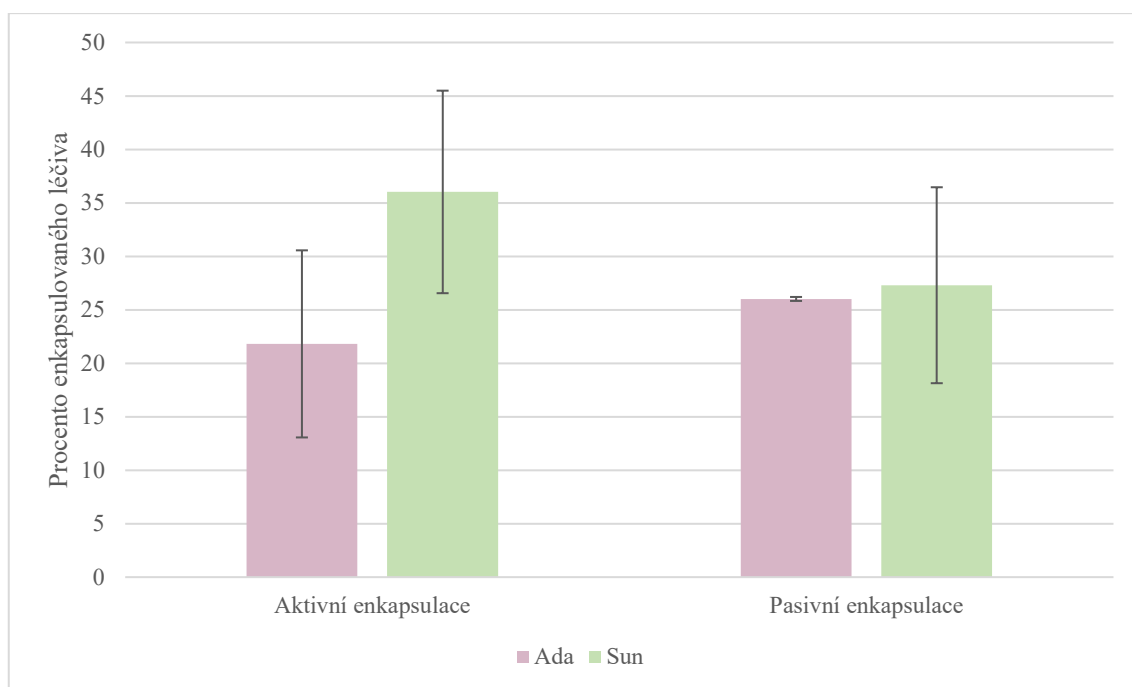
Na *Obr. 5.15* vidíme, že sunitinib i adavosertib se do apoferritinových nanočástic enkapsulují. U sunitinib se nevyskytuje žádná jeho koncentrace v průtocích, tedy neenkapsulovaný sunitinib se vysrážel v průběhu centrifugace, do filtru byl tedy přenesen supernatant obsahující pouze sunitinib vázaný v ApoSun.

Jako další byl proveden pokus na pasivní enkapsulaci výše zmíněných léčiv, viz kapitola 4.3.2.2 *Pasivní enkapsulace (str. 33)*. Výsledné hodnoty jsou uvedeny na *Obr. 5.16 (str. 52)*. Oproti aktivní enkapsulaci léčiv můžeme vidět, že koncentrace sunitinibu v prvním průtoku není nulová, tedy ne veškerý se vysráží. Zároveň je snížena koncentrace enkapsulovaného sunitinibu. Koncentrace adavosertibu v částicích ApoAda je průměrně při pasivní enkapsulaci o něco vyšší než při aktivní.



Obr. 5.16: Koncentrace adavosertibu a sunitinibu v nanočásticích ApoAda a ApoSun připravených pasivní enkapsulací. Teoretická celková koncentrace daného léčiva ve vzorku by byla rovna 0,313 mg/ml. Růžovou barvou jsou znázorněny koncentrace léčiva, které zůstalo ve filtru, tedy bylo enkapsulováno do apoferritinu. Průtoky (značeny zelenou a žlutou barvou) znázorňují léčivo, které filtrem prošel, do apoferritinu se tedy neenkapsulovalo.

Teoretická celková koncentrace adavosertibu ve vzorcích, které byly připraveny, by byla 0,313 mg/ml. Po vydělení koncentrací léčiv enkapsulovaných v apoferritinu jejich celkovou koncentrací ve vzorku získáme hodnoty, které po vynásobení stem a vydělení dvěma budou udávat, kolik procent léčiva se enkapsulovalo. Tyto hodnoty jsou uvedeny na *Obr. 5.17 (str. 53)*. Účinnost enkapsulace adavosertibu a sunitinibu je vyšší než účinnost enkapsulace lenvatinibu, viz. *Obr. 5.5 (str. 42)*.



