

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2021

Bc. Nikola Niederlová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Nové inhibitory v léčbě akutní
myeloidní leukémie**

Diplomová práce

Bc. Nikola Niederlová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2021 Vedoucí práce: Mgr. Pavla Kořalková, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Nikola NIEDERLOVÁ
Osobní číslo: R190067
Studijní program: N1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Nové inhibitory v léčbě akutní myeloidní leukémie
Zadávací katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

1. Vypracování řešete na téma „Nové inhibitory v léčbě akutní myeloidní leukémie“.
2. Zvládnutí použitých metod: kultivace buněčných linií, testy viability a cytotoxicity, western blot, PCR
3. Vyhodnocení zjištěných účinků inhibitorů na buněčných liniích

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

1. Gucký T, Řezníčková E, Radošová Muchová T et al. (2018) Discovery of N2-(4-Amino-cyclohexyl)-9-cyclopentyl- N6-(4-morpholin-4-ylmethyl-phenyl)-9H-purine-2,6-diamine as a Potent FLT3 Kinase Inhibitor for Acute Myeloid Leukemia with FLT3 Mutations. J Med Chem. 2018 May 10;61(9):3855-3869. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b01529. Epub 2018 Apr 30.
2. Lee HK, Kim HW, Lee IY et al. (2014) G-749, a novel FLT3 kinase inhibitor, can overcome drug resistance for the treatment of acute myeloid leukemia. Blood. 2014 Apr 3;123(14):2209-19. doi: 10.1182/blood-2013-04-493916. Epub 2014 Feb 14
3. Katherine A. Minson, Catherine C. Smith, Deborah DeRyckerea et al. The MERTK/FLT3 inhibitor MRX-2843 overcomes resistance-conferring FLT3 mutations in acute myeloid leukemia. JCI Insight. 2016 Mar 17; 1(3): e85630. Published online 2016 Mar 17. doi: 10.1172/jci.insight.85630

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Pavla Kořalková, Ph.D.
Ústav biologie



Datum zadání diplomové práce: 12. října 2019
Termín odevzdání diplomové práce: 31. července 2021

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan


prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 8. listopadu 2018

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora:	Nikola Niederlová
Název práce:	Nové inhibitory v léčbě akutní myeloidní leukémie
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce:	Mgr. Pavla Kořalková, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2021
Klíčová slova	Akutní myeloidní leukémie, FLT3, léčba AML, FLT3 inhibitory
Počet stran	69
Počet příloh	0
Jazyk:	Český

Souhrn

Akutní myeloidní leukémie (AML) je nejčastějším typem akutní leukémie u dospělých pacientů. Teoretická část práce se zabývá procesem leukemogeneze AML, úlohou Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3) receptoru v její patogenezi a léčbou, která se soustřeďuje především na cílenou terapii s využitím FLT3 inhibitorů.

Experimentální část se zaměřuje na hodnocení protinádorové aktivity kandidátních sloučenin LGR3922 a LGR4657 a studuje mechanismus inhibice na úrovni molekul onkogenní FLT3-ITD signalizace *in vitro* a *in vivo*. Na buněčných liniích odvozených od AML a xenotransplantačním myším modelu byl prokázán výrazný protinádorový účinek obou látek a schopnost duální inhibice FLT3 a kináz rodiny Src (SFK). Dosažené výsledky přispívají k rozvoji nových terapeutických přístupů založených na vysoké účinnosti duálních inhibitorů kináz, které mají potenciální využití v léčbě AML.

Biographical identification

Author's first name and surname:	Nikola Niederlová
Title:	New inhibitors in the treatment of acute myeloid leukemia
Type of thesis:	Master
Department:	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University Olomouc
Supervisor:	Mgr. Pavla Kořalková, Ph.D.
The year of presentation:	2021
Keywords	Acute myeloid leukemia, FLT3, AML treatment, FLT3 inhibitors
Number of pages	69
Number of appendices	0
Language:	Czech

Summary

Acute myeloid leukemia (AML) is one of the most common acute form of leukemia in adults. The theoretical part of the thesis introduces the process of AML leukemogenesis and the role of Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3) receptor in the disease pathogenesis. It further describes current treatment approaches, with the main focus on FLT3 inhibitors.

The experimental part of the thesis aims to assess the antitumor activity and the molecular mechanisms underlying the inhibition of oncogenic FLT3-ITD signaling by novel synthetic compounds LGR3922 and LGR4657. AML cell line-based experiments and a subcutaneous xenograft mouse model demonstrated potent antitumor activity of both tested compounds, which is mediated mainly through dual FLT3/Src family kinases (SFK) inhibition. Our results contribute to the development of new therapeutic approaches based on the high efficacy of the dual kinase inhibitors, with the potential for broadening its application to the AML treatment.

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací vypracovala samostatně pod vedením paní Mgr. Pavly Kořalkové, Ph.D. s použitím uvedené literatury.

V Olomouci dne:.....

Podpis:.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala paní Mgr. Pavle Kořalkové, Ph.D. za cenné rady, vstřícnost, trpělivost a čas, který mi věnovala během vypracovávání předložené diplomové práce. Poděkování patří také celému kolektivu Ústavu biologie LF UPOL za pomoc a ochotu. V neposlední řadě děkuji rodině a blízkým za podporu během studia.

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Cíle práce.....	2
3 Literární přehled.....	3
3.1 Akutní myeloidní leukémie.....	3
3.1.1 Etiologie a molekulární patogeneze.....	3
3.1.2 Klinické příznaky.....	4
3.1.3 Diagnostika a klasifikace.....	5
3.2 Úloha FLT3 v patogenezi AML.....	7
3.2.1 FLT3 receptor.....	7
3.2.2 FLT3 ligand.....	8
3.2.3 Signalizace wild-type FLT3.....	8
3.2.4 Onkogenní signalizace FLT3.....	9
3.2.4.1 FLT3-ITD.....	9
3.3 Klasická léčba AML.....	11
3.4 Cílená léčba AML.....	12
3.4.1 FLT3 inhibitory.....	12
3.4.1.1 Inhibitory 1. generace.....	13
3.4.1.2 Inhibitory 2. generace.....	14
3.4.2 Rezistence vůči FLT3 inhibitorům.....	15
3.4.2.1 Primární rezistence.....	15
3.4.2.2 Sekundární rezistence.....	16
3.4.2.3 Překonání rezistence.....	16
4 Materiál a metody.....	17
4.1 Biologický materiál.....	17
4.1.1 Buněčné linie.....	17
4.1.2 Zvířecí modely.....	17
4.2 Chemikálie.....	17
4.3 Roztoky a jejich příprava.....	19
4.4 Inhibitory.....	21
4.5 Protilátky.....	21
4.6 Soupravy.....	22
4.7 Přístroje.....	22
4.8 Kultivace buněk.....	23
4.9 Test na přítomnost mykoplazmat.....	23
4.10 Testování inhibitorů <i>in vitro</i>	24
4.10.1 Test cytotoxicity.....	24
4.10.2 Příprava buněčných lyzátů.....	25
4.10.3 SDS-PAGE.....	27
4.10.4 Western blotting a imunodetekce proteinů.....	27
4.11 Testování inhibitorů <i>in vivo</i>	28
4.11.1 Tvorba MV4-11 xenograftů v myších Athymic Nude-Foxn1 ^{nu}	28

4.11.2 Příprava buněčných lyzátů z MV4-11 tumorů	29
4.11.3 SDS-PAGE, Western blotting a imunodetekce proteinů.....	30
5 Výsledky.....	31
5.1 Test na detekci přítomnosti mykoplazmat.....	31
5.2 Účinnost inhibitorů <i>in vitro</i>	31
5.2.1 Vliv testovaných inhibitorů na proliferaci a viabilitu buněk.....	32
5.2.2 Duální inhibice FLT3/SFK.....	33
5.2.3 Vliv FL3 ligandu na protinádorovou aktivitu testovaných inhibitorů.....	41
5.3 Účinnost inhibitorů <i>in vivo</i>	43
6 Diskuse	47
7 Závěr.....	50
8 Literatura	51

Seznam zkratek

ABL1	z angl. v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
AKT	proteinkináza B
ALK	z angl. anaplastic lymphoma kinase
allo-HSCT	alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk
AML	akutní myeloidní leukémie
APL	akutní promyelocytární leukémie
ASXL1	z angl. additional sex combs like 1
AXL	z angl. tyrosine-protein kinase receptor UFO
BCL-2	z angl. B-cell lymphoma 2
BCR	z angl. breakpoint cluster region protein
c-KIT	tyrosin kinázový receptor známý také jako CD117 (z angl. cluster of differentiation 117) nebo SCFR (z angl. mast/stem cell growth factor receptor)
CBFB	z angl. core-binding factor subunit beta
CDK4/6	cyklin-dependentní kináza 4/6
CEBPA	z angl. CCAAT/enhancer-binding protein alpha
CML	chronická myeloidní leukémie
CSF1R	z angl. colony stimulating factor 1 receptor
CYP3A4	cytochrom P450 3A4
DDX41	z angl. DEAD-Box Helicase 41
DEK	z angl. DEK proto-oncogene
DNMT3A	DNA (cytosin-5)-methyltransferáza 3A
EMA	Evropská léková agentura
ERK1/2	z angl. extracellular signal-regulated kinase 1/2
EZH2	z angl. enhancer of zeste homolog 2
FBS	fetální bovinní sérum
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FGR	z angl. Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace

FL	FLT3 ligand
FLK-1	z angl. fetal liver kinase 1
FLT3	z angl. fms-like tyrosine kinase 3
FYN	z angl. proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza
GATA2	z angl. GATA-binding factor 2
HCK	z angl. tyrosine-protein kinase HCK
HRP	křenová peroxidáza
IDH1/2	isocitrátdehydrogenáza 1/2
ITD	interní tandemová duplikace
JAK2/3	z angl. Janus kinase 2/3
KMT2A	z angl. histone-lysine <i>N</i> -methyltransferase 2A
KRAS	z angl. Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LCK	z angl. lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LTK	z angl. leukocyte receptor tyrosine kinase
LYN	z angl. tyrosine-protein kinase Lyn
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinázy
MDM2	z angl. mouse double minute 2 homolog
MECOM	z angl. MDS1 and EVI1 complex locus protein
MKL1	z angl. megakaryoblastic leukemia 1 protein
MLL	z angl. myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia
MLLT3	z angl. myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to 3
MYH11	z angl. myosin-11
NPM1	nukleofosmin 1
NRAS	z angl. neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
NUP214	z angl. nucleoporin 214
p53	z angl. tumor protein P53
PBS	z angl. phosphate-buffered saline
PDGFR α/β	z angl. platelet-derived growth factor receptor α/β
Pen-Strep	penicillin-streptomycin

PHF6	z angl. PHD finger protein 6
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PML	z angl. promyelocytic leukemia protein
PTEN	z angl. phosphatase and tensin homolog
RAD21	z angl. double-strand-break repair protein rad21 homolog
RAF	z angl. rapidly accelerated fibrosarcoma (serin/threonin protein kinase)
RARA	z angl. retinoic acid receptor alpha
RAS	z angl. rat sarcoma (GTPasa)
RBM15	z angl. putative RNA-binding protein 15
RET	z angl. rearranged during transfection (tyrosin kinase receptor)
RT-PCR	PCR spojená s reverzní transkripcí
RUNX1	z angl. runt-related transcription factor 1
RUNX1T1	z angl. RUNX1 partner transcriptional co-repressor 1
SF3B1	z angl. splicing factor 3B subunit 1
SFK	kinázy rodiny Src
SMC1A/3	z angl. structural maintenance of chromosomes protein 1A/3
SMO	z angl. Smoothened
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
SRC	z angl. proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src (sarcoma)
SRSF2	z angl. splicing factor, arginine/serine-rich 2
STAG1/2	z angl. cohesin subunit SA-1/2
STAT5	z angl. signal transducer and activator of transcription 5
SYK	z angl. spleen tyrosine kinase
TBS	z angl. Tris-buffered saline
TCGA	z angl. The Cancer Genome Atlas

TET2	z angl. tet methylcytosine dioxygenase 2
TKD	tyrosin kinázová doména
TRKA/B/C	z angl. tropomyosin receptor kinase A/B/C
U2AF1	z angl. U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1
VAV	z angl. vav guanine nucleotide exchange factor
VEGFR1/2/3	receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor 1/2/3
WHO	Světová zdravotnická organizace
wt-FLT3	wild-type FLT3
WT1	z angl. Wilms tumor 1
ZRSR2	z angl. U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor 35 kDa subunit-related protein 2

Seznam obrázků

Obrázek 1: Struktura FLT3 receptoru. Ig-like D – imonuglobulin-like domény, TD – transmembránová doména, JD – juxtamembránová doména, KD1/2 – kinázové domény 1/2, KI – kinázový inzert, AS – aktivační smyčka (upraveno podle Grafone *et al.*, 2012; Gebru *et Wang*, 2020).

Obrázek 2: Schéma signální dráhy FLT3-ITD (upraveno podle Grafone *et al.*, 2012; Kazi *et Rönnstrand*, 2019a; Voisset *et al.*, 2020).

Obrázek 3: Schéma experimentu testování inhibitorů *in vivo*.

Obrázek 4: Test na detekci přítomnosti mykoplazmat v buněčné linii KBM-5res. M – marker relativní molekulové hmotnosti, P – pozitivní kontrola, N – negativní kontrola, V – vzorek DNA z buněčné linie KBM-5res.

Obrázek 5: Cytotoxický efekt použitých inhibitorů v buněčných liniích (A) MV4-11 (B) MOLM-13. QUIZ – quizartinib, DAS – dasatinib. Jednotlivé body v grafech vyjadřují průměr a směrodatnou odchylku ze tří nezávislých experimentů.

Obrázek 6: Cytotoxický efekt použitých inhibitorů v buněčné linii KBM-5res. QUIZ – quizartinib, DAS – dasatinib. Jednotlivé body v grafech vyjadřují průměr a směrodatnou odchylku ze tří nezávislých experimentů.

Obrázek 7: Detekce vybraných proteinů v buněčné linii KBM-5res po 6 hod inkubace s testovanými inhibitory. Inhibitory byly použity v koncentraci 250 nmol·l⁻¹. Protein GAPDH sloužil jako kontrola nánosu vzorků. C – kontrola (0,01% DMSO), Q – quizartinib, D – dasatinib.

Obrázek 8: Detekce vybraných proteinů v buněčné linii MV4-11 po 1 hod inkubace s testovanými inhibitory. Inhibitory byly použity v koncentracích 10; 100; 250; 1000 nmol·l⁻¹, popř. v kombinaci Q a D: 100 + 250; 100 + 1000; 10 + 1000 nmol·l⁻¹. Protein GAPDH sloužil jako kontrola nánosu vzorků. C – kontrola (0,01% DMSO), Q – quizartinib, D – dasatinib.

Obrázek 9: Detekce vybraných proteinů v buněčné linii MV4-11 po 6 hod inkubace s testovanými inhibitory. Inhibitory byly použity v koncentracích 10; 100; 250; 1000 nmol·l⁻¹, popř. v kombinaci Q a D: 100 + 250; 100 + 1000; 10 + 1000 nmol·l⁻¹. Protein GAPDH sloužil jako kontrola nánosu vzorků. C – kontrola (0,01% DMSO), Q – quizartinib, D – dasatinib.

Obrázek 10: Detekce vybraných proteinů v buněčné linii MOLM-13 po 1 hod inkubace s testovanými inhibitory. Inhibitory byly použity v koncentracích 10; 100; 250;

1000 nmol·l⁻¹, popř. v kombinaci Q a D: 100 + 250; 100 + 1000; 10 + 1000 nmol·l⁻¹. Protein GAPDH sloužil jako kontrola nánosu vzorků. C – kontrola (0,01% DMSO), Q – quizartinib, D – dasatinib.

Obrázek 11: Detekce vybraných proteinů v buněčné linii MOLM-13 po 6 hod inkubace s testovanými inhibitory. Inhibitory byly použity v koncentracích 10; 100; 250; 1000 nmol·l⁻¹, popř. v kombinaci Q a D: 100 + 250; 100 + 1000; 10 + 1000 nmol·l⁻¹. Protein GAPDH sloužil jako kontrola nánosu vzorků. C – kontrola (0,01% DMSO), Q – quizartinib, D – dasatinib.

Obrázek 12: Cytotoxický efekt použitých inhibitorů s/bez přítomnosti FLT3 ligandu o koncentraci 50 ng·ml⁻¹ v buněčné linii MOLM-13. QUIZ– quizartinib, DAS – dasatinib, FL – FLT3 ligand. Jednotlivé body v grafech vyjadřují průměr a směrodatnou odchylku ze tří nezávislých experimentů.

Obrázek 13: Detekce vybraných proteinů v buněčné linii MOLM-13 po 2 hod inkubace s testovanými inhibitory a FLT3 ligandem o koncentraci 50 ng·ml⁻¹. Inhibitory byly použity v koncentraci 10 nmol·l⁻¹, pouze dasatinib 250 nmol·l⁻¹. Protein GAPDH sloužil jako kontrola nánosu vzorků. C – kontrola (0,01% DMSO), FL – FLT3 ligand, Q – quizartinib, D – dasatinib.

Obrázek 14: Detekce vybraných proteinů v MV4-11 tumorech v Athymic Nude-Foxn1^{nu} myších po 24 a 48 hod od aplikace quizartinibu o koncentraci 10 mg·kg⁻¹. Protein GAPDH sloužil jako kontrola nánosu vzorků. C – kontrola (5% hydroxypropyl-β-cyclodextrin).

Obrázek 15: Detekce vybraných proteinů v MV4-11 tumorech v Athymic Nude-Foxn1^{nu} myších po 24 a 48 hod od aplikace inhibitorů LGR3922 a LGR4657 o koncentraci 10 mg·kg⁻¹. Protein GAPDH sloužil jako kontrola nánosu vzorků. C – kontrola (okyselený fyziologický roztok).

Obrázek 16: Analýza fosforylace FLT3 a SFK v MV4-11 tumorech v Athymic Nude-Foxn1^{nu} myších po 24 a 48 hod od aplikace quizartinibu o koncentraci 10 mg·kg⁻¹. Protein GAPDH sloužil jako kontrola nánosu vzorků. C – kontrola (5% hydroxypropyl-β-cyclodextrin).

Obrázek 17: Analýza fosforylace FLT3 a SFK v MV4-11 tumorech v Athymic Nude-Foxn1^{nu} myších po 24 a 48 hod od aplikace testovaných inhibitorů. Protein GAPDH sloužil jako kontrola nánosu vzorků. C – kontrola (okyselený fyziologický roztok), DAS – dasatinib.

Seznam tabulek

Tabulka 1: Funkční kategorie genů zapojených v leukemogenezi u *de novo* AML pacientů (převzato z Roussel *et al.*, 2020).

Tabulka 2: Klasifikace AML a příbuzných neoplazií podle WHO (převzato z Arber *et al.*, 2016).

Tabulka 3: Seznam použitých protilátek. R – králík, G – koza.

Tabulka 4: Složení PCR reakční směsi pro detekci mykoplazmat.

Tabulka 5: Podmínky PCR reakce pro detekci mykoplazmat.

Tabulka 6: Vybrané koncentrace testovaných inhibitorů na buněčných liniích MV4-11 a MOLM-13.

Tabulka 7: Vybrané koncentrace testovaných inhibitorů na buněčné linii KBM-5res.

Tabulka 8: Vybrané koncentrace testovaných inhibitorů na buněčné linii MOLM-13 pro testování účinnosti FLT3 ligandu.

Tabulka 9: Vybrané koncentrace testovaných inhibitorů na buněčných liniích MV4-11 a MOLM-13 s dobou inkubace 1 nebo 6 hod.

Tabulka 10: Vybrané koncentrace testovaných inhibitorů na buněčné linii MOLM-13 s dobou inkubace 2 hod v přítomnosti nebo nepřítomnosti FLT3 ligandu.

Tabulka 11: Vybrané koncentrace testovaných inhibitorů na buněčné linii KBM-5res s dobou inkubace 6 hod.

Tabulka 12: Seznam detekovaných proteinů.

Tabulka 13: Schéma experimentu testování inhibitorů *in vivo*.

1 Úvod

Akutní myeloidní leukémie (AML) je maligní onemocnění hematopoézy, které je charakterizováno akumulací nezralých myeloidních prekursorů v kostní dřeni a periferní krvi. AML vzniká na podkladu cytogenetických abnormalit a genových mutací v kmenových hematopoetických buňkách a progenitorech. Jednou z nejčastějších mutací u AML pacientů je mutace ve *FLT3* genu kódující FLT3 receptor, který má důležitou úlohu v procesech regulace hematopoézy. FLT3 receptor tak představuje u AML významný terapeutický cíl, proti němuž je v posledních letech vyvíjena moderní cílená léčba v podobě FLT3 inhibitorů. Navzdory vysoké léčebné odpovědi na FLT3 inhibitory dochází u většiny pacientů ke ztrátě efektivity léčby v důsledku rozvoje rezistence. V současné době se tak výzkum soustřeďuje nejen na vývoj nových účinných látek, ale i na možnosti kombinační terapie, které by vedly ke snížení rizika vzniku rezistence.

2 Cíle práce

1. Vypracování rešerše na téma „Nové inhibitory v léčbě akutní myeloidní leukémie“.
2. Zvládnutí použitých metod: kultivace buněčných linií, testy viability a cytotoxicity, western blot, PCR.
3. Vyhodnocení zjištěných účinků inhibitorů na buněčných liniích.

3 Literární přehled

3.1 Akutní myeloidní leukémie

Akutní myeloidní leukémie (AML) je klonální onemocnění hematopoézy, které je charakteristické proliferací a akumulací nezralých a/nebo abnormálně diferencovaných myeloidních buněk (blastů) v kostní dřeni, odkud jsou vyplavovány do krve a extramedulárních tkání (Irons *et al.*, 1996; Döhner *et al.*, 2015).

AML je nejčastějším typem akutní leukémie u dospělých a její incidence se zvyšuje s narůstajícím věkem, kdy většina pacientů má nad 65 let (Shah *et al.*, 2013; De Kouchkovsky *et al.*, 2016). U dětí mladších 15 let se AML vyskytuje jen vzácně, kdy zahrnuje pouze 15–20 % případů dětských akutních leukémií (Creutzig *et al.*, 2012; De Rooij *et al.*, 2015).

3.1.1 Etiologie a molekulární patogeneze

AML u většiny diagnostikovaných pacientů vzniká *de novo*. Tzv. sekundární AML je asociována s některými hematologickými onemocněními (myelodysplastický syndrom, myeloproliferativní neoplázie nebo aplastická anémie), popř. vzniká jako následek předchozí protinádorové léčby (therapy-related AML) (Boddu *et al.*, 2017). K rozvoji AML dochází v důsledku maligní transformace kmenových hematopoetických buněk a progenitorů, která vzniká na základě akumulace chromozomálních aberací (translokace, inverze, delece aj.) a/nebo genových mutací (bodové mutace, krátké inserce/delece, duplikace atd.). AML je tak značně heterogenní onemocnění (Irons *et al.*, 1996; Mrózek *et al.*, 2004; Walter *et al.*, 2009; Döhner *et al.*, 2015). Ačkoliv většina mutací postihuje somatické buňky, diagnostika germinálních mutací asociovaných s AML nabývá na významu. Familiární predispozice k AML je spojována především s mutacemi v genech *RUNX1*, *CEBPA*, *GATA2* a *DDX41* (Song *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2004; Hahn *et al.*, 2011; Polprasert *et al.*, 2015).

Leukemogeneze je mnohastupňový proces, který kromě akumulace somatických mutací zahrnuje kaskádu řady dalších událostí. Průběh je do značné míry ovlivněn povahou získaných mutací, jejich vzájemnými interakcemi a genetickými predispozicemi jedince. Již v preleukemických buňkách se objevují tzv. „passenger“ mutace, které se často vyskytují v genech účastnících se epigenetických procesů (*DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *IDH1/2*), avšak samotné nejsou schopny iniciovat rozvoj

AML. Na počátku diagnózy AML bývá alelická frekvence těchto mutací vysoká (Welch *et al.*, 2012; Genovese *et al.*, 2014; Papaemmanuil *et al.*, 2016).

K transformaci do AML dochází až v důsledku vzniku iniciujících, tzv. „driver“ mutace, která danému klonu umožní neomezenou buněčnou proliferaci (*FLT3*, *NRAS*, *c-KIT*) a/nebo zajistí blok normální myeloidní diferenciaci (*RUNX1T1*, *CEBPA*, *TP53*) (Vosberg *et Greif*, 2019). V rámci The Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network byly tyto rekurentní cytogenetické a molekulárně-genetické abnormality organizovány do 8 funkčních skupin. Signifikantně mutované geny kódují molekuly signálních drah, transkripční faktory, nádorové supresory aj. (viz Tabulka 1). Studie publikovaná Papaemmanuil *et al.* (2016) identifikovala 5234 „driver“ mutací v 76 různých genech a genomických oblastech a prokázala, že u většiny AML pacientů (86 %) se vyskytují více než dvě „driver“ mutace.

