

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Simona Škriabová

Vliv NADPH:cytochrom P450 reduktasy a cytochromu b_5 na metabolismus vandetanibu cytochromem P450 3A5

The effect of NADPH:cytochrome P450 reductase and cytochrome b_5 on metabolism of vandetanib by cytochrome P450 3A5

Bakalářská práce

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

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně pod vedením Mgr. Radka Indry, Ph.D. a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne:

Podpis:

Simona Škriabová

Poděkování:

Touto cestou bych ráda poděkovala svému školiteli Mgr. Radku Indrovi, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce, profesionální přístup, cenné rady, za pomoc při psaní této bakalářské práce a také za pomoc při realizování experimentální části.

Táto práce byla finančně podporována grantem (GAČR: 18-10251S).

Abstrakt

Léčba rakoviny je možná několika způsoby. Jedním z nich je chemoterapie, kdy se onkologickým pacientům podává cytostatikum nebo kombinace více druhů léčiv. Cílem této bakalářské práce bylo studium a rozšíření poznatků o metabolismu protinádorového léčiva vandetanibu. Vandetanib je tyrosinkinasový inhibitor, který se od roku 2012 používá v Evropě na léčbu symptomatické nebo progresivní medulární rakoviny štítné žlázy.

V předkládané bakalářské práci byla studovaná kinetika oxidace vandetanibu cytochromy P450 3A5. Byla studovaná oxidace dvěma různými systémy, jako první byly použité rekombinantní cytochromy P450 3A5 exprimované v hmyzích buňkách transfekovaných *Baculovirem* (SupersomyTM) a jako druhé byly použité lidské rekombinantní cytochromy P450 3A5 exprimované v buňkách *E.coli* (Bactosomy). Dále byl studován vliv NADPH:CYP reduktasy a cytochromu *b*₅ na oxidaci vandetanibu tímto cytochromem.

Oba systémy tvořili demethylovaný metabolit vandetanibu, *N*-desmethylvandetanib, který byl separovaný pomocí metody HPLC. Studium enzymové kinetiky oxidace vandetanibu katalyzované rekombinantními lidskými CYP3A5R, 3A5BR, 3A5BLR u Bactosomů signalizuje, že do aktivního místa enzymu se mohou vázat dvě molekuly vandetanibu, což vede k efektivnější oxidaci. Získané výsledky také naznačují, že na oxidaci vandetanibu má vliv nejen NADPH:CYP reduktasa, ale i cytochrom *b*₅. Vliv cytochromu *b*₅ však závisí na hladině (aktivitě) reduktasy. Přítomnost cytochromu *b*₅ u Bactosomů s nižší hladinou reduktasy nemá pozitivní vliv na kinetiku oxidace, ale u Bactosomů s vyšší hladinou reduktasy a u SupersomůTM výrazně zvyšuje stimulaci oxidace vandetanibu.

Klíčové slova: rakovina, vandetanib, cytochrom P450, inhibitor tyrosinkinasy

Abstract

There are several ways for cancer treatment. One of them is chemotherapy, when cancer patients are given a cytostatic or a combination of multiple types of drugs. The aim of this bachelor thesis was to study the metabolism of the anticancer drug vandetanib. Vandetanib is a tyrosine kinase inhibitor, that has been used in Europe since 2012 for treatment of symptomatic or progressive medullary thyroid cancer.

The kinetics of vandetanib oxidation by cytochromes P450 3A5 was studied in this thesis. Oxidation was investigated by two different systems. The first were recombinant cytochromes P450 3A5 expressed in baculovirus-transfected insect cells (SupersomesTM) and the second were human recombinant cytochromes P450 3A5 expressed in *E.coli* cells (Bactosomes). Furthermore, the effect of NADPH:CYP reductase and cytochrome *b*₅ on vandetanib oxidation was investigated.

Both systems formed the demethylated metabolite of vandetanib, *N*-desmethylvandetanib, which was separated by HPLC. The study of enzyme kinetics of vandetanib oxidation by human CYP3A5R, 3A5BR, 3A5BLR in Bactosomes indicates that two vandetanib molecules can bind into the active site of the enzyme, resulting in more efficient oxidation. The results also indicate that not only NADPH: CYP reductase, but also cytochrome *b*₅ affects vandetanib oxidation. However, the effect of cytochrome *b*₅ depends on the reductase level (activity). Cytochrome *b*₅ does not positive effect on the kinetics of oxidation in Bactosomes with lower reductase level, but significantly increases the stimulation of vandetanib oxidation in Bactosomes with higher reductase level and in SupersomesTM.

Keywords: cancer; vandetanib; cytochromes P450; tyrosine kinase inhibitor

[IN CZECH]

OBSAH

Seznam použitých zkratek.....	8
1 Teoretický úvod.....	10
1.1 Rakovina	10
1.2 Léčba rakoviny a nádorových onemocnění.....	12
1.2.1 Chemoterapie.....	12
1.2.2 Cílená protinádorová léčba	14
1.3 Tyrosinkinasové inhibitory	14
1.3.1 Erlotinib.....	15
1.3.2 Gefitinib.....	15
1.3.3 Sorafenib	16
1.4 Vandetanib	16
1.4.1 Metabolismus vandetanibu	17
1.5 Biotransformace.....	18
1.5.1 První fáze biotransformace	19
1.5.2 Druhá fáze biotransformace	19
1.6 Cytochromy P450.....	20
1.6.1 Struktura cytochromu P450	20
1.6.2 Reakční cyklus cytochromu P450.....	21
1.6.3 Cytochromy P450 podrodiny 3A	22
1.7 Expresní systémy.....	22
2 Cíl bakalářské práce.....	25
3 Materiál a metody.....	26
3.1 Přístroje	26
3.2 Chemikálie.....	27
3.4 Metody	28
3.4.1 Kinetika oxidace vandetanibu cytochromy P450 3A5.....	28
3.4.2 Separace vandetanibu a jeho metabolitů	29
3.4.3 Analýza získaných dat.....	30
4 Výsledky	31

4.1 Oxidace vandetanibu rekombinantními cytochromy P450 3A5 exprimovanými v Supersomech™	31
4.2 Oxidace vandetanibu rekombinantními cytochromy P450 3A5 exprimovanými v Bactosomech	33
5 Diskuze	37
6 Závěr	40
Použitá literatura.....	41

Seznam použitých zkratek

CYP	cytochrom P450
CYP3A5BLR	lidský rekombinantní cytochrom P450 3A5 koexprimovaný s cytochromem <i>b₅</i> a nižší hladinou NADPH:CYP reductasy v <i>E.coli</i>
CYP3A5BR	lidský rekombinantní cytochrom P450 3A5 koexprimovaný s cytochromem <i>b₅</i> a vyšší hladinou NADPH:CYP reductasy v <i>E.coli</i>
CYP3A5LR	lidský rekombinantní cytochrom P450 3A5 koexprimovaný s nižší hladinou NADPH:CYP reductasy v <i>E.coli</i>
CYP3A5R	lidský rekombinantní cytochrom P450 3A5 koexprimovaný s vyšší hladinou NADPH:CYP reductasy v <i>E.coli</i>
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru (z angl. „epidermal growth factor receptor“)
FMO	flavin monooxygenasa
HCC	hepatocelulární karcinom
HIF	hypoxií indukovatelné faktory
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HS	vysokospinová forma cytochromu P450
LS	nízkospinová forma cytochromu P450
MFO	monooxygenasy se smíšenou funkcí (z angl. „mixed function oxidases“)

MTC	medulární rakovina štítné žlázy
NADPH	nikotinamidadenindinukletidfosfát v redukované formě
NRTK	nereceptorové tyrosinkinasy
PDGFR	receptor růstového faktoru odvozeného z krevních destiček (z angl. „platelet-derived growth factor receptor“)
PFS	přežití bez progresu (z angl. „progression free survival“)
RET	„rearranged during transfection“
RTK	receptorové tyrosinkinasy
TK	tyrosinkinasy
TKI	inhibitory tyrosinkinasy
UV	ultrafialové záření
VEGFR	receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (z angl. „vascular endothelial growth factor receptor“)

1 Teoretický úvod

1.1 Rakovina

Termín rakovina se týká vícero onemocnění a může začít kdekoli v těle, neboť lidské tělo tvoří biliony buněk, které jsou schopny dělit se a vytvářet nové a pro tělo člověka potřebné buňky. Staré buňky odumírají a jsou nahrazeny novými. Pokud je tento proces narušen a staré buňky přežijí nebo se tvoří buňky na místech, kde to není nutné, mohou se vytvářet různé výrůstky, ze kterých opětovným dělením vznikají nádory [1].

Mezi faktory způsobující vývoj nádorových procesů lze zařadit faktory biologické, chemické a v neposlední řadě fyzikální. K biologickým patří například imunita organismu, transformační viry či změny fyziologických podmínek. Polární xenobiotika, jako například beryllium nebo azbest, hydrofobní xenobiotika (např. polycyklické aromatické uhlovodíky – PAH) a záření, ať už radioaktivní nebo UV záření patří k fyzikálním faktorům. Z chemických faktorů způsobují nádorové procesy chemické karcinogeny. I když tyto faktory svým působením potencují vznik rakoviny, vnímavost lidí k různým cizorodým látkám je odlišná. Ovlivňuje ji pohlaví, zdraví, věk, výživa a mnoho dalších činitelů [2].

Nádory vznikají v důsledku poruchy buněčného cyklu. Jejich vznik je spojený s poruchou diferenciací buněk a jejich typickým znakem je nekontrolovaný růst buněk. Vznikají v důsledku poškození buněčných regulací. Transformaci normální zdravé buňky v buňku nádorovou způsobují onkogeny, které vznikají mutací z protoonkogenů, nebo také mutace tumor supresorových genů. Tyto geny se za normálních podmínek nacházejí v zdravých buňkách a plní určité funkce, které jsou důležité pro správný růst, dělení (proliferaci) a cyklus buňky [3, 4].

Známe dva základní typy nádorů, maligní a benigní nádory. Maligní (zhoubné) nádory jsou neobalené pochvou a mohou metastazovat, to znamená, že se mohou šířit do okolních tkání nebo mohou být přenášeny krví či lymfou do vzdálených míst a vytvářet nové nádory. Benigní nádory, neboli nezhooubné nádory jsou obalené pochvou, neputují do okolních tkání a nejsou schopny metastazovat [1, 5].

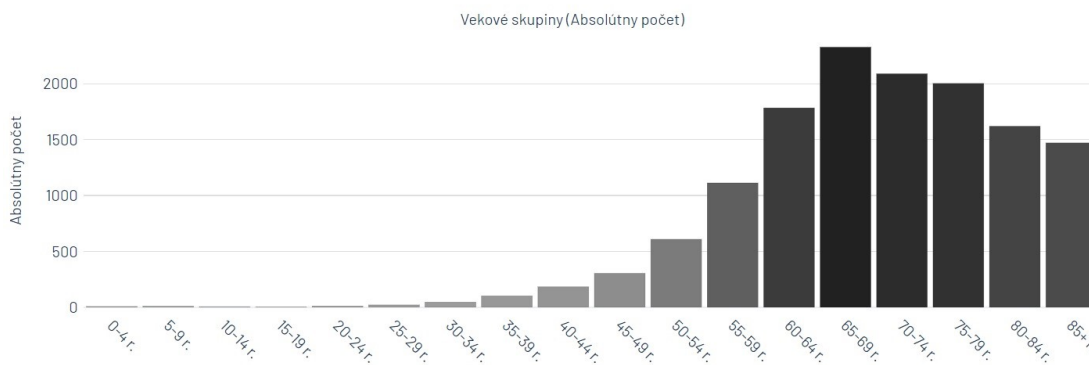
Podle tkáně, ze které vycházejí se nádory dělí na:

- a) karcinomy (epitelový původ)
- b) sarkomy (neepitelový původ)
- c) lymfomy (lymfatická leukémie)
- d) myelomy (myeloidní leukémie)
- e) mezoteliomy
- f) blastomatózní nádory
- g) nediferencované (nemají žádnou podobnost s výchozí tkání) [6]

Nádorové bujení (proces karcinogeneze) je složeno ze tří fází. První fáze je iniciační stádium, neboli iniciace, kdy se z normální zdravé buňky stává preneoplastická léze (tzv. iniciovaná buňka). Abnormální dělení takové buňky značí druhou fází nazývanou promoce. Třetí fáze je stádium progresu, při kterém vzniká klinicky zjištělý nádor schopný metastazovat [7].