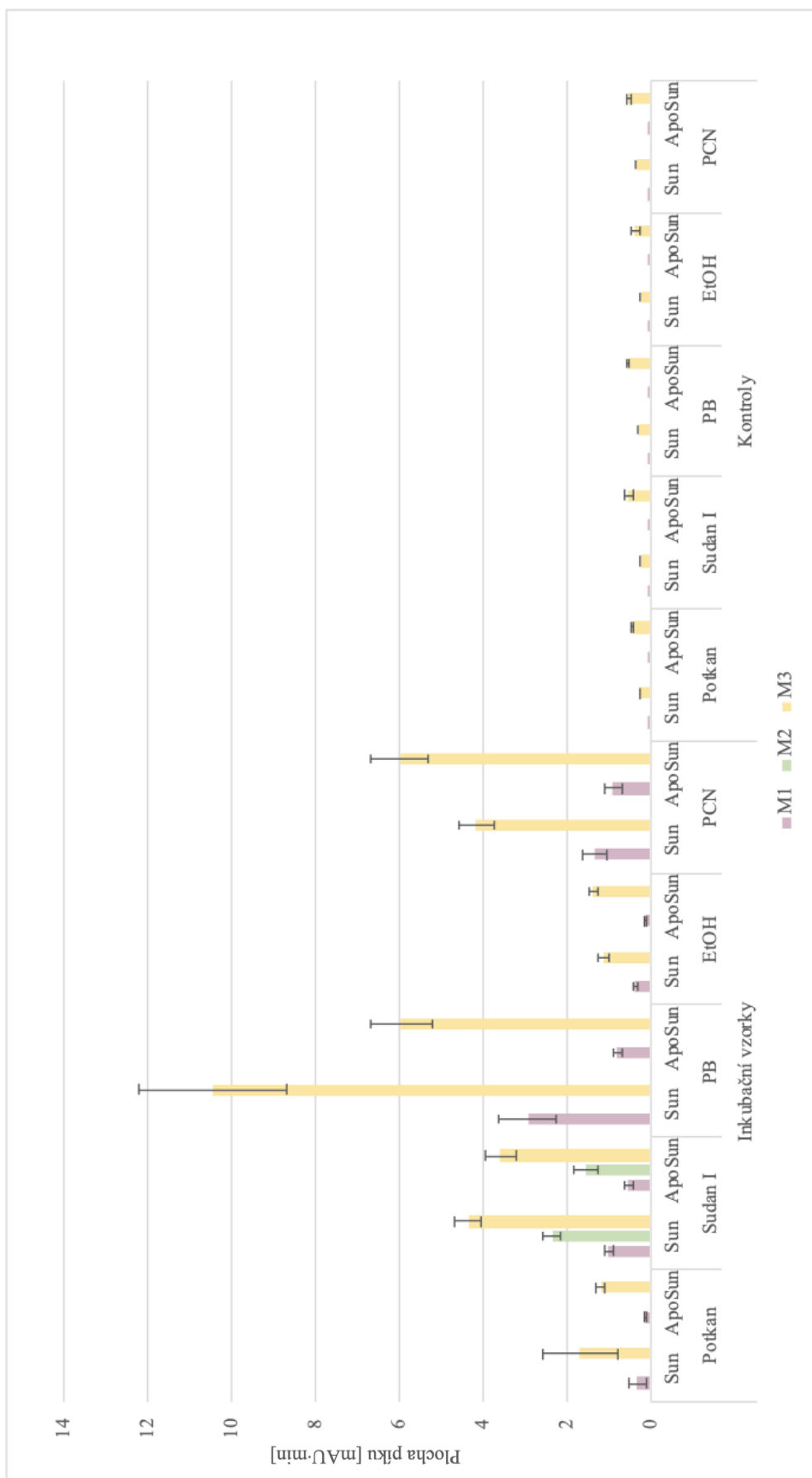
Obr. 5.17: Účinnost aktivní a pasivní enkapsulace adavosertibu a sunitinibu do apoferritinových nanočástic. Růžovou barvou jsou vyneseny hodnoty účinnosti enkapsulace adavosertibu. Zelenou barvou jsou hodnoty pro sunitinib.

Bylo zjištěno tedy, že adavosertib i sunitinib jsou vhodnějšími cytostatiky pro enkapsulaci do apoferritinových nanočástic než lenvatinib. Pro další pokusy byl vybrán sunitinib s ohledem na jeho účinnější enkapsulaci oproti adavosertibu.

5.2.1 Metabolismus Sun a ApoSun

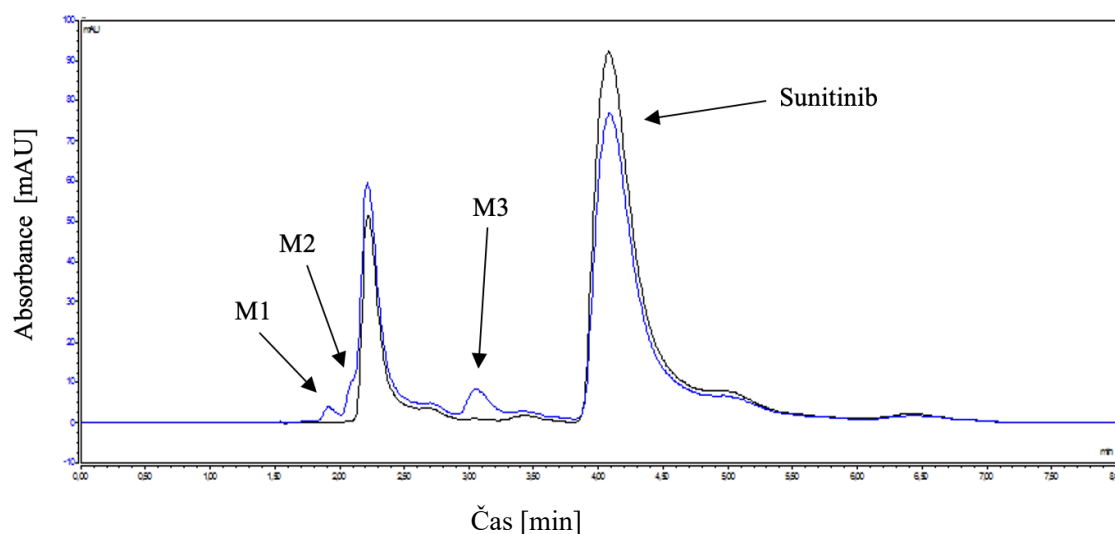
Postupem, který je uveden v kapitole 4.3.2.3 *Metabolismus Sun a ApoSun* (str. 33) byly připraveny vzorky pro zkoumání metabolismu volného sunitinibu a vázaného v nanočásticích ApoSun pomocí různých typů mikrosomů. Výsledky jsou uvedeny na Obr. 5.18 (str. 54).

Na tomto obrázku vidíme, že dochází k tvorbě dvou metabolitů sunitinibu jak u jeho volné, tak i vázané formy. Pouze u mikrosomální frakce potkanů premedikovaných Sudanem I se vyskytují tři metabolity sunitinibu. Ze získaných hodnot se však nedá vyvodit obecný závěr ohledně porovnání tvorby metabolitů volným sunitinibem vs. ApoSun.



Obr. 5.18: Porovnání metabolismu sunitinibu a metabolismu nanočástic ApoSun pomocí mikrosomálních frakcí. Jednotlivé metabolity sunitinibu jsou barevně odlišeny.