Tabulka 1: Funkční kategorie genů zapojených v leukemogenezi u *de novo* AML pacientů (převzato z Roussel *et al.*, 2020).

Funkční kategorie		Geny
Signální dráhy		Mutace <i>FLT3</i> , <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> , <i>KIT</i>
Epigenetické regulace	geny modifikující chromatin	Mutace <i>ASXL1</i> a <i>EZH2</i> ; fúze <i>MLL</i>
	geny vztahující se k metylaci DNA	Mutace <i>DNMT3A</i> , <i>TET2</i> , <i>IDH1</i> , <i>IDH2</i>
Nukleofosmin		Mutace <i>NPM1</i>
Komplex spliceozomu		Mutace <i>SRSF2</i> , <i>SF3B1</i> , <i>U2AF1</i> , <i>ZRSR2</i>
Kohezinový komplex		Mutace <i>RAD21</i> , <i>STAG1</i> , <i>STAG2</i> , <i>SMC1A</i> , <i>SMC3</i>
Myeloidní transkripční faktory		Mutace <i>RUNX1</i> , <i>CEBPA</i> , <i>GATA2</i> ; fúze <i>RUNX1-RUNX1T1</i> , <i>PML-RARA</i> , <i>MYH11-CBFB</i>
Nádorové supresory		Mutace <i>WT1</i> , <i>TP53</i> , <i>PHF6</i> (<i>PTEN</i> a <i>MDM2</i> deregulace)

3.1.2 Klinické příznaky

Klinické příznaky AML jsou zapříčiněny selháním normální hematopoézy spojené s infiltrací kostní dřeně, případně dalších orgánů, leukemickými buňkami a s cytopenií. Symptomy bývají často nespecifické, tudíž se mohou vyskytovat i u jiných onemocnění. Mezi takové projevy patří například únava, malátnost, bledost, dušnost, horečka, pokles váhy, zvýšené riziko infekcí, nevolnost, zvracení, bolest na hrudi, tvorba modřin, anémie nebo krvácení z nosu a dásní (Löwenberg *et al.*, 1999; Asif *et Hassan*, 2012; Shephard *et al.*, 2016).

Rozšíření leukemických buněk do dalších orgánů může vyvolat hepatomegalii, splenomegalii, lymfadenopatii, bolest kostí nebo kožní leze. U některých jedinců se může vyskytnout hyperleukocytóza způsobující leukostázu, která vyvolává poruchy CNS. Vzácně se u pacientů mohou objevit metabolické abnormality, jako je hyperurikémie nebo hypokalcémie (Löwenberg *et al.*, 1999).

3.1.3 Diagnostika a klasifikace

Standardní postupy pro diagnostiku AML zahrnují morfologické, imunofenotypizační, cytogenetické a v neposlední řadě molekulárně-genetické vyšetření periferní krve a kostní dřeně. V případě AML je v krevním obrazu příznačná přítomnost blastů a zbytkové populace zralých granulocytů při absenci středních vývojových forem – tzv. hiatus leucaemicus (Šálek, 2012). Pro stanovení diagnózy AML je nutná přítomnost více než 20 % blastů. Jen ve vzácných případech může být počet blastů menší než 20 % (Betz *et Hess*, 2010; Döhner *et al.*, 2017). Do celkového počtu blastů jsou zahrnuty myeloblasty, monoblasty a megakaryoblasty. V případě AML s monocytární, popř. myelomonocytární diferenciací jsou za ekvivalenty blastů považovány monoblasty a promonocyty (Döhner *et al.*, 2017).

Přesnější vyšetřovací metodou, než přináší studium morfologie, je imunofenotypizace pomocí průtokové cytometrie. Imunofenotypizační vyšetření umožňuje identifikaci blastů, stanovení jejich linie a zjištění imunofenotypu (Béné *et al.*, 2011; Chen *et Cherian*, 2017).

Chromozomální změny jsou identifikovány pomocí konvenčního cytogenetického vyšetření nebo fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Jedna nebo i více chromozomálních abnormalit bývá detekováno přibližně u 55 % dospělých pacientů (Mrózek *et al.*, 2004; Döhner *et al.*, 2010; Meyer *et Levine*, 2014).

V neposlední řadě se provádí molekulárně genetická analýza, která dokáže identifikovat fúzní geny a genové mutace, což je nezbytné zejména u pacientů s normálním karyotypem. Využívá se například PCR spojená s reverzní transkripcí (RT-PCR), arraye pro jednonukleotidové polymorfismy (SNP) nebo metody sekvencování nové generace (Döhner *et al.*, 2010; Weinberg *et al.*, 2017).

Na základě zmíněných diagnostických metod je AML podle WHO klasifikována do několika subtypů (Arber *et al.*, 2016), které jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2: Klasifikace AML a příbuzných neoplazií podle WHO (převzato z Arber *et al.*, 2016).

AML s rekurentními genetickými abnormalitami
AML s t(8,21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
AML s inv(16)(p13.1q22) nebo t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
APL s <i>PML/RARA</i>
AML s t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>
AML s t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
AML s inv(3)(q21.3q26.2) nebo t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i>
AML (megakaryoblastická) s t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i>
Prozatímní entita: AML s <i>BCR-ABL1</i>
AML s mutací <i>NPM1</i>
AML s bialelickou mutací <i>CEBPA</i>
Prozatímní entita: AML s mutací <i>RUNX1</i>
AML s myelodysplastickými změnami
AML vzniklá v souvislosti s léčbou
AML, blíže nespecifikovaná
AML s minimální diferenciací
AML s vyzráváním
AML bez vyzrávání
Akutní myelomonocytární leukémie
Akutní monoblastická/monocytární leukémie
Čistá erytroidní leukémie
Akutní megakaryoblastická leukémie
Akutní bazofilní leukémie
Akutní panmyelóza s myelofibrózou
Myeloidní sarkom
Myeloidní proliferace související s Downovým syndromem
Dočasná abnormální myelopoéza
Myeloidní leukémie asociovaná s Downovým syndromem

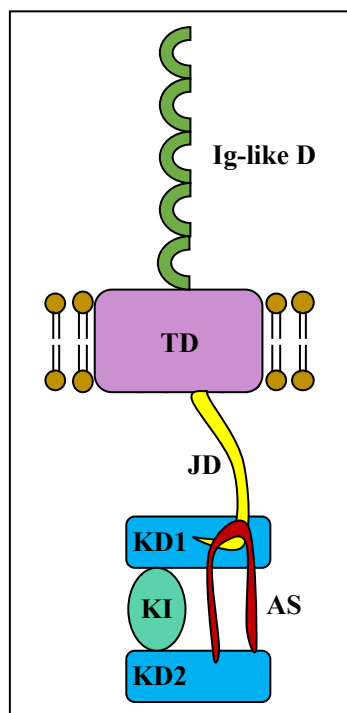
Ačkoliv AML s mutací ve *FLT3* genu není dle WHO klasifikace samostatnou jednotkou, vyskytuje se u velké skupiny AML pacientů. Proto se práce dále zaměřuje na úlohu *FLT3* v patogenezi AML a shrnuje poznatky o možnostech využití *FLT3* inhibitorů v cílené léčbě AML.

3.2 Úloha FLT3 v patogenezi AML

3.2.1 FLT3 receptor

FLT3 (Fms-like tyrosine kinase 3), známá také jako FLK-2 (fetal liver kinase-2), STK-1 (stem cell tyrosine kinase 1) nebo CD135 představuje transmembránový receptor kódovaný *FLT3* genem, který je u člověka lokalizovaný na chromozomu 13 (Rosnet *et al.*, 1991; Grafone *et al.*, 2012). *FLT3* gen má velikost cca 100 kb a skládá se z 24 exonů (Abu-Duhier *et al.*, 2001). Protein FLT3 se skládá z 993 aminokyselin (Rosnet *et al.*, 1993), přičemž glykosylovaný má molekulovou hmotnost 158–160 kDa a jeho neglykosylovaná isoforma pak 130–143 kDa, která není asociovaná s cytoplazmatickou membránou (Markovic *et al.*, 2005).

FLT3 receptor patří do III. třídy rodiny tyrosin kinázových receptorů. Jeho strukturu představuje extracelulární doména obsahující 5 imunoglobulin-like domén, transmembránová doména, cytoplazmatická juxtamembránová doména a 2 cytoplazmatické kinázové domény spojené kinázovým inzertem (viz Obrázek 1) (Agnès *et al.*, 1994; Parcells *et al.*, 2006; Grafone *et al.*, 2012).



Obrázek 1: Struktura FLT3 receptoru. Ig-like D – imunoglobulin-like domény, TD – transmembránová doména, JD – juxtamembránová doména, KD1/2 – kinázové domény 1/2, KI – kinázový inzert, AS – aktivační smyčka (upraveno podle Grafone *et al.*, 2012; Gebru *et al.*, 2020).

V kostní dřeni je FLT3 exprimován na CD34⁺ hematopoetických kmenových buňkách a progenitorech B-lymfoidní a myeloidní linie, kde má důležitou úlohu v regulačních procesech hematopoézy. Podílí se na regulaci metabolismu fosfolipidů, transkripce, proliferace i apoptózy. (Rosnet *et al.*, 1993; Brasel *et al.*, 1995; Grafone *et al.*, 2012). Exprese FLT3 probíhá kromě kostní dřene i v dalších hematopoetických orgánech jako je slezina, játra, brzlík, nebo placenta, ale také v mozku a pohlavních orgánech (Rosnet *et al.*, 1993; Stirewalt *et Radich*, 2003).

3.2.2 FLT3 ligand

FLT3 ligand (FL) představuje transmembránový protein typu I, který má u člověka celkovou délku 235 aminokyselin (Lyman *et al.*, 1993; Lyman *et Jacobsen*, 1998). Lidský *FL* gen se nachází na chromozomu 19 a má délku sekvence cca 5,9 kb (Lyman *et al.*, 1995; McClanahan *et al.*, 1996). FL se řadí mezi růstové faktory a podílí se na regulaci hematopoézy, přičemž samostatně má velmi slabou aktivitu a jeho účinek se projevuje až v kombinaci s dalšími cytokiny (Grafone *et al.*, 2012).

Exprese FL probíhá ve většině tkání zahrnující slezinu, brzlík, periferní krev, kostní dřeň, prostatu, vaječníky, ledviny, plíce, tenké a tlusté střevo, varlata, srdce a placentu. V nejvyšší míře je pak exprimován mononukleárními buňkami periferní krve (Stirewalt *et Radich*, 2003).

3.2.3 Signalizace wild-type FLT3

Neaktivní FLT3 receptor se v cytoplazmatické membráně vyskytuje v podobě monomeru. Jeho stimulace nastává po navázání FL, kdy dochází ke změně konformace a následně indukci dimerizace receptoru. Dimerizace vede k autofosforylaci tyrosin kinázových domén receptoru, což má za následek vytvoření dokovacích míst pro adaptorové molekuly a aktivaci podřízených signálních drah. Komplex FLT3-FL je poté rychle internalizován a degradován (Stirewalt *et Radich*, 2003).

Přenos signálu z FLT3 receptoru je primárně zprostředkován přes fosfatidylinositol-3-kinázu (PI3K) vedoucí k aktivaci proteinkinázy B (AKT), a také přes RAS GTPázu podporující aktivaci ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) a STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) (Zhang *et al.*, 2000; Markovic *et al.*, 2005). Mimo výše uvedené FLT3 interaguje s řadou dalších cytoplazmatických efektorových molekul, jako je např. fosfolipáza C γ 1, VAV, FYN

a SRC. Signální dráhy aktivované wt-FLT3 vedou k přežití, proliferaci a diferenciaci progenitorových hematopoetických buněk (Grafone *et al.*, 2012).

3.2.4 Onkogenní signalizace FLT3

Ke zvýšené expresi wt-FLT3 dochází u řady hematologických malignit, včetně AML (Birg *et al.* 1992; Parcels *et al.*, 2006). U AML je také exprimován aberantní FLT3, který je pozorován přibližně u 30 % pacientů (Gilliland *et Griffin*, 2002). Může se jednat o interní tandemovou duplikaci v juxtamembránové doméně receptoru (FLT3-ITD) nebo o bodovou mutaci v tyrosin kinázové doméně (FLT3-TKD). Nejčastěji detekovanou FLT3-TKD mutací je záměna kyseliny asparagové v pozici 835 (D835X), kdy dochází k substituci tyrosinem (D835Y) nebo histidinem (D835H), méně často valinem (D835V), kyselinou glutamovou (D835E) nebo asparaginem (D835N) (Yamamoto *et al.*, 2001; Kottaridis *et al.*, 2003). Mezi méně frekventované mutace patří např. N676K, Y842C nebo F594L (Kazi *et Rönnstrand*, 2019b).

ITD i TKD způsobují deregulaci FLT3 receptoru. Obě zmíněné mutace mají za následek dimerizaci receptoru nezávislou na přítomnosti ligandu a jeho autofosforylaci, a receptor je tak konstitutivně aktivní (Scholl *et al.*, 2008; Daver *et al.*, 2019).

3.2.4.1 FLT3-ITD

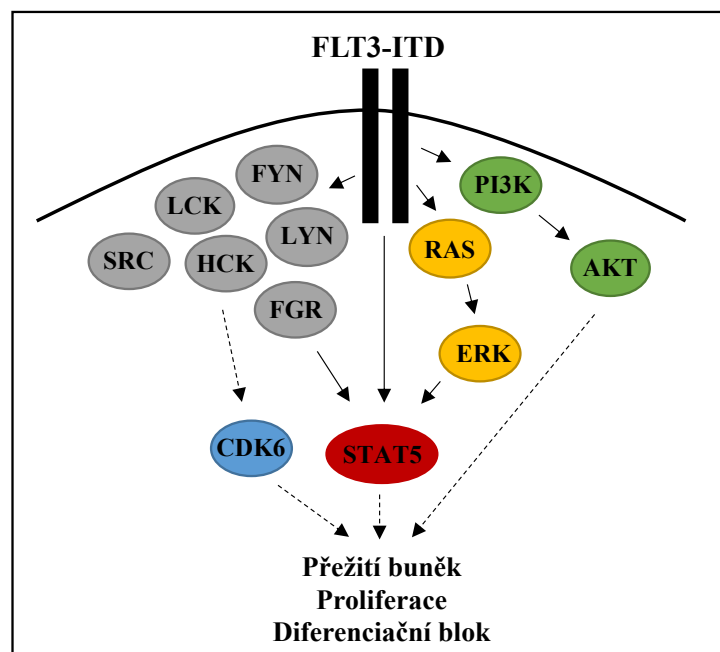
Přítomnost ITD ve *FLT3* genu u pacientů s AML poprvé popsali Nakao *et al.* (1996) a je obecně spojována se špatnou prognózou (vyšší riziko relapsu a kratší celkové přežití) (Kiyoi *et al.*, 1999; Daver *et al.*, 2019). Tato mutace se vyskytuje, když je fragment sekvence kódující juxtamembránovou doménu duplikován a inzertován v přímé orientaci. ITD se nachází v exonech 14 a 15 a délka se pohybuje v rozsahu od 3 až do více než 400 bp, přičemž se vždy objevuje v násobcích tří, tudíž čtecí rámec transkriptu zůstává zachován (Schnittger *et al.*, 2002; Levis *et Small*, 2003; Lagunas-Rangel *et Chávez-Valencia*, 2017). FLT3-ITD je u většiny AML pacientů v heterozygotním stavu, ale může se vykytovat i v obou alelách (Stirewalt *et Radich*, 2003). Samotná FLT3-ITD není schopná vyvolat vznik AML, ale vyžaduje další „driver“ mutace (Lee *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008; Garg *et al.*, 2015). Mutace FLT3-ITD bývá často identifikována s mutacemi v genech *NPM1* a *DNMT3A* (Patel *et al.*, 2012).

Vlivem přítomnosti ITD v juxtamembránové doméně receptor zůstává stále katalyticky aktivní i bez přítomnosti ligandu, což má za následek dimerizaci,

konstitutivní autofosforylaci a aktivaci receptoru a dalších podřízených molekul. Mutovaný receptor také může vytvářet heterodimery s wt-FLT3, výsledkem čehož je fosforylace obou molekul (Kiyoi *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2005).

FLT3-ITD aktivuje PI3K a RAS dráhu podobným způsobem jako wt-FLT3, ale klíčovou roli má aktivace STAT5 (Grafone *et al.*, 2012). Při ITD signalizaci totiž dochází k velké míře fosforylace STAT5, který je tak konstitutivně aktivní a váže se na DNA, na rozdíl od wt-FLT3, kdy je STAT5 fosforylován pouze slabě bez následné vazby na DNA (Mizuki *et al.*, 2000; Stirewalt *et Radich*, 2003). STAT5 pak má významný podíl na přežití leukemických buněk a transkripci antiapoptických genů (Baškiewicz-Masiuk *et Machaliński*, 2004; Carroll *et al.*, 2005). FLT3-ITD se také přímou interakcí podílí na aktivaci některých SFK (kinázy rodiny Src), jako je LYN, FYN, LCK, HCK, FGR nebo SRC. Kinázy LYN, FYN a LCK mají vliv na aktivaci STAT5 a HCK na nadměrnou expresi CDK6 (Robinson *et al.*, 2005; Chougule *et al.*, 2016; Lopez *et al.*, 2016; Kazi *et Rönstrand*, 2019a; Voisset *et al.*, 2020).

Výsledkem onkogenní FLT3-ITD signalizace (viz Obrázek 2) je pak přežití, proliferace a zablokování diferenciací myeloidních progenitorových buněk (Zheng *et al.*, 2002; Chung *et al.*, 2005; Grafone *et al.*, 2012).



Obrázek 2: Schéma signální dráhy FLT3-ITD (upraveno podle Grafone *et al.*, 2012; Kazi *et Rönstrand*, 2019a; Voisset *et al.*, 2020).

3.3 Klasická léčba AML

Standardní léčbou AML, která byla zavedena v 70. letech 20. století, stále zůstává kombinace cytarabinu a antracyklinu (nejčastěji daunorubicinu), označovaná jako „7+3“. Tato metoda zahrnuje infuzi cytarabinu po dobu 7 dnů, přičemž první 3 dny se podává současně s infuzí antracyklinu. Jedná se o intenzivní indukční chemoterapii, která může být doprovázena řadou komplikací, jako například dlouhotrvající aplázie kostní dřeně a silné cytopenie, riziko infekce, sepse i smrti. Cílem indukční chemoterapie je dosažení kompletní remise, která by se měla projevit obnovením normální hematopoézy. (Kopmar *et al.*, 2019; Carter *et al.*, 2020; Zeidan *et al.*, 2020).

Mezi novější cytotoxickou terapii patří léčivo Vyxeos (CPX-351), které představuje liposomální formulaci cytarabinu a daunorubicinu v molárním poměru 5:1. Vyxeos vykazuje u pacientů lepší odpověď na léčbu a prodlužuje celkové přežití AML pacientů ve srovnání s klasickou „7+3“ terapií (Lancet *et al.*, 2014; Alfayez *et al.*, 2020).

Po dosažení kompletní remise se přistupuje ke konsolidační terapii, jejímž účelem je zabránit relapsu (Robak *et al.*, 2009). Při konsolidační léčbě se pacientům podávají vysoké dávky cytarabinu (u jedinců s příznivou cytogenetikou, převážně mladších) a/nebo se volí alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk (allo-HSCT) (u jedinců s nepříznivou cytogenetikou, vysokým rizikem relapsu) (Koreth *et al.*, 2009; Carter *et al.*, 2020; Daver *et al.*, 2020).

U pacientů, kteří nejsou vhodní pro indukční chemoterapii (především starší jedinci nad 65 let), se volí méně intenzivní léčba. Pacientům jsou podávány hypometylační látky (mezi které se řadí azacytidin nebo decitabin) nebo cytarabin v nízkých dávkách (Othus *et al.*, 2014; Kopmar *et al.*, 2019; Carter *et al.*, 2020).

Udržovací terapie nebyla až donedávna součástí standardní léčby AML z hlediska nepřesvědčivých důkazů o jejím prospěchu. Až v posledních letech bylo například zjištěno, že perorálně podávaný azacytidin jako udržovací terapie po intenzivní chemoterapii (s nebo bez následné konsolidační terapie), vede k prodloužení celkového přežití pacientů (Wei *et al.*, 2020). Pro udržovací léčbu po allo-HSCT se také u pacientů s FLT3 mutací využívají tyrosin kinázové inhibitory (Carter *et al.*, 2020).

Chemoterapii kvůli své vysoké toxicitě doprovází řada vedlejších účinků. Mezi ty krátkodobé patří například ztráta vlasů, rozbolavělá ústa, infekce, průjemy, nevolnosti

a různé vyrážky. K dlouhodobým efektům se řadí únava, „chemobrain“, neuropatie nebo dysfunkce orgánů (Crossnohere *et al.*, 2019).

3.4 Cílená léčba AML

Hlubší poznatky mechanismu vývoje AML a nové techniky molekulární genetiky přispěly k výraznému pokroku v oblasti cílené léčby. Nově vyvíjené látky jsou schopny cílit na specifické mutace, klíčové molekuly buněčného metabolismu, popř. na specifický antigen nádorové buňky (Kopmar *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2020). Mezi taková léčiva se řadí například venetoclax jako inhibitor antiapoptického proteinu BCL-2 (Konopleva *et al.*, 2016; Carter *et al.*, 2020), glasdegib jako inhibitor Hedgehog signální dráhy skrz protein SMO (Hoy, 2019), inhibitory IDH1 ivosidenib (Dhillon, 2018) a IDH2 enasidenib (Kim, 2017), a FLT3 inhibitory (podrobně popsány v následující kapitole). Příkladem imunoterapie je gemtuzumab ozogamicin, představující cytotoxické léčivo calicheamicin kovalentně konjugované s monoklonální protilátkou, který cílí na CD33 antigen na myeloidních blastech. Po navázání protilátky na CD33 dochází k internalizaci calicheamicinu, který indukuje vznik dvouvláknových zlomů v DNA, což následně vede k buněčné smrti (Godwin *et al.*, 2017; Jen *et al.*, 2018).

3.4.1 FLT3 inhibitory

Z hlediska častého výskytu mutací ve *FLT3* genu u AML pacientů představuje FLT3 receptor významný molekulární terapeutický cíl. FLT3 inhibitory jsou klasifikovány na inhibitory první a druhé generace v závislosti na jejich specifitě pro FLT3 receptor. Inhibitory 1. generace jsou relativně nespecifické pro FLT3 a jsou aktivní i vůči jiným molekulám, což může mít za následek obecně vyšší toxicitu. Naopak inhibitory 2. generace jsou více selektivní a účinné vůči FLT3 (Weisberg *et al.*, 2010; Antar *et al.*, 2020).

Kromě toho se FLT3 inhibitory rozdělují na typ I a II podle jejich mechanismu interakce s FLT3 receptorem. Oba typy inhibují receptor prostřednictvím vazby na ATP-vazebné místo v intracelulární kinázové doméně receptoru. Inhibitory typu I se vážou na ATP-vazebné místo v aktivní konformaci receptoru a působí jak proti mutaci ITD, tak TKD. Inhibitory typu II pak interagují s ATP-vazebným místem v inaktivní konformaci receptoru a působí pouze proti ITD mutaci (Ke *et al.*, 2015; Antar *et al.*, 2020).

3.4.1.1 Inhibitory 1. generace

Sunitinib

Sunitinib kromě FLT3 způsobuje také inhibici molekul c-KIT, VEGFR2, PDGFR β a RET a řadí se mezi inhibitory typu I. Sunitinib v kombinaci s cytarabinem nebo daunorubicinem inhiboval proliferaci a indukoval apoptózu myeloidních blastů s FLT3-ITD mutací (O'Farrell *et al.*, 2003; Yee *et al.*, 2004). I přes slibné výsledky v 1. a 2. fázi klinického testování se bohužel ukázalo, že kombinace sunitinibu s chemoterapií způsobuje mnoho vedlejších účinků (vyčerpání, průjmy, nevolnost, mukositida, hypertenze, poruchy lymfatického a oběhového systému), a není proto v současné době pro léčbu AML dále vyvíjen. Sunitinib je ale široce využíván pro léčbu různých solidních tumorů (Fiedler *et al.*, 2015; Antar *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2020).