Ve více ekonomicky vyspělých zemích jsou nádorová onemocnění neboli rakovina druhým nejčastějším důvodem úmrtí. Počet lidí s nádorovým onemocněním roste i v důsledku stárnutí populace. Vliv má také novodobý životní styl, jako například fyzická nečinnost, kouření a v neposlední řadě stravovací návyky [8].

Na území Slovenska jsou nádorová onemocnění po nemocech oběhové soustavy druhou nejčastější příčinou úmrtí, s podílem 25,6 %. Standardizovaná úmrtnost v roce 2018 činila 292 resp. 219,3 na 100 000 mužů, resp. žen. Nejčastěji diagnostikovanou rakovinou a hlavní příčinou úmrtí na nádorové onemocnění u žen je rakovina prsu, následovaná rakovina tlustého střeva a konečníku, zhoubného nádoru plic, průdušek a průdušnice. Nejčastější příčinou smrti u mužů byla rakovina průdušnice, průdušek a plic, zhoubný nádor konečníku a tlustého střeva a třetím nejčastějším byl zhoubný nádor prostaty. Úmrtnost v důsledku rakoviny se na Slovensku každým rokem zvyšuje, přičemž nejvyšší úmrtnost v souvislosti s rakovinou na Slovensku je ve věkové kategorii 65-69 let. Nejnižší je pak u dětí (viz Obr. 1, str. 12) [9].



Obr. 1: Graf znázorňující úmrtnost na nádorová onemocnění na Slovensku pro obě pohlaví v roce 2018 podle věkových skupin [10].

1.2 Léčba rakoviny a nádorových onemocnění

Léčba rakoviny je možná několika způsoby. Prvním způsobem léčby byl chirurgický zákrok, který se využíval až do 20. století jako v podstatě jediný způsob léčby nádorů. Postupem času se kromě chirurgického zákroku začaly využívat nově objevené způsoby léčby. Nový způsob léčby nádorů představovala radioterapie, která vznikla po objevení rentgenových paprsků. Obě výše zmíněné metody se časem zdokonalovaly. Postupně se zvyšovala účinnost léčby a zmenšovalo riziko poškození zdravých buněk. Mezi další způsob léčby se řadí chemoterapie, která měla začátky ve čtyřicátých letech minulého století. Narozdíl od radioterapie a chirurgické léčby, které jsou využívané k odstranění lokálního nádoru, má chemoterapie systémový léčebný účinek, což znamená, že se využívá k odstranění metastazujících nádorů v celém těle nemocného pacienta. V 70. letech byla objevena další metoda, imunoterapie, která na léčbu využívá, jak můžeme už z názvu vidět, imunitní systém. Pro dosažení co nejlepšího výsledku se zpravidla používá kombinace výše zmíněných způsobů léčby nádorů [11].

1.2.1 Chemoterapie

Chemoterapie je metoda, kdy se onkologickým pacientům podávají cytostatika, což jsou léčiva s protinádorovým účinkem. Jak jsme již zmínili, chemoterapie je systémová léčba. Cytostatika mohou mít přírodní nebo syntetický původ. Fungují na bázi poškození DNA. Poškozují nebo zastaví buněčné dělení rychle se dělících buněk. Jelikož cytostatika nedokáží rozlišit nádorové buňky od normální zdravé buňky je důsledkem léčby nádorových onemocnění pomocí chemoterapie mnoho nežádoucích účinků.

Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří zvracení, nevolnost, ztráta vlasů či úbytek hmotnosti. Působí také negativně na krvetvorbu, což má za následek například krvácivé projevy, anémii a únavu.

Podle mechanismu účinku se cytostatika dělí na:

- a) Protinádorová antibiotika – přímé poškození struktury už syntetizovaných nukleových kyselin, které vedou k porušení jejich funkce
- b) Antimetabolity – inhibice klíčových enzymů metabolismu, který vede k porušení syntézy nukleových kyselin s následnou inhibicí buněčného cyklu
- c) Alkylační cytostatika – porucha syntézy proteinů
- d) Platinové cytostatika – poškození struktury a funkce již přítomných nukleových kyselin
- e) Alkaloidy z rostlin – inhibice buněčného dělení
- f) Ostatní [12]

Samotná chemoterapie se dělí do různých skupin:

- Monochemoterapie je léčba, při které se onkologickému pacientovi podává pouze jedno cytostatikum.
- Kombinovaná chemoterapie využívá kombinace cytostatik s odlišnými nežádoucími účinky, toxicitou a mechanismem účinku
- Adjuvantní chemoterapie znamená podávání cytostatika, které se podává pacientovi po odstranění nádoru chirurgickým zákrokem nebo radioterapií, ale pořád se předpokládají zbytkové mikrometastázy.
- Neoadjuvantní léčbou se rozumí podání chemoterapie před chirurgickým zákrokem. Přičemž hlavním cílem je dosáhnout zmenšení nádoru a tím usnadnit operabilitu.
- Paliativní chemoterapie má za cíl prodloužení a zlepšení kvality života a navzdory nežádoucím účinkům omezení růstu nádoru.
- Konkomitantní chemoradioterapie je kombinace chemoterapie a radioterapie [13].

1.2.2 Cílená protinádorová léčba

Koncem 20. století se do popředí dostala nová metoda, která výrazně ovlivnila léčbu rakoviny. Tato metoda se nazývá cílená léčba. Podobně jako při léčbě pomocí chemoterapie se při cílené léčbě používají farmakologické látky, jejichž hlavním účinkem je inhibice růstu, omezení šíření rakoviny a také aktivace drah vedoucích k apoptóze. Avšak mechanismy účinku a toxicita cílené léčby se liší od mechanismů tradiční cytotoxické chemoterapie. Obecně je cílená léčba lépe snášena a toxicita pro zdravé buňky je menší. Existují tři hlavní typy cílených terapií rakoviny, patří mezi ně monoklonální protilátky, malé molekulové inhibitory a imunotoxiny [14, 15].

1.3 Tyrosinkinasové inhibitory

Tyrosinkinasy (TK) tvoří skupinu enzymů, které jsou schopny fosforylovat tyrosin, což vede ke konformačním změnám a následně k aktivaci daného proteinu [16]. TK jsou nadměrně exprimovány v solidních nádorech a stimulují jejich růst a šíření [17]. Jsou zodpovědné za regulaci buněčných funkcí včetně buněčné signalizace, diferenciaci, růstu, pohyblivosti, adheze nebo přeskupení cytoskeletu. Přibližně jedna třetina onkogenů zapojených do lidských malignit je odvozena od TK. Zaměření na specifickou signalizaci TK inhibuje proliferaci nádorů a jejich růst, a tudíž se ukázala jako slibná strategie léčby rakoviny [18]

TK se dělí na dvě velké rodiny, receptorové (RTK) a nereceptorové (NRTK) tyrosinkinasy. RTK se nacházejí na povrchu buňky, zatímco NRTK jsou uvnitř buňky. RTK jsou důležité složky signálních transdukčních drah zprostředkujících komunikaci. RTK jsou transmembránové receptory obsahující extracelulární a intracelulární část. Vazbou ligandu na extracelulární část RTK dochází k procesům jako je buněčný růst, metabolismus, pohyblivost a diferenciaci, při kterých hrají důležitou roli. NRTK neobsahují žádnou transmembránovou nebo extracelulární část. Obsahují modulární domény odpovědné za subcelulární zacílení a regulaci katalytické aktivity [19, 20].

Jednou z receptorových TK, která je exprimovaná ve většině solidních nádorů, je EGFR-TK (TK receptoru pro epidermální růstový faktor) [17]. Další TK reprezentuje například receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGFR), receptor růstového faktoru odvozeného z destiček (PDGFR), receptor faktoru kmenových buněk a receptor faktoru-1 stimulující kolonie [21].

Inhibitory tyrosinkinasy (TKI) jsou malé molekuly, které inhibují TK. Soutěží s ATP o vazebné místo katalytické domény. Zjistilo se, že některé TKI mají protinádorovou aktivitu. TKI jsou tedy důležitou novou třídou cílené léčby, která zasahuje do specifických signálních drah buněk, a tak umožňuje cílenou léčbu vybraných malignit [22].

1.3.1 Erlotinib

Erlotinib (Tarceva) je licencovaným inhibitorem TK, který zprostředkovává inhibici EGFR. Používá se při léčbě lokálního pokročilého nebo metastatického nemalobuněčného karcinomu plic po selhání alespoň jednoho předchozího chemoterapeutického režimu [23]. Takoví pacienti mají aktivační mutace EGFR Mut + [24]. EGFR se podílí na mnoha signálních drahách souvisejících s rakovinou, které patří mezi důležité znaky karcinogeneze a také progresu nádoru, jako například proliferace buňky, migrace, inhibice apoptózy apod. Aktivita jeho TK hraje důležitou roli při zprostředkování zmíněných procesů a využívá se jako terapeutický cíl [25]. Dlouhodobým podáváním erlotinibu se téměř ve všech nádorech vyvine rezistence na léčivo. Novější studie uvádí, že erlotinib v kombinaci s bevacizumabem významně prodlužují přežití bez progresu (PFS) ve srovnání s léčbou samotným erlotinibem [24].

1.3.2 Gefitinib

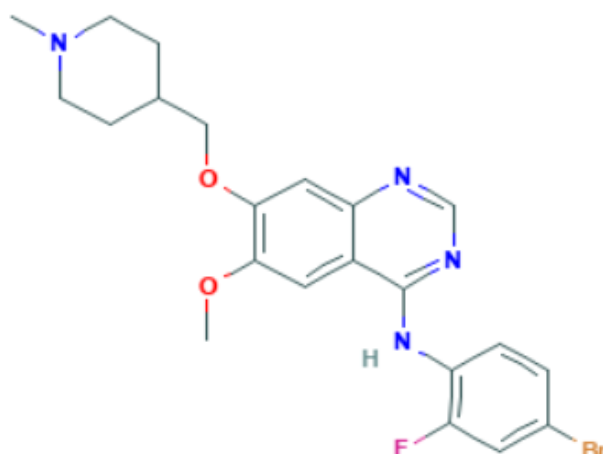
Gefitinib (Iressa, AstraZeneca) se používá k léčbě metastazujícího nebo lokálního nemalobuněčného karcinomu plic v pokročilém stádiu [26]. Gefitinib je inhibitorem EGFR. Rozsáhlé studie prokazují příznivý vliv na PFS a lepší kvalitu života u onkologických pacientů, kterým je podáván [27]. Podávání gefitinibu v kombinaci s chemoterapií vykazuje u pacientů lepší výsledky v PFS ve srovnání s pacienty, kterým byl podáván samotný gefitinib nebo samotná chemoterapie [28]. Většina nepříznivých účinků gefitinibu je reverzibilní, patří mezi ně například vyrážka, suchá kůže a průjem. Gefitinib se metabolizuje v játrech [27]. Enzymy CYP450 hrají rozhodující roli v procesu metabolismu gefitinibu, přičemž hlavním enzymem zapojeným do metabolismu je CYP3A4, vedlejší roli hrají ostatní enzymy CYP450 [26].