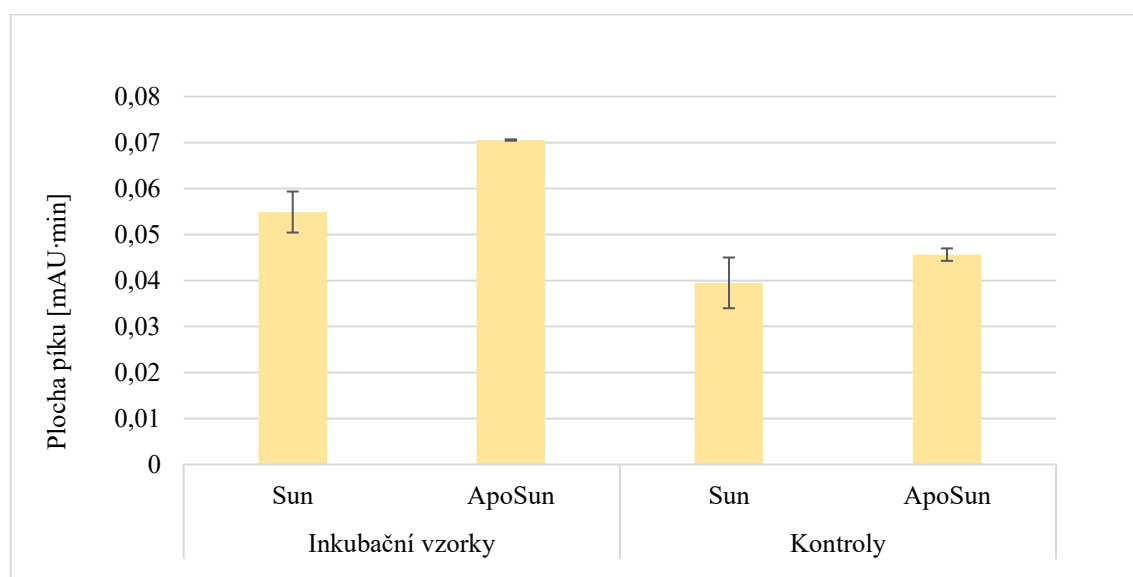
Na Obr. 5.19 jsou dále ukázány chromatografické záznamy kontroly a vzorku, který byl metabolisován pomocí mikrosomální frakce potkanů premedikovaných Sudanem I.



Obr. 5.19: Chromatografický záznam metabolismu sunitinibu mikrosomální frakcí potkanů premedikovaných Sudanem I. Černou barvou je značen kontrolní vzorek, ve kterém nedocházelo k biotransformaci sunitinibu, modře je značen vzorek po biotransformaci pomocí mikrosomální frakce potkanů premedikovaných Sudanem I.

5.2.2 Metabolismus Sun a ApoSun cytochromy enkapsulovanými v liposomálních nanočásticích

V kapitole 4.3.2.4 *Metabolismus Sun a ApoSun cytochromy enkapsulovanými v liposomálních nanočásticích* (str. 36) byla popsána příprava těchto vzorků. Výsledky jsou znázorněny na Obr. 5.20.

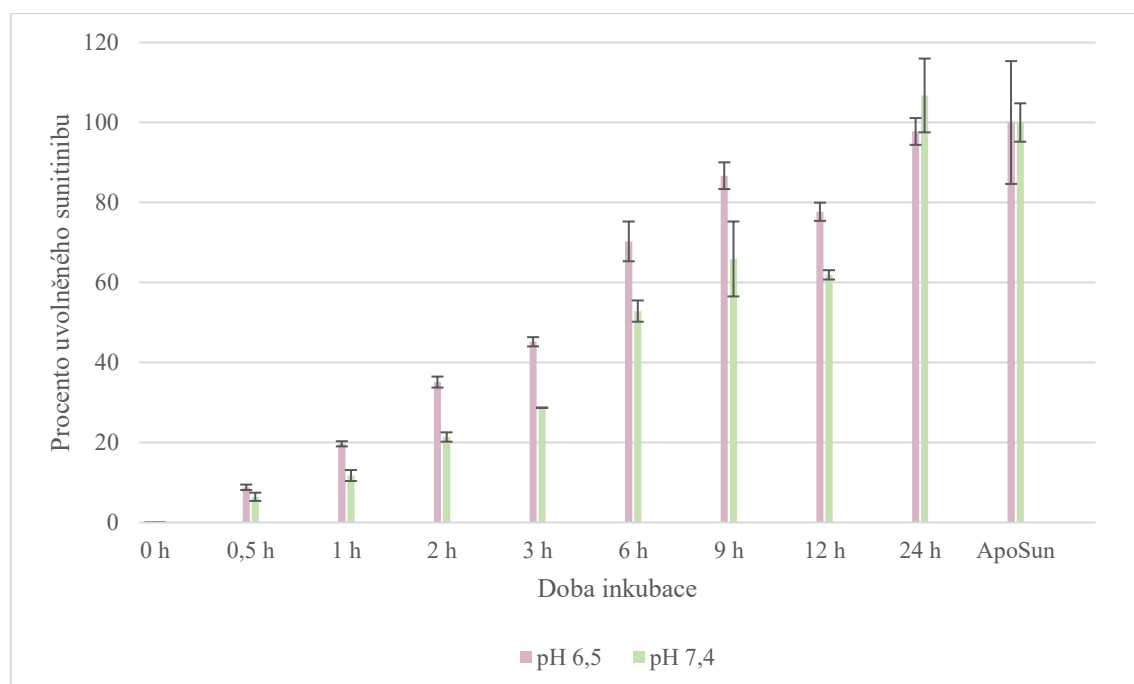


Obr. 5.20: Metabolismus Sun a ApoSun enzymy enkapsulovanými v liposomech.

Vidíme, že oproti metabolismu sunitinibu pomocí mikrosomálních frakcí (viz předchozí kapitola) dochází k tvorbě pouze jednoho metabolitu, který se ale objevuje i v kontrolních vzorcích, tedy přeměna sunitinibu je do jisté míry procesem samovolným. Zároveň více metabolitu vzniká v případě, že léčivo je vázáno ve formě ApoSun, což může být způsobeno jeho interakcí s apoferritinovým proteinem.

5.2.3 Kinetika uvolňování sunitinibu z apoferritinu

Byla měřena kinetika uvolňování sunitinibu z apoferritinových nanočástic tak, jak je popsáno v kapitole 4.3.2.5 *Kinetika uvolňování sunitinibu z apoferritinu* (str. 37). Na Obr. 5.21 je znázorněno procento uvolněného sunitinibu v závislosti na čase a pH roztoku. Vidíme, že sunitinib se rychleji uvolňuje z apoferritinu při nižším pH okolí, čehož je možno tedy využít při cílené protinádorové léčbě, jelikož okolí nádorové tkáně je díky Warburgově efektu kyselější. Pokles po 12 hodinách inkubace je nejspíše způsoben nedostatečným promícháním odebíraného roztoku z dialyzační zkumavky.