Sorafenib

Sorafenib inhibuje kromě FLT3 také RAF, VEGFR1/2/3, PDGFR β , c-KIT a RET a patří do skupiny inhibitorů typu II (Antar *et al.*, 2020). Sorafenib v kombinaci s indukční chemoterapií vedl ke zvýšení celkového přežití AML pacientů ≤ 60 let (Rölling *et al.* 2015). Naopak starší pacienti vykazovali nižší toleranci této léčby, která byla spojena s vyšší mortalitou související s terapií a nižším počtem kompletních remisí (Serve *et al.*, 2013). Kombinace sorafenibu a hypometylačních látek vedla k vysoké míře odpovědi u pacientů s FLT3 mutací (Yu *et al.*, 2020). Navíc, sorafenib jako udržovací terapie po allo-HSCT u FLT3-ITD pacientů snižoval riziko relapsu (Burchert *et al.*, 2020; Xuan *et al.*, 2020). Mezi vedlejší účinky způsobené sorafenibem patří vyrážka, únava, průjmy, nevolnost a hypertenze. Sorafenib se nachází ve 2.–3. fázi klinického testování a na léčbu AML je dostupný pouze pro „off-label“ použití. Využívá se však pro léčbu různých solidních tumorů (Antar *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2020).

Lestaurtinib

Lestaurtinib slouží kromě FLT3 také jako inhibitor JAK2/3 a TRKA/B/C a řadí se k inhibitorům typu I. K vedlejším účinkům, které mohou vzniknout při léčbě lestaurtinibem, patří infekce, sepse a infarkt myokardu. Lestaurtinib selhal ve 3. fázi klinického testování, kdy v kombinaci s indukční a konsolidační terapií u nově diagnostikovaných AML pacientů s FLT3 mutací nepřinesl žádný klinický benefit (Knapper *et al.*, 2017; Daver *et al.*, 2019; Antar *et al.*, 2020).

Midostaurin

Midostaurin kromě FLT3 inhibuje také PKC, SYK, FLK-1, AKT, PKA, c-KIT, FGR, SRC, PDGFR α/β a VEGFR1/2 a patří mezi inhibitory typu I (Antar *et al.*, 2020). Midostaurin byl v roce 2017 schválen americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) a Evropskou lékovou agenturou (EMA) pro léčbu nově diagnostikovaných AML pacientů s FLT3 mutací v kombinaci se standardní chemoterapií. Schválen byl na základě výsledků 3. fáze klinického testování, kdy došlo k prodloužení jak intervalu bez symptomů nemoci, tak doby celkového přežití pacientů s mutací FLT3-ITD nebo TKD. Midostaurin byl podáván současně s indukční terapií („7+3“) a konsolidační terapií (cytarabin ve vysokých dávkách), dále u pacientů v remisi jako udržovací terapie (Stone *et al.*, 2017). V další studii 2. fáze klinického testování midostaurin také výrazně prodloužil dobu do relapsu u FLT3-ITD pacientů (Schlenk *et al.*, 2019). Mezi vedlejší účinky při léčbě midostaurinem se řadí horečka, otoky, infekce, nevolnost, zvracení, průjemy, únava a krvácení (Antar *et al.*, 2020).

3.4.1.2 Inhibitory 2. generace

Crenolanib

Crenolanib vykazuje kromě FLT3 také inhibiční aktivitu vůči PDGFR α/β a řadí se mezi inhibitory typu I. Ve 2. fázi klinického testování byl crenolanib použit v kombinaci se standardní „7+3“ chemoterapií. U nově diagnostikovaných AML pacientů s FLT3 mutací mladších 60 let pak byl crenolanib dobře tolerován. Momentálně se crenolanib nachází ve 3. fázi klinického testování a pro léčbu AML prozatím nebyl schválen. K vedlejším účinkům, které vznikají při léčbě crenolanibem, patří nevolnost, zvracení, transaminitida, vyrážka a otoky (Wang *et al.*, 2017; Antar *et al.*, 2020).

Quizartinib

Quizartinib způsobuje kromě FLT3 také inhibici c-KIT, PDGFR a CSF1R a patří do skupiny inhibitorů typu II. Quizartinib jako monoterapie byl v roce 2019 v Japonsku schválen pro léčbu AML pacientů s FLT3-ITD, kteří se nachází v relapsu nebo nereagují na léčbu (Antar *et al.*, 2020; Carter *et al.*, 2020). Ke schválení vedly příznivé výsledky 3. fáze klinického testování, kdy byla při podávání quizartinibu prodloužena celková doba přežití pacientů ve srovnání s chemoterapií (Cortes *et al.*, 2019). V 1. fázi klinického testování byl quizartinib také testován u nově

diagnostikovaných AML pacientů, kdy v kombinaci s chemoterapií vykazoval antileukemickou aktivitu (Altman *et al.*, 2018). Mezi vedlejší účinky způsobené quizartinibem se řadí nevolnost, zvracení, prodloužení QTc intervalu a myelosuprese (Antar *et al.*, 2020).

Gilteritinib

Gilteritinib působí kromě FLT3 také jako inhibitor LTK, ALK a AXL a řadí se k inhibitorům typu I (Antar *et al.*, 2020). Gilteritinib byl v roce 2018 schválen FDA a v roce 2019 EMA jako monoterapie pro léčbu AML pacientů s FLT3 mutací (ITD i TKD), kteří jsou v relapsu nebo nereagují na léčbu. Schválení gilteritinibu bylo uděleno na základě 3. fáze klinického testování, kdy byl gilteritinib srovnáván se standardní chemoterapií. Pacienti na gilteritinibu dosahovali delšího celkového přežití a více jedinců se nacházelo v remisi (Perl *et al.*, 2019; Tzogani *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2020). K vedlejším účinkům při podávání gilteritinibu patří průjemy, únava, transaminitida, febrilní neutropenie a infekce (Antar *et al.*, 2020).

3.4.2 Rezistence vůči FLT3 inhibitorům

Zásadním problémem při léčbě AML FLT3 inhibitory je jejich dočasná účinnost a vznik rezistence vůči nim. Tato rezistence může být buď vrozená nebo získaná. Vrozená rezistence (označovaná také jako primární) je dána specifickými charakteristikami AML, kdežto získaná (sekundární) se vyvíjí po počáteční odpovědi v průběhu terapie (Kindler *et al.*, 2010; Antar *et al.*, 2020).

3.4.2.1 Primární rezistence

U některých pacientů bylo ukázáno, že k vrozené rezistenci přispívá trvalá aktivace molekul MAPK a STAT5 nezávisle na FLT3-ITD, což naznačuje aktivaci alternativních signálních drah nezávislých na FLT3, které vedou k přežití leukemických buněk (Knapper *et al.*, 2006; Kindler *et al.*, 2010).

K rezistenci vůči FLT3 inhibitorům může také přispívat enzym CYP3A4 nacházející se v mikroprostředí kostní dřeně. Ve stromálních buňkách kostní dřeně dochází k expresi CYP3A4, který posiluje metabolizaci FLT3 inhibitorů, což vede k potlačení jejich účinku. CYP3A4 v játrech pak také hraje roli v inaktivaci některých FLT3 inhibitorů (Chang *et al.*, 2017; Chang *et al.*, 2019; Kiyoi *et al.*, 2020).

Mutace FLT3-TKD, popř. mutace i v jiných genech, mohou také zprostředkovat primární rezistenci vůči určitým FLT3 inhibitorům (Scholl *et al.*, 2020).

3.4.2.2 Sekundární rezistence

Důležitým mechanismem sekundární rezistence je vznik mutací jako následek terapie FLT3 inhibitory. Rezistence může být zapříčiněná mutací ve *FLT3* genu, kdy si leukemické buňky zachovávají závislost na FLT3 signální dráze (tzv. „on-target“ rezistence). Příkladem jsou bodové mutace FLT3-TKD. Rezistence také vzniká v důsledku mutací v jiných genech než *FLT3*, což souvisí s aktivací alternativních signálních drah nezávislých na FLT3 (tzv. „off-target“ rezistence). Například se jedná o mutaci v *NRAS* genu, která vede k aktivaci RAS navzdory inhibici FLT3 (Piloto *et al.*, 2007; Kindler *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2012; Kiyoi *et al.*, 2020; Scholl *et al.*, 2020).

Jeden z dalších mechanismů rezistence souvisí s přítomností FL v mikroprostředí kostní dřeně. Bylo zjištěno, že indukční a konsolidační chemoterapie vede ke zvýšené koncentraci FL, což snižuje účinek FLT3 inhibitorů. U AML pacientů s FLT3-ITD mutací je totiž často exprimován také wt-FLT3, který je aktivován právě díky vazbě FL, což může vyústit v trvalou aktivaci FLT3/MAPK signální dráhy vedoucí k přežití leukemických buněk i v přítomnosti FLT3 inhibitoru (Sato *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2016; Daver *et al.*, 2019).

Sekundární rezistence může dále souviset s nadměrnou expresí FLT3 (Kindler *et al.*, 2010).

3.4.2.3 Překonání rezistence

Důležitou strategií k překonání rezistence představuje kombinace různých léčebných režimů. Může se jednat o podávání FLT3 inhibitorů v kombinaci s intenzivní chemoterapií, hypometylačními látkami nebo jinými inhibitory, které pak vedou k inhibici klíčových signálních drah různými způsoby účinku. Studie se v rámci kombinační terapie s dalšími specifickými inhibitory zaměřují například na využití inhibitorů BCL-2, MDM2, STAT5, CDK4/6, IDH1/2 nebo CYP3A4 (Daver *et al.*, 2019; Antar *et al.*, 2020; Eguchi *et al.*, 2020). Nedávná studie například ukázala, že kombinace dasatinibu s quizartinibem přispívá k překonání rezistence zprostředkované stromálními buňkami kostní dřeně vůči samotnému quizartinibu (Patel *et al.*, 2020).

V neposlední řadě se výzkum stále zaměřuje na vývoj nových inhibitorů, které by přispěly k překonání rezistence (Eguchi *et al.*, 2020).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

4.1.1 Buněčné linie

Pro provedení experimentů byly použity následující lidské nádorové buněčné linie:

- MV4-11 – odvozená od akutní myelomonocytární leukémie (ATCC, CRL-9591); kultivace v RPMI médiu obohaceném o 10% FBS a 1% Pen-Strep.
- MOLM-13 – odvozená od akutní monocytární leukémie (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, ACC 554); kultivace v RPMI médiu obohaceném o 10% FBS a 1% Pen-Strep.
- KBM-5 rezistentní na $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ imatinib (dále KBM-5res) – odvozená od chronické myeloidní leukémie (CML); rezistence byla dosažena kultivací linie KBM-5 ve zvyšujících se koncentracích imatinibu, výsledná rezistentní linie obsahuje v každé buňce 4 až 8 kopií BCR/ABL fúze, z nichž je 28 % mutovaných (T315I) (Ricci *et al.*, 2002); kultivace v IMDM médiu obohaceném o 10% FBS a 1% Pen-Strep.

Kultivace zmíněných buněčných linií probíhala v inkubátoru při teplotě $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a atmosféře s 5% CO_2 .

4.1.2 Zvířecí modely

Pro *in vivo* experimenty byly použity samice imunodeficientních myší Athymic Nude-Foxn1^{nu} ve stáří 8 týdnů.

4.2 Chemikálie

- 4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-ethansulfonová kyselina = HEPES (Serva, kat. č. 25245.04)
- (2-hydroxypropyl)- β -cyklodextrin (Sigma-Aldrich, kat. č. H107)
- Akrylamid/bis-akrylamid roztok, 37.5:1, 30 % (w/v), 2,6 % C = AA/BIS (Serva, kat. č. 10688.03)
- Aprotinin (PanReac AppliChem, kat. č. A2132,0010)
- β -glycerol fosfát (Sigma-Aldrich, kat. č. G6251)
- Bradfordovo činidlo, 5x (Serva, kat. č. 39222.03)
- Diethylpyrokarbonát = DEPC (Sigma-Aldrich, kat. č. D5758)

- Dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich, kat. č. P0662)
- Dimethylsulfoxid = DMSO (Sigma-Aldrich, kat. č. D8418)
- Dithiotreitol = DTT (Sigma-Aldrich, kat. č. D9163)
- DNA Gel Loading Dye (6X) (ThermoFisher, kat. č. R0611)
- Dodecylsulfát sodný = SDS (Lach-Ner, kat. č. 40089-AP0-G0500-1)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina = EDTA (VWR Chemicals, kat. č. 20301.290)
- Ethylendiamintetraacetát sodný dihydrát (Sigma-Aldrich, kat. č. E5134)
- Ethylenglykoltetraoctová kyselina = EGTA (VWR Chemicals, kat. č. 20308.156)
- Fenylmetansulfonyl fluorid = PMSF (Sigma-Aldrich, kat. č. 78830)
- Fetální bovinní sérum = FBS (Gibco, kat. č. 16000044)
- FLT3 ligand human (ProSpec kat. č. CYT-331)
- Fluorid sodný (Lach-Ner, kat. č. 30049-CP0-G0500-1)
- GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10000x in water (Biotium, kat. č. 41003)
- Glycerol bezvodý p. a. (Lach-Ner, kat. č. 40058-AT0)
- Glycin (Merck, kat. č. 4201)
- Hydrogenfosforečnan sodný dihydrát p. a. (Lach-Ner, kat. č. 30388-AP0-G1000-5)
- Chlorid draselný p. a. (Lach-Ner, kat. č. 30076-AP0-G0500-1)
- Chlorid hořečnatý hexahydrát (PanReac AppliChem, kat. č. A4425)
- Chlorid sodný p. a. (Lach-Ner, kat. č. 30093-AP0-G1000-1)
- IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's) médium + GlutaMAX™ (Gibco, kat. č. 31980-022)
- Kyselina boritá (Amresco, kat. č. 0588)
- Kyselina sulfosalicylová (Serca, kat. č. 35706.01)
- Kyselina trichloroctová = TCA (Serva, kat. č. 36910.03)
- Leupeptin (PanReac AppliChem, kat. č. A2183, 0010)
- Matrigel matrix (Corning, kat. č. 354248)
- N,N,N',N'-tetramethylendiamin = TEMED (Sigma-Aldrich, kat. č. T9281)
- Nonidet P-40 (Amresco, kat. č. E109)
- PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific™, kat. č. 26619)

- Pen-Strep (10000 U/mL) (Gibco, kat. č. 15140122)
- Persíran amonný = APS (Serva, kat. č. 13376.02)
- Ponceau S (Sigma-Aldrich, kat. č. 141194)
- Quick-Load® 1 kb Plus DNA Ladder (New England Biolabs, kat. č. N0469S)
- Resazurin sodium salt (Sigma-Aldrich, kat. č. R7017)
- RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 médium + GlutaMAX™ (Gibco, kat. č. 61870-010)
- SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific™, kat. č. 34075)
- SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific™, kat. č. 34095)
- SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific™, kat. č. 34077)
- *Taq* polymeráza (New England Biolabs, kat. č. M0273G)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan = TRIS (Lach-Ner, kat. č. 40159-CP0-G1000-1)
- Trypanová modř 0,4% (Invitrogen™, kat. č. T10282)
- Tween® 20 (Sigma-Aldrich, kat. č. P1379)
- UltraPure™ Agarose (Invitrogen™, kat. č. 16500-500)
- Vanadičnan sodný (Sigma-Aldrich, kat. č. S6508)

4.3 Roztoky a jejich příprava

- Blotovací pufr: 6,06 g TRIS + 3 g glycin + 0,37 g SDS + 200 ml metanol, doplnit dH₂O do 1000 ml.
- 5x Laemliho nanášecí pufr (LSB): 0,36 g TRIS + 1 g SDS + 0,77 g DTT + 0,005 g bromfenolová modř + 5 ml glycerol, doplnit dH₂O do 10 ml.
- 10x PBS (pH 7,4): 80 g NaCl + 2 g KCl + 14,4 g Na₂HPO₄·2H₂O + 2,4 g KH₂PO₄ rozpustit v 800 ml dH₂O, upravit pH, doplnit dH₂O do 1000 ml, autoklávovat.
- Lyzační pufr (pH 7,4): 1 ml 1 mol·l⁻¹ HEPES + 0,5 ml 1 mol·l⁻¹ KCl + 1,5 ml 0,1 mol·l⁻¹ MgCl₂·6H₂O + 0,2 ml 0,5 mol·l⁻¹ EDTA + 0,5 ml 0,2 mol·l⁻¹ EGTA + 0,5 ml 100% Nonidet P-40; doplnit dH₂O do 100 ml, upravit pH, autoklávovat.

- Lyzační pufr eliminující erythrocyty (pH 7,5): 4,15 g NH_4Cl + 5 ml $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl; doplnit dH_2O do 500 ml, upravit pH, autoklávovat.
- 1x PBS: 100 ml 10x PBS + 900 ml dH_2O .
- 10x running pufr (pH 8,3): 30,3 g TRIS + 142,6 g glycin + 10 g SDS rozpustit v 1000 ml dH_2O .
- 1x running pufr: 100 ml 10x running pufr + 900 ml dH_2O .
- 10x TBE (pH 8,3): 108 g TRIS + 55 g H_3BO_3 + 7,4 g $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, doplnit dH_2O do 1000 ml, upravit pH, filtrovat, autoklávovat.
- 0,5x TBE: 50 ml 10x TBE + 950 ml dH_2O .
- 10x Ponceau S: 2 g Ponceau + 30 g TCA + 30 g sulfosalicylová kys. Rozpustit ve 100 ml dH_2O .
- 10% dělicí gel: 7,9 ml dH_2O + 6,7 ml 30% AA/BIS + 5 ml $1,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ TRIS (pH 8,8) + 0,2 ml 10% SDS + 0,2 ml 10% APS + 0,008 ml TEMED.
- 5% zaostřovací gel: 4,1 ml dH_2O + 1 ml 30% AA/BIS + 0,75 ml $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ TRIS (pH 6,8) + 0,06 ml 10% SDS + 0,06 ml 10% APS + 0,006 ml TEMED.
- 10x TBS (pH 7,6): 60,6 g TRIS + 87,6 g NaCl rozpustit v 900 ml dH_2O , upravit pH doplnit dH_2O do 1000 ml, autoklávovat.
- 1x TBS: 100 ml 10x TBS + 900 ml dH_2O .
- 1x TBS + 0,1% Tween 20 (1x T-TBS): 1000 ml 1x TBS + 1 ml Tween 20.
- 10% APS: 1 g APS rozpustit v 10 ml dH_2O .
- 10% SDS: 1 g SDS rozpustit v 10 ml dH_2O .
- $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ TRIS (pH 6,8): 120 g TRIS rozpustit v 1000 ml dH_2O , upravit pH, autoklávovat.
- $1,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ TRIS (pH 8,8): 182 g TRIS rozpustit v 1000 ml dH_2O , upravit pH, autoklávovat.
- 4% nízkotučné mléko: 2 g mléka rozpustit v 50 ml 1x T-TBS.
- 5% nízkotučné mléko: 2,5 g mléka rozpustit v 50 ml 1x TBS.
- Okyselený fyziologický roztok (pH 5)
- DEPC- H_2O : 1 ml DEPC + 1000 ml dH_2O , míchat přes noc, autoklávovat.
- Deionizovaná voda (dH_2O) (Direct-Q, Millipore).

4.4 Inhibitory

- LGR3922 (syntéza RNDr. Tomášem Guckým, Ph.D., Katedra experimentální biologie PřF UPOL; Gucký *et al.*, 2018), zásobní roztok v DMSO 10 mmol·l⁻¹
- LGR4657 (syntéza RNDr. Tomášem Guckým, Ph.D., Katedra experimentální biologie PřF UPOL), zásobní roztok v DMSO 10 mmol·l⁻¹
- Quizartinib (použit jako standard; MedChemExpress, HY-13001), zásobní roztok v DMSO 10 mmol·l⁻¹
- Dasatinib (použit jako standard; MedChemExpress, HY-10181), zásobní roztok v DMSO 10 mmol·l⁻¹

4.5 Protilátky

Pro imunodetekci proteinů na membráně byly použity specifické primární a sekundární protilátky (viz Tabulka 3).

Tabulka 3: Seznam použitých protilátek. R – králík, G – koza.

Primární protilátky			
Protilátka	Zdroj	Ředění	Výrobce
anti-p-Src Family (Tyr416)	R	1:100	Cell Signaling Technology
anti-Src Family	R	1:100–200	Cell Signaling Technology
anti-p-Stat5 (Tyr694)	R	1:500	Cell Signaling Technology
anti-Stat5	R	1:500	Cell Signaling Technology
anti-p-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	R	1:1000	Cell Signaling Technology
anti-p44/42 MAPK (Erk1/2)	R	1:1000	Cell Signaling Technology
anti-p-FLT3 (Tyr589/591)	R	1:250–500	Cell Signaling Technology
anti-FLT3	R	1:500	Cell Signaling Technology
anti-GAPDH	R	1:5000–20000	Cell Signaling Technology
Sekundární protilátky			
Protilátka	Zdroj	Ředění	Výrobce
anti-rabbit IgG-HRP	G	1:1000–3000	Cell Signaling Technology

4.6 Soupravy

- DNeasy Blood & Tissue Kit (250) (Qiagen; 69506)
- Mycoplasma Detection Kit (SouthernBiotech; 13100-01)

4.7 Přístroje

- Analytické váhy Mettler AE 240 (Mettler)
- Blotovací zařízení (Bio-Rad)
- Centrifuga Centrifuge 5415 D (Eppendorf)
- Centrifuga BR4i (Jouan)
- Centrifuga MIKRO 200R (Hettich)
- Centrifuga UNIVERSAL 320R (Hettich)
- Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen)
- Dokumentační systém G:Box Chemi XX9 (SynGene)
- Fotometr Infinite M200 NanoQuant (Tecan)
- Inkubátor Biocenter (SalvisLab)
- Inverzní mikroskop IX71 (Olympus)
- Laminární box (Thermo Scientific)
- Lednice (Liebherr)
- Míchačka zkumavek rotační Multi RS-60 (Biosan)
- Mikrovlnná trouba (Le Cygne Electronics)
- Minicentrifuga Spectrafuge mini (Labnet International)
- Mrazák -86 °C VIP ECO (PHCbi)
- Pipetor (Hirschmann Laborgeräte)
- Sestava pro SDS-PAGE (Bio-Rad)
- Suchá lázeň Dry Block Heating Thermostat Bio TDB-100 (Biosan)
- Termocykler MJ Mini (Bio-Rad)
- Třepačka PSU-20i, Multi-functional Orbital Shaker (Biosan)
- Váhy (KERN EW)
- Vodní lázeň (Mettler)
- Vortex V-1 plus (Biosan)
- Výrobník ledové tříště VLTZ 15 40 A (Gastro-Eis-Technik)
- Zdroj elektrického napětí (Bio-Rad)

4.8 Kultivace buněk

Buněčné linie MV4-11, MOLM-13 a KBM-5res byly kultivovány při 37 °C v přítomnosti 5% CO₂ a relativní vzdušné vlhkosti 90 %. Morfologie buněk a hustota kultury byla pravidelně kontrolována pomocí inverzního mikroskopu. Pasážování buněk a výměna média probíhala každé 2–3 dny. Před experimenty byla koncentrace buněk a jejich viabilita hodnocena na přístroji firmy Invitrogen (barvení trypanovou modří), popř. pomocí Bürkerovy komůrky a inverzního mikroskopu.

4.9 Test na přítomnost mykoplazmat

Všechny buněčné linie byly opakovaně testovány na přítomnost mykoplazmat. Před izolací byly buňky 2–3 dny kultivovány bez antibiotik. DNA testovaných buněčných linií byla izolována pomocí kitu DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) dle standardního protokolu výrobce. Pokud není uvedeno jinak, všechny úkony byly prováděny při laboratorní teplotě. (2–5)·10⁶ buněk bylo centrifugováno při 1800 RPM 3 min. Po odsátí supernatantu byl pelet resuspendován ve 200 µl PBS s následným přidáním 20 µl proteinázy K. Poté bylo přidáno 200 µl AL pufru, promícháno a inkubováno 10 min při 56 °C. Po inkubaci bylo připipetováno 200 µl 96% etanolu a celá směs byla přenesena do kolonky. Následovala centrifugace (8000 RPM, 1 min). DNA na kolonce byla následně ve dvou krocích přečištěna pomocí 500 µl pufru AW1 (centrifugace při 8000 RPM, 1 min) a AW2 (centrifugace při 14000 RPM, 3 min). Kolonka byla poté přenesena do nové mikrozkuhavky. DNA byla eluována přidáním 50 µl AE pufru (1 min inkubace, centrifugace při 8000 RMP 1 min). Výsledná koncentrace a čistota izolované DNA byla stanovena spektrofotometricky. Do doby analýzy byla DNA uchovávána při -80 °C.

Izolovaná DNA byla následně použita pro detekci mykoplazmat s využitím PCR kitu firmy SouthernBiotech. Složení reakční směsi je uvedeno v Tabulce 4.

Tabulka 4: Složení PCR reakční směsi pro detekci mykoplazmat.