1.3.3 Sorafenib

Sorafenib (Nexavar) je aktivní inhibitor multikinázy, který představuje jediné účinné léčivo pro léčbu pokročilého hepatocelulárního karcinomu (HCC). U pacientů s HCC zvyšuje přežití a prodlužuje dobu do progresu [29]. Přesto, z dlouhodobého hlediska je jeho úspěch podstatně nižší a to z důvodu vzniku rezistence prostřednictvím několika mechanismů. Dlouhodobé podávání sorafenibu způsobuje u pacientů snížení hustoty mikrocév, podporuje intratumorální hypoxii a hypoxií indukovatelné faktory (HIF). Kombinace léčby sorafenibem s inhibitory proti HIF nebo genovou terapií zvyšuje překonání rezistence k sorafenibu [30].

1.4 Vandetanib

Vandetanib, nebo jinak N-(4-brom-2-fluorfenyl)-6-methoxy-7-[(1-methylpiperidin-4-yl)-methoxy]-chinazolin-4-amin (obchodní název Caprelsa), jehož struktura je znázorněna na Obr. 2, str. 17 [31], je tyrosinkinasový inhibitor, který se používá u nádorů štítné žlázy, u kterých nezabírá konvenční léčba spočívající v chirurgii a léčbě radioaktivním jódem. Konkrétně při léčbě pokročilé nebo metastatické medulární rakoviny štítné žlázy (MTC) [32, 33]. Jelikož MTC je vzácná rakovina, dlouho na toto onemocnění nebyly schváleny žádné léky. Vandetanib byl prvním schváleným lékem, který výrazně zvýšil přežití bez progresu. V Evropě byl schválen v březnu 2012 jako první léčba při symptomatické nebo progresivní MTC, zatímco v USA byl schválen o rok dříve [34, 35]. Vandetanib je aktivním antagonistou pro receptor vaskulárního endoteliárního růstového faktoru 2 a 3 (VEGFR-2, VEGFR-3), RET-kinázu a receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR). Vandetanib vyvíjela společnost AstraZeneca také pro nemalobuněčný karcinom plic [32, 34].

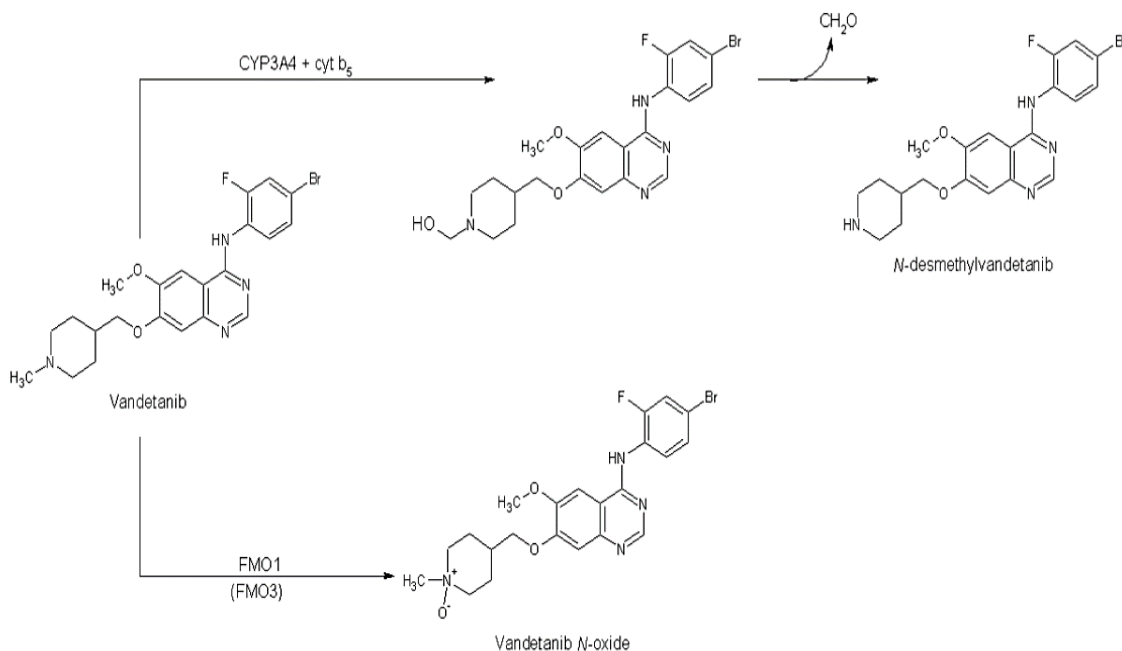


Obr. 2: Struktura vandetanibu [36].

Vandetanib, podobně jako jiné tyrosinkinasové inhibitory, má mnoho vedlejších nežádoucích účinků. Mezi běžné nežádoucí účinky patří nevolnost, bolest hlavy, průjem a hypertenze. Závažný nežádoucí účinek vedoucí k zastavení léčby představuje prodloužení QT intervalu [34, 35]

1.4.1 Metabolismus vandetanibu

Bylo prokázáno, že metabolismus vandetanibu u člověka a u pokusných zvířat vede ke stejným metabolitům. Hlavní metabolity nalezené v exkrementech u lidí a pokusných zvířat byly vandetanib-*N*-oxid a *N*-desmethylvandetanib [31]. U pokusných zvířat byl nalezen *O*-desmethylvandetanib glukoronid jako minoritní metabolit. Byl také nalezen v lidské moči [37, 38]. Na metabolismu vandetanibu se podílejí enzymy cytochromu P450 (CYP) a flavin monooxygenasy (FMO). Nejvýznamnějším a hlavním enzymem, který je zodpovědný za přeměnu vandetanibu na *N*-desmethylvandetanib v játrech z více jak 99 %, je CYP3A4. Oxidaci vandetanibu na vandetanib-*N*-oxid umožňují enzymy FMO1 a FMO3 (Obr. 3, str. 18) [31].



Obř. 3: Schéma tvorby hlavních metabolitů oxidace vandetanibu pomocí enzymů CYP3A4 a FMO [31].

1.5 Biotransformace

Cizorodá látka neboli xenobiotikum je taková látka, která není schopna poskytovat danému organismu žádnou energii a také neslouží pro syntézu biomolekul. Xenobiotika, obecně to platí pro všechny látky, překonávají při vstupu do organismu několik bariér. Vstupovat do organismu mohou prostřednictvím dýchacích cest, gastrointestinálním traktem a v menší míře také kůží. Následně jsou distribuovány v organismu pomocí tělních tekutin. Absorpce a distribuce jsou ovlivněny velikostí molekul a jejich lipofilitou [39]. Látky, které vstupují do organismu, ať už léčiva nebo xenobiotika, mohou být z těla vyloučeny v nezměněné podobě (pokud jsou to vysoce polární látky) nebo pomocí mnoha enzymů procházejí metabolismem (biotransformací) [40]. Nicméně existují xenobiotika, které nepodléhají biotransformaci a zároveň jejich eliminace z organismu je velmi obtížná. Takové xenobiotika zůstávají v organismu a ukládají se do tukové tkáně.

Enzymy metabolizující xenobiotika mění jejich chemickou strukturu. Jejich hlavním cílem je urychlit eliminaci xenobiotik z organismu, anebo alespoň omezit vstup xenobiotik do dalších tkání a orgánů. Pro objevení nových léčiv je důležitý výzkum vztahu mezi strukturou a metabolismem xenobiotik. Proces biotransformace zahrnuje dvě fáze, první a druhou biotransformační fázi [39].

1.5.1 První fáze biotransformace

Úkolem první fáze biotransformace je zavedení respektive „odkrytí“ polární skupiny v molekule xenobiotika [40]. Mezi reakce první fáze biotransformace patří:

a) Oxidace

Enzymy významné pro oxidaci v první fázi biotransformace jsou monooxygenasy, které se dělí na dvě základní skupiny. První skupinou jsou flavinové monooxygenasy (FMO). Druhou velkou skupinou jsou oxygenasy se smíšenou funkcí (z angl. „mixed function oxidases“, MFO), které obsahují cytochrom P450 [41]. Jejich úkolem je vázat kyslík a rozštěpit ho na atomární kyslík, přičemž jeden atom zabudovávají do molekuly xenobiotik a druhý do molekuly vody. Důležité enzymy jsou také peroxidasy. Oxidační cestě podléhají mnohá xenobiotika. Mezi oxidační reakce první fáze patří hydroxylace, oxidační deaminace, oxidace alkoholů a aldehydů, dealkylace, oxidační dehalogenace, N-oxidace a S-oxidace.

b) Redukce

Redukční cestě podléhá podstatně méně xenobiotik než cestě oxidační. Přesto je to pro některá xenobiotika hlavní metabolická cesta. Redukci podléhají aldehydy, ketony, azosloučeniny a nitroskupiny. Redukčně jsou štěpeny i disulfidy. Enzymy redukční fáze jsou například NADPH:CYP reduktasa a xanthinoxidasa.

c) Hydrolýza

Hydrolýze podléhají estery, epoxidy, amidy, karbamáty a hydrazidy. Nejčastější enzymy jsou hydrolasy, ačkoliv hydrolýza může probíhat také bez přítomnosti enzymů [39].

1.5.2 Druhá fáze biotransformace

V rámci druhé fáze biotransformace dochází ke konjugaci xenobiotika s endogenní sloučeninou. Mezi reakce druhé fáze patří glukoronidace (konjugace s UDP-glukoronovou kyselinou), sulfatace (konjugace se sulfátem, např. 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát), konjugace s glutathionem, methylace (konjugace s S-adenosylmethioninem), acetylace (konjugace s acetyl-CoA) a také konjugace s aminokyselinami [39].

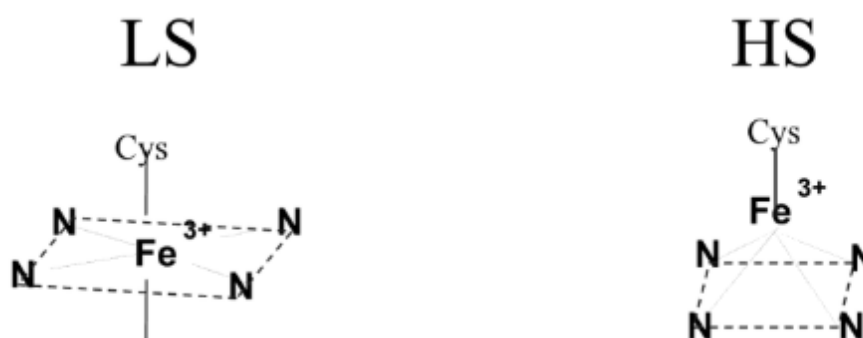
1.6 Cytochromy P450

Cytochrom P450 (CYP) byl poprvé popsán jako hemoprotein vázaný na membránu endoplazmatického retikula v roce 1962. Dnes je pod pojmem cytochrom P450 chápána velká skupina monooxygenas, podílející se na biotransformaci xenobiotik a syntéze některých tělu vlastních látek, jako jsou steroidní hormony. Je známo více než 3000 různých CYP. U člověka nalezneme 57 genů CYP. CYP jsou významné enzymy první fázi biotransformace. U člověka jsou součástí systému, který obsahuje kromě CYP i NADPH:CYP reduktasu a fakultativně cytochrom b_5 a jeho reduktasu [39, 40, 41].