Obr. 5.21: Uvolňování sunitinibu z nanočástic ApoSun v závislosti na čase a pH roztoku. Poslední sloupeček „ApoSun“ odpovídá jak sunitinibu uvolněnému, tak stále navázanému, tedy teoretickým sto procentům.

6. Diskuze

Enkapsulace cytostatik do nanočásticových transportérů je v současnosti jedním ze směrů protinádorové léčby. Tato práce je zaměřena na enkapsulaci tyrosinkinasových inhibitorů (lenvatinibu, adavosertibu a sunitinibu) do proteinu (apoferritinu) a následný metabolismus takto navázaného léčiva pomocí enzymů volných i vázaných v liposomech.

Lenvatinib je cytostatikum používané pro léčbu štítné žlázy⁶⁶, jehož enkapsulace do apoferritinu byla v poslední době hojně zkoumána^{81,82}. Přestože tyto studie provedené v minulých letech prokázovaly, že lenvatinib není vhodnou molekulou pro enkapsulaci do apoferritinu, jelikož je kvůli své hodnotě pK_a (5,05) odpuzován negativně nabitou centrální dutinou apoferritinu při jeho opětovném skládání do nativní struktury a zároveň při vyšším pH již není rozpustný a precipituje, byla provedena série experimentů v rámci této diplomové práce ověřující tuto skutečnost a následně optimalizace přípravy ApoLen. Optimalizace přípravy ApoLen spočívala v nalezení vhodného zvyšování pH tak, aby apoferritin se již skládal, ale lenvatinib byl stále rozpustný a s kladným nábojem. Po provedení optimalizace přípravy ApoLen došlo ke zvýšení účinnosti enkapsulace o 20–40 %, přesto ale není lenvatinib vhodným léčivem pro enkapsulaci do apoferritinových nanočástic.

V minulosti byla provedena i enkapsulace lenvatinibu do liposomů, která sice byla úspěšnější než enkapsulace do apoferritinu, ale získaný výtěžek byl tak nízký, že nemohly být dále využity⁸¹. Byla provedena i studie pasivní vs. aktivní enkapsulace lenvatinibu, jejíž výsledky sice naznačují stejnou efektivitu enkapsulace, ale pasivně vytvořené nanočástice ApoLen vykazují značně vyšší protinádorovou aktivitu nejspíš díky stabilnímu pH v průběhu jejich přípravy⁸².

Přes neúspěšnou přípravu nanočástic ApoLen, nemůže být pochyb, že apoferritin je vhodným nanotransportérem pro cytostatika. Již se úspěšně povedly připravit částice apoferritin-ellipticin, ve kterých je ellipticin vázaný v centrální dutině, či na povrchu apoferritinu^{83,84}. Mimo ellipticinu byly také úspěšně připraveny například částice apoferritin-vandetanib a apoferritin-doxorubicin^{43,85}. Neúspěšnost navázání lenvatinibu do centrální dutiny tohoto proteinového nanotransportéru není tedy důkazem nevhodnosti použití apoferritinu pro cílenou protinádorovou terapii.

Jelikož lenvatinib není vhodným léčivem pro enkapsulaci do apoferritinu, byla vybrána dvě další léčiva (adavosertib a sunitinib), která mají hodnotu pK_a vyšší. Podle předpokladu byla efektivita enkapsulace těchto cytostatik vyšší než lenvatinibu.

Můžeme tedy říci, že adavosertib i sunitinib jsou vhodnějšími cytostatiky pro vkládání do apoferritinových nanočástic, díky hodnotě jejich pK_a (adavosertib 13,27; sunitinib 8,95). Jejich náboj při bazickém pH je tedy stále kladný, či neutrální a léčiva tak nejsou odpuzována negativně nabitou centrální dutinou apoferritinu. Dalším důvodem je fakt, že obě léčiva mají lepší rozpustnost (sunitinibu $5\times$ a adavosertibu až $80\times$)⁸⁶⁻⁸⁸. Dále bylo zjištěno, že rozdíl mezi aktivní a pasivní enkapsulací těchto léčiv není nijak markantní, ale příprava těchto nanočástic se značně zjednoduší. Otázkou však zůstává, zda, stejně jako u lenvatinibu, nebude rozdíl v cytotoxicitě aktivně a pasivně připravených nanočástic ApoAda nebo ApoSun, jak bylo pozorováno u lenvatinibu⁸².

Sunitinib již byl úspěšně enkapsulován jak do liposomálních nanotransportérů, tak do polymerických micel^{89,90}. Jelikož adavosertib je léčivem do klinické praxe ještě nezavedeným, tak nejsou k dispozici žádné další studie zkoumající jeho enkapsulaci do nanotransportérů. Z výsledků této diplomové práce však plyne, že nejspíše bude vhodnějším cytostatikem pro enkapsulaci do apoferritinu než lenvatinib.

Jelikož efektivita enkapsulace sunitinibu byla vyšší než u adavosertibu navzdory teoretické vyšší rozpustnosti, pro pokusy zkoumající metabolismus cytostatik vázaných v apoferritinu pomocí volných i v liposomech vázaných biotransformačních enzymů byl vybrán právě sunitinib. Při studování metabolismu sunitinibu pomocí mikrosomálních frakcí nebyla pozorována žádná zákonitost týkající se rozdílu metabolismu enkapsulované a neenkapsulované formy léčiva. Můžeme konstatovat, že sunitinib je metabolisován jak volný, tak ve formě ApoSun. V případě použití mikrosomální frakce potkanů premedikovaných Sudanem I dochází ke vzniku tří metabolitů. Přestože v této práci nebyly metabolity identifikovány, můžeme na základě porovnání našeho chromatografického záznamu a výsledků předchozí studie říci, že nejspíše metabolit M1 odpovídá defluorovanému sunitinibu, metabolit M2 *N*-desethylsunitinibu a metabolit M3 oxidovanému sunitinibu⁷⁸. Struktury těchto metabolitů jsou uvedeny *Obr. 2.13 (str. 25)*.