Chemikálie	Objem [µl]
DEPC-H ₂ O	17,3
10x pufr	2,5
Primery + dNTPs	2,5
Vnitřní kontrola	1,0
Taq polymeráza	0,2

Ke směsi bylo přidáno 1,5 μl testované DNA (o koncentraci 100 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), případně pozitivní kontroly dodávané výrobcem, nebo negativní kontroly (DEPC- H_2O). Poté proběhla PCR amplifikace za podmínek uvedených v Tabulce 5.

Tabulka 5: Podmínky PCR reakce pro detekci mykoplazmat.

Počáteční denaturace	95 °C	5 min
denaturace	95 °C	30 s
35 cyklů	annealing	58 °C
	elongace	72 °C
Závěrečná elongace	72 °C	7 min

Získané PCR produkty byly smíchány s DNA Gel Loading Dye v poměru 5:1. Vzorky spolu s markerem relativní molekulové hmotnosti byly nanášeny do 1% agarózového gelu připraveného rozpuštěním agarózy v 0,5x TBE pufru s přidáním interkalujícího fluorescenčního barviva GelRed (2,5 μl na 100 ml agarózy). Elektroforetická separace probíhala cca 1 hod při 80 V. PCR produkty byly vizualizovány prostřednictvím UV transiluminátoru dokumentačního přístroje G:Box Chemi XX9.

4.10 Testování inhibitorů *in vitro*

4.10.1 Test cytotoxicity

Buňky vybraných buněčných linií (MV4-11, MOLM-13, KBM-5res) byly po 90 μl nasazeny na 96-jamkovou desku v koncentraci $2\cdot 10^4$ buněk/jamka. Následně bylo k buňkám přidáno 10 μl testovaných inhibitorů s výslednými koncentracemi v jamce uvedenými v Tabulce 6 a 7. Do kontrolních jamek bylo přidáno DMSO o výsledné koncentraci 0,001 %. Buňky s testovanými látkami byly inkubovány po dobu 72 hodin při 37 °C.

Tabulka 6: Vybrané koncentrace testovaných inhibitorů na buněčných liniích MV4-11 a MOLM-13.

Inhibitor	Koncentrace [$\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$]
LGR3922	2,5; 5; 10; 50; 100; 250
LGR4657	2,5; 5; 10; 50; 100; 250
Quizartinib	2,5; 5; 10; 50; 100; 250
Dasatinib	10; 100; 250; 1000; 3000

Tabulka 7: Vybrané koncentrace testovaných inhibitorů na buněčné linii KBM-5res.

Inhibitor	Koncentrace [nmol·l⁻¹]
LGR3922	10; 100; 250; 500; 1000
LGR4657	10; 100; 250; 500; 1000
Quizartinib	10; 100; 250; 500; 1000
Dasatinib	5; 10; 100; 250; 1000

Pro testování účinnosti FL byly buňky MOLM-13 nasazeny v koncentraci $1 \cdot 10^4$ buněk/jamka. K buňkám pak bylo přidáno 10 μ l testovaných inhibitorů s výslednými koncentracemi v jamce uvedenými v Tabulce 8. Do kontrolních jamek bylo přidáno DMSO o výsledné koncentraci 0,001 %. Inhibitory působily na buňky buď samostatně, nebo v kombinaci s FL o koncentraci 50 ng·ml⁻¹ po dobu 72 hodin při 37 °C.

Tabulka 8: Vybrané koncentrace testovaných inhibitorů na buněčné linii MOLM-13 pro testování účinnosti FLT3 ligandu.

Inhibitor	Koncentrace [nmol·l⁻¹]
LGR3922	1; 2,5; 5; 10; 50; 100
LGR4657	1; 2,5; 5; 10; 50; 100
Quizartinib	1; 2,5; 5; 10; 50; 100
Dasatinib	10; 100; 250; 1000; 3000

Po uplynutí inkubace bylo do jamek přidáno 20 μ l 0,25 mmol·l⁻¹ roztoku resazurinu, který byl s buňkami inkubován 4 hodiny při 37 °C. Poté byla změřena fluorescence (excitace 530/25 nm, emise 575/15 nm) v jednotlivých jamkách a vyhodnocena cytotoxicita testovaných látek.

4.10.2 Příprava buněčných lyzátů

Pro přípravu buněčných lyzátů byly buňky jednotlivých buněčných linií (MV4-11, MOLM-13, KBM-5res) nasazeny na sterilní Petriho misky o koncentraci $6 \cdot 10^6$ buněk v celkovém objemu 10 ml média. Následně byly k buňkám přidány testované inhibitory, případně FL o koncentraci 50 ng·ml⁻¹. Přehled výsledných koncentrací inhibitorů v 10 ml média je uveden v Tabulce 9, 10 a 11. Do kontrolní misky bylo napipetováno DMSO o výsledné koncentraci 0,01 %. Buňky byly inkubovány po dobu 1, 2 nebo 6 hod při 37 °C.

Tabulka 9: Vybrané koncentrace testovaných inhibitorů na buněčných liniích MV4-11 a MOLM-13 s dobou inkubace 1 nebo 6 hod.

Inhibitor	Koncentrace [nmol·l⁻¹]
LGR3922	10; 100; 250; 1000
LGR4657	10; 100; 250; 1000
Quizartinib	10; 100; 250; 1000
Dasatinib	10; 100; 250; 1000
Quizartinib + dasatinib	100 + 250
Quizartinib + dasatinib	100 + 1000
Quizartinib + dasatinib	10 + 1000

Tabulka 10: Vybrané koncentrace testovaných inhibitorů na buněčné linii MOLM-13 s dobou inkubace 2 hod v přítomnosti nebo nepřítomnosti FLT3 ligandu.

Inhibitor	Koncentrace [nmol·l⁻¹]
LGR3922	10
LGR4657	10
Quizartinib	10
Dasatinib	250
Quizartinib + dasatinib	10 + 250

Tabulka 11: Vybrané koncentrace testovaných inhibitorů na buněčné linii KBM-5res s dobou inkubace 6 hod.

Inhibitor	Koncentrace [nmol·l⁻¹]
LGR3922	250
Quizartinib	250
Dasatinib	250
Quizartinib + dasatinib	250 + 250

Po uplynutí inkubace byly buňky přeneseny do 15ml plastových zkumavek, misky byly promyty 2 ml 1x PBS a buňky ve zkumavkách byly centrifugovány (2000 RPM, 3–5 min, 4 °C). Po odsátí supernatantu byly misky opět promyty (5 ml 1x PBS) a pelet buněk resuspendován. Následovala centrifugace (2000 RPM, 3–5 min, 4 °C). Po odsátí supernatantu byl pelet resuspendován v 1 ml 1x PBS, přenesen do 1,5ml mikrozkušavek a obsah centrifugován opět za stejných podmínek. K výslednému peletu bylo přidáno 100 µl vychlazeného lyzačního pufru (před aplikací byly k 1 ml lyzačního pufru přidány inhibitory proteáz a fosfatáz: 10 µl 1 mol·l⁻¹ β-glycerol fosfát; 2 µl 0,5 mol·l⁻¹ NaF; 1 µl 0,1 mol·l⁻¹ Na₃VO₄; 1 µl 0,1 mol·l⁻¹ PMSF; 1 µl 1 mol·l⁻¹ DTT; 1 µl 10 mg·ml⁻¹ leupeptin a 1 µl 2 mg·ml⁻¹ aprotinin). Lyze buněk

probíhala po dobu 45–50 min v ledové tříšti. V průběhu lyze byl obsah mikrozumavek několikrát propipetován a zvortexován. Následně byly vzorky centrifugovány (14000 RPM, 15 min, 4 °C) a supernatant přenesen do 1,5ml mikrozumavek, které byly uchovány do doby analýzy při -80 °C.

4.10.3 SDS-PAGE

Separace proteinů byla provedena v polyakrylamidovém gelu (10% dělicí a 5% zaostřovací gel o tloušťce 1,5 mm) pomocí SDS-PAGE.

Vzorky připravených buněčných lyzátů, umístěné v ledové tříšti, byly smíchány s 5x LSB v poměru 4:1, 3–5 min zahřáty na 95 °C a přeneseny zpět do ledové tříště. Takto připravené vzorky byly nanášeny do jamek v gelu v daném objemu podle zjištěné koncentrace proteinů metodou dle Bradforda.

Elektroforéza probíhala cca 15 min při 100 V, poté cca 2 hod při 115 V. Elektroforetická vana byla po celou dobu separace chlazená.

4.10.4 Western blotting a imunodetekce proteinů

Separované proteiny byly přeneseny na nitrocelulózovou membránu (velikost pórů 0,45 μm) metodou semi-dry western blotting. Přenos proteinů z gelu na membránu probíhal 1,5 hod při konstantním napětí 18 V.

Po transferu byla membrána nabarvena roztokem 1x Ponceau S a nařezaná dle molekulových hmotností detekovaných proteinů (viz Tabulka 12). Membrány byly následně promyty v 1x T-TBS a za mírného třepání blokovány ve 4% nízkotučném mléku po dobu 1 hod. Membrány byly poté převrstveny vybranými primárními protilátkami (viz kap. 4.5 Protilátky) naředěnými v 5% nízkotučném mléku a inkubovány přes noc při 4 °C. Následující den byly membrány 3x po 10 minutách promyty za lehkého třepání v 1x T-TBS, převrstveny sekundární protilátkou značenou křenovou peroxidázou (viz kap. 4.5 Protilátky) naředěnou v 5% nízkotučném mléku a inkubovány 1 hod při pokojové teplotě. Membrány byly následně promyty (3x 10 minut) a pomocí chemiluminiscenčního substrátu byly vybrané proteiny detekovány a vizualizovány v dokumentačním systému G:Box Chemi XX9.

Tabulka 12: Seznam detekovaných proteinů.

Protein	Molekulová hmotnost [kDa]
pFLT3 (Tyr589/591)	130, 160
FLT3	130, 160
pSTAT5 (Tyr694)	90
STAT5	90
pSFK (Tyr416)	60
SFK	60
pERK1/2 (Thr202/Tyr204)	42, 44
ERK1/2	42, 44
GAPDH	37

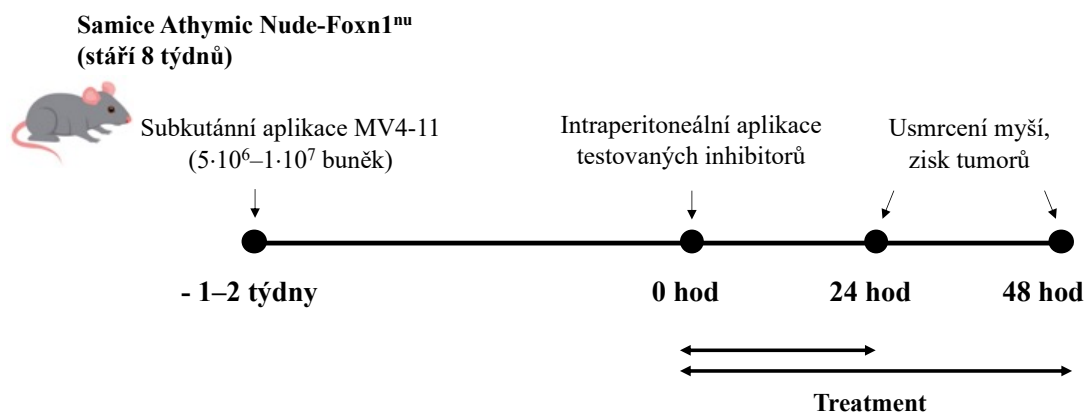
4.11 Testování inhibitorů *in vivo*

4.11.1 Tvorba MV4-11 xenograftů v myších Athymic Nude-Foxn1^{nu}

Buňky MV4-11 byly posbírány v exponenciální fázi růstu, centrifugovány (1500 RPM, 5 min, 4 °C), promyty v 1x PBS a opět centrifugovány za stejných podmínek. Buněčný pelet byl resuspendován ve vychlazeném RPMI médiu na požadovanou koncentraci $5 \cdot 10^6$ – $1 \cdot 10^7$ buněk/50 μ l média. 50 μ l buněčné suspenze bylo smícháno s 50 μ l matrigelu. Výsledná směs o objemu 100 μ l byla subkutánně aplikována na boční stranu hrudníku samice myši Athymic Nude-Foxn1^{nu} ve stáří 8 týdnů. Následně byl sledován růst tumoru do objemu 500–800 mm³, přičemž hmotnost myši a velikost tumoru byla kontrolována 3x týdně.

Po dosažení požadované velikosti tumoru (1–2 týdny) byly myši po 2–3 jedincích náhodně rozděleny do experimentálních skupin pro testování inhibitorů. Jednorázová dávka 10 mg·kg⁻¹ quizartinibu (v 5% hydroxypropyl- β -cyclodextrinu), LGR3922 a LGR4657 (v okyseleném fyziologickém roztoku), popř. 20 mg·kg⁻¹ dasatinibu (v okyseleném fyziologickém roztoku) byla do myši aplikována intraperitoneálně. Kontrolní myši obdržely 5% hydroxypropyl- β -cyclodextrin nebo okyselený fyziologický roztok. Po daném časovém intervalu (24 a 48 hod) byly myši usmrceny a tumory vypreparovány pro přípravu lyzátů. Schéma experimentu je uvedeno na Obrázku 3 a v Tabulce 13.

Veškerou manipulaci s myšmi prováděl veterinář.



Obrázek 3: Schéma experimentu testování inhibitorů *in vivo*.

Tabulka 13: Schéma experimentu testování inhibitorů *in vivo*.

Experimentální skupina	Časový interval
Vehikulum LGR objemový ekvivalent	24 hod 48 hod
LGR3922 10 mg·kg ⁻¹	24 hod 48 hod
LGR4657 10 mg·kg ⁻¹	24 hod 48 hod
Vehikulum quizartinib objemový ekvivalent	24 hod 48 hod
Quizartinib 10 mg·kg ⁻¹	24 hod 48 hod
Dasatinib 20 mg·kg ⁻¹	24 hod 48 hod

4.11.2 Příprava buněčných lysátů z MV4-11 tumorů

Resekované tumory byly vloženy do Petriho misek s RPMI médiem s 2% FBS. Sterilními nástroji byla tkáň homogenizována a následně přes filtr (s velikostí pórů 30 μ m) převedena do 15ml zkumavky. Získaná buněčná suspenze byla centrifugována (1500 RPM, 5 min, 4 °C). Po odsátí supernatantu byl pelet resuspendován ve 2–4 ml lyzačního pufru eliminujícího červené krvinky. Lyze erytrocytů probíhala 10 min v ledové tříšti. Po následné centrifugaci (1500 RPM, 5 min, 4 °C) byl supernatant odsát a pelet buněk byl 2x promyt 1–6 ml 1x PBS (centrifugace 1500 RPM, 5 min, 4 °C). Finální buněčný pelet byl resuspendován v 50–100 μ l lyzačního pufru s přídatkem inhibitorů proteáz a fosfatáz (viz kap. 4.10.2). Lyze buněk probíhala 45 min v ledové tříšti, přičemž v průběhu byla suspenze několikrát vortexována a propipetována.

Následně byly vzorky centrifugovány (14000 RPM, 15 min, 4 °C), supernatant přenesen do 1,5ml mikrozumavek a uložen na -80 °C do doby další analýzy.

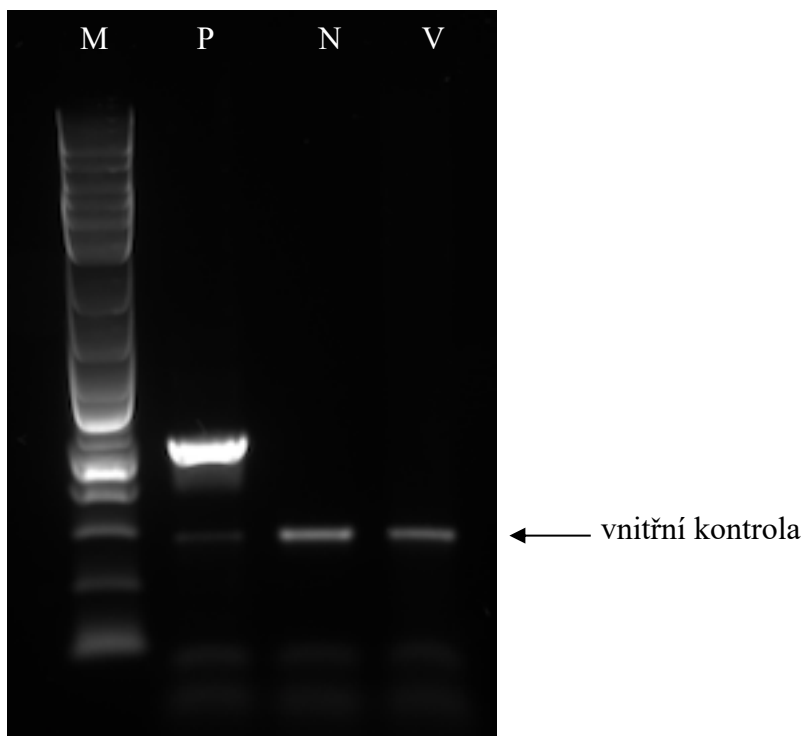
4.11.3 SDS-PAGE, Western blotting a imunodetekce proteinů

SDS-PAGE, western blotting a imunodetekce proteinů probíhala za stejných podmínek již uvedených v předchozích kapitolách 4.10.3 a 4.10.4.

5 Výsledky

5.1 Test na detekci přítomnosti mykoplazmat

Všechny buněčné linie (MV4-11, MOLM-13 a KBM-5res), které byly použity k provedení experimentů, byly otestovány na přítomnost mykoplazmat. V žádné buněčné linii nebyla přítomnost mykoplazmat detekována. Na Obrázku 4 je uveden výsledek testu na detekci mykoplazmat v buněčné linii KBM-5res.



Obrázek 4: Test na detekci přítomnosti mykoplazmat v buněčné linii KBM-5res. M – marker relativní molekulové hmotnosti, P – pozitivní kontrola, N – negativní kontrola, V – vzorek DNA z buněčné linie KBM-5res.

5.2 Účinnost inhibitorů *in vitro*

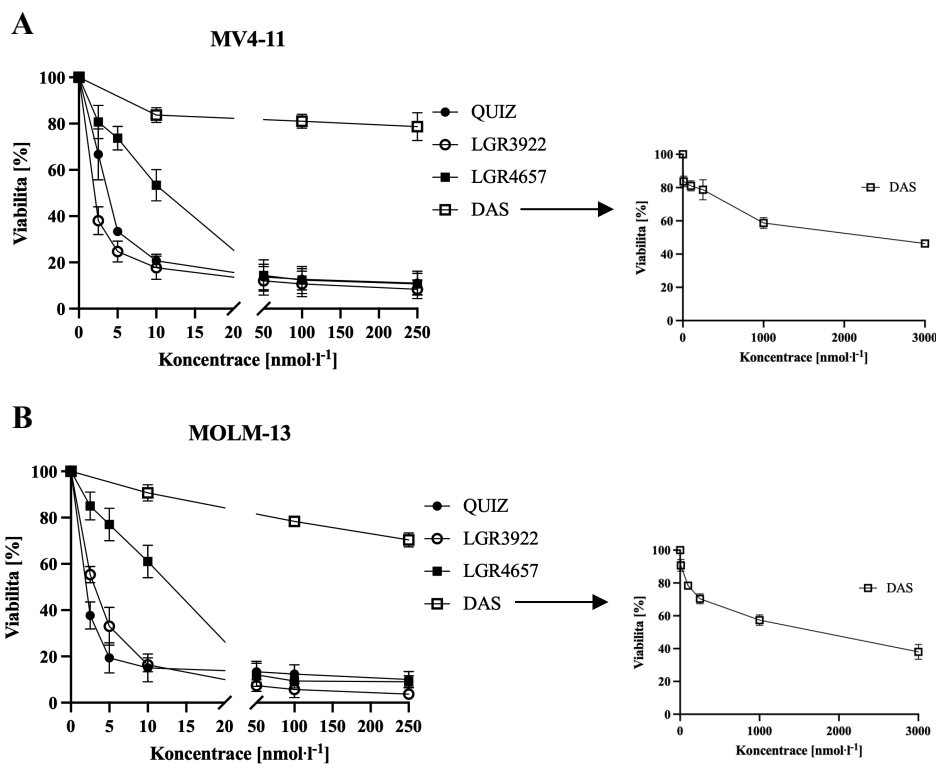
Inhibiční aktivita testovaných inhibitorů (LGR3922 a LGR4657) a dostupných léčiv na trhu (quizartinib, dasatinib) byla nejprve hodnocena testy cytotoxicity. Quizartinib byl zvolen jako kontrolní FLT3 inhibitor a dasatinib jako inhibitor SFK. Jednotlivé proteiny, které představují klíčové molekuly signálních drah nádorových buněk, byly dále hodnoceny pomocí western blot analýzy a následné imunodetekce pomocí specifických protilátek.

5.2.1 Vliv testovaných inhibitorů na proliferaci a viabilitu buněk

Pro analýzu inhibiční aktivity byly testované inhibitory (LGR3922, LGR4657), quizartinib a dasatinib inkubovány s buněčnými liniemi MV4-11, MOLM-13 nebo KBM-5res ve zvolené koncentrační škále po dobu 72 hodin.

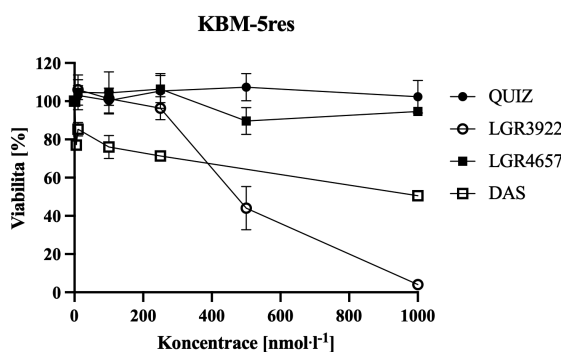
U buněčné linie MV4-11 byla pozorována nejvyšší inhibiční aktivita u inhibitoru LGR3922, dále pak quizartinibu a LGR4657. Inhibitor LGR3922 významně snížil proliferaci/viabilitu buněk již při koncentraci $2,5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Od koncentrace $50 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ inhibitory LGR3922, LGR4657 a quizartinib vykazovaly shodnou účinnost. Dasatinib měl větší vliv na pokles proliferace/viability až v koncentraci $\geq 1000 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (viz Obrázek 5A).

Naopak u buněčné linie MOLM-13 v nejnižších použitých koncentracích ($2,5$ a $5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) byl vyšší cytotoxický efekt pozorován u quizartinibu, LGR3922 dosáhl shodného účinku až při koncentraci $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Stejně jako v případě MV4-11, LGR3922, LGR4657 a quizartinib o koncentraci $\geq 50 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ prokázaly shodný inhibiční efekt. Stejně tak měl dasatinib větší vliv na pokles proliferace/viability až v koncentraci $\geq 1000 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (viz Obrázek 5B).



Obrázek 5: Cytotoxický efekt použitých inhibitorů v buněčných liniích (A) MV4-11 (B) MOLM-13. QUIZ – quizartinib, DAS – dasatinib. Jednotlivé body v grafech vyjadřují průměr a směrodatnou odchylku ze tří nezávislých experimentů.

Pro ověření možného vlivu inhibitoru LGR3922 na SFK kinázy byla použita buněčná linie KBM-5res, která obecně vykazuje vysokou aktivitu SFK. Inhibitor LGR3922 způsobil výrazný pokles proliferace/viability buněk při koncentraci $\geq 500 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. LGR4657 a quizartinib v rozmezí testovaných koncentrací 10–1000 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ neprokázaly významný inhibiční účinek. Dasatinib v rozmezí koncentrací 10–1000 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ inhiboval proliferaci/viability pouze parciálně (viz Obrázek 6).

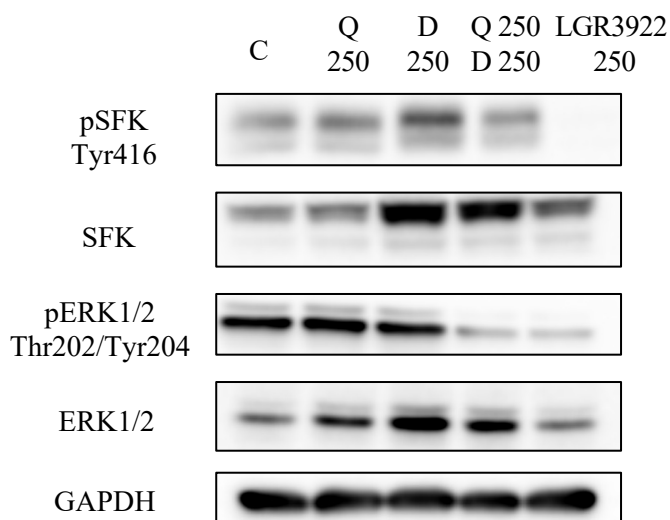


Obrázek 6: Cytotoxický efekt použitých inhibitorů v buněčné linii KBM-5res. QUIZ – quizartinib, DAS – dasatinib. Jednotlivé body v grafech vyjadřují průměr a směrodatnou odchylku ze tří nezávislých experimentů.