1.6.1 Struktura cytochromu P450

Na rozdíl od eukaryot, u kterých je CYP lokalizován hlavně v membráně hladkého endoplazmatického retikula a v menší míře v mitochondriích, jsou enzymy CYP u prokaryot rozpuštěné v cytosolu. CYP má porfyrinový skelet (protoporfyrin IX). V centru protoporfyrinového skeletu se nachází atom Fe^{3+} vázán čtyřmi ligandy. Protoporfyrinový skelet se váže hydrofobními vazbami a prostřednictvím thiolátového aniontu v cysteinu, který je pátým ligandem. Šestým ligandem je molekula vody [39, 41].

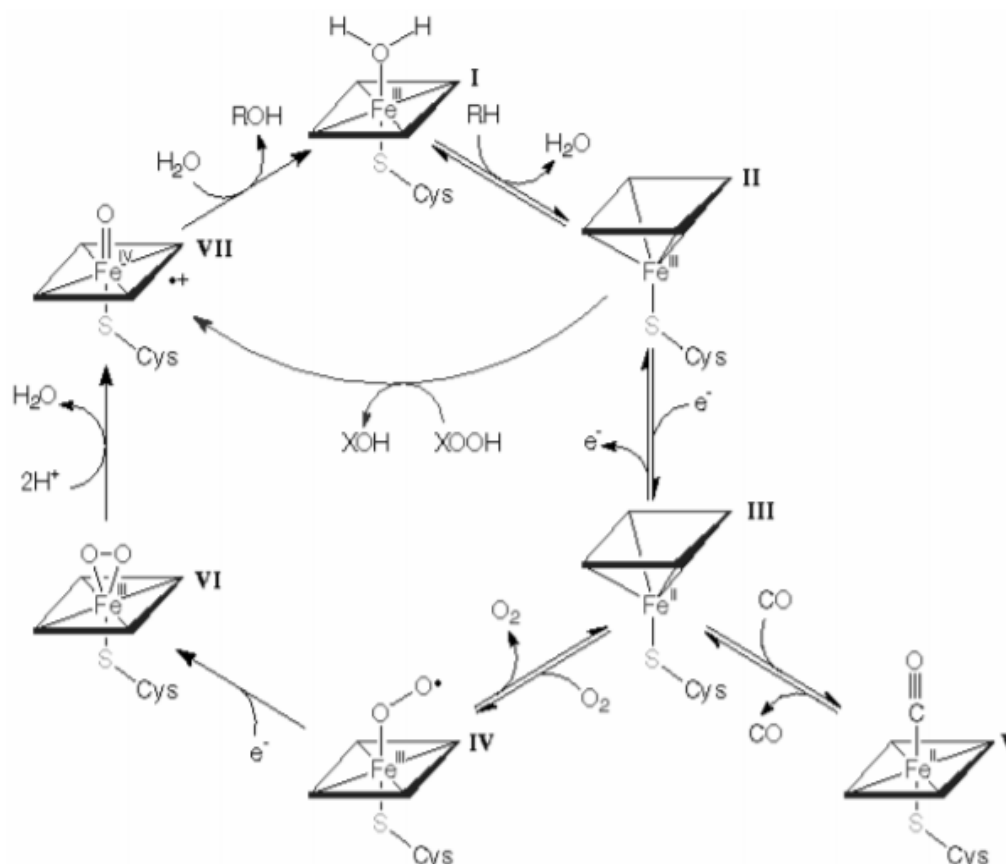
Fe^{3+} se může v CYP vyskytovat buď v nízkospinové formě (LS) nebo vysokospinové formě (HS), zobrazeno na Obr. 4. V LS má maximálně spárované 3d valenční elektrony a ve formě HS má maximálně nespárované 3d valenční elektrony [39].



Obr. 4: Zobrazení LS a HS formy Fe^{3+} v cytochrome P450 [39].

1.6.2 Reakční cyklus cytochromu P450

Reakční cyklus CYP je vícestupňovým uspořádaným cyklem, složeným z minimálně osmi kroků, jehož schéma je zobrazeno na Obr. 5. Na začátku cyklu je enzym v klidovém stavu, železo je v oxidačním čísle III a ve formě LS. Navázáním substrátu [RH] do aktivního místa enzymu dochází k vytlačení vody (šestého ligandu). Aktivní místo změní konformaci a tím se dostává do formy HS. Následně se redukuje CYP při interakci s NADPH:CYP reduktasou, čímž se železo stává dvojmocné, ale stále je přítomné ve formě HS. Takový enzym dokáže vázat ligandy jako je například molekula kyslíku nebo CO. Po navázání ligandu se vytvoří forma LS s trojmocným železem. Avšak takový komplex je poměrně nestabilní, a proto dochází k jeho redukci pomocí NADPH:CYP reduktasy. Takto se aktivuje peroxidový anion z molekuly kyslíku. Po druhé redukci je komplex CYP aktivovanou formou, kde nastává štěpení O-O vazby a vzniká molekula vody. Následně dochází k oxidaci substrátu [RH] a jeho vytěsnění vodou. CYP se opět dostává na začátek cyklu do klidového stavu se železem v oxidačním čísle III [41].



Obr. 5: Schéma reakčního cyklu pro CYP [41].

1.6.3 Cytochromy P450 podrodiny 3A

Cytochromy P450 jsou na základě sekvenční podobnosti rozříděny do rodin označených číslem, například CYP3, a následně do podrodin označených písmenem jako je CYP3A. Takové podrodiny již obsahují konkrétní enzymy. Cytochromy P450 3A4, 3A5 a 3A7 jsou zástupci podrodiny 3A u člověka. CYP3A4 je nejvýznamnějším lidským CYP. CYP3A4 spolu s minoritní formou CYP3A5 a CYP3A7, typickou formou pro novorozence, jsou zodpovědné za polovinu metabolických reakcí u cizorodých látek.

Hlavní forma CYP3A4 se vyskytuje zejména v játrech a v lidském střevě. Flexibilní a otevřené aktivní místo CYP3A4 je zodpovědné za schopnost navázat a přeměnit velké množství léčiv. Aktivní místa ostatních CYP nejsou až tak flexibilní a přístupnost k nim je podstatně menší v porovnání s CYP3A4. Mezi substráty CYP3A4 patří například steroidy, antibiotika, blokátory Ca^{2+} kanálů, chemoterapeutika a řada dalších léčiv [42].

Enzymy CYP3A5 jsou exprimované ve více orgánech, včetně jater, tenkého střeva, ledvin, plic, prostaty, nadledvin a hypofýzy. Celková mRNA exprese CYP3A5 je přibližně 2% podrodiny CYP3A [43]. Mezi nejznámější substráty CYP3A5 patří například HIV antivirotika, markolidová antibiotika, antihistaminika, blokátory Ca^{2+} iontů a jiné [42].

Srovnávací studie monooxygenasové aktivity CYP3A4 a CYP3A5 odhalily, že substrátová specifita CYP3A5 je podobná substrátové specifitě CYP3A4, i když jeho aktivita je obecně výrazně nižší. V některých případech, včetně erytromycinu, chinidinu a estradiolu je enzym CYP3A5 neaktivní [44].

1.7 Expresní systémy

Proteiny s terapeutickým významem mohou produkovat mikroorganismy, tkáňové kultury buněk vyšších organismů nebo mohou být izolovány z přirozených zdrojů. Jinou možností přípravy takových proteinů mohou být i geneticky modifikovaná zvířata, rostlinní producenti nebo bezbuněčné expresní systémy [45].

Expresní systémy, které se používají na produkci rekombinantních proteinů mohou být eukaryotické nebo prokaryotické. Volba vhodného expresního systému závisí na rychlosti růstu, kultuře hostitelských buněk, posttranslačním zpracování

syntetizovaného proteinu a na úrovni expresu cílového genu. Nejvíce používaným expresním systémem je prokaryotický systém, jelikož umožňuje získat velké množství rekombinantních proteinů za krátkou dobu. Takový expresní systém je založen především na bakteriích *E. coli*. [46]. Kromě bakterií existuje mnoho dalších expresních systémů, jako jsou kvasinky, hmyzí buňky, savčí buňky, z vyšších eukaryotických organismů to mohou být například transgenní rostliny [45]. Každý systém má svoje výhody a nevýhody, které jsou shrnuty v Tabulce č. 1, str. 24.

Tabulka č. 1: Srovnání běžně používaných proteinových expresních systémů [47, 48].

Expresní systém	Výhody	Nevýhody
<i>E. coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> - rychlý růst (dny) - levné médium - dobře charakterizovaná genetika - jednoduché zvětšení 	<ul style="list-style-type: none"> - omezená kapacita pro posttranslační úpravy - nadměrně exprimované proteiny mohou být špatně složeny a nerozpustné (zejména proteiny eukaryotického původu)
<i>Kvasinky</i>	<ul style="list-style-type: none"> - středně rychlý růst (týdny) - podporují většinu posttranslačních úprav - levné médium - vysoká kapacita skládání - vysoká hustota buněk 	<ul style="list-style-type: none"> - N-glykosylace odlišné od savčích forem - bezpečnostní opatření potřebná pro velkovýrobu kvůli použití methanolu v indukčním médiu
<i>Hmyzí buňky</i>	<ul style="list-style-type: none"> - středně rychlý růst (týdny) - podporují většinu posttranslačních úprav - vysoká kapacita skládání 	<ul style="list-style-type: none"> - N-glykosylace odlišné od savčích forem - obtížné zvětšení - drahé
<i>Savčí buňky</i>	<ul style="list-style-type: none"> - středně rychlý růst (týdny) - správné skládání - úplná posttranslační modifikace 	<ul style="list-style-type: none"> - drahé - obtížné zvětšení
<i>Rostliny</i>	<ul style="list-style-type: none"> - relativně levné - podporují většinu posttranslačních úprav - vysoká kapacita skládání 	<ul style="list-style-type: none"> - N-glykosylace odlišné od savčích forem - pomalý růst (měsíce, transgenní rostliny) - pro různé rostliny

2 Cíl bakalářské práce

Cílem předkládané bakalářské práce bylo studium metabolismu vandetanibu, tyrosinkinasového inhibitoru, který se používá při léčbě pokročilé nebo metastatické medulární rakoviny štítné žlázy (MTC).