Dále byl studován metabolismus sunitinibu pomocí CYP 1A1 vázaných v liposomálních nanočásticích. I v tomto případě došlo k biotransformaci sunitinibu, byť pouze za vzniku jednoho druhu metabolitu. Zároveň předpokládáme, že do určité míry je přeměna sunitinibu na vzniklý metabolit procesem samovolným. V případě ApoSun je množství vzniklého metabolitu vyšší, za což nejspíše může být zodpovědná jeho interakce s proteinovým nanotransportérem (apoferritinem).

V minulosti byl studován metabolismus dalšího cytostatika, ellipticinu, v apoferritinu pomocí CYP 3A4. Docházelo k mírně zvýšenému vzniku metabolitů v případě volné formy ellipticinu oproti formě apoferritin-ellipticin⁸³. Avšak při metabolisování ellipticinu v jeho volné i enkapsulované formě pomocí mikrosomálních frakcí došlo k až dvounásobnému nárůstu tvorby metabolitů u formy apoferritin-ellipticin, nejspíše proto, že volný ellipticin je ve vodném prostředí špatně rozpustný, ale ve formě apoferritin-ellipticin je cytostatikum uchováno v hydrofobní dutině a uvolněno až v mikrosomálním systému⁹¹. V případě studia volného a vázaného doxorubicinu do apoferritinové dutiny bylo zjištěno, že Apo-kavita seskládaná okolo tohoto cytostatika nemá téměř žádný vliv na biotransformaci doxorubicinu pomocí mikrosomálních frakcí⁹¹.

Zdá se tedy, že proteinová struktura obklopující cytostatika má pouze malý vliv na jejich metabolismus pomocí mikrosomálních frakcí. Spíše než, že by zabráňovala předčasnému metabolisování léčiv, tak pro jejich ve vodném prostředí špatně rozpustné zástupce tvoří hydrofobní prostředí, díky čemuž pak léčivo neprecipituje a je snáze metabolisováno v přítomnosti mikrosomálních frakcí. Nejspíše tedy apoferritin nebude vhodným nanotransportérem pro enkapsulaci cytostatik v jejich pro-aktivní formě v naději, že k jejich aktivaci pomocí příslušných enzymů dojde až v místě nádoru díky uvolnění léčiva z Apo-kavity. Tato hypotéza ale potřebuje ještě další zkoumání.

Nakonec bylo provedeno měření kinetiky uvolňování sunitinibu z apoferritinu v závislosti na čase. Bylo zjištěno, že cytostatikum se rychleji uvolňuje v prostředí o nižším pH (6,5) oproti fyziologickému pH 7,4. Této skutečnosti se dá využívat právě při cílené protinádorové léčbě, kdy větší množství sunitinibu by bylo uvolněno v okolí nádoru než ve zdravé tkáni. V případě již výše diskutovaného ellipticinu enkapsulovaného taktéž v apoferritinu dochází také k rychlejšímu uvolňování z centrální dutiny při pH 6,5 oproti pH 7,4. Na rozdíl od nanočástic ApoSun ani po 48 hodinách nedošlo k uvolnění veškerého ellipticinu (v prostředí o pH 6,6 k uvolnění 80 %; o pH 7,4 k uvolnění 20 %) ⁸³. Ellipticin se tedy v tomto ohledu jeví jako lepší cytostatikum pro enkapsulaci do apoferritinu.

7. Závěr

Výsledky měření, která byla provedena a popsána více lze shrnout do následujících bodů:

- 1) Ke zvýšení efektivity enkapsulace lenvatinibu dojde, pokud zvyšování pH je prováděno „dvoukrokově“: nejprve na hodnotu pH 4, při kterém je ponecháno inkubovat po dobu 60 min, a následně nad hodnotu pH 8. Nicméně i přes zvýšení efektivity enkapsulace není lenvatinib vhodným cytostatikem pro enkapsulaci do apoferritinu kvůli jeho hodnotě pK_a .
- 2) Adavosertib i sunitinib jsou vhodnými cytostatiky pro enkapsulaci do apoferritinu, a to jak aktivním, tak pasivním způsobem.
- 3) Pomocí mikrosomálních frakcí dochází k metabolismu sunitinibu, a to jak volného, tak vázaného ve formě ApoSun. Jsou tvořeny dva metabolity, v případě mikrosomální frakce potkanů premedikovaných Sudanem I dokonce tři metabolity.
- 4) Cytochromy P450 1A1 vázané v liposomálních nanočásticích metabolisují sunitinib i ApoSunitinib.
- 5) V prostředí o pH 6,5 dochází k rychlejšímu uvolňování sunitinibu z apoferritinu, než v prostředí o pH 7,4. V obou případech je veškerý sunitinib uvolněn do 24 hodin.

Seznam citované literatury

1. Český statistický úřad. *Příčiny úmrtí v ČR v letech 2010–2019*. Dostupné z URL: <<https://www.czso.cz/csu/czso/ceska-republika-podle-pohlavi-a-veku-2010-2019>> [cit. 19.11.2020].
2. Nečas, E.: Patofyziologie nádorového bujení. In *Patofyziologie pro nelékařské směry*. Vokurka, M. (Ed.). Praha: Karolinum Press, 2014, p. 59–64.
3. Bártová, J.: Nádory. In *Přehled patologie*. Bártová, J. (Ed.). Praha: Karolinum Press, 2015, p. 58–66.
4. Sommerová, L., Ondroušková, E. & Hrstka, R.: Nádorové buňky jako dynamický systém – molekulární a fenotypové změny v průběhu vzniku, progresu a šíření nádoru. *Klin Onkol.* **29**:4, 4S6 – 4S11 (2016).
5. Klener, P. & Klener, P.: *Nová protinádorová léčba a léčebné strategie v onkologii*. Praha: Grada Publishing a.s., 2009.
6. Xu, G.; McLeod, H. L.: Strategies for enzyme/prodrug cancer therapy. *Clin Cancer Res.* **7**:11, 3314–3324 (2001).
7. Gerber, D. E.: Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *Am Fam Physician.* **77**:3, 311–319 (2008).
8. Sorokin, P.: Mylotarg approved for patients with CD33+ acute myeloid leukemia. *Clin J Oncol Nurs.* **4**:6, 279–280 (2000).
9. Lode, H. N.; Xiang, R.; Becker, J. C.; Gillies, S. D.; Reisfeld, R. A.: Immunocytokines: a promising approach to cancer immunotherapy. *Pharmacol Ther.* **80**:3, 277–292 (1998).
10. Wolfe, L. A.; Mullin, R. J.; Laethem, R.; Blumenkopf, T. A.; Cory, M.; Miller, J. F.; Keith, B. R.; Humphreys, J.; Smith, G.K.: Antibody-directed enzyme prodrug therapy with the T268G mutant of human carboxypeptidase A1: in vitro and in vivo studies with prodrugs of methotrexate and the thymidylate synthase inhibitors GW1031 and GW1843. *Bioconjug Chem.* **10**:1, 38–48 (1999).
11. Padma, V. V.: An overview of targeted cancer therapy. *Biomedicine (Taipei).* **5**:4, (2015).