5.2.2 Duální inhibice FLT3/SFK

Pomocí metody western blotting a následné imunodetekce klíčových molekul signální dráhy FLT3 byla na úrovni inhibice fosforylace sledována účinnost jednotlivých inhibitorů (popř. jejich kombinace).

Pro potvrzení molekulárního mechanismu a selektivity inhibitoru LGR3922 k SFK kinázám byla nejdříve použita buněčná linie KBM-5res. Buňky byly inkubovány s testovanými inhibitory o koncentraci $250 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ po dobu 6 hod. Úplná inhibice fosforylace SFK v pozici Tyr416 byla pozorována pouze u inhibitoru LGR3922. Významné snížení fosforylace ERK1/2 v pozici Thr202/Tyr204 bylo dosaženo u inhibitoru LGR3922 a kombinace quizartinibu a dasatinibu. Za daných experimentálních podmínek quizartinib nebo dasatinib nevedl k poklesu fosforylace SFK (Tyr416) nebo ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (viz Obrázek 7).

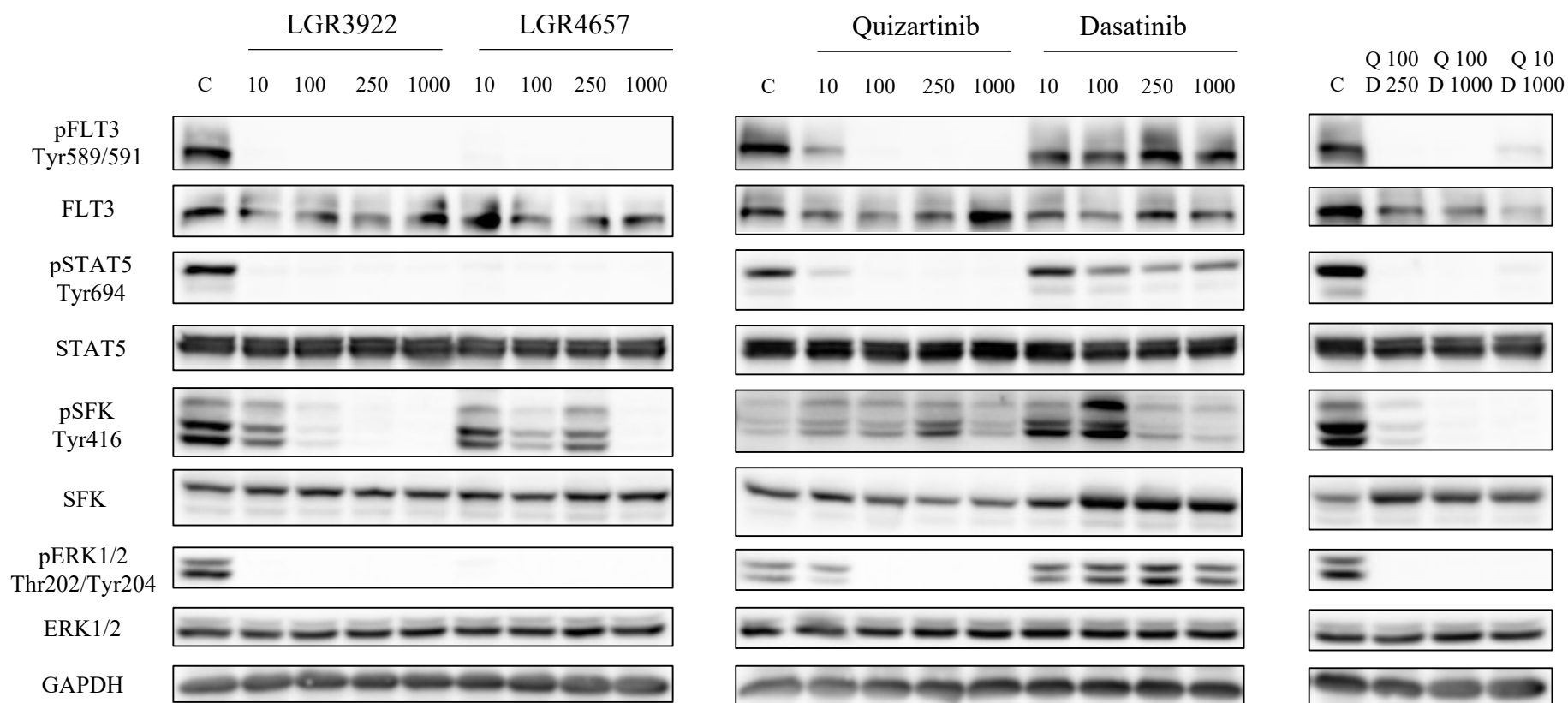


Obrázek 7: Detekce vybraných proteinů v buněčné linii KBM-5res po 6 hod inkubace s testovanými inhibitory. Inhibitory byly použity v koncentraci 250 nmol·l⁻¹. Protein GAPDH sloužil jako kontrola nánosu vzorků. C – kontrola (0,01% DMSO), Q – quizartinib, D – dasatinib.

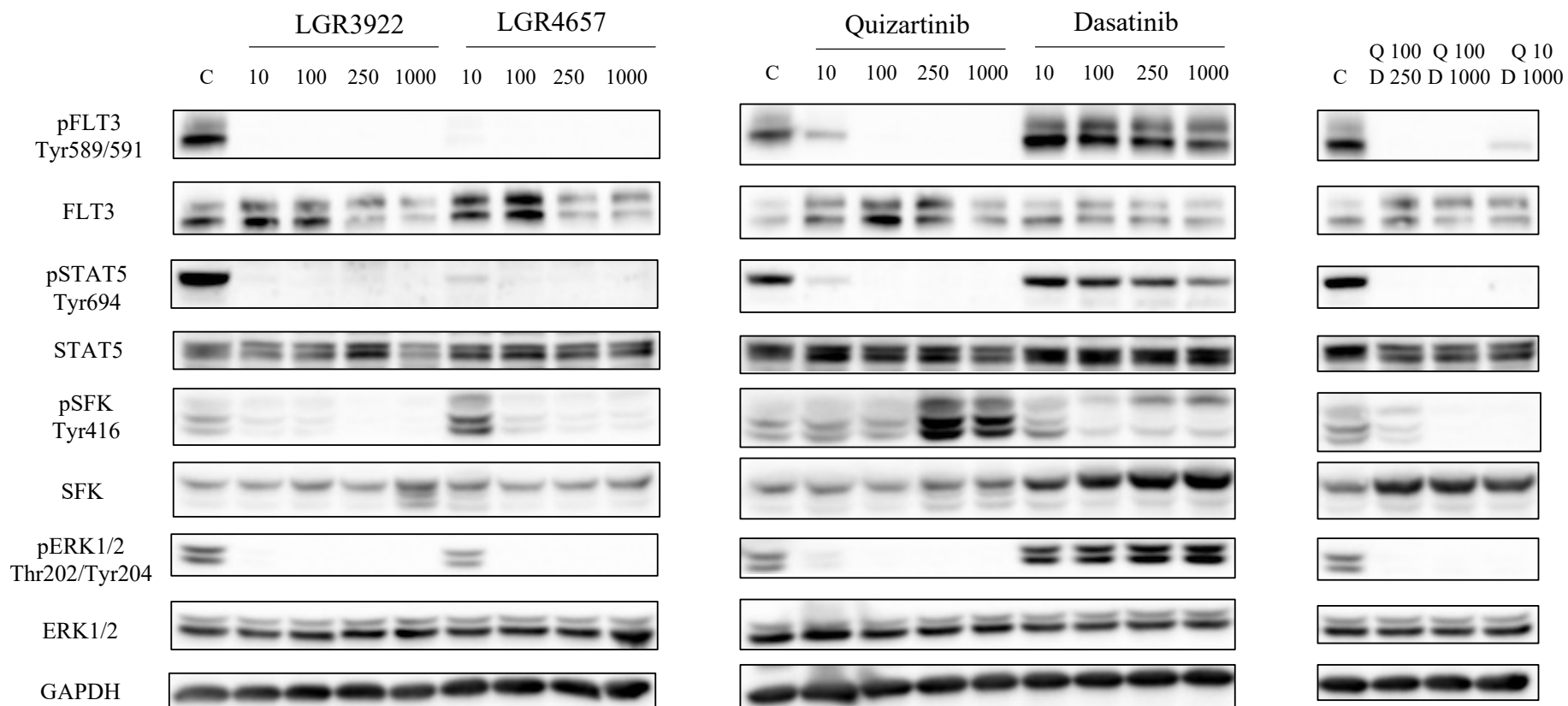
Účinnost inhibitorů LGR3922 a LGR4657 na klíčové molekuly FLT3-ITD dráhy byla dále testována na buněčných liniích MV4-11 a MOLM-13 v časových intervalech 1 a 6 hod. Pro kontrolu inhibice fosforylace FLT3 v pozici Tyr589/591 byl použit inhibitor quizartinib, pro SFK (Tyr416) dasatinib a pro duální inhibici FLT3/SFK kombinace quizartinibu a dasatinibu.

V případě 1 hod působení inhibitorů LGR3922 a LGR4657 na linii MV4-11 byla pozorována inhibice fosforylace u proteinů FLT3 (Tyr589/591), STAT5 (Tyr694) a ERK1/2 (Thr202/Tyr204), a to ve všech zvolených koncentracích. Úplná inhibice fosforylace SFK (Tyr416) byla detekována pro koncentrace 250 a 1000 nmol·l⁻¹ u inhibitoru LGR3922, v případě LGR4657 až při 1000 nmol·l⁻¹. Parciální inhibice SFK (Tyr416) nastala již při koncentraci ≤ 100 nmol·l⁻¹ u LGR3922, u LGR4657 při koncentraci ≤ 250 nmol·l⁻¹. Quizartinib plně inhiboval FLT3 (Tyr589/591), STAT5 (Tyr694) a ERK1/2 (Thr202/Tyr204) při koncentraci ≥ 100 nmol·l⁻¹. Hladina fosforylace SFK (Tyr416) zůstala stabilní. Dasatinib parciálně inhiboval SFK (Tyr416) při koncentraci ≥ 250 nmol·l⁻¹, současně se zvyšovala totální forma SFK. Úplná inhibice na všech úrovních detekovaných molekul pFLT3, pSTAT5, pSFK a pERK1/2 dosažená u LGR3922 (v koncentracích 250 a 1000 nmol·l⁻¹) a LGR4657 (1000 nmol·l⁻¹) byla srovnatelná pouze s kombinací quizartinibu (100 nmol·l⁻¹) a dasatinibu (1000 nmol·l⁻¹) (viz Obrázek 8).

Hladina fosforylace proteinů v linii MV4-11 po 6 hod od ovlivnění LGR3922 byla srovnatelná jako v případě 1 hod inkubace, tj. úplná inhibice fosforylace FLT3 (Tyr589/591), STAT5 (Tyr694) a ERK1/2 (Thr202/Tyr204) při všech koncentracích, SFK (Tyr416) při 250 a 1000 nmol·l⁻¹ a parciální pokles fosforylace SFK (Tyr416) při 10 a 100 nmol·l⁻¹. K mírnému zeslabení inhibiční aktivity došlo u inhibitoru LGR4657 oproti ovlivnění 1 hod. Úplnou inhibici fosforylace FLT3 (Tyr589/591), STAT5 (Tyr694) a ERK1/2 (Thr202/Tyr204) tak bylo možné u LGR4657 pozorovat v koncentracích 100; 250 a 1000 nmol·l⁻¹. Nárůst fosforylace oproti 1 hod byl u LGR4657 pozorován při nejnižší koncentraci 10 nmol·l⁻¹ u FLT3 (Tyr589/591), STAT5 (Tyr694) a ERK1/2 (Thr202/Tyr204). Současně došlo k opětovné fosforylaci SFK (Tyr416) při 1000 nmol·l⁻¹. Quizartinib dosahoval shodných výsledků jako při 1 hod inkubaci, avšak došlo k výraznému zvýšení fosforylace SFK při koncentraci ≥ 250 nmol·l⁻¹. Úplná inhibice na všech úrovních detekovaných molekul pFLT3, pSTAT5, pSFK a pERK1/2 dosažená u LGR3922 (v koncentracích 250 a 1000 nmol·l⁻¹) byla stejně jako po 1 hod inkubace srovnatelná pouze s kombinací quizartinibu (100 nmol·l⁻¹) a dasatinibu (1000 nmol·l⁻¹) (viz Obrázek 9).



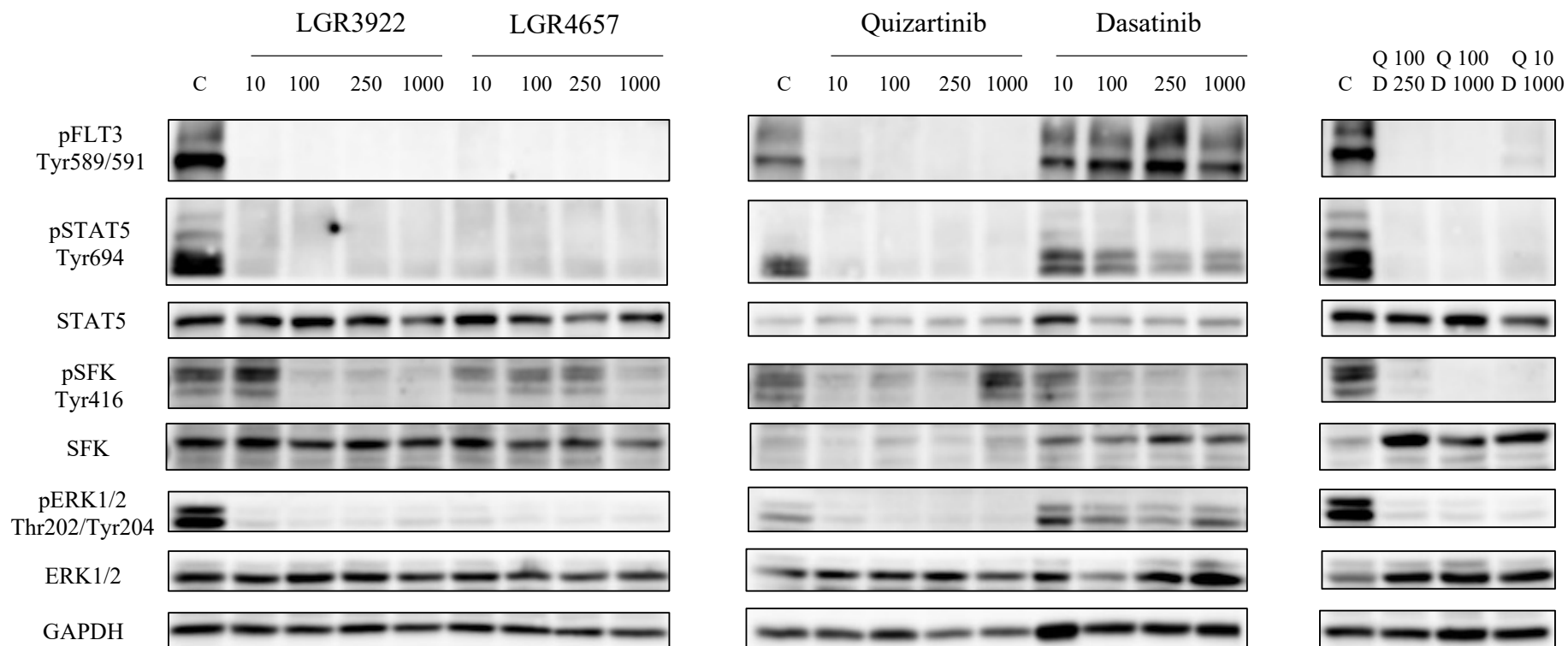
Obrázek 8: Detekce vybraných proteinů v buněčné linii MV4-11 po 1 hod inkubace s testovanými inhibitory. Inhibitory byly použity v koncentracích 10; 100; 250; 1000 nmol·l⁻¹, popř. v kombinaci Q a D: 100 + 250; 100 + 1000; 10 + 1000 nmol·l⁻¹. Protein GAPDH sloužil jako kontrola nánosu vzorků. C – kontrola (0,01% DMSO), Q – quizartinib, D – dasatinib.



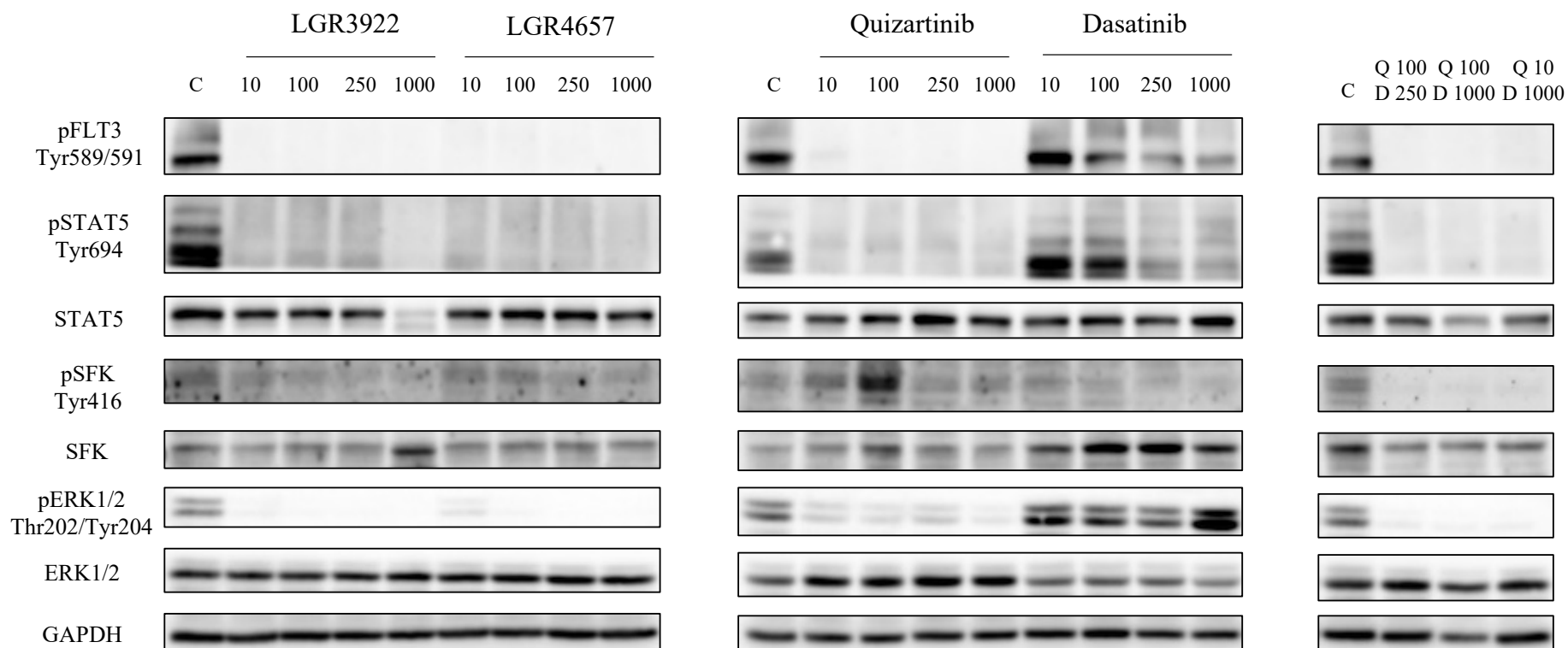
Obrázek 9: Detekce vybraných proteinů v buněčné linii MV4-11 po 6 hod inkubace s testovanými inhibitory. Inhibitory byly použity v koncentracích 10; 100; 250; 1000 nmol·l⁻¹, popř. v kombinaci Q a D: 100 + 250; 100 + 1000; 10 + 1000 nmol·l⁻¹. Protein GAPDH sloužil jako kontrola nánosu vzorků. C – kontrola (0,01% DMSO), Q – quizartinib, D – dasatinib.

Po 1 hod působení inhibitorů LGR3922 a LGR4657 v buněčné linii MOLM-13 byla zjištěna úplná inhibice fosforylace proteinů FLT3 (Tyr589/591) a STAT5 (Tyr694) při všech použitých koncentracích. Slabá fosforylace ERK1/2 (Thr202/Tyr204) byla přítomna u všech koncentrací obou inhibitorů, což bylo pozorováno i v případě quizartinibu, dasatinibu i jejich kombinace. Vlivem inhibitorů LGR3922 a LGR4657 došlo k parciální inhibici fosforylace SFK (Tyr416), která je na rozdíl od MV4-11 přítomna i v případě quizartinibu o koncentraci $\leq 250 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Úplná inhibice fosforylace SFK (Tyr416) byla za daných podmínek dosažena pouze v případě kombinace quizartinibu a dasatinibu ($10 + 1000$ a $100 + 1000 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) (viz Obrázek 10).

Hladina fosforylace proteinů FLT3 (Tyr589/591) a STAT5 (Tyr694) v linii MOLM-13 po 6 hod od ovlivnění LGR3922 a LGR4657 byla srovnatelná jako v případě 1 hod inkubace, tj. úplná inhibice byla zaznamenána u všech použitých koncentrací. Na rozdíl od 1 hod inkubace, delší působení inhibitorů LGR3922 a LGR4657 vedlo k úplné inhibici fosforylace ERK1/2 (Thr202/Tyr204), a to ve všech koncentracích kromě $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ u LGR4657. Stejný trend byl pozorován i v případě kombinace quizartinib a dasatinib. Naopak k zesílení fosforylace ERK1/2 (Thr202/Tyr204) došlo v případě použití samotného quizartinibu. Parciální inhibice byla detekována u SFK (Tyr416) po ovlivnění LGR3922 a LGR4657, což je srovnatelné s 1 hod působením. Naopak nárůst fosforylace byl pozorován u quizartinibu (viz Obrázek 11).



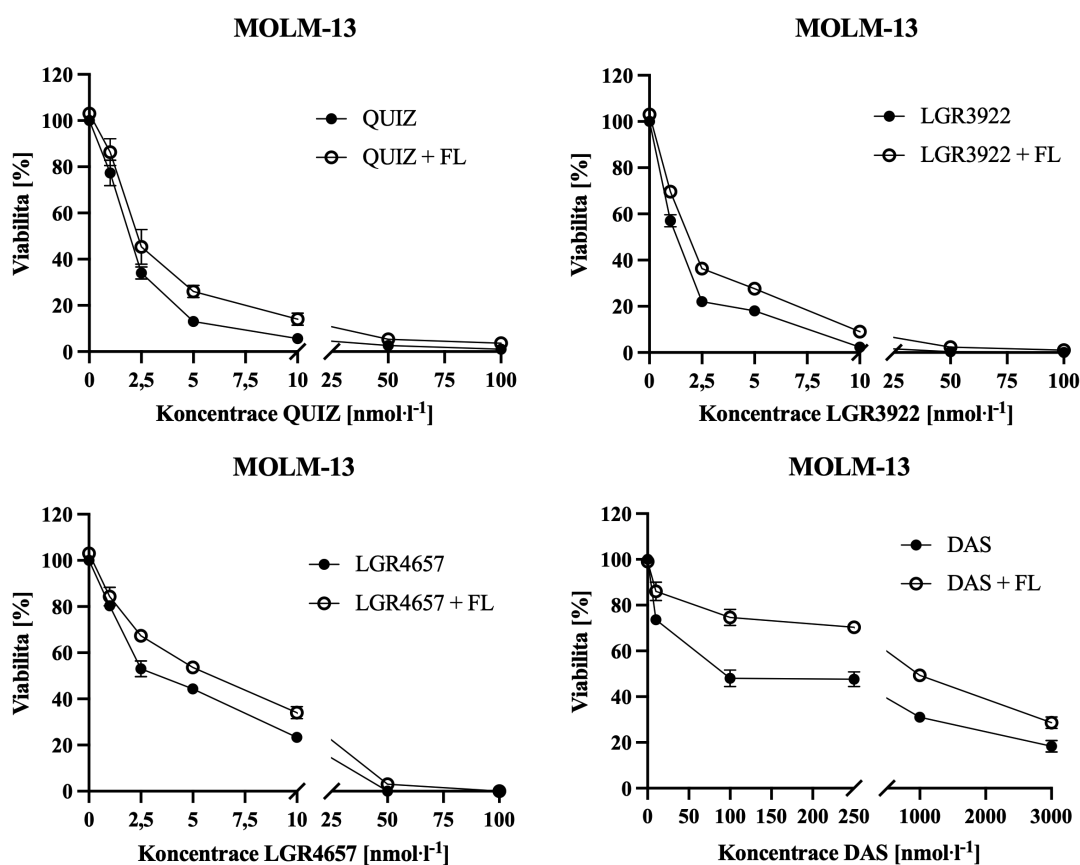
Obrázek 10: Detekce vybraných proteinů v buněčné linii MOLM-13 po 1 hod inkubace s testovanými inhibitory. Inhibitory byly použity v koncentracích 10; 100; 250; 1000 nmol·l⁻¹, popř. v kombinaci Q a D: 100 + 250; 100 + 1000; 10 + 1000 nmol·l⁻¹. Protein GAPDH sloužil jako kontrola nánosu vzorků. C – kontrola (0,01% DMSO), Q – quizartinib, D – dasatinib.