Konkrétní cíle práce jsou shrnuty do následujících bodů:

- Studium kinetiky oxidace vandetanibu rekombinantními lidskými cytochromy P450 3A5 exprimovanými v eukaryotním systému (hmyzích buňkách)
- Studium kinetiky oxidace vandetanibu rekombinantními lidskými cytochromy P450 3A5 exprimovanými v bakteriálním systému (*E.coli*)
- Studium vlivu aktivity NADPH:CYP reductasy na oxidaci vandetanibu
- Studium vlivu cytochromu *b*₅ na oxidaci vandetanibu

3 Materiál a metody

3.1 Přístroje

Automatické pipety: Nichiryo, Nichipet EX, *Japonsko*

Eppendorf Reference, *Německo*

Inkubátor: Thermomixer compact, Eppendorf, *Německo*

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

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

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

- pH metr kalibrován pomocí standardů Hamilton, *Švýcarsko*

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

analytické váhy: Discovery, Ohaus, *Švýcarsko*

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

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

- čerpadla: RS Pump

- vorkovač: RS Autosampler

- fluorescenční detektor: RS Fluorescence Detector

- UV/Vis detektor: RS Diode Array Detector

- Termostat: RS Column Compartment

- RS Degasys

Kolona: Nucleosil 100-5, C18, 250 x 4 mm, 5 μ m, Macherey-Nagel, *Německo*

Program na vyhodnocení HPLC měření: Chromeleon ® 7

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

3.2 Chemikálie

Vandetanib	LC Laboratories, <i>USA</i>
Acetonitril (ACN) – HPLC Far UV-Gradient grade	VWR, <i>USA</i>
Dichlormethan G.R.	Lachner, <i>Česká republika</i>
Triethylamin	Sigma Aldrich, <i>USA</i>
NADPH	Sigma Aldrich, <i>USA</i>
DMSO pure (Dimethylsulfoxid)	Lachner, <i>Česká republika</i>
Methanol pro měření HPLC	VWR, <i>USA</i>
Fenacetin	Sigma Aldrich, <i>USA</i>
KH ₂ PO ₄ (pH 7,4)	Lachner, <i>Česká republika</i>

3.3 Použité enzymy

Bactosomální enzymy:

CYP3A5BLR	Cypex, <i>UK</i>
CYP3A5BR	Cypex, <i>UK</i>
CYP3A5LR	Cypex, <i>UK</i>
CYP3A5R	Cypex, <i>UK</i>

Supersomální enzymy:

CYP3A5	Corning, <i>USA</i>
CYP3A5 + b ₅	Corning, <i>USA</i>

3.4 Metody

3.4.1 Kinetika oxidace vandetanibu cytochromy P450 3A5

Inkubační směsi s vandetanibem o různých koncentracích byli připraveny ve třech paralelních vzorcích o objemu 250 μ l s následujícím složením:

- 0,1 M fosfátový pufr KH_2PO_4 (pH 7,4)
- 5; 10; 25; 50; 100; 200 a 400 μ M vandetanib (0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 20 a 40 mM zásobní roztok v DMSO)
- 100 nM cytochrom P450
- 500 nM cytochrom b_5 (Bactosomy), 1200 nM cytochrom b_5 (SupersomyTM)
- 1 mM NADPH (zásobní roztok 10 mM)

Inkubační směsi byly připraveny smícháním fosfátového pufru s vandetanibem o různých koncentracích. Následně byl do této směsi přidán lidský cytochrom P450 3A5 koexprimovaný s NADPH:CYP reduktasou a případně cytochromem b_5 v hmyzích buňkách transfekovaných *Baculovirem* (SupersomyTM), viz Tabulka č. 2, str. 29, nebo buňkách *E. coli* (Bactosomy), zobrazeno v Tabulce č. 3, str. 29. Reakce byly iniciovány přidáním roztoku NADPH. Takto připravené inkubační směsi byly ponechány inkubovat za přítupu kyslíku v inkubátoru (Thermomixer compact) po dobu 20 minut při 450 RPM. Po uběhnutí inkubační doby byly reakce jednotlivých reakčních směsí zastaveny pomocí 1 ml dichlormethanu. Následně bylo do směsi přidáno 5 μ l 1 mM fenacetinu (vnitřní standard). V takto připravené směsi probíhala extrakce po dobu 2 minut a 1400 RPM. Spodní vrstva, obsahující organickou fázi byla po centrifugaci (Centrifuge 5418, 5 minut a 15 000 RCF) odebrána a ponechána v nových zkumavkách. K vrchní vodní vrstvě byl přidán opět dichlormethan a byla provedena druhá extrakce obdobně jako první. Odebrané spodní vrstvy byly spojené a odpařené na odparce (Labconco) při teplotě 37 °C. Vzorky byly rozpuštěné v 50 μ l metanolu pomocí sonikátoru (Elmasonic EASY 30H) po dobu 2 minut. Připravené vzorky byly následně separovány metodou HPLC, viz následující kapitola 3.4.2.

Tabulka č. 2: Charakteristika jednotlivých použitých Supersomálních systémů.

Číslo šarže	P450 (nmol/ml)	Protein (mg/ml)	RED (nmol/min/mg prot)	Cytochrom b ₅ (nmol/ml)
5231003	2,0	2,3	1000	-
6265004	1,0	16	1700	12

Tabulka č. 3: Charakteristika jednotlivých použitých Bactosomálních systémů.

Číslo šarže	P450 (nmol/ml)	Protein (mg/ml)	RED (nmol/min/mg prot)	Cytochrom b ₅ (nmol/ml)
LR008	2,8	14,5	331	-
R001	1,2	13,2	1167	-
BLR009	1,7	8,8	352	8,4
BR001	1,2	13,5	1133	6,0

3.4.2 Separace vandetanibu a jeho metabolitů

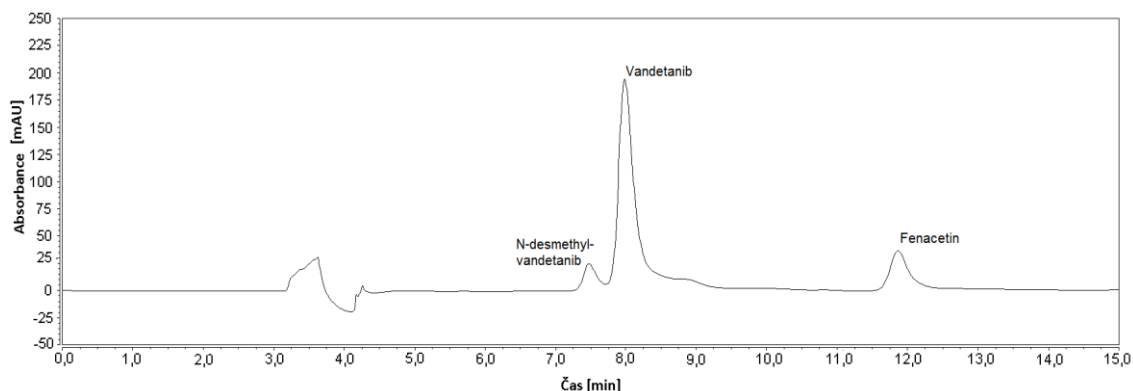
Separace vandetanibu a jeho metabolitů byla prováděna pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC. Na separaci byla použita mobilní fáze složená z 30 % acetonitrilu a 70 % (0,5 % triethylaminu, pH 3). Separace probíhala na koloně Nucleosil 100-5, C18, 250 x 4 mm, 5 μm při teplotě 37 °C. Aplikace, neboli nástřik na kolonu byl 25 μl. Rychlost průtoku mobilní fáze činila 0,6 ml/min a detekce metabolitů byla prováděná v UV oblasti při vlnové délce 254 nm.

3.4.3 Analýza získaných dat

Z analýzy HPLC byly získané chromatogramy, které byly následně zpracovány a vyhodnoceny v programu Chromeleon 7. Data o *N*-desmethylvandetanibu, vandetanibu a fenacetinu, které byly získané v programu Chromeleon 7 byly následně zpracovány v programu MS Excel a v programu Origin, ze kterého jsme získali finální grafy závislosti relativní plochy píku *N*-desmethylvandetanibu na koncentraci vandetanibu.

4 Výsledky

V rámci bakalářské práce byla studovaná oxidace vandetanibu lidskými rekombinantními cytochromy P450 3A5 exprimovanými v hmyzích buňkách transfekovaných *Baculovirem*, označovaných jako SupersomyTM. Také byly použity rekombinantní CYP3A5 exprimované v buňkách *E.coli*, označované jako Bactosomy. Oba systémy oxidovaly vandetanib na N-desmethylvandetanib, který byl separovaný pomocí metody HPLC (Obr. 6). Tvorba metabolitu vandetanibu byla závislá na přítomnosti redukovaného NADPH v inkubační směsi.



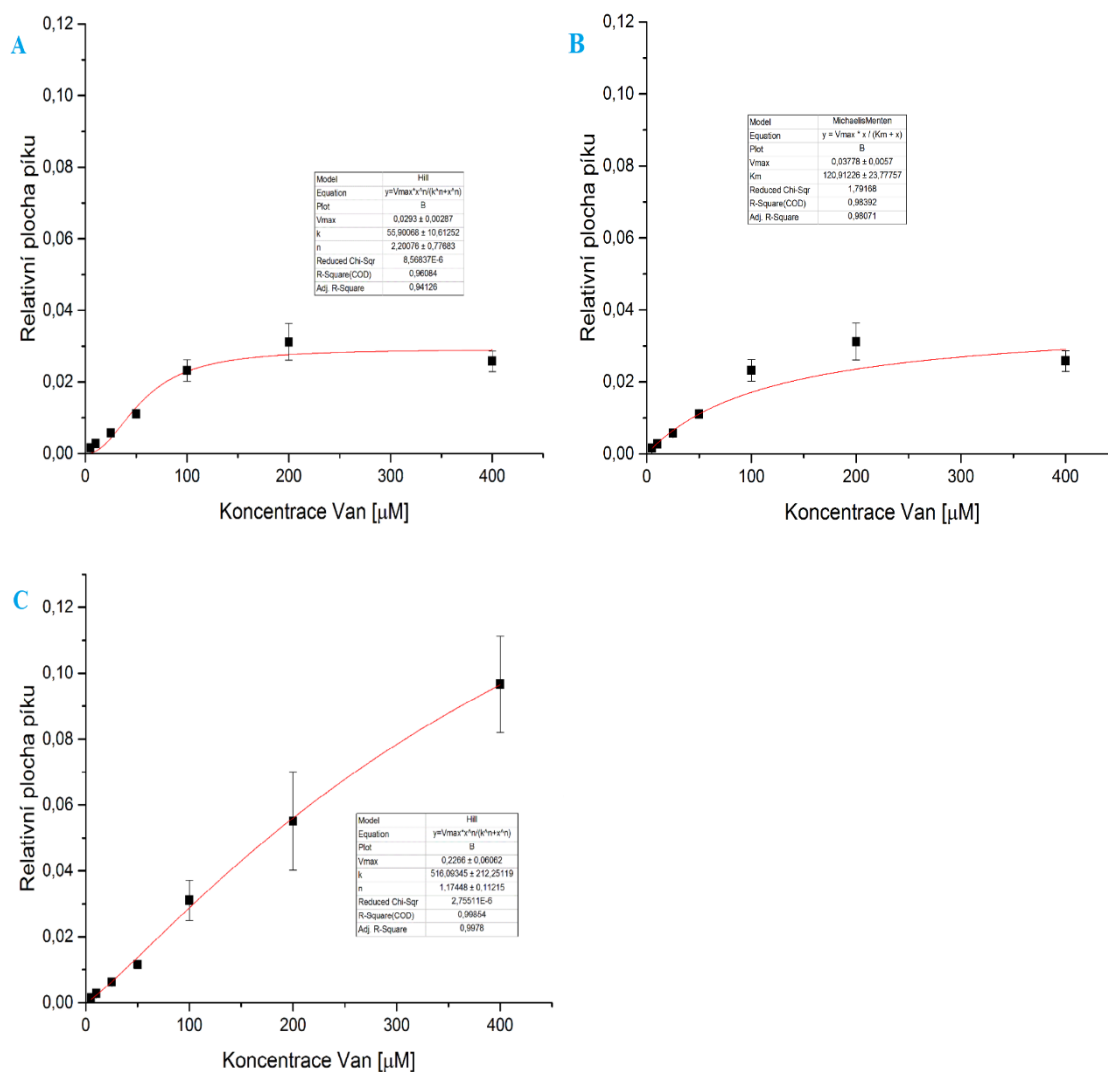
Obr. 6: Chromatografický záznam vandetanibu a jeho metabolitu, N-desmethylvandetanibu.