12. Springer, C. J.; Niculescu-Duvaz, I.: Prodrug-activating systems in suicide gene therapy. *J Clin Invest.* **105**:9, 1161–1167 (2000).
13. Rainov, N. G.; Dobberstein, K. U.; Sena-Esteves, M.; Herrlinger, U.; Kramm, C. M.; Philpot, R. M.; Hilton, J.; Chiocca, E. A.; Breakefield, X. O.: New prodrug activation gene therapy for cancer using cytochrome P450 4B1 and 2-aminoanthracene/4-ipomeanol. *Hum Gene Ther.* **9**:9, 1261–1273 (1998).
14. Niculescu-Duvaz, I.; Spooner, R.; Marais, R.; Springer, C. J.: Gene-directed enzyme prodrug therapy. *Bioconjug Chem.* **9**:1, 4–22 (1998).
15. Friedlos, F.; Court, S.; Ford, M.; Denny, W. A.; Springer, C.: Gene-directed enzyme prodrug therapy: quantitative bystander cytotoxicity and DNA damage induced by CB1954 in cells expressing bacterial nitroreductase. *Gene Ther.* **5**:1, 105–112 (1998).
16. Nevozhay, D.; Kańska, U.; Budzyńska, R.; Boratyński, J.: Current status of research on conjugates and related drug delivery systems in the treatment of cancer and other diseases. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* **61**, 350–360 (2007).
17. Wilczewska, A. Z.; Niemirowicz, K.; Markiewicz, K. H.; Car, H.: Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacol Rep.* **64**:5, 1020–1037 (2012).
18. Ai, J.; Biazar, E.; Jafarpour, M.; Montazeri, M.; Majdi, A.; Aminifard, S.; Zafari, M.; Akbari, H. R.; Rad, H. G.: Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. *Int J Nanomedicine.* **6**, 1117–1127 (2011).
19. Dostálová, S.; Vaculovičová, M.; Adam, V.; Kizek, R.: Viry jako nanotransportéry léčiv. *J. Met. Nano.* **1**:1, 30-33 (2014).
20. Drbohlavová, J.; Chomoucká, J.; Adam, V.; Ryvolová, M.; Eckschlager, T.; Hubálek, J.; Kizek, R.: Nanocarriers for anticancer drugs--new trends in nanomedicine. *Curr Drug Metab.* **14**:5, 547–564 (2013).
21. Tokajuk, G.; Niemirowicz, K.; Deptuła, P.; Piktel, E.; Cieśluk, M.; Wilczewska, A. Z.; Dąbrowski, J. R.; Bucki, R.: Use of magnetic nanoparticles as a drug delivery system to improve chlorhexidine antimicrobial activity. *Int J Nanomedicine.* **12**, 7833–7846 (2017).

22. Heger, Z.; Eckschlager, T.; Stiborová, M.; Adam, V.; Zítka, O.; Kizek, R.: Modern nanomedicine in treatment of lung carcinomas. *Klin Onkol.* **28**:4, 245–250 (2015).
23. Zhang, W.; Zhang, Z.; Zhang, Y.: The application of carbon nanotubes in target drug delivery systems for cancer therapies. *Nanoscale Res Lett.* **6**:1, 555 (2011).
24. Aljabali, A. A. A.: Viral nanoparticles: A drug delivery platform. *J Pharm Toxicol.* **1**:1, 1-2 (2017).
25. Alavi, M.; Karimi, N.; Safaei, M.: Application of various types of liposomes in drug delivery systems. *Adv Pharm Bull.* **7**:1, 3–9 (2017).
26. Lee, J. S. Feijen, J.: Polymersomes for drug delivery: design, formation and characterization. *J Control Release.* **161**:2, 473–483 (2012).
27. Anajafi, T.; Mallik, S.: Polymersome-based drug-delivery strategies for cancer therapeutics. *Ther deliv.* **6**:4, 521-534 (2015).
28. Verma, D.; Gulati, N.; Kaul, S.; Mukherjee, S.; Nagaich, U.: Protein Based Nanostructures for Drug Delivery. *J Pharm (Cairo).* **16**, (2018).
29. Lohcharoenkal, W.; Wang, L.; Chen, Y. C.; Rojanasakul, Y.: Protein nanoparticles as drug delivery carriers for cancer therapy. *BioMed Res Int.*, (2014).
30. Harrison, P. M.; Fischbach, F. A.; Hoy, T. G.; Haggis, G. H.: Ferric oxyhydroxide core of ferritin. *Nature* **216**:5121, 1188–1190 (1967).
31. Ullrich, A.; Horn, S.: Structural investigations on differently sized monodisperse iron oxide nanoparticles synthesized by remineralization of apoferritin molecules. *J Nanoparticle Res.* **15**:8, (2013).
32. Rouault, T. A.: The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat Chem Biol.* **2**:8, 406–414 (2006).
33. Uchida, M.; Kang, S.; Reichhardt, C.; Harlen, K.; Douglas, T.: the ferritin superfamily: Supramolecular templates for materials synthesis. *Biochim Biophys Acta.* **1800**:8, 834–845 (2010).
34. Meldrum, F. C.; Heywood, B. R.; Mann, S. Magnetoferritin: in vitro synthesis of a novel magnetic protein. *Science* **257**:5069, 522–523 (1992).