Obrázek 11: Detekce vybraných proteinů v buněčné linii MOLM-13 po 6 hod inkubace s testovanými inhibitory. Inhibitory byly použity v koncentracích 10; 100; 250; 1000 nmol·l⁻¹, popř. v kombinaci Q a D: 100 + 250; 100 + 1000; 10 + 1000 nmol·l⁻¹. Protein GAPDH sloužil jako kontrola nánosu vzorků. C – kontrola (0,01% DMSO), Q – quizartinib, D – dasatinib.

5.2.3 Vliv FL3 ligandu na protinádorovou aktivitu testovaných inhibitorů

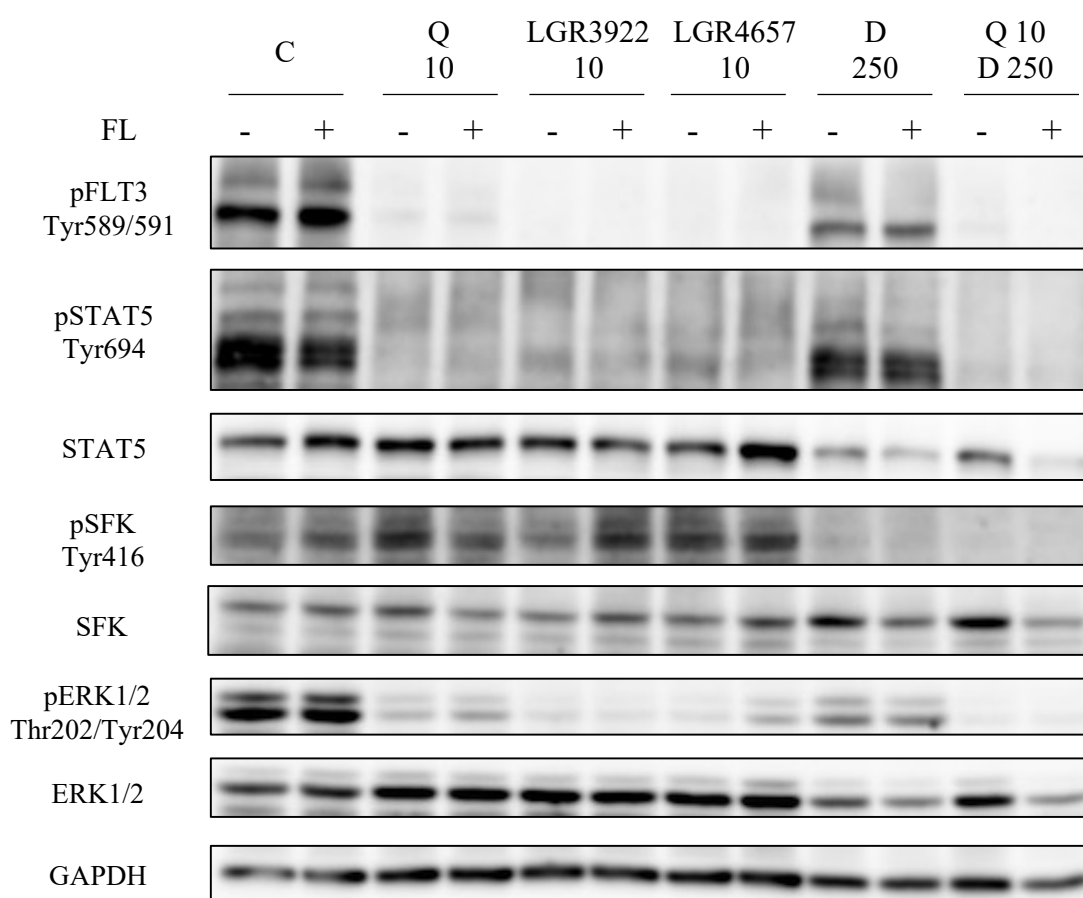
V rámci testů cytotoxicity byl na buněčné linii MOLM-13 dále testován vliv FL o koncentraci 50 ng·ml⁻¹ na inhibiční potenciál testovaných inhibitorů LGR3922 a LGR4657. U obou testovaných inhibitorů byl při použití FL zaznamenán mírný nárůst proliferace/viability, tj. snížení účinnosti inhibice ve srovnání se samotným inhibitorem (viz Obrázek 12). Stejný trend byl pozorován i v případě kontrolních látek quizartinibu a dasatinibu.



Obrázek 12: Cytotoxický efekt použitých inhibitorů s/bez přítomnosti FLT3 ligandu o koncentraci 50 ng·ml⁻¹ v buněčné linii MOLM-13. QUIZ– quizartinib, DAS – dasatinib, FL – FLT3 ligand. Jednotlivé body v grafech vyjadřují průměr a směrodatnou odchylku ze tří nezávislých experimentů.

Vliv FL byl dále sledován na úrovni molekulárního mechanismu inhibice testovaných inhibitorů. Buňky linie MOLM-13 byly 2 hod inkubovány s inhibitory LGR3922 a LGR4657 o koncentraci 10 nmol·l⁻¹ s nebo bez přítomnosti FL o koncentraci 50 ng·ml⁻¹. Jako kontrolní inhibitory byly použity quizartinib o koncentraci 10 nmol·l⁻¹, dasatinib 250 nmol·l⁻¹ nebo kombinace quizartinibu a dasatinibu o koncentracích 10 + 250 nmol·l⁻¹. Přítomnost FL neovlivnila inhibiční

účinek LGR3922 na fosforylaci FLT3 (Tyr589/591), STAT5 (Tyr694) ani ERK1/2 (Thr202/Tyr204); zvýšená hladina fosforylace byla přítomna pouze u SFK (Tyr416). Konstantní inhibice fosforylace FLT3 (Tyr589/591) a STAT5 (Tyr694) byla zachována i v případě LGR4657, mírný nárůst byl pozorován u ERK1/2 (Thr202/Tyr204). Při přítomnosti FL u quizartinibu došlo k nárůstu fosforylace FLT3 (Tyr589/591) a ERK1/2 (Thr202/Tyr204); naopak fosforylace SFK (Tyr416) se mírně snížila. Inhibiční účinek dasatinibu a kombinace quizartinibu a dasatinibu zůstal konstantní (viz Obrázek 13).

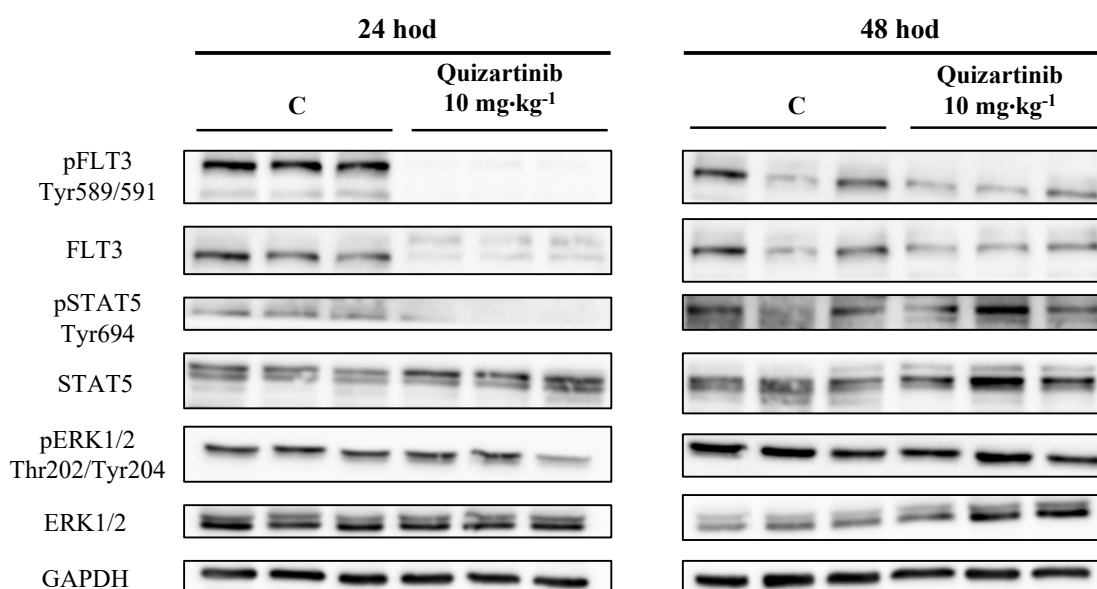


Obrázek 13: Detekce vybraných proteinů v buněčné linii MOLM-13 po 2 hod inkubace s testovanými inhibitory a FLT3 ligandem o koncentraci 50 ng·ml⁻¹. Inhibitory byly použity v koncentraci 10 nmol·l⁻¹, pouze dasatinib 250 nmol·l⁻¹. Protein GAPDH sloužil jako kontrola nánosu vzorků. C – kontrola (0,01% DMSO), FL – FLT3 ligand, Q – quizartinib, D – dasatinib.

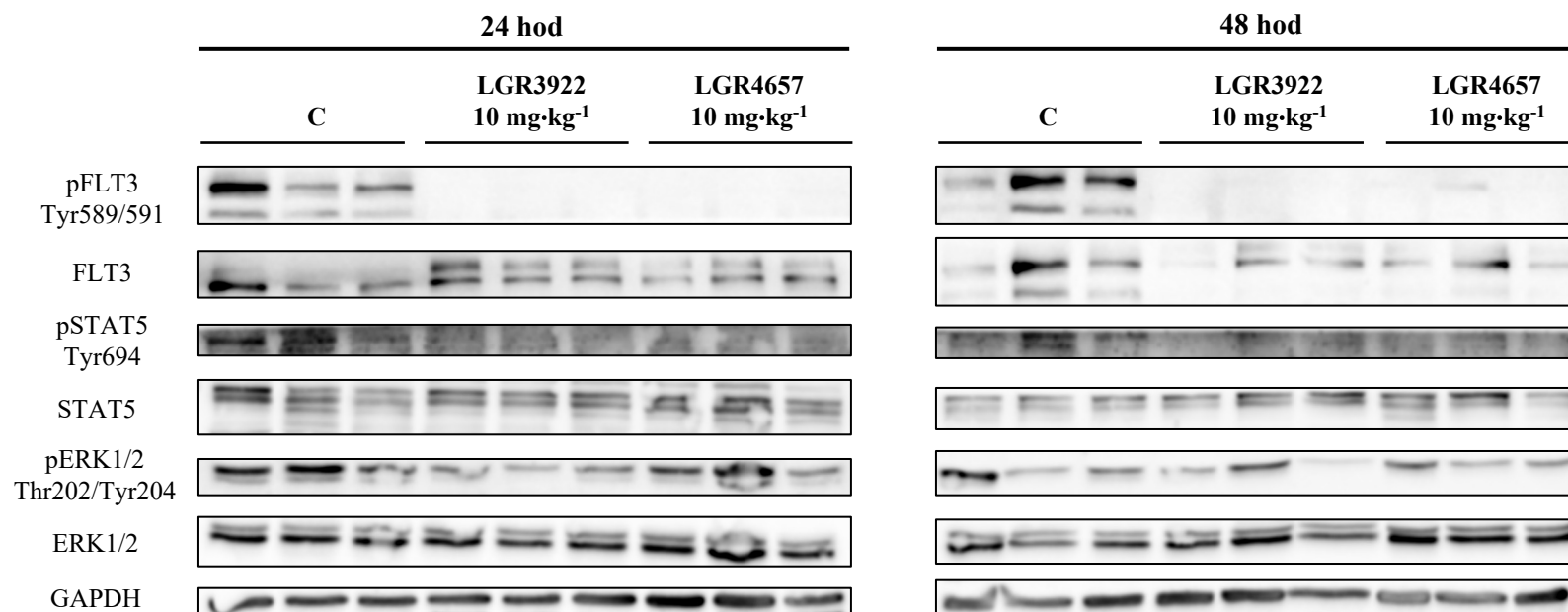
5.3 Účinnost inhibitorů *in vivo*

Účinnost inhibitorů *in vivo* byla hodnocena pomocí western blot analýzy a následné imunodetekce vybraných proteinů pomocí specifických protilátek. Molekulární mechanismus inhibice testovaných inhibitorů (LGR3922, LGR4657) byl hodnocen na úrovni hladiny fosforylace vybraných molekul, a to v časových intervalech 24 a 48 hod po aplikaci látek. Pro tento experiment byl použit imunodeficientní myší model Athymic Nude-Foxn1^{nu} se subkutánně implantovanými tumory nádorové linie MV4-11.

V první fázi byla hodnocena účinnost LGR3922 a LGR4657 na inhibici fosforylace FLT3 (Tyr589/591) a podřízených molekul STAT5 (Tyr694) a ERK1/2 (Thr202/Tyr204). Oba inhibitory LGR3922 i LGR4657 po 24 hod od aplikace plně inhibovaly fosforylaci FLT3 (Tyr589/591) a STAT5 (Tyr694); fosforylace ERK1/2 (Thr202/Tyr204) byla mírně inhibována pouze v případě LGR3922. Komerčně dostupný inhibitor quizartinib vedl k inhibici FLT3 (Tyr589/591) a STAT5 (Tyr694). Po 48 hod od aplikace byly látky LGR3922 a LGR4657 stále schopny inhibovat fosforylaci FLT3 (Tyr589/591) a STAT5 (Tyr694), naopak u quizartinibu došlo k zeslabení inhibičního účinku a obnovení fosforylace FLT3 i STAT5 (viz Obrázek 14 a 15).

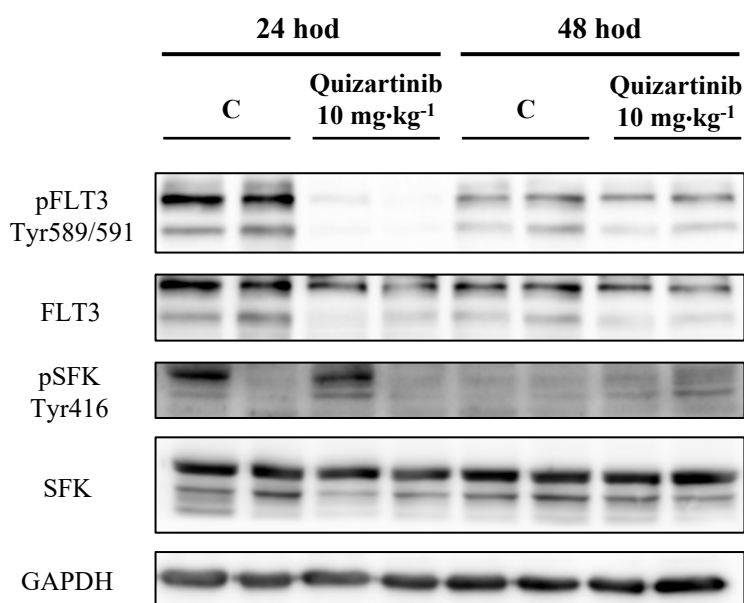


Obrázek 14: Detekce vybraných proteinů v MV4-11 tumorech v Athymic Nude-Foxn1^{nu} myších po 24 a 48 hod od aplikace quizartinibu o koncentraci 10 mg·kg⁻¹. Protein GAPDH sloužil jako kontrola nánosu vzorků. C – kontrola (5% hydroxypropyl-β-cyclodextrin).

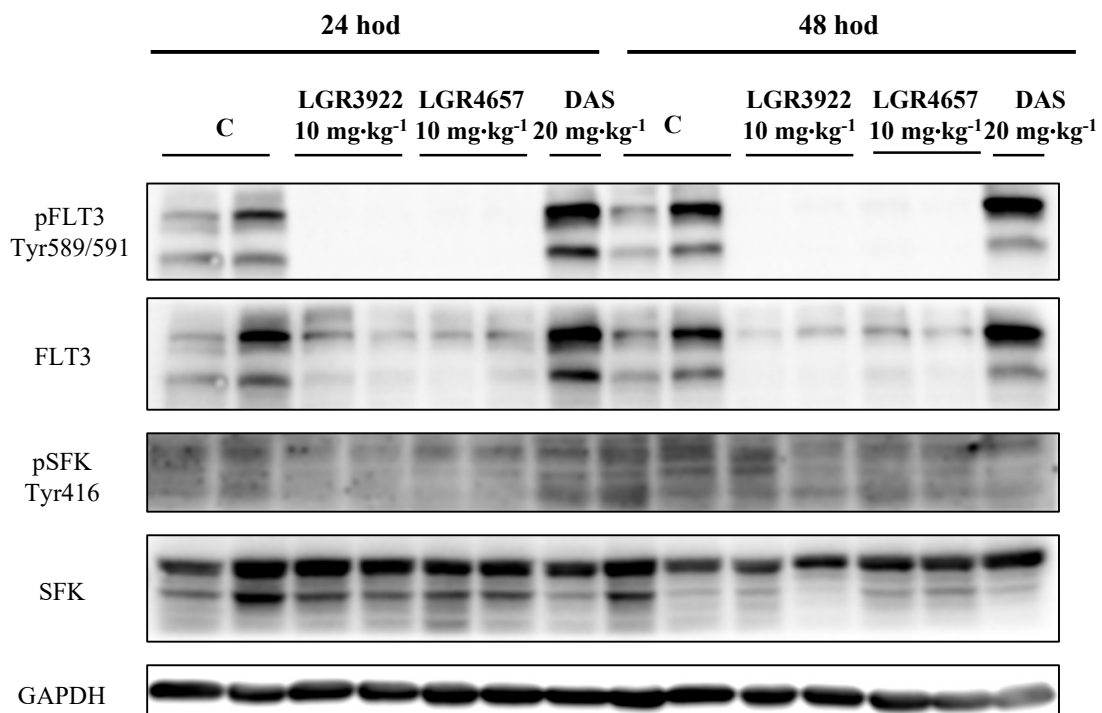


Obrázek 15: Detekce vybraných proteinů v MV4-11 tumorech v Athymic Nude-Foxn1^{nu} myších po 24 a 48 hod od aplikace inhibitorů LGR3922 a LGR4657 o koncentraci 10 mg·kg⁻¹. Protein GAPDH sloužil jako kontrola nánosu vzorků. C – kontrola (okyselený fyziologický roztok).

Následně byly inhibitory LGR3922 a LGR4657 testovány na duální inhibici fosforylace FLT3 (Tyr589/591) a SFK (Tyr416). Jako kontrolní inhibitory byly použity quizartinib a dasatinib. Jednorázová dávka LGR3922 byla schopna po 24 hod od aplikace zcela inhibovat fosforylaci FLT3 (Tyr589/591) a parciálně SFK (Tyr416). Zatímco FLT3 (Tyr589/591) byl zcela inhibován i po 48 hod, u SFK (Tyr416) došlo k obnovení fosforylace. Látka LGR4657 byla za daných podmínek schopna plně inhibovat FLT3 (Tyr589/591), slabě pak SFK (Tyr416). Variabilní inhibice FLT3/SFK byla pozorována v případě quizartinibu po 24 hod, kdy v případě plné inhibice fosforylace FLT3 (Tyr589/591) došlo i k inhibici SFK (Tyr416), naopak částečná inhibice FLT3 (Tyr589/591) nevedla k inhibici SFK (Tyr416). V časovém intervalu 48 hod po ovlivnění quizartinibem byl u všech zvířat pozorován nárůst hladiny fosforylace jak FLT3 (Tyr589/591), tak SFK (Tyr416). Slabý pokles hladiny fosforylace SFK (Tyr416) byl pozorován 48 hod po aplikaci dasatinibu (viz Obrázek 16 a 17).



Obrázek 16: Analýza fosforylace FLT3 a SFK v MV4-11 tumorech v Athymic Nude-Foxn1^{nu} myších po 24 a 48 hod od aplikace quizartinibu o koncentraci 10 mg·kg⁻¹. Protein GAPDH sloužil jako kontrola nánosu vzorků. C – kontrola (5% hydroxypropyl-β-cyclodextrin).



Obrázek 17: Analýza fosforylace FLT3 a SFK v MV4-11 tumorech v Athymic Nude-Foxn1^{nu} myších po 24 a 48 hod od aplikace testovaných inhibitorů. Protein GAPDH sloužil jako kontrola nánosu vzorků. C – kontrola (okyselený fyziologický roztok), DAS – dasatinib.

6 Diskuse

FLT3-ITD patří k nejčastějším genetickým aberacím AML a obecně je asociovaná se špatnou prognózou. Během posledních let došlo k výraznému pokroku ve vývoji specifických FLT3 inhibitorů, avšak jejich užívání je výrazně limitováno vznikem rezistence (Stein *et Tallman*, 2016). Současným trendem je tak vývoj látek s duálním charakterem nebo možnost kombinované léčby (Mologni *et al.*, 2021).

Protinádorová aktivita a inhibiční mechanismus proti FLT3-ITD byl u látky LGR3922 popsán v publikaci Gucký *et al.* (2018), a současně je tato látka pod patentovou ochranou PCT/CZ2018/050010. Na základě kinázových esejí (Gucký *et al.*, 2018) a míry inhibice fosforylace podřízených molekul FLT3-ITD dráhy se však předpokládalo, že kromě FLT3 mají testované látky LGR3922 a LGR4657 další významný molekulární cíl. Tato práce tak blíže charakterizuje protinádorovou aktivitu a duální charakter inhibice látek LGR3922 a LGR4657 ve srovnání s dostupnými inhibitory na trhu (quizartinib, dasatinib) jak v *in vitro*, tak *in vivo* experimentech.

Protinádorová aktivita obou testovaných inhibitorů byla nejdříve hodnocena prostřednictvím testů cytotoxicity na buněčné linii MV4-11 (exprimující pouze mutantní FLT3-ITD) a MOLM-13 (exprimující FLT3-ITD a wt-FLT3) (Quentmeier *et al.*, 2003). Inhibitor LGR3922 prokázal srovnatelný inhibiční účinek s komerčně dostupným FLT3 inhibitorem quizartinibem, což popsali i Gucký *et al.* (2018). Látka LGR4657 vykazovala slabší inhibiční efekt při nižších koncentracích, v koncentraci $\geq 50 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ však dosahovala porovnatelné míry inhibice proliferace/viability jako LGR3922 a quizartinib.

Na základě kinázových esejí (Gucký *et al.*, 2018) byla dále hodnocena možnost duální inhibice FLT3/SFK testovaných inhibitorů, jelikož SFK mají důležitou úlohu v onkogenní signalizaci FLT3-ITD (Roginskaya *et al.*, 1999; Chougule *et al.*, 2016; Lopez *et al.*, 2016). Inhibice SFK pomocí inhibitoru dasatinibu vedla ke snížení proliferace AML buněčných linií i primárních buněk AML pacientů (Guerrouahen *et al.*, 2010). Podobného výsledku bylo dosaženo i v případě našich experimentů na liniích MV4-11 a MOLM-13. Pro zhodnocení míry inhibice SFK testovaných látek LGR3922 a LGR4657 byla použita linie KBM-5res, která, stejně jako jiné imatinib rezistentní linie, vykazuje vysokou expresi a aktivitu SFK (Donato *et al.*, 2003). Inhibitor LGR3922 prokázal jak výraznou inhibici proliferace/viability KBM-5res linie, tak úplnou inhibici fosforylace SFK (Tyr416), a to překvapivě ve větší míře než

dasatinib. Vzhledem k tomu, že dasatinib není schopen inhibice BCR/ABL (T315I) (Müller *et al.*, 2009), výrazná protinádorová aktivita inhibitoru LGR3922 u KBM-5res by mohla být založena nejen na inhibici SFK, ale i na schopnosti inhibovat právě BCR/ABL (T315I).