4.1 Oxidace vandetanibu rekombinantními cytochromy P450 3A5 exprimovanými v SupersomechTM

Cílem této části práce bylo zjistit vliv cytochromu b_5 na kinetiku oxidace vandetanibu. Za tímto účelem byl použit rekombinantní cytochrom P450 3A5 exprimovaný v hmyzích buňkách transfekovaných *Baculovirem* koexprimovaný s NADPH:CYP reduktasou a případně i s cytochromem b_5 . Charakteristiky systémů, které byly použité v této části práce, jsou uvedeny v tabulce č. 2, str. 29.

V rámci bakalářské práce byly testovány dva systémy, které se lišily přítomností cytochromu b_5 . Systém bez přítomnosti cytochromu b_5 (Obr. 7A, str. 32) vykazoval sigmoidální závislost, nižší aktivitu oxidace ($V_{\max} = 0,03$) a hodnotu Hillova koeficientu 2,20. Tato hodnota naznačuje, že do aktivního místa enzymu se mohou vázat dvě molekuly vandetanibu. Jelikož byly hodnoty při nižších koncentracích vandetanibu odchýlené, byl sestrojen graf s využitím kinetiky Michaelis-Menteové (Obr. 7B),

ve kterém jsou odchýlené hodnoty při vyšších koncentracích. Ze získaných grafů lze předpokládat, že skutečná hodnota bude mezi hodnotami z grafu 7A a 7B. Naopak systém s přítomností cytochromu b_5 (Obr. 7C) vykazuje hodnotu Hillova koeficientu 1,18, což značí spíše hyperbolickou závislost, než sigmoidální. Systém zároveň vykazoval výrazně vyšší aktivitu oxidace ($V_{\max} = 0,23$).

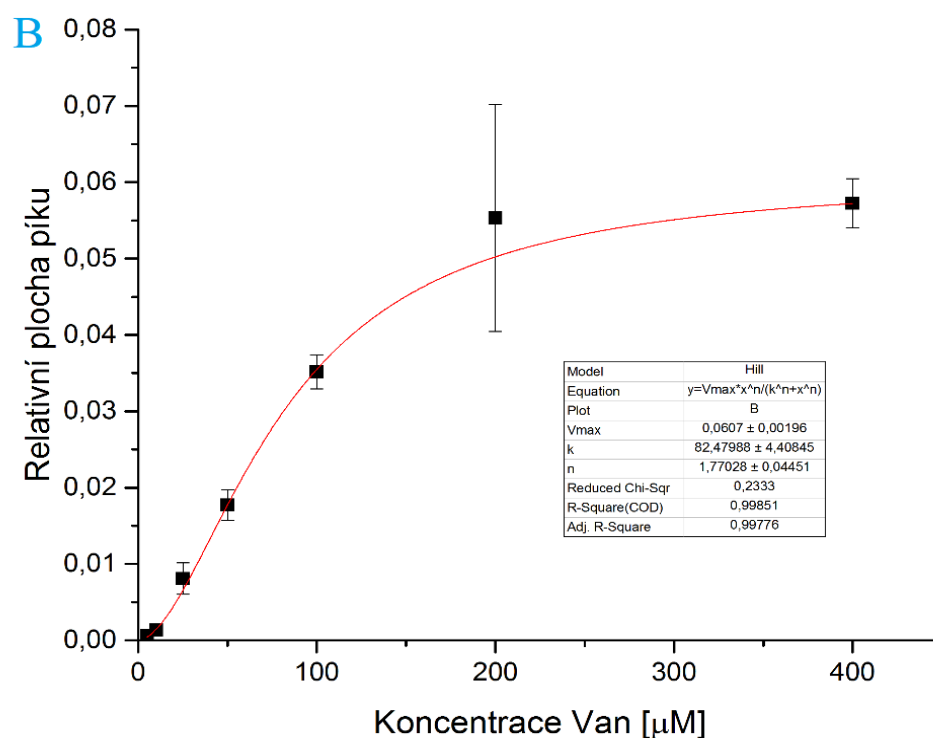
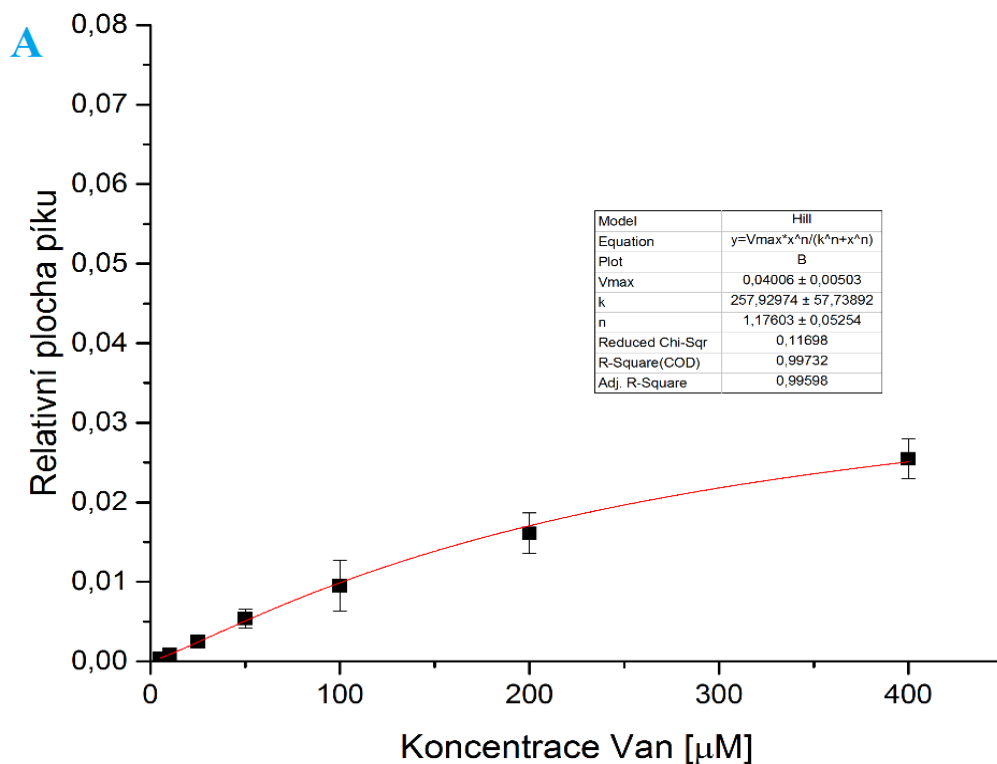


Obr. 7: Enzymová kinetika oxidace vandetanibu katalyzovaná pomocí CYP3A5 exprimované v SupersomechTM (A) s nižší hladinou reduktasy a bez přítomnosti cytochromu b_5 (Hillův výnos) (B) s nižší hladinou reduktasy a bez přítomnosti cytochromu b_5 (výnos podle Michaelis-Menteové) (C) s vyšší hladinou reduktasy a s cytochromem b_5 . Parametry jednotlivých měření jsou uvedeny na obrázku v tabulkách.

4.2 Oxidace vandetanibu rekombinantními cytochromy P450 3A5 exprimovanými v Bactosomech

V rámci studia vlivu cytochromu b_5 na oxidaci vandetanibu byl zjištěn stimulační efekt cytochromu b_5 . Bohužel se jednotlivé systémy lišily množstvím a aktivitou exprimované reductasy. V této části bakalářské práce byly proto provedené experimenty, jejichž cílem bylo zjistit vliv cytochromu b_5 a aktivity NADPH:CYP reductasy na oxidaci vandetanibu. Za tímto účelem byl použit rekombinantní lidský cytochrom P450 3A5 vázaný v membráně *E.coli* koexprimovaný s NADPH:CYP reduktasou a případně i s cytochromem b_5 . Charakteristiku použitých systémů nalezneme v tabulce č. 3, strana 29.

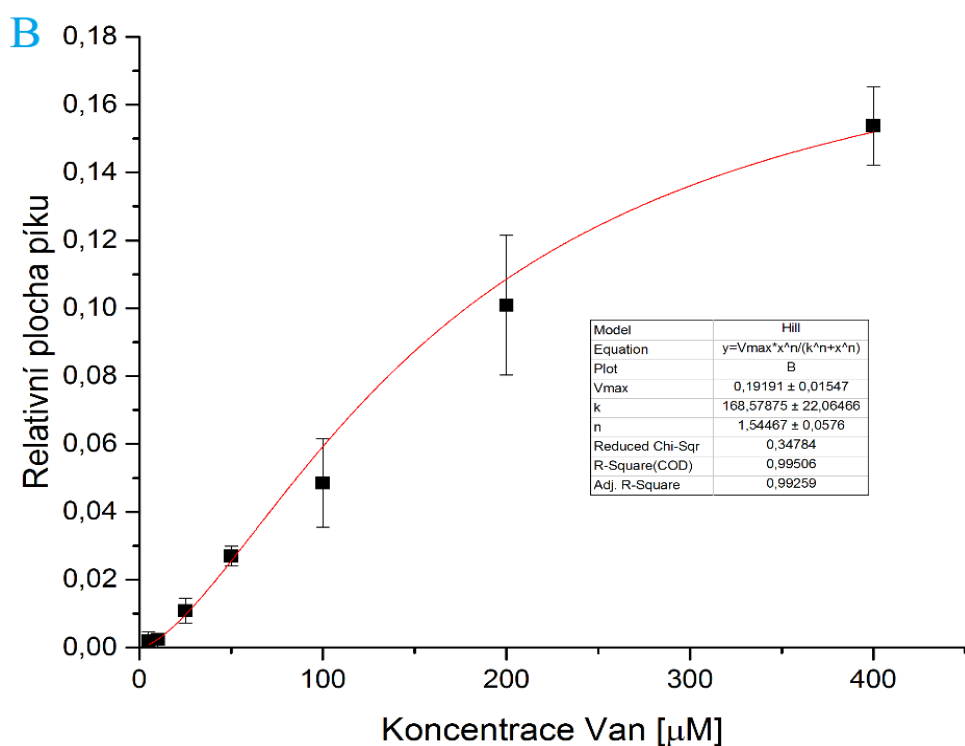
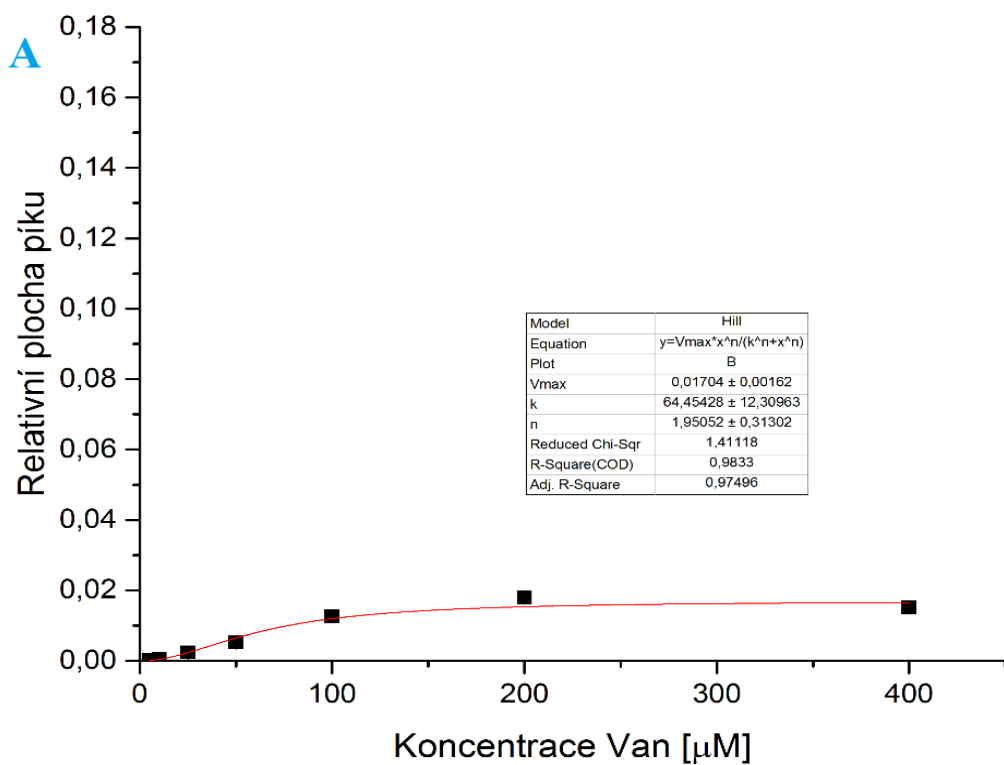
V rámci práce byly testované dva systémy bez přítomnosti cytochromu b_5 , které se lišily množstvím a aktivitou exprimované reductasy. Systém s nižší hladinou reductasy CYP3A5LR, zobrazený na Obr. 8A, str. 34, vykazoval hodnotu Hillova koeficientu 1,18, což značí spíše hyperbolickou závislost, než sigmoidální. Systém zároveň vykazoval nižší aktivitu oxidace ($V_{\max} = 0,04$) oproti systému s vyšší hladinou reductasy CYP3A5R ($V_{\max} = 0,06$). Systém s vyšší hladinou, zobrazený na Obr. 8B, str. 34 vykazoval sigmoidální závislost s hodnotou Hillova koeficientu 1,77. Tato hodnota tak naznačuje vazbu dvou molekul vandetanibu do aktivního centra enzymu.