35. Zeth, K.; Hoiczky, E.; Okuda, M.: ferroxidase-mediated iron oxide biomineralization: Novel pathways to multifunctional nanoparticles. *Trends Biochem Sci.* **41**:2, 190–203 (2016).
36. Harrison, P. M.; Arosio, P.: The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta.* **1275**:3, 161–203 (1996).
37. Zang, J.; Chen, H.; Zhao, G.; Wang, F.; Ren, F.: Ferritin cage for encapsulation and delivery of bioactive nutrients: From structure, property to applications. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **57**:17, 3673–3683 (2017).
38. Uto, K.; Yamamoto, K.; Kishimoto, N.; Muraoka, M.: Characterization of stable, electroactive protein cage/synthetic polymer multilayer thin films prepared by layer-by-layer assembly. *J Nanoparticle Res.* **15**:4, (2013).
39. Granier, T.; Gallois, B.; Dautant, A.; d'Estaintot, B. L.; Précigoux, G.: Comparison of the structures of the cubic and tetragonal forms of horse-spleen apoferritin. *Acta Crystallogr. D.* **53**:5, 580–587 (1997).
40. Chasteen, N. D.; Harrison, P. M.: Mineralization in Ferritin: An efficient means of iron storage. *J Struct. Biol.* **126**:3, 182–194 (1999).
41. Jiang, B.; Fang, L.; Wu, K.; Yan, X.; Fan, K.: Ferritins as natural and artificial nanozymes for theranostics. *Theranostics* **10**:2, 687–706 (2020).
42. Lin, X.; Xie, J.; Niu, G.; Zhang, F.; Gao, H.; Yang, M.; Quan, Q.; Aronova, M. A.; Zhang, G.; Lee, S.; Leapman, R.; Chen, X.: Chimeric ferritin nanocages for multiple function loading and multimodal imaging. *Nano Lett.* **11**:2, 814–819 (2011).
43. Kilic, M. A.; Ozlu, E.; Calis, S.: A novel protein-based anticancer drug encapsulating nanosphere: apoferritin-doxorubicin complex. *J Biomed Nanotechnol.* **8**:3, 508–514 (2012).
44. Heger, Z.; Skaličková, S.; Zítka, O.; Adam, V.; Kizek, R. Apoferritin applications in nanomedicine. *Nanomedicine (Lond).* **9**:14, 2233–2245 (2014).
45. Hatziantoniou, S.; Demetzos, C.: Lipids of membranes: Chemistry, biological role and applications as drug carriers. In *Studies in Natural Products Chemistry*, vol. 34. Atta-ur-Rahman (Ed.). Amsterdam: Elsevier, 2008, p. 173–202.

46. Supplement Clinic. *LipoNano C with non-GMO Ingredients!* Dostupné z URL: <https://www.supplementclinic.com/product_p/662425055371-6.htm> [cit. 25. 7. 2021].
47. Gupta, P. K.; Jaiswal, A. K.; Kumar, V.; Verma, A.; Dwivedi, P.; Dube, A.; Mishra, P. R.: Covalent functionalized self-assembled lipo-polymerosome bearing amphotericin B for better management of leishmaniasis and its toxicity evaluation. *Mol Pharm.* **11**:3, 951–963 (2014).
48. Emami, S.; Azadmard-Damirchi, S.; Peighambaroust, S. H.; Valizadeh, H.; Hesari, J.: Liposomes as carrier vehicles for functional compounds in food sector. *J Exp. Nanosci.* **11**:9, 737-559 (2016).
49. Dle ústního sdělení Věry Černé (Univerzita Karlova v Praze) dne 24. 3. 2020.
50. McGinnity, D. F.; Grime, K.: ADME Optimization in drug discovery. In *Comprehensive medicinal chemistry III*. Chackalamannil, S.; Rotella, D.; Ward, S. E. (Ed.). Amsterdam: Elsevier, 2017, p. 34–44.
51. Beiras, R.: Biotransformation. In *Marine Pollution*. Beiras, R. (Ed.) Amsterdam: Elsevier, 2018, p. 205–214.
52. Solé, M.; Porte, C.; Albaigés, J.: Mixed-function oxygenase system components and antioxidant enzymes in different marine bivalves: Its relation with contaminant body burdens. *Aquatic Toxicology* **30**:3, 271–283 (1994).
53. Hemmati, S.: Biosynthesis of lignans in plant species of the section *Linum*: pinoresinol-lariciresinol reductase and justicidin B 7-hydroxylase. *Inaugural-Dissertation*. Faculty of mathematics and natural sciences, Heinrich-Heine University, Düsseldorf (2007).
54. Estabrook, R. W.: A passion for P450s (rememberances of the early history of research on cytochrome P450). *Drug Metab Dispos.* **31**:12, 1461–1473 (2003).
55. Nelson, D. R.: The cytochrome p450 homepage. *Hum Genomics.* **4**:1, 59–65 (2009).
56. Slaughter, R. L.; Edwards, D. J.: Recent advances: the cytochrome P450 enzymes. *Ann Pharmacother.* **29**:6, 619–624 (1995).

57. Guengerich, F. P.: Metabolic reactions: Types of reactions of cytochrome P450 enzymes. In *Cytochrome P450*. Schenkman, J. B. & Greim, H. (Ed.). Berlin: Springer, 1993, p. 89–103.
58. Otyepka, M.; Berka, K.; Anzenbacher, P.: Is there a relationship between the substrate preferences and structural flexibility of cytochromes P450? *Curr drug metab.* **13**:2, 130–142 (2012).
59. Hunter, T.: Signaling--2000 and beyond. *Cell.* **100**:1, 113–127 (2000).
60. Schlessinger, J.: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* **103**:2, 211–225 (2000).
61. Blume-Jensen, P.; Hunter, T.: Oncogenic kinase signalling. *Nature.* **411**:6835, 355–365 (2001).
62. Robinson, D. R.; Wu, Y.-M.; Lin, S.-F.: The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene.* **19**:49, 5548–5557 (2000).
63. Hubbard, S. R.: Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Prog Biophys and Mol Biol.* **71**:3-4, 343–358 (1999).
64. Du, Z.; Lovly, C. M.: Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Mol Cancer.* **17**:1, 58 (2018).
65. Gotink, K. J.; Verheul, H. M. W.: Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? *Angiogenesis.* **13**:1, 1–14 (2010).
66. U.S. Food and Drug Administration. Drug Trials Snapshot: LENVIMA. Dostupné z URL: < <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/drug-trials-snapshot-lenvima>> [cit.26. 7. 2021].
67. Capozzi, M.; De Divitiis, C.; Ottaiano, A; von Arx, C.; Scala, S.; Tatangelo, F.; Delrio, P.; Tafuto, S.: Lenvatinib, a molecule with versatile application: from preclinical evidence to future development in anti-cancer treatment. *Cancer Manag Res.* **11**, 3847–3860 (2019).
68. DragBank online. *Lenvatinib*. Dostupné z URL: <<https://go.drugbank.com/drugs/DB09078>> [cit.26. 7. 2021].