Molekulární mechanismus inhibice testovaných inhibitorů byl dále hodnocen na liniích MV4-11 a MOLM-13 prostřednictvím western blot analýzy, a to po 1 a 6 hod inkubace. Ve srovnání s quizartinibem oba testované inhibitory LGR3922 a LGR4657 prokázaly silnější inhibiční efekt vůči fosforylaci FLT3 (Tyr589/591) i podřízeným signálním molekulám STAT5 (Tyr694) a ERK1/2 (Thr202/Tyr204). Stejná účinnost látky LGR3922 na linii MV4-11 po 1 hod inkubace byla ukázána i ve studii, kterou provedli Gucký *et al.* (2018). Na rozdíl od quizartinibu však oba testované inhibitory prokázaly výraznou inhibici fosforylace SFK (Tyr416) u MV4-11 i MOLM-13. Quizartinibem indukovaná parciální inhibice fosforylace SFK (Tyr416) byla zaznamenána v případě MOLM-13 po 1 hod. Podobný efekt byl zaznamenán i ve studii, kterou publikovali Elgamal *et al.* (2020). Tento efekt je pravděpodobně spojený s nižší mírou exprese FLT3/FLT3-ITD u linie MOLM-13 (Kelly *et al.*, 2002). Po 6 hod expozice inhibitoru byl pozorován opětovný nárůst fosforylace SFK (Tyr416) stejně tak jako ERK1/2 (Thr202/Tyr204). Dasatinib za daných experimentálních podmínek nebyl schopen úplné inhibice fosforylace SFK (Tyr416), výraznější inhibiční aktivity dosahoval pouze v kombinaci s quizartinibem. Obecně monoterapie quizartinibu nebo dasatinibu nedosahovala účinnosti LGR3922. Účinnost látky LGR3922, tj. duální inhibice FLT3/SFK a podřízených signálních molekul STAT5 a ERK byla porovnatelná pouze s kombinací quizartinibu a dasatinibu o koncentracích 100 + 1000 nmol·l⁻¹.

Zvýšená exprese FL v mikroprostředí kostní dřeně je jedním z mechanismů rezistence vůči FLT3 inhibitorům (Sato *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2016; Daver *et al.*, 2019), proto byla dále sledována účinnost testovaných inhibitorů v kombinaci s FL, a to na buněčné linii MOLM-13. Pomocí testu cytotoxicity bylo u všech inhibitorů ukázáno, že přítomnost FL vede k mírnému zvýšení proliferace/viability buněk ve srovnání s působením samotných inhibitorů. K podobnému efektu v případě quizartinibu dospěli také Kawase *et al.* (2019). Následná proteinová analýza prokázala, že u quizartinibu v kombinaci s FL dochází k obnově fosforylace FLT3 (Tyr589/591) a ERK1/2 (Thr202/Tyr204). Tyto výsledky jsou v souladu se skutečností, že FL snižuje účinek quizartinibu v buňkách, které koexprimují FLT3-ITD a wt-FLT3 (Sato *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2016). U látky

LGR4657 došlo ke zvýšení fosforylace ERK1/2 (Thr202/Tyr204). V případě inhibitoru LGR3922 nedošlo k obnově fosforylace ani u jedné ze zmíněných signálních molekul. Naopak bylo pozorováno zvýšení fosforylace SFK (Tyr416). Právě zvýšená fosforylace SFK, resp. HCK, vede u FLT3-ITD k aktivaci CDK6, a tím dochází k nekontrolovatelné proliferaci (Lopez *et al.*, 2016). To naznačuje, že duální inhibice FLT3/SFK je ideální strategií pro úplný blok proliferace linie MOLM-13.

Inhibiční efekt testovaných inhibitorů byl dále analyzován *in vivo* na MV4-11 xenograftech v imunodeficientních myších Athymic Nude-Foxn1^{nu}. Jednorázová dávka LGR3922 a LGR4657 plně inhibovala fosforylaci FLT3 (Tyr589/591) po 24 i 48 hod od aplikace, na rozdíl od quizartinibu, kdy byla po 48 hod fosforylace obnovena. Oproti quizartinibu látka LGR3922 byla také schopná inhibice STAT5 (Tyr694) a ERK1/2 (Thr202/Tyr204). K podobným výsledkům pro látku LGR3922 vs. quizartinib na MV4-11 xenograftech dospěli také Gucký *et al.* (2018). V rámci této práce byla také poprvé prokázána duální inhibice fosforylace FLT3 (Tyr589/591) a SFK (Tyr416) inhibitory LGR3922 a LGR4657 *in vivo*. Inhibiční účinek obou inhibitorů vůči fosforylaci SFK (Tyr416) byl pozorován až 48 hod po aplikaci. U quizartinibu byla pozorována mírná heterogenita, nicméně po 48 hod od aplikace byla fosforylace SFK (Tyr416) již jednoznačně přítomna, stejně jako v případě FLT3 (Tyr589/591).

Na základě *in vitro* a *in vivo* experimentů bylo jednoznačně prokázáno, že inhibitory LGR3922 a LGR4657 mají silnou protinádorovou aktivitu na AML buněčných liniích, která je primárně založena na duální inhibici fosforylace FLT3/SFK. Ve srovnání s klinicky používaným quizartinibem vykazují oba inhibitory srovnatelných, ne-li lepších výsledků (zvláště LGR3922). Navíc, jejich schopnost duální inhibice fosforylace FLT3/SFK by mohla být klíčovým mechanismem, jak plně inhibovat proliferaci nádorových buněk a především, jak předcházet vzniku rezistence. Nedávno bylo totiž prokázáno, že kombinace quizartinibu a dasatinibu (tj. inhibice FLT3 a SFK) přispívá k překonání rezistence zprostředkované stromálními buňkami kostní dřeně vůči samotnému quizartinibu (Patel *et al.*, 2020). Vývoj látek na principu duální inhibice FLT3/SFK (Larocque *et al.*, 2017; Elgamal *et al.*, 2020) nebo kombinační terapie (Patel *et al.*, 2020) tak nabývá u léčby AML na významu.

7 Závěr

V předložené diplomové práci byla studována protinádorová aktivita a mechanismus duální inhibice fosforylace FLT3/SFK látek LGR3922 a LGR4657 *in vitro* a *in vivo*.

Testované inhibitory LGR3922 a LGR4657 prokázaly silný protinádorový účinek na AML buněčných liniích MV4-11 a MOLM-13, v případě LGR3922 také na linii KBM-5res odvozené od CML. Molekulární mechanismus inhibice obou inhibitorů LGR3922 a LGR4657 byl založen na inhibici fosforylace FLT3 (Tyr589/591) a podřízených molekul STAT5 (Tyr694) a ERK (Thr202/Tyr204). Testované inhibitory vykazovaly již v koncentraci 10 nmol·l⁻¹ lepší inhibiční efekt vůči fosforylaci FLT3 (Tyr589/591) než komerčně dostupný FLT3 inhibitor quizartinib. Oba testované inhibitory také prokázaly schopnost inhibice fosforylace SFK (Tyr416). Inhibitor LGR3922 vykazoval výrazně silnější inhibiční efekt než komerčně používaný SFK inhibitor dasatinib.

Přítomnost FL vedla k mírnému snížení protinádorové aktivity testovaných inhibitorů. Nicméně v případě LGR3922 současně poukázala na to, proč je duální inhibice FLT3/SFK ideální strategií pro úplný blok proliferace nádorových buněk.

Schopnost LGR3922 a LGR4657 inhibovat fosforylaci FLT3 (Tyr589/591) byla prokázána i na subkutánních MV4-11 tumorech po 24 a 48 h, naopak v případě quizartinibu byla po 48 hod fosforylace obnovena. I přes značnou variabilitu bylo možné u testovaných inhibitorů pozorovat duální inhibici FLT3 (Tyr589/591) a SFK (Tyr416).

Dosažené výsledky jednoznačně prokazují, že LGR3922 a LGR4657 představují duální FLT3/SFK inhibitory s výraznou protinádorovou aktivitou. Zvláště látka LGR3922 by mohla mít terapeutický potenciál nejen v oblasti léčby AML, ale i CML. Navzdory přesvědčivým výsledkům je nezbytné pro účely dalšího vývoje této látky jako potenciální protinádorové terapie prokázat jeho účinnost na primárních buňkách AML pacientů a pokročilých PDX (patient derived xenograft) zvířecích modelech.

8 Literatura

Abu-Duhier F. M., Goodeve A. C., Wilson G. A., Care R. S., Peake I. R. *et* Reilly J. T. (2001): Genomic structure of human FLT3: implications for mutational analysis. *British Journal of Haematology* 113: 1076–1089.

Agnès F., Shamoon B., Dina Ch., Rosnet O., Birnbaum D. *et* Galibert F. (1994): Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene: exon/intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III. *Gene* 145: 283–288.

Alfayez M., Kantarjian H., Kadia T., Ravandi-Kashani F. *et* Daver N. (2020): CPX-351 (vyxeos) in AML. *Leukemia & Lymphoma* 61: 288–297.

Altman J. K., Foran J. M., Pratz K. W., Trone D., Cortes J. E. *et* Tallman M. S. (2018): Phase 1 study of quizartinib in combination with induction and consolidation chemotherapy in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *American Journal of Hematology* 93: 213–221.

Antar A. I., Otrrock Z. K., Jabbour E., Mohty M. *et* Bazzarbachi A. (2020): FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: ten frequently asked questions. *Leukemia* 34: 682–696.

Arber D. A., Orazi A., Hasserjian R., Thiele J., Borowitz M. J., Le Beau M. M., Bloomfield C. D., Cazzola, M. *et* Vardiman J. W. (2016): The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127: 2391–2405.

Asif N. *et* Hassan K. (2012): Clinical Manifestations of Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Islamabad Medical & Dental College* 1: 6–9.

Bańkiewicz-Masiuk M. *et* Machaliński B. (2004): The role of the STAT5 proteins in the proliferation and apoptosis of the CML and AML cells. *European Journal of Haematology* 72: 420–429.

Béné M. C., Nebe T., Bettelheim P., Buldini B., Bumbea H., Kern W., Lacombe F., Lemez P., Marinov I., Matutes E., Maynadié M., Oelschlagel U., Orfao A., Schabath R., Solenthaler M., Tschurtschenthaler G., Vladareanu A. M., Zini G., Faure G. C. *et* Porwit A. (2011): Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia* 25: 567–574.

Betz B. L. *et* Hess J. L. (2010): Acute myeloid leukemia diagnosis in the 21st century. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 134: 1427–1433.

Birg B. F., Courcoul M., Rosnet O., Bardin F., Pébusque M.-J., Marchetto S., Tabilio A., Mannoni P. *et* Birnbaum D. (1992): Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages. *Blood* 80: 2584–2593.

Boddu P., Kantarjian H. M., Garcia-Manero G., Ravandi F., Verstovsek S., Jabbour E., Borthakur G., Konopleva M., Bhalla K. N., Daver N., DiNardo C. D., Benton Ch. B., Takahashi K., Estrov Z., Pierce S. R., Andreeff M., Cortes J. E. *et* Kadia T. M. (2017): Treated secondary acute myeloid leukemia: a distinct high-risk subset of AML with adverse prognosis. *Blood Advances* 1: 1312–1323.

Brasel K., Escobar S., Anderberg R., de Vries P., Gruss H. J. *et* Lyman S. D. (1995): Expression of the *flt3* receptor and its ligand on hematopoietic cells. *Leukemia* 9: 1212–1218.

Burchert A., Bug G., Fritz L. V., Finke J., Stelljes M., Röllig Ch., Wollmer E., Wäsch R., Bornhäuser M., Berg T., Lang F., Ehninger G., Serve H., Zeiser R., Wagner E.-M., Kröger N., Wolschke Ch., Schleuning M., Götze K. S., Schmid Ch., Crysandt M., Eßeling E., Wolf D., Wang Y., Böhm A., Thiede Ch., Haferlach T., Michel Ch., Bethge W., Wündisch T., Brandts Ch., Harnisch S., Wittenberg M., Hoeffkes H.-G., Rospleszcz S., Burchardt A., Neubauer A., Brugger M., Strauch K., Schade-Brittinger C. *et* Metzelder S. K. (2020): Sorafenib maintenance after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia with *FLT3*–internal tandem duplication mutation (SORMAIN). *Journal of Clinical Oncology* 38: 2993–3002.

Carroll M., Kim T. K., Higashino K. *et* Gewirtz A. M. (2005): Acute myeloid leukemia cells require STAT5 for survival. *Blood* 106: 1616.

Carter J. L., Hege K., Yang J., Kalpage H. A., Su Y., Edwards H., Hüttemann M., Taub J. W. *et* Ge Y. (2020): Targeting multiple signaling pathways: the new approach to acute myeloid leukemia therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5: 288.

Cortes J. E., Khaled S., Martinelli G., Perl A. E., Ganguly S., Russell N., Krämer A., Dombret H., Hogge D., Jonas B. A., Leung A. Y.-H., Mehta P., Montesinos P., Radsak M., Sica S., Arunachalam M., Holmes M., Kobayashi K., Namuyinga R., Ge N., Yver A., Zhang Y. *et* Levis M. J. (2019): Quizartinib versus salvage chemotherapy in relapsed or refractory *FLT3*-ITD acute myeloid leukaemia (QuANTUM-R): a multicentre, randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 20: 984–997.

Creutzig U., van den Heuvel-Eibrink M. M., Gibson B., Dworzak M. N., Adachi S., de Bont E., Harbott J., Hasle H., Johnston D., Kinoshita A., Lehrnbecher T., Leverger G., Mejstrikova E., Meshinchi S., Pession A., Raimondi S. C., Sung L., Stary J., Zwaan Ch. M., Kaspers G. J. L. *et* Reinhardt D. (2012): Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. *Blood* 120: 3187–3205.

Crossnohere N. L., Richardson D. R., Reinhart C., O'Donoghue B., Love S. M., Smith B. D. *et* Bridges F. P. (2019): Side effects from acute myeloid leukemia treatment: results from a national survey. *Current Medical Research and Opinion* 35: 1965–1970.

Daver N., Schlenk R. F., Russell N. H. *et* Levis M. J. (2019): Targeting *FLT3* mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia* 33: 299–312.

Daver N., Wei A. H., Pollyea D. A., Fathi A. T., Vyas P. *et* DiNardo C. D. (2020): New directions for emerging therapies in acute myeloid leukemia: the next chapter. *Blood Cancer Journal* 10: 107.

De Kouchkovsky I. *et* Abdul-Hay M. (2016): 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'. *Blood Cancer Journal* 6: e441.

De Rooij J. D. E., Zwaan C. M. *et* van den Heuvel-Eibrink M. (2015): Pediatric AML: From biology to clinical management. *Journal of Clinical Medicine* 4: 127–149.

Dhillon S. (2018): Ivosidenib: first global approval. *Drugs* 78: 1509–1516.

Döhner H., Estey E. H., Amadori S., Appelbaum F. R., Büchner T., Burnett A. K., Dombret H., Fenaux P., Grimwade D., Larson R. A., Lo-Coco F., Naoe T., Niederwieser D., Ossenkoppele G. J., Sanz M. A., Sierra J., Tallman M. S., Löwenberg B. *et* Bloomfield C. D. (2010): Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 115: 453–474.

Döhner H., Weisdorf D. J. *et* Bloomfield C. D. (2015): Acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine* 373: 1136–1152.

Döhner H., Estey E., Grimwade D., Amadori S., Appelbaum F. R., Büchner T., Dombret H., Ebert B. L., Fenaux P., Larson R. A., Levine R. L., Lo-Coco F., Naoe T., Niederwieser D., Ossenkoppele G. J., Sanz M., Sierra J., Tallman M. S., Tien H., Wei A. H., Löwenberg B. *et* Bloomfield C. D. (2017): Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 129: 424–447.

Donato N. J., Wu J. Y., Stapley J., Gallick G., Lin H., Arlinghaus R. *et* Talpaz M. (2003): BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood* 101: 690–698.

Eguchi M., Minami Y., Kuzume A. *et* Chi S. (2020): Mechanisms underlying resistance to FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia. *Biomedicines* 8: 245.

Elgamal O. A., Mehmood A., Jeon J. Y., Carmichael B., Lehman A., Orwick S. J., Truxall J., Goettl V. M., Wasmuth R., Tran M., Mitchell S., Lapalombella R., Eathiraj

S., Schwartz B., Stegmaier K., Baker S. D., Hertlein E. *et* Byrd J. C. (2020): Preclinical efficacy for a novel tyrosine kinase inhibitor, ArQule 531 against acute myeloid leukemia. *Journal of Hematology & Oncology* 13: 8.

Fiedler W., Kayser S., Kebenko M., Janning M., Krauter J., Schittenhelm M., Götze K., Weber D., Göhring G., Teleanu V., Thol F., Heuser M., Döhner K., Ganser A., Döhner H. *et* Schlenk R. F. (2015): A phase I/II study of sunitinib and intensive chemotherapy in patients over 60 years of age with acute myeloid leukaemia and activating *FLT3* mutations. *British Journal of Haematology* 169: 694–700.

Garg M., Nagata Y., Kanojia D., Mayakonda A., Yoshida K., Keloth S. H., Zang Z. J., Okuno Y., Shiraishi Y., Chiba K., Tanaka H., Miyano S., Ding L.-W., Alpermann T., Sun Q.-Y., Lin D.-Ch., Chien W., Madan V., Liu L.-Z., Tan K.-T., Sampath A., Venkatesan S., Inokuchi K., Wakita S., Yamaguchi H., Chng W. J., Kham S.-K. Y., Yeoh A. E.-J., Sanada M.,² Schiller J., Kreuzer K.-A., Kornblau S. M., Kantarjian H. M., Haferlach T., Lill M., Kuo M.-Ch., Shih L.-Y., Blau I.-W., Blau O., Yang H., Ogawa S. *et* Koefler H. P. (2015): Profiling of somatic mutations in acute myeloid leukemia with *FLT3*-ITD at diagnosis and relapse. *Blood* 126: 2491–2501.

Gebru M. T. *et* Wang H.-G. (2020): Therapeutic targeting of FLT3 and associated drug resistance in acute myeloid leukemia. *Journal of Hematology & Oncology* 13: 155.

Genovese G., Kähler A. K., Handsaker R. E., Lindberg J., Rose S. A., Bakhoum S. F., Chambert K., Mick E., Neale B. M., Fromer M., Purcell S. M., Svantesson O., Landén M., Höglund M., Lehmann S., Gabriel S. B., Moran J. L., Lander E. S., Sullivan P. F., Sklar P., Grönberg H., Hultman Ch. M. *et* McCarroll S. A. (2014): Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *The New England Journal of Medicine* 371: 2477–2487.

Gilliland D. G. *et* Griffin J. D. (2002): The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 100: 1532–1542.

Godwin C. D., Gale R. P. *et* Walter R. B. (2017): Gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 31: 1855–1868.

Grafone T., Palmisano M., Nicci Ch. *et* Storti S. (2012): An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: biology and treatment. *Oncology Reviews* 6: e8.

Gucký T., Řezníčková E., Radošová Muchová T., Jorda R., Klejová Z., Malínková V., Berka K., Bazgier V., Ajani H., Lepšík M., Divoký V. *et* Kryštof V. (2018): Discovery of N^2 -(4-amino-cyclohexyl)-9-cyclopentyl- N^6 -(4-morpholin-4-ylmethyl-phenyl)-9*H*-purine-2,6-diamine as a potent FLT3 kinase inhibitor for acute myeloid leukemia with FLT3 mutations. *Journal of Medicinal Chemistry* 61: 3855–3869.

Guerrouahen B. S., Futami M., Vaklavas Ch., Kanerva J., Whichard Z. L., Nwawka K., Blanchard E. G., Lee F. Y., Robinson L. J., Arceci R., Kornblau S. M., Wieder E., Cayre Y. E. *et* Corey S. J. (2010): Dasatinib inhibits the growth of molecularly heterogeneous myeloid leukemias. *Clinical Cancer Research* 16: 1149–1158.

Hahn Ch. N., Chong Ch.-E., Carmichael C. L., Wilkins E. J., Brautigan P. J., Li X.-Ch., Babic M., Lin M., Carmagnac A., Lee Y. K., Kok Ch. H., Gagliardi L., Friend K. L., Ekert P. G., Butcher C. M., Brown A. L., Lewis I. D., To L. B., Timms A. E., Storek J., Moore S., Aintree M., Escher R., Bardy P. G., Suthers G. K., D'Andrea R. J., Horwitz M. S. *et* Scott H. S. (2011): Heritable *GATA2* mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Nature Genetics* 43: 1012–1017.

Hoy S. M. (2019): Glasdegib: first global approval. *Drugs* 79: 207–213.

Chang Y.-T., Hernandez D., Ghiaur G., Levis M. J. *et* Jones R. J. (2017): Bone marrow stroma protects FLT3 acute myeloid leukemia (AML) through CYP3A4-mediated drug metabolism of FLT3 tyrosine kinase inhibitors (TKIs). *Blood* 130: 2519.

Chang Y.-T., Hernandez D., Alonso S., Gao M., Su M., Ghiaur G., Levis M. J. *et* Jones R. J. (2019): Role of CYP3A4 in bone marrow microenvironment-mediated protection of FLT3/ITD AML from tyrosine kinase inhibitors. *Blood Advances* 3: 908–916.

Chen F., Ishikawa Y., Akashi A., Naoe T. *et* Kiyoi H. (2016): Co-expression of wild-type FLT3 attenuates the inhibitory effect of FLT3 inhibitor on FLT3 mutated leukemia cells. *Oncotarget* 7: 47018–47032.

Chen X. *et* Cherian S. (2017): Acute myeloid leukemia immunophenotyping by flow cytometric analysis. *Clinics in Laboratory Medicine* 37: 753–769.

Chougule R. A., Kazi J. U. *et* Rönstrand L. (2016): FYN expression potentiates FLT3-ITD induced STAT5 signaling in acute myeloid leukemia. *Oncotarget* 7: 9964–9974.

Chung K. Y., Morrone G., Schuringa J. J., Wong B., Dorn D. C. *et* Moore M. A. S. (2005): Enforced expression of an *Flt3* internal tandem duplication in human CD34⁺ cells confers properties of self-renewal and enhanced erythropoiesis

Irons R. D. *et* Stillman W. S. (1996): The process of leukemogenesis. *Environmental Health Perspectives* 104: 1239–1246.

Jen E. Y., Ko Ch.-W., Lee J. E., Del Valle P. L., Aydanian A., Jewell Ch., Norsworthy K. J., Przepiora D., Nie L., Liu J., Sheth Ch. M., Shapiro M., Farrell A. T. *et* Pazdur R. (2018): FDA approval: gemtuzumab ozogamicin for the treatment of adults with newly diagnosed CD33-positive acute myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research* 24: 3242–3246.

Kawase T., Nakazawa T., Eguchi T., Tsuzuki H., Ueno Y., Amano Y., Suzuki T., Mori M. *et* Yoshida T. (2019): Effect of Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3) ligand (FL) on antitumor activity of gilteritinib, a FLT3 inhibitor, in mice xenografted with FL-overexpressing cells. *Oncotarget* 10: 6111–6123.

Kazi J. U. *et* Rönstrand L. (2019a): The role of SRC family kinases in FLT3 signaling. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 107: 32–37.

Kazi J. U. *et* Rönstrand L. (2019b): FMS-like tyrosine kinase 3/FLT3: from basic science to clinical implications. *Physiological Reviews* 99: 1433–1466.

Ke Y.-Y., Singh V. K., Coumar M. S., Hsu Y. Ch., Wang W., Song J.-S., Chen Ch.-H., Lin W.-H., Wu S.-H., Hsu J. T. A., Shih Ch. *et* Hsieh H.-P. (2015): Homology modeling of DFG-in FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) and structure-based virtual screening for inhibitor identification. *Scientific Reports* 5: 11702.

Kelly L. M., Yu J.-Ch., Boulton Ch. L., Apatira M., Li J., Sullivan C. M., Williams I., Amaral S. M., Curley D. P., Duclos N., Neuberg D., Scarborough R. M., Pandey A., Hollenbach S., Abe K., Lokker N. A., Gilliland D. G. *et* Giese N. A. (2002): CT53518, a novel selective FLT3 antagonist for the treatment of acute myelogenous leukemia (AML). *Cancer Cell* 1: 421–432.

Kim E. S. (2017): Enasidenib: first global approval. *Drugs* 77: 1705–1711.

Kindler T., Lipka D. B. *et* Fischer T. (2010): FLT3 as a therapeutic target in AML: still challenging after all these years. *Blood* 116: 5089–5102.

Kiyoi H., Towatari M., Yokota S., Hamaguchi M., Ohno R., Saito H. *et* Naoe T. (1998): Internal tandem duplication of the *FLT3* gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia* 12: 1333–1337.

Kiyoi H., Naoe T., Nakano Y., Yokota S., Minami S., Miyawaki S., Asou N., Kuriyama K., Jinnai I., Shimazaki Ch., Akiyama H., Saito K., Oh H., Motoji T., Omoto E., Saito H., Ohno R., *et* Ueda R. (1999): Prognostic implication of *FLT3* and *N-RAS* gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 93: 3074–3080.

Kiyoi H., Kawashima N. *et* Ishikawa Y. (2020): *FLT3* mutations in acute myeloid leukemia: Therapeutic paradigm beyond inhibitor development. *Cancer Science* 111: 312–322.

Knapper S., Mills K. I., Gilkes A. F., Austin S. J., Walsh V. *et* Burnett A. K. (2006): The effects of lestaurtinib (CEP701) and PKC412 on primary AML blasts: the induction of cytotoxicity varies with dependence on FLT3 signaling in both FLT3-mutated and wild-type cases. *Blood* 108: 3494–3503.

Knapper S., Russell N., Gilkes A., Hills R. K., Gale R. E., Cavenagh J. D., Jones G., Kjeldsen L., Grunwald M. R., Thomas I., Konig H., Levis M. J. *et* Burnett A. K. (2017): A randomized assessment of adding the kinase inhibitor lestaurtinib to first-line chemotherapy for FLT3-mutated AML. *Blood* 129: 1143–1154.

Konopleva M., Pollyea D. A., Potluri J., Chyla B., Hogdal L., Busman T., McKeegan E., Salem A. H., Zhu M., Ricker J. L., Blum W., DiNardo C. D., Kadia T., Dunbar M., Kirby R., Falotico N., Levenson J., Humerickhouse R., Mabry M., Stone R., Kantarjian H. *et* Letai A. (2016): Efficacy and biological correlates of response in a phase II study of venetoclax monotherapy in patients with acute myelogenous leukemia. *Cancer Discovery* 6: 1106–1117.

Kopmar N. E. *et* Estey E. H. (2019): New drug approvals in acute myeloid leukemia: an unprecedented paradigm shift. *Clinical Advances in Hematology & Oncology* 17: 569–575.

Koreth J., Schlenk R., Kopecky K. J., Honda S., Sierra J., Djulbegovic B. J., Wadleigh M., DeAngelo D. J., Stone R. M., Sakamaki H., Appelbaum F. R., Döhner H., Antin J. H., Soiffer R. J. *et* Cutler C. (2009): Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *JAMA* 301: 2349–2361.

Kottaridis P. D., Gale R. E. *et* Linch D. C. (2003): Flt3 mutations and leukaemia. *British Journal of Haematology* 122: 523–538.

Lagunas-Rangel F. A. *et* Chávez-Valencia V. (2017): FLT3–ITD and its current role in acute myeloid leukaemia. *Medical Oncology* 34: 114.

Lancet J. E., Cortes J. E., Hogge D. E., Tallman M. S., Kovacsics T. J., Damon L. E., Komrokji R., Solomon S. R., Kolitz J. E., Cooper M., Yeager A. M., Louie A. C. *et* Feldman E. J. (2014): Phase 2 trial of CPX-351, a fixed 5:1 molar ratio of cytarabine/daunorubicin, vs cytarabine/daunorubicin in older adults with untreated AML. *Blood* 123: 3239–3246.

Larocque E., Naganna N., Ma X., Opoku-Temeng C., Carter-Cooper B., Chopra G., Lapidus R. G. *et* Sintim H. O. (2017): Aminoisoquinoline benzamides, FLT3 and Src-family kinase inhibitors potently inhibit proliferation of acute myeloid leukemia cell lines. *Future Medicinal Chemistry* 9: 1213–1225.

Lee B. H., Williams I. R., Anastasiadou E., Boulton Ch. L., Joseph S. W., Amaral S. M., Curley D. P., Duclos N., Huntly B. J. P., Fabbro D., Griffin J. D. *et* Gilliland D. G. (2005): FLT3 internal tandem duplication mutations induce myeloproliferative or lymphoid disease in a transgenic mouse model. *Oncogene* 24: 7882–7892.

Levis M. *et* Small D. (2003): FLT3: ITD Does matter in leukemia. *Leukemia* 17: 1738–1752.

Li L., Piloto O., Nguyen H. B., Greenberg K., Takamiya K., Racke F., Huso D. *et* Small D. (2008): Knock-in of an internal tandem duplication mutation into murine FLT3 confers myeloproliferative disease in a mouse model. *Blood* 111: 3849–3858.

Lopez S., Voisset E., Tisserand J. C., Mosca C., Prebet T., Santamaria D., Dubreuil P. *et* De Sepulveda P. (2016): An essential pathway links FLT3-ITD, HCK and CDK6 in acute myeloid leukemia. *Oncotarget* 7: 51163–51173.

Löwenberg B., Downing J. R. *et* Burnett A. (1999): Acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine* 341: 1051–1062.

Lyman S. D., James L., Vanden Bos T., de Vries P., Brasel K., Gliniak B., Hollingsworth L. T., Picha K. S., McKenna H. J., Splett R. R., Fletcher F. A., Maraskovsky E., Farrah T., Foxworthe D., Williams D. E. *et* Beckmann M. P. (1993): Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells. *Cell* 75: 1157–1167.

Lyman S. D., Stocking K., Davison B., Fletcher F., Johnson L. *et* Escobar S. (1995): Structural analysis of human and murine flt3 ligand genomic loci. *Oncogene* 11: 1165–1172.

Lyman S. D. *et* Jacobsen S. E. W. (1998): c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* 91: 1101–1134.

Markovic A., MacKenzie K. L. *et* Lock R. B. (2005): FLT-3: a new focus in the understanding of acute leukemia. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37: 1168–1172.

McClanahan T., Culpepper J., Campbell D., Wagner J., Franz-Bacon K., Mattson J., Tsai S., Luh J., Guimaraes M. J., Mattei M.-G., Rosnet O., Birnbaum D. *et* Hannum Ch. H. (1996): Biochemical and genetic characterization of multiple splice variants of the Flt3 ligand. *Blood* 88: 3371–3382.

Meyer S. C. *et* Levine R. L. (2014): Translational implications of somatic genomics in acute myeloid leukaemia. *The Lancet Oncology* 15: 382–394.

Mizuki M., Fenski R., Halfter H., Matsumura I., Schmidt R., Müller C., Grüning W., Kratz-Albers K., Serve S., Steur C., Büchner T., Kienast J., Kanakura Y., Berdel W. E. *et* Serve H. (2000): Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood* 96: 3907–3914.

Mologni L., Marzaro G., Redaelli S. *et* Zambon A. (2021): Dual kinase targeting in leukemia. *Cancers* 13: 119.

Mrózek K., Heerema N. A. *et* Bloomfield C. D. (2004): Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Reviews* 18: 115–136.

Müller M. C., Cortes J. E., Kim D.-W., Druker B. J., Erben P., Pasquini R., Branford S., Hughes T. P., Radich J. P., Ploughman L., Mukhopadhyay J. *et* Hochhaus A. (2009): Dasatinib treatment of chronic-phase chronic myeloid leukemia: analysis of responses according to preexisting *BCR-ABL* mutations. *Blood* 114: 4944–4953.

Nakao N., Yokota S., Iwai T., Kaneko H., Horiike S., Kashima K., Sonoda Y., Fujimoto T. *et* Misawa S. (1996): Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 10: 1911–1918.

O'Farrell A.-M., Abrams T. J., Yuen H. A., Ngai T. J., Louie S. G., Yee K. W. H., Wong L. M., Hong W., Lee L. B., Town A., Smolich B. D., Manning W. C., Murray L. J., Heinrich M. C. *et* Cherrington J. M. (2003): SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo. *Blood* 101: 3597–3605.

Othus M., Kantarjian H., Petersdorf S., Ravandi F., Godwin J., Cortes J., Pierce S., Erba H., Faderl S., Appelbaum F. R. *et* Estey E. (2014): Declining rates of treatment-related mortality in patients with newly diagnosed AML given 'intense' induction regimens: a report from SWOG and MD Anderson. *Leukemia* 28: 289–292.

Papaemmanuil E., Gerstung M., Bullinger L., Gaidzik V. I., Paschka P., Roberts N. D., Potter N. E., Heuser M., Thol F., Bolli N., Gundem G., Van Loo P., Martincorena I., Ganly P., Mudie L., McLaren S., O'Meara S., Raine K., Jones D. R., Teague J. W., Butler A. P., Greaves M. F., Ganser A., Döhner K., Schlenk R. F., Döhner H. *et* Campbell P. J. (2016): Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine* 374: 2209–2221.

Parcells B. W., Ikeda A. K., Simms-Waldrup T., Moore T. B. *et* Sakamoto K. M. (2006): FMS-like tyrosine kinase 3 in normal hematopoiesis and acute myeloid leukemia. *Stem Cells* 24: 1174–1184.

Patel J. P., Gönen M., Figueroa M. E., Fernandez H., Sun Z., Racevskis J., Van Vlierberghe P., Dolgalev I., Thomas S., Aminova O., Huberman K., Cheng J., Viale A., Socci N. D., Heguy A., Cherry A., Vance G., Higgins R. R., Ketterling R. P., Gallagher R. E., Litzow M., van den Brink M. R. M., Lazarus H. M., Rowe J. M., Luger S., Ferrando A., Paietta E., Tallman M. S., Melnick A., Abdel-Wahab O. *et* Levine R. L. (2012): Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine* 366: 1079–1089.

Patel A. B., Pomicter A. D., Yan D., Eiring A. M., Antelope O., Schumacher J. A., Kelley T. W., Tantravahi S. K., Kovacsovics T. J., Shami P. J., O'Hare T. *et* Deininger M. W. (2020): Dasatinib overcomes stroma-based resistance to the FLT3 inhibitor quizartinib using multiple mechanisms. *Leukemia* 34: 2981–2991.

Perl A. E., Martinelli G., Cortes J. E., Neubauer A., Berman E., Paolini S., Montesinos P., Baer M. R., Larson R. A., Ustun C., Fabbiano F., Erba H. P., Di Stasi A., Stuart R., Olin R., Kasner M., Ciceri F., Chou W.-C., Podoltsev N., Recher C., Yokoyama H., Hosono N., Yoon S.-S., Lee J.-H., Pardee T., Fathi A. T., Liu C., Hasabou N., Liu X., Bahceci E. *et* Levis M. J. (2019): Gilteritinib or chemotherapy for relapsed or refractory *FLT3*-mutated AML. *The New England Journal of Medicine* 381: 1728–1740.

Piloto O., Wright M., Brown P., Kim K.-T., Levis M. *et* Small D. (2007): Prolonged exposure to FLT3 inhibitors leads to resistance via activation of parallel signaling pathways. *Blood* 109: 1643–1652.

Polprasert Ch., Schulze I., Sekeres M. A., Makishima H., Przychodzen B., Hosono N., Singh J., Padgett R. A., Gu X., Phillips J. G., Clemente M., Parker Y., Lindner D., Dienes B., Jankowsky E., Saunthararajah Y., Du Y., Oakley K., Nguyen N., Mukherjee S., Pabst C., Godley L. A., Churpek J. E., Pollyea D. A., Krug U., Berdel W. E., Klein H.-U., Dugas M., Shiraishi Y., Chiba K., Tanaka H., Miyano S., Yoshida K., Ogawa S., Müller-Tidow C. *et* Maciejewski J. P. (2015): Inherited and somatic defects in *DDX41* in myeloid neoplasms. *Cancer Cell* 27: 658–670.

Quentmeier H., Reinhardt J., Zaborski M. *et* Drexler H. G. (2003): FLT3 mutations in acute myeloid leukemia cell lines. *Leukemia* 17: 120–124.

Ricci C., Scappini B., Divoky V., Gatto S., Onida F., Verstovsek S., Kantarjian H. M. *et* Beran M. (2002): Mutation in the ATP-binding pocket of the ABL kinase domain in an STI571-resistant BCR/ABL-positive cell line. *Cancer Research* 62: 5995–5998.

Robak T. *et* Wierzbowska A. (2009): Current and emerging therapies for acute myeloid leukemia. *Clinical Therapeutics* 31: 2349–2370.

Robinson L. J., Xue J. *et* Corey S. J. (2005): Src family tyrosine kinases are activated by Flt3 and are involved in the proliferative effects of leukemia-associated Flt3 mutations. *Experimental Hematology* 33: 469–479.

Roginskaya V., Zuo S., Caudell E., Nambudiri G., Kraker A. J. *et* Corey S. J. (1999): Therapeutic targeting of Src-kinase Lyn in myeloid leukemic cell growth. *Leukemia* 13: 855–861.

Röllig Ch., Serve H., Hüttmann A., Noppeney R., Müller-Tidow C., Krug U., Baldus C. D., Brandts Ch. H., Kunzmann V., Einsele H., Krämer A., Schäfer-Eckart K., Neubauer A., Burchert A., Giagounidis A., Krause S. W., Mackensen A., Aulitzky W., Herbst R., Hänel M., Kiani A., Frickhofen N., Kullmer J., Kaiser U., Link H., Geer T., Reichle A., Junghanß Ch., Repp R., Heits F., Dürk H., Hase J., Klut I.-M., Illmer T., Bornhäuser M., Schaich M., Parmentier S., Görner M., Thiede Ch., von Bonin M., Schetelig J., Kramer M., Berdel W. E. *et* Ehninger G. (2015): Addition of sorafenib versus placebo to standard therapy in patients aged 60 years or younger with newly diagnosed acute myeloid leukaemia (SORAML): a multicentre, phase 2, randomised controlled trial. *The Lancet Oncology* 16: 1691–1699.

Rosnet O., Matteï M. G., Marchetto S. *et* Birnbaum D. (1991): Isolation and chromosomal localization of a novel FMS-like tyrosine kinase gene. *Genomics* 9: 380–385.

Rosnet O., Schiff C., Pébusque M.-J., Marchetto S., Tonnelle C., Toiron Y., Birg F. *et* Birnbaum D. (1993): Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood* 82: 1110–1119.

Roussel X., Daguindau E., Berceanu A., Desbrosses Y., Warda W., da Rocha M. N., Trad R., Deconinck E., Deschamps M. *et* Ferrand Ch. (2020): Acute myeloid leukemia: from biology to clinical practices through development and pre-clinical therapeutics. *Frontiers in Oncology* 10: 599933.

Sato T., Yang X., Knapper S., White P., Smith B. D., Galkin S., Small D., Burnett A. *et* Levis M. (2011): FLT3 ligand impedes the efficacy of FLT3 inhibitors in vitro and in vivo. *Blood* 117: 3286–3293.

Serve H., Krug U., Wagner R., Sauerland M. C., Heinecke A., Brunnberg U., Schaich M., Ottmann O., Duyster J., Wandt H., Fischer T., Giagounidis A., Neubauer A., Reichle A., Aulitzky W., Noppeney R., Blau I., Kunzmann V., Stuhlmann R., Krämer A., Kreuzer K.-A., Brandts Ch., Steffen B., Thiede Ch., Müller-Tidow C., Ehninger G. *et* Berdel W. E. (2013): Sorafenib in combination with intensive chemotherapy in elderly patients with acute myeloid leukemia: results from a randomized, placebo-controlled trial. *Journal of Clinical Oncology* 31: 3110–3118.

Shah A., Andersson T. M.-L., Racht B., Björkholm M *et* Lambert P. C. (2013): Survival and cure of acute myeloid leukaemia in England, 1971–2006: a population-based study. *British Journal of Haematology* 162: 509–516.

Shephard E. A., Neal R. D., Rose P. W., Walter F. M. *et* Hamilton W. (2016): Symptoms of adult chronic and acute leukaemia before diagnosis: large primary care case-control studies using electronic records. *British Journal of General Practice* 66: e182–e188.

Schlenk R. F., Weber D., Fiedler W., Salih H. R., Wulf G., Salwender H., Schroeder T., Kindler T., Lübbert M., Wolf D., Westermann J., Kraemer D., Götze K. S., Horst H.-A., Krauter J., Girschikofsky M., Ringhoffer M., Südhoff T., Held G., Derigs H.-G., Schroers R., Greil R., Griebhammer M., Lange E., Burchardt A., Martens U., Hertenstein B., Marretta L., Heuser M., Thol F., Gaidzik V. I., Herr W., Krzykalla J., Benner A., Döhner K., Ganser A., Paschka P. *et* Döhner H. (2019): Midostaurin added to chemotherapy and continued single-agent maintenance therapy in acute myeloid leukemia with *FLT3*-ITD. *Blood* 133: 840–851.

Schnittger S., Schoch C., Dugas M., Kern W., Staib P., Wuchter Ch., Löffler H., Sauerland C. M., Serve H., Büchner T., Haferlach T. *et* Hiddemann W. (2002): Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to

cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* 100: 59–66.

Scholl C., Gilliland D. G. *et* Fröhling S. (2008): Deregulation of signaling pathways in acute myeloid leukemia. *Seminars in Oncology* 35: 336–345.

Scholl S., Fleischmann M., Schnetzke U. *et* Heidel F. H. (2020): Molecular mechanisms of resistance to FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: ongoing challenges and future treatments. *Cells* 9: 2493.

Smith M. L., Cavenagh J. D., Lister T. A. *et* Fitzgibbon J. (2004): Mutation of *CEBPA* in familial acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine* 351: 2403–2407.

Smith C. C., Wang Q., Chin Ch.-S., Salerno S., Damon L. E., Levis M. J., Perl A. E., Travers K. J., Wang S., Hunt J. P., Zarrinkar P. P., Schadt E. E., Kasarskis A., Kuriyan J. *et* Shah N. P. (2012): Validation of ITD mutations in FLT3 as a therapeutic target in human acute myeloid leukaemia. *Nature* 485: 260–263.

Song W.-J., Sullivan M. G., Legare R. D., Hutchings S., Tan X., Kufrin D., Ratajczak J., Resende I. C., Haworth C., Hock R., Loh M., Felix C., Roy D.-C., Busque L., Kurnit D., Willman Ch., Gewirtz A. M., Speck N. A., Bushweller J. H., Li F. P., Gardiner K., Poncz M., Maris J. M. *et* Gilliland D. G. (1999): Haploinsufficiency of *CBFA2* causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nature Genetics* 23: 166–175.

Stein E. M. *et* Tallman M. S. (2016): Emerging therapeutic drugs for AML. *Blood* 127: 71–78.

Stirewalt D. L. *et* Radich J. P. (2003): The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nature Reviews Cancer* 3: 650–665.

Stone R. M., Mandrekar S. J., Sanford B. L., Laumann K., Geyer S., Bloomfield C. D., Thiede C., Prior T. W., Döhner K., Marcucci G., Lo-Coco F., Klisovic R. B., Wei A.,

Sierra J., Sanz M. A., Brandwein J. M., de Witte T., Niederwieser D., Appelbaum F. R., Medeiros B. C., Tallman M. S., Krauter J., Schlenk R. F., Ganser A., Serve H., Ehninger G., Amadori S., Larson R. A. *et* Döhner H. (2017): Midostaurin plus chemotherapy for acute myeloid leukemia with a *FLT3* mutation. *The New England Journal of Medicine* 377: 454–464.

Šálek C. (2012): Diagnostika a léčba akutních leukemií. *Interní medicína pro praxi* 14: 366–372.

Tzogani K., Røshol H., Olsen H. H., Aas I. B., Dalhus M. L., Håkonsen G. D., Nilssen L. S., Lindberg V., Økvist M., Bolstad B., Rogovska I., Karpova N., Enzmann H., Gisselbrecht Ch. *et* Pignatti F. (2020): The European Medicines Agency review of gilteritinib (Xospata) for the treatment of adult patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia with an *FLT3* mutation. *The Oncologist* 25: e1070–e1076.

Voisset E., Brenet F., Lopez S. *et* de Sepulveda P. (2020): SRC-family kinases in acute myeloid leukaemia and mastocytosis. *Cancers* 12: 1996.

Vosberg S. *et* Greif P. A. (2019): Clonal evolution of acute myeloid leukemia from diagnosis to relapse. *Genes, Chromosomes and Cancer* 58: 839–849.

Walter M. J., Payton J. E., Ries R. E., Shannon W. D., Deshmukh H., Zhao Y., Baty J., Heath S., Westervelt P., Watson M. A., Tomasson M. H., Nagarajan R., O’Gara B., Bloomfield, C. D., Mrózek K., Selzer R. R., Richmond T. A., Kitzman J., Geoghegan J., Eis P. S., Maupin R., Fulton R. S., McLellan M., Wilson R. K., Mardis E. R., Link D. C., Graubert T. A., DiPersio J. F. *et* Ley T. J (2009): Acquired copy number alterations in adult acute myeloid leukemia genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 12950–12955.

Wang E. S., Tallman M. S., Stone R. M., Walter R. B., Karanes Ch., Jain V. *et* Collins R. H. (2017): Low relapse rate in younger patients ≤ 60 years old with newly diagnosed *FLT3*-mutated acute myeloid leukemia (AML) treated with crenolanib and cytarabine/anthracycline chemotherapy. *Blood* 130: 566.

Wei A. H., Döhner H., Pocock C., Montesinos P., Afanasyev B., Dombret H., Ravandi F., Sayar H., Jang J.-H., Porkka K., Selleslag D., Sandhu I., Turgut M., Giai V., Ofran Y., Çakar M. K., de Sousa A. B., Rybka J., Frairia C., Borin L., Beltrami G., Čermák J., Ossenkoppele G. J., La Torre I., Skikne B., Kumar K., Dong Q., Beach C. L. *et* Roboz G. J. (2020): Oral azacitidine maintenance therapy for acute myeloid leukemia in first remission. *The New England Journal of Medicine* 383: 2526–2537.

Weinberg O. K., Sohani A. R., Bhargava P *et* Nardi V. (2017): Diagnostic work-up of acute myeloid leukemia. *American Journal of Hematology* 92: 317–321.

Weisberg E., Roesel J., Furet P., Bold G., Imbach P., Flörsheimer A., Caravatti G., Jiang J., Manley P., Ray A. *et* Griffin J. D. (2010): Antileukemic effects of novel first- and second-generation FLT3 inhibitors: structure-affinity comparison. *Genes & Cancer* 1: 1021–1032.

Welch J. S., Ley T. J., Link D. C., Miller Ch. A., Larson D. E., Koboldt D. C., Wartman L. D., Lamprecht T. L., Liu F., Xia J., Kandoth C., Fulton R. S., McLellan M. D., Dooling D. J., Wallis J. W., Chen K., Harris Ch. C., Schmidt H. K., Kalicki-Veizer J. M., Lu Ch., Zhang Q., Lin L., O’Laughlin M. D., McMichael J. F., Delehaunty K. D., Fulton L. A., Magrini V. J., McGrath S. D., Demeter R. T., Vickery T. L., Hundal J., Cook L. L., Swift G. W., Reed J. P., Alldredge P. A., Wylie T. D., Walker J. R., Watson M. A., Heath S. E., Shannon W. D., Varghese N., Nagarajan R., Payton J. E., Baty J. D., Kulkarni S., Klco J. M., Tomasson M. H., Westervelt P., Walter M. J., Graubert T. A., DiPersio J. F., Ding L., Mardis E. R. *et* Wilson R. K. (2012): The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell* 150: 264–278.

Xuan L., Wang Y., Huang F., Fan Z., Xu Y., Sun J., Xu N., Deng L., Li X., Liang X., Luo X., Shi P., Liu H., Wang Z., Jiang L., Yu Ch., Zhou X., Lin R., Chen Y., Tu S., Huang X. *et* Liu Q. (2020): Sorafenib maintenance in patients with *FLT3*-ITD acute myeloid leukaemia undergoing allogeneic haematopoietic stem-cell transplantation: an open-label, multicentre, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 21: 1201–1212.

Yamamoto Y., Kiyoi H., Nakano Y., Suzuki R., Kodera Y., Miyawaki S., Asou N., Kuriyama K., Yagasaki F., Shimazaki Ch., Akiyama H., Saito K., Nishimura M., Motoji

T., Shinagawa K., Takeshita A., Saito H., Ueda R., Ohno R. *et* Naoe T. (2001): Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 97: 2434–2439.

Yang X., Sexauer A. *et* Levis M. (2014): Bone marrow stroma-mediated resistance to FLT3 inhibitors in FLT3-ITD AML is mediated by persistent activation of extracellular regulated kinase. *British Journal of Haematology* 164: 61–72.

Yee K. W. H., Schnittenheim M., O’Farrell A.-M., Town A. R., McGreevey L., Bainbridge T., Cherrington J. M. *et* Heinrich M. C. (2004): Synergistic effect of SU11248 with cytarabine or daunorubicin on FLT3 ITD–positive leukemic cells. *Blood* 104: 4202–4209.

Yu J., Jiang P. Y. Z., Sun H., Zhang X., Jiang Z., Li Y. *et* Song Y. (2020): Advances in targeted therapy for acute myeloid leukemia. *Biomarker Research* 8: 17.

Zeidan A. M., Podoltsev N. A., Wang X., Zhang Ch., Bewersdorf J. P., Shallis R. M., Huntington S. F., Neparidze N., Giri S., Gore S. D., Davidoff A. J., Ma X. *et* Wang R. (2020): Patterns of care and clinical outcomes with cytarabine-anthracycline induction chemotherapy for AML patients in the United States. *Blood Advances* 4: 1615–1623.

Zhang S., Fukuda S., Lee Y., Hangoc G., Cooper S., Spolski R., Leonard W. J. *et* Broxmeyer H. E. (2000): Essential role of signal transducer and activator of transcription (Stat)5a but not Stat5b for Flt3-dependent signaling. *The Journal of Experimental Medicine* 192: 719–728.

Zheng R., Friedman A. D. *et* Small D. (2002): Targeted inhibition of FLT3 overcomes the block to myeloid differentiation in 32Dcl3 cells caused by expression of FLT3/ITD mutations. *Blood* 100: 4154–4161.