Obr. 8: Enzymová kinetika oxidace vandetanibu katalyzovaná pomocí CYP3A5 exprimované v Bactosomech (A) s nižší hladinou reductasy CYP3A5LR, (B) s vyšší hladinou reductasy CYP3A5R. Parametry jednotlivých měření jsou uvedeny na obrázku v tabulkách.

Testovány byly také dva systémy CYP3A5 exprimované v *E.coli* koexprimované s cytochromem b_5 , které se lišily množstvím a aktivitou exprimované reductasy. Jak systém s nižší hladinou reductasy CYP3A5BLR, zobrazena na Obr. 9A, str. 36, tak systém s vyšší hladinou reductasy CYP3A5BR, viz. Obr. 9B, str. 36, vykazují charakter sigmoidální křivky. Systém s nižší hladinou reductasy vykazuje nižší aktivitu oxidace ($V_{\max} = 0,02$) s hodnotou Hillova koeficientu 1,95. Systém s vyšší hladinou reductasy vykazuje vyšší aktivitu oxidace ($V_{\max} = 0,19$) s hodnotou Hillova koeficientu 1,55. Obě hodnoty Hillových koeficientů signalizují, že se do aktivního centra enzymů mohou vázat dvě molekuly.

Enzymové kinetiky systémů s vyššími hladinami reductasy, které se liší přítomností cytochromu b_5 (Obr. 8B, str. 34 a Obr. 9B, str. 36) vykazují sigmoidální charakter křivky. Avšak aktivita oxidace vandetanibu je u systému s přítomností cytochromu b_5 3x větší než u systému bez přítomnosti zmíněného hemoproteinu, což značí příznivý vliv cytochromu b_5 na kinetiku oxidace vandetanibu. Naopak u systému s nižšími hladinami reductasy (Obr. 8A, str. 34 a Obr. 9A, str. 36) dochází spíše k poklesu aktivity oxidace u systému s přítomností cytochromu b_5 .



Obř. 9: Enzymov kinetika oxidace vandetanibu katalyzovan pomocí CYP3A5 exprimovan v Bactosomech za přítomnosti cytochromu *b*₅ (A) s niřší hladinou reduktasy CYP3A5BLR (B) s vyřší hladinou reduktasy CYP3A5BR. Parametry jednotliv měření jsou uvedeny na obrázku v tabulkách.

5 Diskuze

Cílem této bakalářské práce bylo studium a rozšíření poznatků o metabolismu protinádorového léčiva vandetanibu, který se používá na léčbu symptomatické nebo progresivní medulární rakoviny štítné žlázy. Vandetanib patří mezi látky, které inhibují tyrosinkinasy.

Ve studii, ze které jsme vycházeli, se (Indra a kol. 2019) věnovali studiu rekombinantních enzymů CYP exprimovaných v SupersomechTM. Ve zmíněné studii bylo prokázáno, že pomocí cytochromů P450 3A4, 2D6, 1A1, 2C8 a 3A5 dochází k oxidaci vandetanibu na demetylovaný metabolit vandetanibu, *N*-desmethylvandetanib. Také studovali kinetiku této oxidace pomocí CYP3A4, 2D6 a 1A1. Co však nebylo studováno, byla kinetika oxidace vandetanibu cytochromem P450 3A5, ačkoliv je druhým nejefektivnějším enzymem po 3A4.

V první části bakalářské práce byla studovaná kinetika oxidace vandetanibu katalyzovaná cytochromy P450 3A5 exprimovanými v SupersomechTM. Na analýzu enzymové kinetiky byly použité dva systémy lišící se aktivitou a množstvím exprimované reductasy NADPH:CYP a také přítomností cytochromu *b*₅ v inkubačních směsích.

Enzymová kinetika systému CYP3A5 bez přítomnosti cytochromu *b*₅ s aktivitou reductasy 29 pmol/min vykazovala sigmoidální závislost a nižší aktivitu oxidace. Hillův koeficient $n = 2,20$ signalizuje, že se do aktivního místa enzymu mohou vázat dvě molekuly vandetanibu. Avšak graf s použitím kinetiky Michaelis-Menteové vykazující hyperbolickou závislost, značí, že reálná hodnota bude nižší a bude začínat spíše číslem 1. Systém s přítomností cytochromu *b*₅ a s aktivitou reductasy 680 pmol/min vykazuje hyperbolickou závislost, ale vyšší aktivitu oxidace. Z hodnot aktivit oxidace vandetanibu je zřejmé, že systém s přítomností CYP3A5, NADPH:CYP reductasy a cytochromu *b*₅ tvoří metabolit vandetanibu, *N*-desmethylvandetanib téměř v 8x větším množství než systém, který obsahuje jenom CYP3A5 a NADPH:CYP reductasu. Získané výsledky značí, že oxidace vandetanibu pomocí CYP3A5 v přítomnosti cytochromu *b*₅ nevykazuje sigmoidální charakter a liší se tak od výsledků získaných pro CYP3A4 v rámci výše zmíněné studie (Indra, 2019).

Z výsledků první části bakalářské práce je vidět nárůst aktivity v systému s cytochromem *b*₅. Zároveň má tenhle systém i mnohem vyšší aktivitu reductasy (hladina

se liší cca 23x). Takže je možné, že nárůst aktivity oxidace souvisí s aktivitou reduktasy a nikoliv s přítomností cytochromu b_5 . Abychom to potvrdili, nebo vyvrátili, tak jsme použili i jiný systém. Konkrétně jsme použili Bactosomy, kde se systémy bez a s cytochromem b_5 vzájemně liší jen nepatrně v aktivitě reduktas.

V druhé části bakalářské práce proto byla studovaná kinetika oxidace vandetanibu katalyzovaná cytochromy P450 3A5 exprimovanými v Bactosomech. Enzymová kinetika CYP3A5LR vykazuje charakter hyperboly, což naznačuje, že do aktivního místa enzymu se váže pouze jedna molekula vandetanibu. Naopak, enzymové kinetiky katalyzované pomocí CYP3A5R, CYP3A5BLR a CYP3A5BR vykazují sigmoidální závislost. Hillův koeficient $n = 1,77$; $n = 1,95$ a $n = 1,55$ naznačuje, že se do aktivního místa daného enzymu mohou vázat dvě molekuly vandetanibu. Systémy s nižší hladinou reduktasy CYP3A5LR (43 pmol/min) a CYP3A5BLR (46 pmol/min) vykazují nižší aktivity oxidace v porovnání se systémy s vyšší hladinou reduktasy CYP3A5R (321 pmol/min) a CYP3A5BR (319 pmol/min).

Při porovnání enzymové kinetiky systémů bez přítomnosti cytochromu b_5 (Obr. 8, str. 34), je rozdíl aktivity oxidace vandetanibu jenom 1,5 x větší u enzymu s vyšší hladinou reduktasy, než u enzymu s nižší hladinou reduktasy. Naopak u systémů s přítomností cytochromu b_5 (Obr. 9, str. 36) dochází k tvorbě *N*-desmethylvandetanibu téměř v 10 x větším množství u systému s vyšší hladinou reduktasy než u systému s nižší hladinou reduktasy. Jelikož aktivity reduktas u systému lišící se přítomností cytochromu b_5 jsou prakticky stejné, z výsledku je zřejmé, že cytochrom b_5 výrazně přispívá k oxidaci vandetanibu.

Na rozdíl od porovnání systémů s vyššími hladinami reduktasy lišící se přítomností cytochromu b_5 , kde je aktivita oxidace 3x větší u systému s přítomností cytochromu b_5 , u systémů s nižšími hladinami reduktasy lišící se přítomností cytochromu b_5 , dochází spíše k poklesu aktivity oxidace u systému s přítomností cytochromu b_5 .

Ze získaných výsledků bakalářské práce (str. 31– 36) vyplývá, že NADPH:CYP reduktasa má vliv na aktivitu oxidace vandetanibu, jelikož systémy s vyššími hladinami reduktasy vykazují vyšší aktivitu oxidace vandetanibu. Přítomnost cytochromu b_5 nemá pozitivní vliv na kinetiku oxidace u Bactosomů s nižší hladinou reduktasy, ale u Bactosomů s vyšší hladinou reduktasy a u SupersomůTM výrazně zvyšuje stimulaci oxidace vandetanibu, což bylo pozorováno také ve zmíněné studii (Indra a kol. 2019).

U Bactosomů s nižší hladinou reductasy je množství cytochromu b_5 vyšší než množství reductasy, což znamená, že může docházet k blokaci přenosu elektronů z reductasy cytochromem b_5 a to může mít za následek, že nebyl pozorován nárůst aktivity oxidace oproti systému bez přítomnosti cytochromu b_5 . Poměr hladiny cytochromu b_5 a NADPH:CYP reductasy totiž ovlivňuje stimulaci nebo inhibici cytochromů P450 3A4 a 3A5 [49]. Jedním z vysvětlení těchto výsledků je zabránění interakce NADPH:CYP reductasy s cytochromem P450 v důsledku interakce příslušného cytochromu P450 s cytochromem b_5 [50].

6 Závěr

Výsledky předkládané bakalářské práce jsou příspěvkem k rozšíření poznatků o metabolismu protinádorového léčiva vandetanibu a také prokazují, že cíle práce byly splněny. V průběhu měření a vypracování této bakalářské práce byly zjištěny poznatky, které jsou shrnuty do následujících bodů:

- Rekombinantní lidské cytochromy P450 3A5 testované v předkládané práci jsou schopny oxidovat vandetanib.
- Rekombinantní lidské cytochromy P450 3A5 tvoří *N*-desmethylvandetanib. Druhý metabolit vandetanibu, vandetanib-*N*-oxid nebyl detekován.
- Systémy s vyšší hladinou reductasy vykazují vyšší aktivitu oxidace vandetanibu, než systémy s nižší hladinou reductasy, což značí vliv NADPH:CYP reductasy na oxidaci vandetanibu.
- U SupersomůTM má velký význam přítomnost cytochromu *b*₅ na aktivitu oxidace vandetanibu, kdy je tvořen metabolit téměř v 8x větším množství než bez přítomnosti cytochromu *b*₅. Cytochrom *b*₅ má také význam u Bactosomů s vyššími hladinami reductasy, kdy se za jeho přítomnosti tvoří 3x více metabolitu vandetanibu.
- Studium kinetiky oxidace vandetanibu na *N*-desmethylvandetanib, která byla katalyzovaná pomocí CYP3A5R, 3A5BR, 3A5BLR u Bactosomů signalizuje, že se do aktivního místa enzymu mohou vázat dvě molekuly, což vede k efektivnější oxidaci.

Použitá literatura

1. National cancer institute, Dostupné z: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (cit. 27.1.2020)
2. Nečas, E.: *Obecná patologická fyziologie*. Karolinum, Praha.
3. Rokyta R.; a kolektiv: *Fyziologie a patologická fyziologie*. Grada Publishing, Praha, **2015**
4. Alberts, B.; Bray, D.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P.: *Genetická rozmanitost*, v knize *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Espero Publishing, Ústí nad Labem, str. 300-303, **2005**, 2. vyd.
5. Mihalová, R.; Otová, B.: *Základy biologie a genetiky člověka*. Karolinum, Praha, **2014**
6. Krška, Z.; Hoskovec, D.; Petruželka, L.; a kolektiv: *Chirurgická onkologie*. Grada Publishing, Praha, **2014**
7. Černochoch, J.; a kolektiv: *Prekancerózy v trávicím traktu*. Grada Publishing, Praha, **2012**
8. World Health Organization. *The Global Burden of Disease: 2004 Update*. Geneva: World Health Organization; **2008**.
9. *Zdravotnícka ročenka Slovenskej republiky*. Národné centrum zdravotníckych informácií, **2018**, 227.
10. Národný onkologický register Slovenskej republiky, Dostupné z: <https://iszi.nczisk.sk/nor.sr/mortalita> (cit. 21.1.2020)
11. Klener, P. jr.; Klener P.: *Principy systémové protinádorové léčby*. Grada Publishing, Praha, **2013**
12. Slezáková, L.; a kolektiv: *Ošetřovatelství pro zdravotnické asistenty III*. Grada Publishing, Praha, **2007**
13. Válek, V.; Kala, Z.; Kiss, I.; a kolektiv: *Maligní ložiskové procesy jater*. Grada Publishing, Praha, **2006**
14. Baudino, T. A.: Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Current Drug Discovery Technologies*. 12, 3–20 (**2015**)
15. Gerber, D. E.: Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *American Family Physician*. 77, 311–319 (**2008**).

16. van Vollenhoven, R.F.: 64 - Kinase inhibition: A new therapeutic principle in rheumatology. In: *Rheumatology* (Sixth Edition). Hochberg, M. C.; Silman, A. J.; Smolen, J. S.; Weinblatt, M. E.; Weisman, M. H. (Ed.). Philadelphia: Mosby/Elsevier, (2015), p. 511–517, ISBN 978-0-323-09138-1
17. Litwack, G.: Chapter 5 - Enzymes. In: *Human Biochemistry*. Litwack; G. (Ed.). Boston: Academic Press, (2018), p. 95–129. ISBN 978-0-12-383864-3
18. Karavasilis, V.; Reid, A.; Sinha, R.; and De bono, J. S.: CHAPTER 17 - Cancer drug resistance. In: *Cancer Drug Design and Discovery*. Neidle, S. (Ed.). New York: Academic Press, (2008) p. 405–423. ISBN 978-0-12-369448-5
19. Hubbard, S. R.; and Miller, W. T.: Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Current opinion in cell biology*. 19, 117–123. (2007).
20. Hubbard, S.R.; Mohammadi, M.; and Schlessinger, J.: Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases. *The Journal of biological chemistry*. 273, 11987–11990. (1998)
21. Amato, R. J.; Stepankiw, M.; and Ochuwa, N. S.: Chapter 8 - Molecular-targeted Therapy for Renal Cell Carcinoma. In: *Renal Disease in Cancer Patients*, Finkel K. W.; and Howard S. C. (Eds.). New York: Academic Press, (2014) p. 115–127. ISBN 978-0-12-415948-8
22. Arora, A.; and Scholar, E.M.: Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 315, 971-979. (2005)
23. Tridente, G.: Chapter 7 - Erlotinib. In: *Adverse Events and Oncotargeted Kinase Inhibitors*, Tridente, G., (Ed.) New York: Academic Press, 2017, p. 145–165. ISBN 978-0-12-809400-6
24. Masuda, C.; Yanagisawa, M.; Yorozu, K.; Kurasawa, M.; Furugaki, K.; Ishikura, N.; Iwai, T.; Sugimoto, M.; and Yamamoto, K.: Bevacizumab counteracts VEGF-dependent resistance to erlotinib in an EGFR-mutated NSCLC xenograft model. *International Journal of Oncology*. 51, 425–434. (2017)
25. Steins, M.; Thomas, M.; and Geißler, M.: Erlotinib. *Recent Results in Cancer Research. Fortschritte der Krebsforsch. Progres dans les recherches sur le cancer* 211, 1–17. (2018)
26. Zhao, C.; Han, S. Y.; and Li, P. P.: Pharmacokinetics of Gefitinib: Roles of Drug Metabolizing Enzymes and Transporters. *Current Drug Delivery* 14, 282–288. (2017)

27. Rawluk, J.; and Waller, C. F.: Gefitinib. Recent results in cancer research. *Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans recherches sur le cancer* 211, 235–246. (2018)
28. Sim, E.H., Yang, I.A., Wood-Baker, R., Bowman, R.V., and Fong, K.M.: Gefitinib for advanced non-small cell lung cancer. The Cochrane database of systematic reviews. 2018. (2018).
29. Keating, G. M.; and Santoro, A.: Sorafenib. *Drugs* 69, 223–240. (2009).
30. Liang, Y.; Zheng, T.; Song, R.; Wang, J.; Yin, D.; Wang, L.; Liu, H.; Tian, L.; Fang, X.; Meng, X.; Jiang H.; Liu, J.; Liu, L.: Hypoxia-mediated sorafenib resistance can be overcome by EF24 through Von Hippel-Lindau tumor suppressor-dependent HIF-1 α inhibition in hepatocellular carcinoma. *Hepatology Baltiore, Md.* 57, 1847–1857. (2013)
31. Indra, R.; Pompach, P.; Martínek, V.; Takácsová, P.; Vavrová, K.; Heger, Z.; Adam, V.; Eckschlager, T.; Kopečková, K.; Arlt, V. M.; Stiborová, M.: Identification of Human Enzymes Oxidizing the Anti-Thyroid-Cancer Drug Vandetanib and Explanation of the High Efficiency of Cytochrome P450 3A4 in its Oxidation. *International Journal of Molecular Sciences*. 20, 3392 (2019).
32. Commander, H., Whiteside, G., and Perry, C.: Vandetanib. *Drugs*. 71, 1355–1365. (2011).
33. Ancker, O. V.; Krüger, M.; Wehland, M.; Infanger, M.; and Grimm, D.: Multikinase Inhibitor Treatment in Thyroid Cancer. *International journal of molecular sciences*. 21. (2019).
34. Grabowski, P.; Briest, F.; Baum, R. P.; Zaknun, J. J.; Kulkarni, H. R.; Zeitz, M.; and Hörsch, D.: Vandetanib therapy in medullary thyroid cancer. *Drugs of Today (Barcelona Spain 1998)* 48, 723–733. (2012)
35. Chougnet, C. N.; Schlumberger, M.; Leboulleux, S.; and Baudin, E.: [Vandetanib, in the management of patients with locally advanced or metastatic medullary thyroid carcinomas]. *Bulletin du Cancer (Paris)* 101, 891–895. (2014)
36. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. *Vandetanib*, CID=3081361, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vandetanib> (accessed on Feb. 15, 2020)
37. Martin, P.; Oliver, S.; Kennedy, S.J.; Partridge, E.; Hutchison, M.; Clarke, D.; Gilda, P.: Pharmacokinetics of vandetanib: three phase I studies in healthy subjects. *Clinical therapeutics*. 2012, 34, 221–237.

38. Martin, P.; Oliver, S.; Robertson, J.; Kennedy, S. J.; Read, J.; Duvauchelle, T.: Pharmacokinetic drug interactions with vandetanib during coadministration with rifampicin or itraconazole. *Drugs in research & development*. 11, 37–51, (2011)
39. Skalová, L.; a kolektiv: *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Karolinum, Praha, 2017.
40. Dostálek, M.; a kolektiv: *Farmakokinetika*. Grada Publishing, Praha, 2006
41. Stiborová, M.; Hudeček, J.; Páca, J. Jr.; Martínek, V.; Páca, J.: Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chemické Listy*. 98, 876 – 890 (2004)
42. Švihovec, J.; a kolektiv: *Farmakologie*. Grada Publishing, Praha, 2018
43. Zhou, S.: *Cytochrome P450 2D6: Structure, Function, Regulation and Polymorphism*; Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2016.
44. Ioannides, C.: *Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects*, CRC Press, 1996.
45. Fousek, M.; Víttek, L.; Blahoš, J.; Hajdúch, M.; Ruml, T.; a kolektiv: *Biologická léčiva: teoretické základy a klinická praxe*. Grada Publishing, Praha, 2012
46. Porowińska, D.; Wujak, M.; Roszek, K.; and Komoszyński, M.: [Prokaryotic expression systems]. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej*. 67, 119–129. (2013).
47. Marintcheva, B.: *Harnessing the Power of Viruses*; San Diego, CA: Academic Press, 2017
48. Divan, A.; Royds, J.: *Tools and Techniques in Biomolecular Science*; Oxford: Oxford University Press, 2013
49. Lee, S. J.; Goldstein, J. A.: Comparison of CYP3A4 and CYP3A5: the effects of cytochrome b5 and NADPH-cytochrome P450 reductase on testosterone hydroxylation activities. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 27(6), 663-337, (2012)
50. Im S.C, Waskell L.: The interaction of microsomal cytochrome P450 2B4 with its redox partners, cytochrome P450 reductase and cytochrome b5. *Archives of biochemistry and biophysics*. 507(1), 144-153, (2011)