69. Koyama, N.; Saito, K.; Nishioka, Y.; Yusa, W.: Pharmacodynamic change in plasma angiogenic proteins: a dose-escalation phase 1 study of the multi-kinase inhibitor lenvatinib. *BMC Cancer*. **14**:1, 530 (2014).
70. Inoue, K.; Mizuo, H.; Kawaguchi, S.; Fukuda, K.; Kusano, K.; Yoshimura, T.: Oxidative metabolic pathway of lenvatinib mediated by aldehyde oxidase. *Drug Metab Dispos*. **42**:8, 1326–1333 (2014).
71. Chemical Book. *MK-1775*. Dostupné z URL: <https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB82514921.htm> [cit. 26. 7. 2021].
72. Russell, P.; Nurse, P.: Negative regulation of mitosis by *wee1+*, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell*. **49**:4, 559–567 (1987).
73. Do, K.; Doroshow, J. H.; Kummar, S.: Wee1 kinase as a target for cancer therapy. *Cell Cycle*. **12**:19, 3159–3164 (2013).
74. Faivre, S.; Delbaldo, C.; Vera, K.; Robert, C.; Lozahic, S.; Lassau, N.; Bello, C.; Deprimo, S.; Brega, N.; Massimini, G.; Armand, J. P.; Scigalla, P.; Raymond, E.: Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer. *J Clin Oncol*. **24**:1, 25–35 (2006).
75. U.S. Food and Drug Administration. *Highlights of prescribing information for sunitinib*. Dostupné z URL: <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/021938s13s17s18lbl.pdf> [cit. 26. 7. 2021].
76. DrugBank online. *Sunitinib*. Dostupné z URL: <<https://go.drugbank.com/drugs/DB01268>> [cit. 26. 7. 2021].
77. Speed, W.; Bello, C.; Peng, G.; Patyna, S.; Wu, E.: In vitro and in vivo metabolism of sunitinib in nonclinical species and humans. *Cancer Res*. **68**:9, 1285 (2008).
78. Amaya, G. M.; Durandis, R.; Bourgeois, D. S.; Perkins, J. A.; Abouda, A. A.; Wines, K. J.; Mohamud, M.; Starks, S. A.; Daniels, R. N.; Jackson, K. D.: Cytochromes P450 1A2 and 3A4 catalyze the metabolic activation of sunitinib. *Chem Res Toxicol*. **31**:7, 570–584 (2018).
79. Hromek, V.: Inhibitory tyrosinkinasy jako protinádorová léčiva nové generace. *Bakalářská práce*. Přírodovědecká fakulta University Karlovy, Praha (2014).

80. Milichovský, J.: Cílená mutagenese ve studiu lidských cytochromů P450 rodiny 1 a jejich interakčních partnerů. *Disertační práce*. Přírodovědecká fakulta University Karlovy (2016).
81. Takácsová, P.: Studium účinku protinádorových léčiv inhibitorů tyrosinkinas ve formě nanotransportérů. *Diplomová práce*. Přírodovědecká fakulta University Karlovy, Praha (2019).
82. Škubalová, Z.; Rex, S.; Sukupová, M.; Zahálka, M.; Sládal, P.; Příbyl, J.; Michálková, H.; Weerasekera, A.; Adam, V.; Heger, Z.: Passive Diffusion vs Active pH-Dependent Encapsulation of Tyrosine Kinase Inhibitors Vandetanib and Lenvatinib into Folate-Targeted Ferritin Delivery System. *Int J Nanomedicine*. **16**, 1–14 (2021).
83. Indra, R.; Černá, T.; Heger, Z.; Hraběta, J.; Wilhelm, M.; Dostálová, S.; Lengálová, A.; Martínková, M.; Adam, V.; Eckschlager, T.; Schmeiser, H. H.; Arlt, V. M.; Stiborová, M.: Ellipticine-loaded apoferritin nanocarrier retains DNA adduct-based cytochrome P450-facilitated toxicity in neuroblastoma cells. *Toxicology*. **419**, 40–54 (2019).
84. Urbanová, T.: Nanočásticové formy protinádorových léčiv a mechanismy ovlivňující jejich protinádorovou účinnost. *Bakalářská práce*. Přírodovědecká fakulta University Karlovy, Praha (2019).
85. Jáklová, K.: Příprava léčiv vázaných v nanočásticích pro cílenou léčbu rakoviny. *Bakalářská práce*. Přírodovědecká fakulta University Karlovy, Praha (2018).
86. Selleckchem.com. *Adavosertib (MK-1775)*. Dostupné z URL: <<https://www.selleckchem.com/datasheet/MK-1775-S152505-DataSheet.html>> [cit. 13. 8. 2021].
87. Cayman chemical. *Product information – Lenvatinib*. Dostupné z URL: <<https://www.caymanchem.com/pdfs/19375.pdf>> [cit. 13. 8. 2021].
88. Cayman chemical. *Product information – Sunitinib Malate*. Dostupné z URL: <<https://fnkprddata.blob.core.windows.net/domestic/data/datasheet/CAY/13159.pdf>> [cit. 13. 8. 2021].

86. Bianchini, F.; De Santis, A.; Portioli, E.; Krauss, I.R.; Battistini, L.; Curti, C.; Peppicelli, S.; Calorini, L.; D'Errico, G.; Zanardi, F.; Sartori, A.: Integrin-targeted AmpRGD sunitinib liposomes as integrated antiangiogenic tools. *Nanomedicine*. **18**, 135–145 (2019).
87. Huo, M.; Zhao, Y.; Satterlee, A. B.; Wang, Y.; Xu, Y.; Huang, L.: Tumor-targeted delivery of sunitinib base enhances vaccine therapy for advanced melanoma by remodeling the tumor microenvironment. *J Control Release*. **245**, 81–94 (2017).
88. Wilhelm, M.: Vliv cytochromů P450 na metabolismus protinádorových léčiv vázaných v apoferritinové nanočástici. *Diplomová práce*. Přírodovědecká fakulta University Karlovy, Praha (2020).

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

Jméno a příjmení, adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka