

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



Modulace signální dráhy BTK

novými nízkomolekulárními inhibitory

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

| | |
|-------------------------|-------------------------------|
| Autor: | Michaela Gapčová |
| Studijní program: | B1501 Experimentální biologie |
| Studijní obor: | Experimentální biologie |
| Forma studia: | Prezenční |
| Vedoucí práce: | Mgr. Hana Dostálová |
| Termín odevzdání práce: | 2022 |

Bibliografická identifikace

| | |
|-------------------------|--|
| Jméno a příjmení autora | Míchaela Gapčová |
| Název práce | Modulace signální dráhy BTK novými nízkomolekulárními inhibitory |
| Typ práce | Bakalářská |
| Pracoviště | Laboratoř růstových regulátorů |
| Vedoucí práce | Mgr. Hana Dostálová |
| Rok obhajoby práce | 2022 |

Abstrakt

Brutonova tyrozinkináza (BTK) je nереceptorová kináza, hrající významnou roli v signalizaci B-lymfocytů, u kterých je podmínkou proliferace a přežití buněk. Inhibice BTK tak vede k přerušení buněčných signálních drah, které souvisí s rozvojem B-buněčných malignit a autoimunitních onemocnění.

Inhibitory BTK jsou malé molekuly cílící na tuto kinázu, a v posledních letech se staly předmětem studia protinádorové léčby. Mezi schválené inhibitory BTK pro klinické použití patří ibrutinib, acalabrutinib a zanubrutinib.

Teoretická část bakalářské práce se zabývá popisem BTK, signálními dráhami B-lymfocytů a také BTK inhibitory používanými v klinických studiích. V praktické části je pozornost věnována novým nízkomolekulárním inhibitorům a jejich účinkům na proliferaci nádorových buněk, fosforylaci proteinů klíčových pro signalizaci BTK a buněčný cyklus.

| | |
|---------------|--|
| Klíčová slova | BTK signalizace, maligní B-lymfocyty, BTK inhibitory |
| Počet stran | 55 |
| Počet příloh | 0 |
| Jazyk | Český |

Bibliographical identification

| | |
|---------------------------------|--|
| Author's first name and surname | Michaela Gapčová |
| Title of thesis | Modulation of BTK signaling pathway by novel small-molecule inhibitors |
| Type of thesis | Bachelor |
| Department | Laboratory of Growth Regulators |
| Supervisor | Mgr. Hana Dostálová |
| The year of presentation | 2022 |

Abstract

Bruton's tyrosine kinase (BTK) is a non-receptor kinase that plays a crucial role in B-cell signaling, which is critical for cell proliferation and survival. Thus, inhibition of BTK leads to interruption of cellular signaling pathways, associated with the development of B-cell malignancies and autoimmune diseases.

BTK inhibitors are small molecules targeting this kinase and have become a novel target of anticancer therapy in recent years. For clinical use, ibrutinib, acalabrutinib, and zanubrutinib are approved.

The theoretical part of this work deals with the description of BTK, signaling pathways of B-lymphocytes as well as BTK inhibitors both approved and used in clinical trials. In the practical part, attention is paid to new low-molecular inhibitors and their effects on tumor cell proliferation, phosphorylation of key proteins for BTK signaling, and cell cycle.

| | |
|----------------------|--|
| Keywords | BTK signaling, malignant B-lymphocytes, BTK inhibitors |
| Number of pages | 55 |
| Number of appendices | 0 |
| Language | Czech |

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod odborným vedením Mgr. Hany Dostálové, za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 20. 5. 2022

.....

„Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí Mgr. Haně Dostálové za odborné vedení práce, věcné připomínky a především trpělivost. Ráda bych také poděkovala celému kolektivu Katedry experimentální biologie za pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí.“

OBSAH

| | |
|--|----|
| Seznam použitých zkratk..... | 8 |
| 1 Úvod a cíle práce..... | 10 |
| 2 Současný stav řešené problematiky | 11 |
| 2.1 Brutonova tyrozinkináza | 11 |
| 2.2 Struktura BTK..... | 11 |
| 2.3 Aktivace BTK a její zapojení v signalizaci B-buněčného receptoru | 12 |
| 2.3.1 Regulace BTK signalizace | 15 |
| 2.4 Další signální dráhy BTK..... | 16 |
| 2.5 Klinický význam signalizace BTK | 17 |
| 2.5.1 Chronická lymfocytární leukemie..... | 17 |
| 2.5.2 Lymfom z plášťových buněk | 17 |
| 2.5.3 Waldenströmova makroglobulinémie | 18 |
| 2.5.4 Lymfom z marginální zóny | 18 |
| 2.5.5 Další onemocnění | 19 |
| 2.6 BTK jako terapeutický cíl | 20 |
| 2.6.1 Schválené BTK inhibitory..... | 20 |
| 2.6.2 Další BTK inhibitory v klinických studiích..... | 23 |
| 3 Experimentální část..... | 26 |
| 3.1 Materiál | 26 |
| 3.1.1 Použité chemikálie | 26 |
| 3.1.2 Roztoky | 27 |
| 3.1.3 Kultivační média | 28 |
| 3.1.4 Použité protilátky | 29 |
| 3.1.5 Testované inhibitory..... | 30 |
| 3.1.6 Buněčné kultury | 30 |
| 3.1.7 Přístrojové vybavení..... | 30 |
| 3.1.8 Programy | 32 |
| 3.2 Metody | 32 |
| 3.2.1 Buněčné kultury | 32 |
| 3.2.2 Ovlivnění a sklizení buněk..... | 32 |
| 3.2.3 Lyzace buněk | 33 |
| 3.2.4 SDS-PAGE, western blotting a imunodetekce | 34 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.2.5 | Analýza buněčného cyklu průtokovým cytometrem | 35 |
| 3.2.6 | Analýza cytotoxicity | 36 |
| 4 | Výsledky a diskuze | 37 |
| 4.1 | Analýza cytotoxicity | 38 |
| 4.2 | Imunodetekce proteinů zapojených v signální dráze BTK | 39 |
| 4.3 | Analýza buněčného cyklu | 44 |
| 5 | Závěr | 46 |
| 6 | Použitá literatura | 48 |

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|----------------|--|
| ABC | activated B-cell like |
| ALL | acute lymphatic leukemia |
| BCR | B-cell receptor |
| BLNK | B-cell linker protein |
| BTK | Bruton's tyrosine kinase |
| CLL | chronic lymphocytic leukemia |
| CSU | chronic spontaneous urticaria |
| DAG | 1,2-diacylglycerol |
| DLBCL | diffuse large B cell lymphoma |
| ERK | extracellular signal regulated kinase |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FL | follicular lymphoma |
| FOXO | forkhead transcription factors |
| GCB | germinal centre B-cell like |
| IKK | I kappa B kinase |
| IP3 | inositol 1,4,5-trisphosphate |
| IRAK-1 | interleukin 1 receptor-associated kinase |
| ITAM | immunoreceptor tyrosine-based activation motif |
| JNK | c-Jun amino-terminal kinase |
| Mal | MyD88 adaptor-like protein |
| MALT | mucosa associated lymphoid tissue |
| MAPK | mitogen-activated protein kinase |
| MCL | mantle cell lymphoma |
| MM | multiple myeloma |
| MS | multiple sclerosis |
| MyD88 | myeloid differentiation factor 88 |
| MZL | marginal zone lymphoma |
| NF- κ B | nuclear factor kappa B |
| NFAT | nuclear factor of activated T cells |
| NHL | non-Hodgkin's lymphoma |
| NMZL | nodal marginal zone lymphoma |

| | |
|----------------|---|
| PCNSL | primary central nervous system lymphoma |
| PDK1 | 3-phosphoinositide-dependent kinase 1 |
| PI3K | phosphatidylinositol-3-kinase |
| PIP2 | phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate |
| PIP3 | phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate |
| PKC | protein kinase C |
| PLC γ 2 | phospholipase C γ 2 |
| RA | rheumatoid arthritis |
| SHIP1 | SH2-domain-containing inositol 5'-phosphatase-1 |
| SLE | systemic lupus erythematosus |
| SMZL | splenic marginal zone lymphoma |
| SS | Sjögren's syndrome |
| TIR | Toll/interleukin-1 receptor |
| TLR | Toll-like receptor |
| WM | Waldenström's macroglobulinemia |
| XLA | X-linked agammaglobulinemia |

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Brutonova tyrozinkináza (BTK) je kináza patřící do rodiny Tec kináz a představuje nezbytnou součást signální dráhy B-buněčného receptoru. BTK má zásadní roli pro vývoj, zrání a diferenciaci nezralých B-lymfocytů, ale také pro jejich samotné přežití. Mutace vedoucí ke ztrátě funkce BTK mají za následek vznik onemocnění X-vázaná agamaglobulinémie (XLA). Naopak nadměrná exprese a aktivita kinázy BTK bývá spojována s vývojem B-buněčných malignit, a právě proto je důležitým terapeutickým cílem.

V posledních 10 letech byla provedena celá řada preklinických studií zaměřených na inhibici BTK. Prvním schváleným inhibitorem k léčbě lymfomu z plášťových buněk se stal v roce 2013 ibrutinib. Následně byly schváleny inhibitory druhé generace acalabrutinib a zanubrutinib, s vyšší aktivitou a selektivitou. Předmětem současného výzkumu je získání nových BTK inhibitorů s mírnějšími vedlejšími účinky a lepší léčebnou účinností.

V rámci teoretické části bakalářské práce byla charakterizována Brutonova tyrozinkináza, popsána její struktura a zapojení v signalizaci B-buněčného receptoru. Dále bylo cílem zpracovat literární rešerši se zaměřením na popis signalizační dráhy BTK a její možné ovlivnění nízkomolekulárními inhibitory včetně schválených léčiv.

Cílem experimentální části bylo charakterizovat účinky těchto nízkomolekulárních potenciálních inhibitorů se zaměřením na jejich možnou buněčnou cytotoxicitu v nádorových buněčných liniích, interakci se signální dráhou BTK a vliv na buněčný cyklus.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Brutonova tyrozinkináza

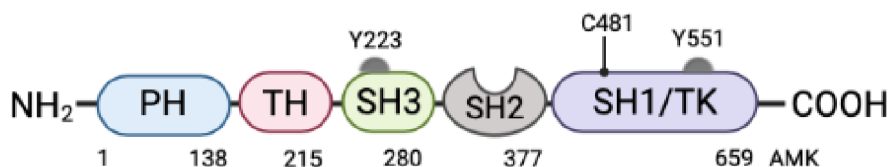
Brutonova tyrozinkináza (BTK) je nereceptorová kináza, která hraje důležitou roli v signalizaci B-lymfocytů, a spolu s dalšími čtyřmi kinázami patří do rodiny Tec kináz. V roce 1993 bylo zjištěno, že mutace BTK jsou u lidí příčinou dědičného onemocnění X-vázané agamaglobulinémie (XLA), která je charakterizovaná nedostatkem periferních B-lymfocytů a nízkou hladinou sérových protilátek (Satterthwaite et al., 1997).

Kináza BTK je exprimována ve většině buněčných linií hematopoetického systému, kromě T-lymfocytů. Nejdůležitější je však pro B-lymfocyty, u kterých je podmínkou proliferace a přežití buněk. Pokud B-lymfocyty BTK neprodukují, nedozrávají, a může u nich nastat předčasná smrt. Na základě těchto poznatků se BTK brzy stala zajímavým terapeutickým cílem u autoimunitních onemocnění. Z rodiny Tec kináz se jedná o jedinou kinázu, která je spojována s lidským onemocněním (Thomas et al., 1993).

Tento protein je převážně lokalizován v cytoplazmě, avšak prostřednictvím interakce jedné z jeho domén s fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfátem (PIP3) může docházet k translokaci proteinu z cytoplazmy do membrány v rámci zapojení do signalizačních drah (Saito et al., 2001).

2.2 Struktura BTK

BTK je protein složený z 659 aminokyselin, které jsou dále rozděleny do pěti domén (Obrázek 1): PH doména (pleckstrin homology), TH doména (Tec homology), SH3 doména (Src homology), SH2 doména a tyrozinkinázová doména (Ponader et al. 2014).



Obr. 1: Schéma struktury Brutonovy tyrozinkinázy včetně rozložení domén (převzato a upraveno z Hendriks et al., 2014).

PH doména se nachází na N-terminálním konci a zprostředkovává vazbu s lipidy z buněčných membrán (PIP3), nebo s proteiny. Mutace v této doméně může způsobit přerušení vazby na membránu či zamezit signalizaci prostřednictvím BTK (Jiang et al., 2015).

Následující doména TH je složená ze dvou oblastí bohatých na prolin. Tato doména obsahuje Zn^{2+} vazebnou oblast, do které se váží zinečnaté ionty nepostradatelné pro správnou enzymatickou aktivitu a stabilitu proteinu (Mohamed et al., 2009).

Doména SH3 navazuje na TH doménu a skládá se přibližně z 60 aminokyselin. Obsahuje pět až osm β -řetězců, které jsou uspořádány do dvou antiparalelních β -listů. Doména je důležitá při rozpoznávání substrátu, či regulaci kinázové aktivity, a váže sekvence bohaté na prolin (Noble et al., 1993). Regulace BTK je zprostředkována fosforylací dvou tyrozinových zbytků, přičemž jeden z nich se nachází v SH3 doméně. Jedná se o tyrozin v pozici Y223, který se účastní aktivace kináz zapojených v interakci signální dráhy (Marcotte et al., 2010).

Další doménou v pořadí je SH2 doména, která zprostředkovává vazbu s tyrozin-fosforylovanými peptidy na jiných molekulách. Tato doména interaguje s B-buněčným adaptorovým proteinem (BLNK), což vede k aktivaci fosfolipázy C- γ , která je důležitá k fosforylaci a aktivaci BTK proteinu (Tzeng et al., 2000).

Na C-terminálním konci proteinu je katalytická tyrozinkinázová doména (TK doména), která bývá také označována za SH1 doménu. Tato doména obsahuje tyrozin v pozici Y551, který je zodpovědný za počáteční aktivaci BTK. Při aktivaci BTK dochází nejdříve k fosforylaci tyrozinu v pozici Y551, která je následována autofosforylací tyrozinu v pozici Y223 (Hansson et al., 2001). V tyrozinkinázové doméně se navíc nachází cysteinové reziduum C481, které představuje cíl látek, BTK inhibitorů, kovalentně interagujících s enzymem (Brullo et al., 2021).

2.3 Aktivace BTK a její zapojení v signalizaci B-buněčného receptoru

Kináza BTK hraje primární roli v signalizaci B-lymfocytů zprostředkované receptorem B-lymfocytů (BCR). BTK je aktivována kinázami rodiny SRC a v rámci dráhy sama katalyzuje přenos signálů esenciálních pro přežití a diferenciaci buňky. BTK se přirozeně vyskytuje v cytoplazmě, v procesu aktivace je však navázána k membráně prostřednictvím své PH domény, která interaguje s molekulou PIP3. Pro kinázovou aktivitu BTK je zapotřebí již popsaná duální fosforylace: první aktivační na reziduu

Y551, klíčová pro vlastní katalytickou aktivitu enzymu, následovaná autofosforylací na Y223. Druhou fosforylací dochází ke stabilizaci konformace enzymu a k její plné aktivaci. Takto aktivovaná kináza může být zapojena v přenosu signálu v signalizační kaskádě BCR, klíčové dráze B-lymfocytů (Marcotte et al., 2010; Hendriks et al., 2014).

Na počátku této kaskády stojí receptor BCR, sloužící k rozpoznání a následnému navázání antigenu na jeho povrch. BCR spolu s dalšími proteiny tvoří komplex, který se skládá ze dvou těžkých a dvou lehkých imunoglobulinových řetězců a asociovaných signalizačních molekul $Ig\alpha$ a $Ig\beta$. Tyto heterodimery obsahují imunoreceptorové tyrozinové aktivační motivy (ITAM), které zajišťují kinázovou aktivitu receptoru BCR (Singh et al., 2018).

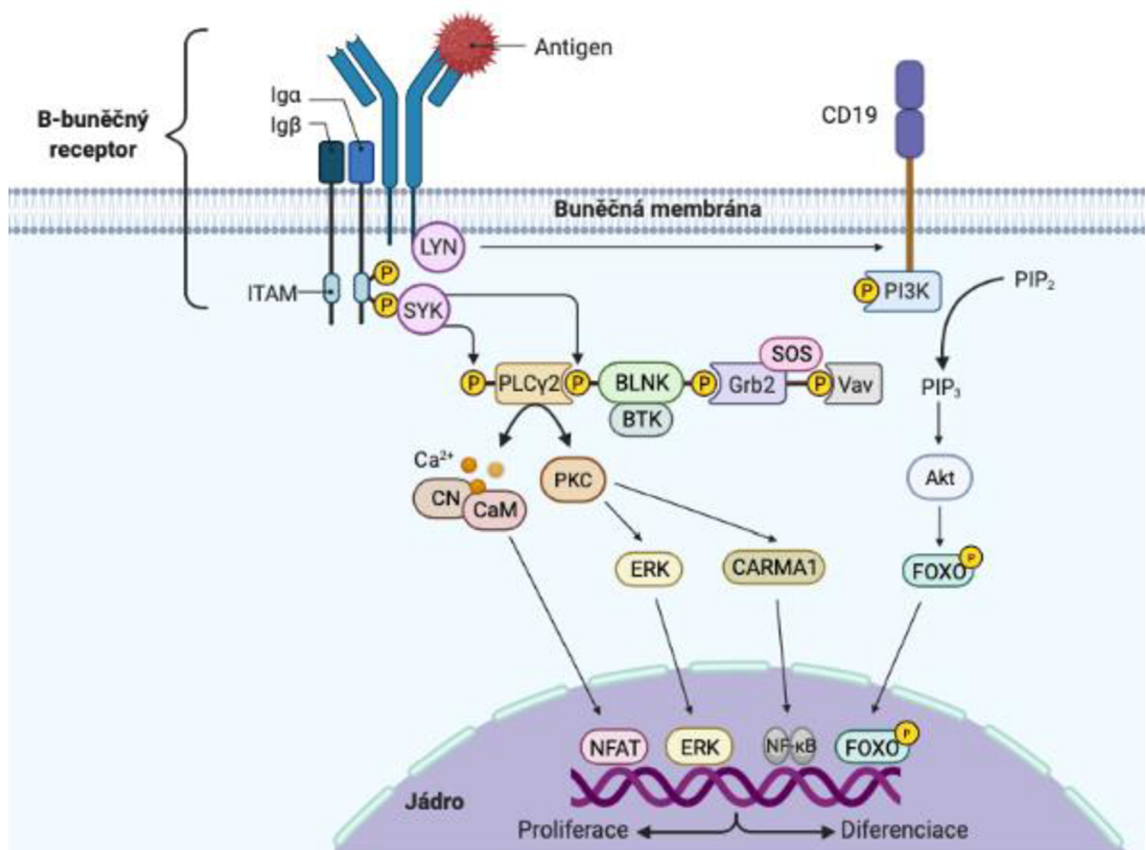
Signalizace je zahájena navázáním antigenu na extracelulární doménu BCR, což způsobí tvorbu shluků (clusterů) a spuštění signální kaskády (Liu et al., 2010). Vazba antigenu vede k fosforylaci tyrozinů domény ITAM, která je zprostředkována enzymy ze SRC-rodiny tyrozinkináz, nejčastěji enzymem LYN. Následně je aktivována slezinná tyrozinkináza SYK vazbou na fosforylovaný ITAM. V další části signální dráhy enzym SYK fosforyluje adaptorovou molekulu BLNK, která funguje jako tzv. molekulární lešení a zajišťuje propojení signálu receptoru v membráně B-lymfocytů s podřízenou BTK a dalšími kinázami (Hendriks et al., 2014).

Kromě BTK vyvazuje z cytozolu protein BLNK fosfolipázu $C\gamma 2$ ($PLC\gamma 2$). Ta je souhrou katalytických aktivit kináz SYK a BTK fosforylována a aktivována. $PLC\gamma 2$ svou enzymatickou činností vytváří dva typy druhých posílů: hydrolyzuje fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfát (PIP₂) za vzniku inozitol-1,4,5-trisfosfátu (IP₃) a 1,2-diacylglycerolu (DAG). IP₃ zprostředkovává uvolňování Ca^{2+} z endoplazmatického retikula do buňky, kde jsou zapotřebí k přenosu signálu vedoucímu k aktivaci potřebných transkripčních faktorů. Molekuly DAG potom usnadňují aktivaci izoenzymu proteinkinázy C (PKC), který aktivuje několik mitogenem aktivovaných kináz (MAPK) (Petro et al., 2001). Rodina MAPK se skládá z kinázy regulované extracelulárním signálem (ERK), c-JunN-koncové kinázy (JNK) a p38 MAP kinázy (Krens et al., 2006). Navíc PKC fosforyluje CARMA1, což způsobí aktivaci I kappa B kinázy (IKK) s následnou aktivací nukleárního faktoru kappa B (NF- κ B) (Pontoriero et al., 2019).

Zároveň s aktivací receptoru BCR jsou kinázou LYN také fosforylována tyrozinová rezidua nacházející se na cytoplazmatickém konci koreceptoru CD19 v membráně B-lymfocytů. To umožňuje vazbu fosfatidylinozitol-3-kinázy (PI3K) ke koreceptoru a aktivaci této kinázy. PI3K fosforyluje PIP₂ za vzniku PIP₃, druhého

posla, který zprostředkovává přenos signálu v následujících drahách a interaguje s PH doménou BTK v rámci její aktivace navázáním na plazmatickou membránu. Stejným způsobem je zajištěna i aktivace serin/threoninové kinázy AKT. Tato kináza je v membráně fosforylována 3-fosfoinozimid dependentní kinázou 1 (PDK1), a plně aktivovaná se vrací do cytoplazmy (Inabe et al., 2002). AKT se účastní přenosů anti-apoptických signálů, zprostředkovává například fosforylaci transkripčních faktorů FOXO a je zodpovědný za jejich přesun do jádra (Limon et al., 2012).

Konečným výsledkem signalizace BTK (schématicky shrnuto v Obrázku 2) je tedy aktivace drah NF- κ B, MAPK, PI3K, nukleárního faktoru aktivovaných T-buněk (NFAT) a dalších, které podporují proliferaci a přežití buněk (Young et al., 2013). Po přenosu signálu se v jádře aktivují transkripční faktory, které indukují transkripci a diferenciaci buněk (Yu et al., 2008).



Obr. 2: Signální dráha B-buněčného receptoru po navázání ligandu, znázornění klíčových molekul zapojených do přenosu signálu vedoucího k vývoji a růstu B-buněk (převzato a upraveno z Wang et al., 2020).

2.3.1 Regulace BTK signalizace

Kontrola aktivity BTK je důležitá pro homeostázu B-lymfocytů, a doposud bylo identifikováno několik mechanismů regulace signalizace BTK. Přemístění BTK do plazmatické membrány a její následná aktivace je regulována některými fosfatázami, které se mohou do membrány dostávat podobným způsobem jako BTK. V případě aberantní regulace může docházet ke vzniku abnormalit buňky, jež jsou častou příčinou různých onemocnění (Singh et al., 2018).

Většina identifikovaných regulátorů se řadí mezi negativní regulátory. Může se jednat o cytoplazmatické fosfatázy či transmembránové adaptory, které tlumí signalizaci. Jedním z prvních popsaných negativních regulátorů BTK byla kináza PKC (Mohamed et al., 2009). Dalším příkladem je kináza LYN, která zaujímá v mechanismu regulace BTK dvojí roli. Jakožto aktivátor fosforyluje heterodimery $Ig\alpha$ a $Ig\beta$ B-buněčného receptoru. Tato fosforylace vede k dalším aktivačním fosforylacím včetně kinázy BTK a přenosu signálu v rámci celé dráhy. Naopak ve funkci negativního regulátoru fosforyluje enzym LYN receptory $Fc\gamma RIIB$ a $CD22$. $Fc\gamma RIIB$ obsahuje tyrozinový imunoreceptor s inhibujícím motivem (ITIM), který po fosforylaci přitahuje inozitol 5-fosfatázu 1 obsahující SH doménu (SHIP1). Tato fosfatáza je aktivována navázáním na receptor $Fc\gamma RIIB$ a katalyzuje defosforylaci $PIP3$ na $PIP2$, což vede k inhibici BTK a $PLC\gamma 2$ (Singh et al., 2018). Oba druhy PIP ovlivňují hladinu aktivity AKT, a dále také regulují přežití a diferenciaci buněk. (Hazen et al., 2009).

Pomocí kinázy LYN je podobně fosforylována oblast ITIM v cytoplazmatické doméně $CD22$. Inhibiční receptor $CD22$ následně umožní aktivaci fosfatázy SHP-1, která tlumí BTK signalizaci (Nishizumi et al., 1998). SHP-1 zprostředkovává defosforylaci LYN, SYK a BTK, což vede ke snížení jejich kinázové aktivity a potlačení BTK signalizace (Phadnis-Moghe et al., 2016).

2.4 Další signální dráhy BTK

BTK je zapojena do mnoha dalších signálních drah v B-lymfocytech. Bylo prokázáno, že protinádorová aktivita BTK inhibitorů může být z velké části závislá na jejich úloze mimo signalizaci BCR, například v chemokinové nebo TLR (Toll-like receptor) signalizaci (Corneth et al., 2015).

Zapojení BTK kinázy do buněčné signalizace můžeme pozorovat například u chemokinových receptorů. Exprese těchto receptorů spřažených s G-proteiny je u různých typů buněk velmi variabilní (Murdoch et al., 2000). S B-lymfocyty jsou spojovány receptory CXCR4 a CXCR5, které zajišťují jejich migraci do lymfatických folikulů (Okada et al., 2002). Bylo potvrzeno, že podjednotky $G\alpha$ a $G\beta\gamma$ receptorů interagují s BTK a ovlivňují její aktivitu, dochází tak k provázání signálních drah B-buněk (Bence et al., 1997; Singh et al., 2018).

Další dráhou, ve které hraje roli BTK, je signalizace Toll-like receptorů. Tyto glykoproteiny jsou exprimovány na povrchu myeloidních nebo B-buněk, a jsou schopny rozpoznávat molekuly odvozené od virů či bakterií (Singh et al., 2018).

Bylo prokázáno, že se BTK podílí na aktivaci NF- κ B prostřednictvím TLR4. Navíc BTK interaguje s klíčovými proteiny signalizace TLR, mezi které patří MyD88, adaptorový protein MyD88 (Mal), kináza asociovaná s receptorem pro interleukin 1 (IRAK-1) a TIR (Taneichi et al., 2008; Rip et al., 2019).

Se signalizací BTK jsou v neposlední řadě spojeny Fc receptory, glykoproteiny vážící Fc části imunoglobulinů. Po navázání antigenu a aktivaci Fc receptoru dochází k přenosu signálu zapojením kinázy SYK, která aktivuje další signální molekuly, jako jsou například multimolekulární adaptorové komplexy či PI3K. Následná produkce molekuly druhého posla PIP3 umožní navázání BTK a PLC γ , což vede k aktivaci podřízených členů dráhy a uvolnění vápníku z endoplazmatického retikula (Nimmerjahn et al., 2008).

Mezi BCR, chemokinovou signalizací a dalšími dráhami buněčné adheze dochází k vzájemnému propojení. Proto v případě BCR inhibitorů dochází nejen k inhibici samotné BCR dráhy, ale také k inhibici všech dalších signalizací (Ondrisova et al., 2020).

2.5 Klinický význam signalizace BTK

Na základě fenotypu X-vázané agamaglobulinemie bylo zjištěno, že B-lymfocyty patří mezi nejnáchylnější typ buněk vůči aktivitě BTK. Pacienti XLA s mutací BTK jsou deficientní v periferních B-lymfocytech a imunoglobulinech. Tato manifestace pomohla odhalit roli BTK ve vývoji bílých krvinek a potvrdila u XLA pacientů útlum jejich vývinu ve fázi pre-B-lymfocytů (Singh et al., 2018). Klíčovou roli BTK v B-lymfocytech demonstrují jak v patologiích pozorované defekty enzymu, tak *in vivo* experimenty (Satterthwaite et al., 1997; Davis et al., 2010). Díky svému zapojení do proliferace je BCR signalozom a konkrétně kináza BTK atraktivním cílem v léčbě B-buněčných malignit a autoimunitních chorob (de Rooij et al., 2012).

Inhibitory kináz zapojených v signalizaci B-lymfocytárního receptoru mají klinický význam u B-buněčných malignit. V praxi jsou BTK inhibitory indikovány a schváleny v léčbě chronické lymfocytární leukemie (CLL), lymfomu z pláštěových buněk (MCL), lymfomu z marginální zóny (MZL) a Waldenströmovy makroglobulinémie (WM) (Tam et al., 2019).

2.5.1 Chronická lymfocytární leukemie

Chronická lymfocytární leukemie (CLL) je nejčastější typ leukemie západních zemí, postihující především starší osoby. CLL je charakterizována nahromaděním zralých B-lymfocytů v kostní dřeni, periferní krvi a lymfatických orgánech. U tohoto typu onemocnění jsou nádorové buňky klonální a exprimují nízké hladiny povrchového B-buněčného receptoru. Navíc dochází k přeuspořádání genů pro těžký řetězec imunoglobulinů IgHV (Damm et al., 2014).

Signalizace BCR u buněk CLL probíhá konstitutivně, avšak odezva BCR na ligaci antigenu je velmi variabilní. K léčbě CLL jsou v poslední době využívány inhibitory signální dráhy BCR, především ibrutinib (Woyach et al., 2014).

2.5.2 Lymfom z pláštěových buněk

Lymfom z pláštěových buněk (MCL) je lymfoproliferativní onemocnění, které vzniká patofyziologií B-lymfocytů pláště lymfatických folikulů. Zralé B-lymfocyty se rychle šíří krví, kostní dřeni a lymfatickými orgány. Nádorové buňky nesou typickou translokaci t(11;14)(q13,q32), jejíž výsledkem je nadměrná produkce cyklinu D1. Ke vzniku maligního nádoru jsou však nutné i další patologické události (Navarro et al., 2020).

MCL se vyznačuje špatnou celkovou odpovědí, v důsledku rychlého relapsu po počáteční léčbě. Medián přežití tohoto onemocnění činí 5 let (Bernard et al., 2015).

Přestože se léčebné výsledky u pacientů s MCL v posledních letech zlepšily díky kombinaci imunochemoterapie a intenzivních režimů, u většiny pacientů se stále jedná o nevléčitelné onemocnění. Přibývající znalosti v oblasti molekulárních mechanismů MCL usnadnily vývoj nových terapií. V MCL je BTK prokazatelně nadměrně exprimována, proto mezi novými léky vyniká inhibitor ibrutinib (Cinar et al., 2013; Colomer et al., 2014).

2.5.3 Waldenströмова makroglobulinémie

Waldenströмова makroglobulinémie (WM) patří do skupiny indolentních B-buněčných lymfomů. Vyznačuje se infiltrací kostní dřeně lymfoplazmocytyárními buňkami a přítomností monoklonálního imunoglobulinu IgM v séru. U více než 90 % pacientů s WM je detekována mutace MyD88, a mutace CXCR4 je přítomna asi u 30–35 % pacientů (Tam et al., 2020).

Buňky WM vykazují konstitutivní aktivaci BTK, která je důležitá pro správnou funkci BCR. S výhodou je proto v terapii využíváno BTK inhibitorů (ibrutinib, acalabrutinib, zanubrutinib). Mezi další schválená terapeutika v léčbě WM patří alkylační činidla, nukleosidová analoga, inhibitory proteazomů, nebo monoklonální protilátky, například rituximab (Issa et al., 2011).

2.5.4 Lymfom z marginální zóny

Lymfom z marginální zóny (MZL) se řadí do skupiny indolentních B-buněčných lymfomů, které jsou odvozeny z marginální zóny sekundárních lymfoidních folikulů. Lymfomy se dělí na tři základní typy: extranodální lymfomy v mízní tkáni sliznic (MALT), splenické lymfomy z B-buněk marginální zóny (SMZL) a nodální lymfomy z marginální zóny (NMZL). Tato tři onemocnění mají odlišný průběh i medián přežití (Conconi et al., 2015).

Dostupných poznatků a dat o signalizaci B-buněčného receptoru v MZL není mnoho, i přesto je dráha pokládána za klíčovou v aktivaci MZL buněk. Rozvoj onemocnění je spojován s chronickými infekcemi organismu, které potenciálně aktivují dráhu BCR. Aktivní je tak i kináza BTK a může proto sloužit jako cíl terapie MZL (Noy et al., 2017).

2.5.5 Další onemocnění

Kromě výše zmíněných malignit má deregulace BTK klinický význam i u dalších nádorových onemocnění. Zásadní funkce BTK jsou však omezeny zejména pro B-buňky. BTK je vyžadována pro BCR signalizaci a podílí se na rozvoji B-buněčných malignit, včetně folikulárního lymfomu (FL), akutní lymfoblastové leukemie (ALL) a difúzního velkobuněčného B-lymfomu (DLBCL). Indikace léčiv cílících na BTK v těchto malignitách jsou předmětem plejády klinických studií (Novero et al., 2014).

Folikulární lymfom představuje nejčastější indolentní B-buněčný lymfom. Až u 85 % pacientů s FL se vyskytuje translokace t(14;18)(q32;q21) nebo variantní translokace, která způsobí přemístění onkogenu *Bcl2* do oblasti genu pro těžké imunoglobulinové řetězce (Horsman et al., 2003). U souboru pacientů byla prokázána přítomnost mutace v genu pro BTK, což může vést k aberacím v signální dráze B-lymfocytů a naznačovat možnost využití BTK inhibitorů. Zapojení BTK v signalizaci FL buněk však doposud nebylo plně objasněno, efektivita těchto léčiv v klinických studiích je výrazně nižší než v porovnání s jinými hematomalignitami (Hu et al., 2021).

Akutní lymfoblastická leukemie je jedna z nejčastějších malignit v dětském věku. ALL je způsobena nahromaděním nádorově změněných zárodečných buněk v kostní dřeni, které se postupně vyplavují do krve. V důsledku infiltrace kostní dřene se v periferní krvi vyskytují malé počty různých krevních elementů (Zanette et al., 2007). Role BTK a jejich inhibitorů v ALL není zcela vysvětlena a prozkoumána jako je tomu u jiných hematomalignit. Kim et al. (2017) však naznačili potenciální zapojení ibrutinibu v inhibici pre-BCR signální kaskády vedoucí k potlačení proliferace buněk ALL.

Difúzní velkobuněčný B-lymfom, nejčastější podtyp nehodgkinských lymfomů (NHL), je agresivní a rychle rostoucí lymfom. DLBCL se dělí na dvě podskupiny podle buněčného původu, na lymfomy podobné B-buňkám z germinálního centra (GCB) a na lymfomy podobné aktivovaným B-buňkám (ABC) (Alizadeh et al., 2000). Pro přežití ABC lymfomů s chronickou aktivní BCR signalizací je nezbytná BTK, a proto se jako léky používají blokátory BTK. Například ibrutinib, kovalentní inhibitor BTK, narušením signalizační dráhy B-lymfocytů snižuje aktivitu NF- κ B, což umožňuje zničit ABC lymfomy (Wilson et al., 2015).

Mnohočetný myelom (MM) je charakterizován nahromaděním klonálních plazmatických buněk v kostní dřeni, a způsobuje asi 10 % všech hematologických malignit. Mezi klinické příznaky onemocnění patří anémie, selhání ledvin, kostní léze

či hyperkalcemie, jež jsou způsobeny poruchou plazmatických buněk (Rajkumar et al., 2011). Bylo prokázáno, že u MM je zvýšená exprese BTK, přičemž pacienti s vyšší expresí BTK mají horší prognózu (Liu et al., 2014).

2.6 BTK jako terapeutický cíl

Brutonova tyrozinkináza je základní složka signální dráhy zprostředkované receptorem BCR a je spojena s přenosy signálu, proliferací, aktivací a diferenciací lymfoidních B-buněk. Signální dráha BTK je rozhodující pro přežití nádorových buněk. Navíc BTK reguluje několik intracelulárních signálů, které jsou součástí signálních drah, jako například MAPK nebo NF- κ B. V důsledku toho vede inhibice BTK k přerušení mnoha buněčných signálních drah, které souvisí s rozvojem B-buněčných malignit. Látky cílící na kinázu BTK, inhibitory BTK, mají vliv na proliferaci a aktivaci apoptózy, tudíž představují významný cíl v oblasti vývoje léčiv (Herman et al., 2011).

Dle mechanismu účinku a způsobu vazby se BTK inhibitory dělí na dva typy: ireverzibilní a reverzibilní inhibitory. Ireverzibilní inhibitory obsahují skupiny Michaelova akceptoru, které zajišťují kovalentní vazbu s C481 v ATP-vazebném místě BTK. Naopak reverzibilní inhibitory se vážou na specifické místo domény SH3 pomocí slabých, nekovalentních interakcí. Všechny současné schválené BTK inhibitory jsou ireverzibilní inhibitory (Brullo et al., 2021).

Interakcí, ať už kovalentní či nekovalentní, inhibitorů s kinázou dojde k zablokování autofosforylace tyrozinu Y223 a fosforylace podřízených členů dráhy, včetně fosfolipázy C γ 2. Dochází tak k inhibici klíčových signálních drah a potlačení proliferace malignit (Nicolson et al., 2018).

2.6.1 Schválené BTK inhibitory

Během posledního desetiletí došlo k dynamickému rozvoji BTK inhibitorů. V současné době jsou úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) schváleny tři BTK inhibitory: ibrutinib, acalabrutinib a zanubrutinib (Palma et al., 2021). Jejich přehled a souhrn vlastností je uveden v Tabulce 1.

Ibrutinib

V roce 2013 se ibrutinib (PCI-32765) stal prvním schváleným BTK inhibitorem v terapiích onkologických onemocnění (de Claro et al., 2015). Jedná se o perorálně podávaný, vysoce účinný a ireverzibilní inhibitor BTK, který se váže na C481 a tím blokuje kinázovou aktivitu enzymu. Aktivní je v sub-nanomolárních koncentracích (IC_{50} 0,5 nM) (Honigberg et al., 2010). Brání proliferaci nádorových B-lymfocytů, zpomaluje jejich migraci a vyvolává buněčnou smrt. Ibrutinib byl schválen FDA k léčbě mnoha B-buněčných malignit, včetně chronické lymfocytární leukemie, Waldenströmovy makroglobulinémie, lymfomu z plášťových buněk a dalších. Využívá se především k léčbě těch pacientů, u kterých došlo k relapsu nebo nereagují na klasický způsob léčby (Charalambous et al., 2018).

Navzdory slibným preklinickým výsledkům a počátečnímu klinickému úspěchu je odpověď pacientů často nedostatečná, nebo dochází k rozvoji rezistence na ibrutinib. Až jedna třetina pacientů má přirozenou rezistenci, zatímco u mnoha dalších se rozvíjí rezistence získaná. Rezistence na léčbu ibrutinibem může být způsobena genetickými mutacemi (popsané jsou získané mutace C481S v BTK, či R665W, L845F a S707Y v lipáze PLC γ 2), negenetickými příčinami nebo jinými neznámými faktory (Woyach et al., 2017; Walliser et al., 2018). Proto má v současné době velký klinický význam identifikace nových cílených látek, které by sloužily k překonání rezistence (George et al., 2020).

Ibrutinib je obecně relativně dobře tolerován a dlouhodobá léčba je spojena pouze s mírnou toxicitou. Většina nežádoucích účinků je mírná nebo středně těžká (stupeň 1-2), a obvykle odezní bez potřebné dodatečné léčby. Nejčastěji se jedná o únavu, průjem, krvácení či infekce. U několika procent pacientů se při dlouhodobém pozorování vyskytuje fibrilace síní (Berglöff et al., 2015). Za těmito toxickými projevy léku stojí jeho poměrně nízká specifita léčiva. Kromě primárního cíle, kterým je kináza BTK, má řadu vedlejších cílových molekul („off-target“). Těmito off-target kinázami jsou kinázy sdílející konzervované cysteinové reziduum na analogické pozici jako v aktivním místě BTK. Jsou jimi například ostatní kinázy TEC rodiny (BMX, ITK, TEC, RLK/TXK), kinázy ERBB rodiny (EGFR, HER2, HER4), a další (JAK3 a BLK) (Liclican et al., 2020).

Acalabrutinib

Acalabrutinib (ACP-196) je selektivní, ireverzibilní inhibitor BTK druhé generace, s dokonalejšími farmakologickými vlastnostmi oproti ibrutinibu. V roce 2017 byl schválen k léčbě lymfomu z plášťových buněk (Markham et al., 2018). Acalabrutinib se stejně jako ibrutinib kovalentně váže na C481, avšak s vyšší selektivitou a aktivitou (Wu et al., 2016). Inhibiční aktivita pro BTK je sice několikanásobně vyšší než u ibrutinibu, tj. $IC_{50} = 5,1$ nM podle Kaptein et. al, (2018), avšak co upozadilo ibrutinib je vysoká specifita acalabrutinibu. Na rozdíl od ibrutinibu neinhibuje signalizaci enzymů z kinázových rodin TEC a ERBB. Dále také nepoškozuje funkci krevních destiček (Miao et al., 2021). Inhibitor prodáváný pod názvem Calquence je v současné době schválen k léčbě chronické lymfocytární leukemie a lymfomu z plášťových buněk. Léčba acalabrutinibem vede k úplné ztrátě fosforylované BTK v periferní krvi, což má za následek inhibici signalizace BTK a NF- κ B dráhy. (Miao et al., 2021).

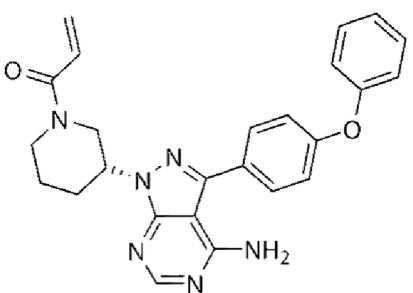
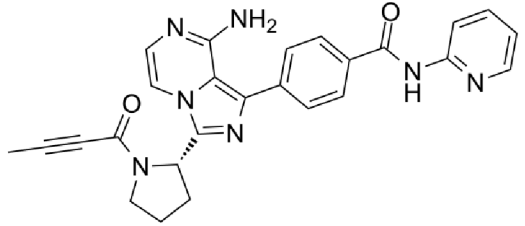
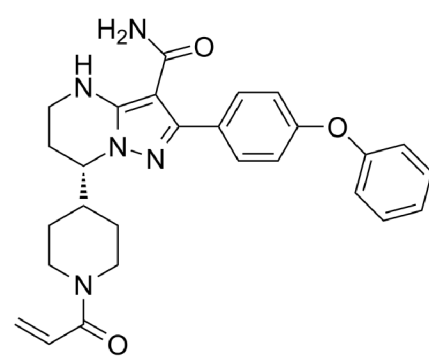
Nejčastějšími nehematologickými vedlejšími účinky jsou bolesti hlavy, průjem, infekce horních dýchacích cest nebo nevolnost. Během léčby acalabrutinibem zatím nebyly zaznamenány žádné případy fibrilace síní (Kriegsmann et al., 2018).

Zanubrutinib

Zanubrutinib (BGB-3111) je specifický, účinný, ireverzibilní inhibitor BTK s příznivým farmakologickým a farmakokinetickým profilem, schválený v roce 2019 k léčbě lymfomu z plášťových buněk u dospělých pacientů (Syed 2020). Jedná se o inhibitor druhé generace, a svou účinností se koncentrací IC_{50} blíží ibrutinibu. Oproti svému předchůdci však vykazuje vysokou selektivitou a vylepšenou bezpečnost použití v praxi (Guo et al., 2019). Bylo prokázáno, že monoterapie zanubrutinibem je všeobecně dobře tolerována pacienty s různými B-buněčnými malignitami (Hillmen et al., 2020). Zanubrutinib byl do dnešního dne schválen pro léčbu chronické lymfocytární leukemie, lymfomu z plášťových buněk a Waldenströmovy makroglobulinémie (Estupiñán et al., 2021).

Zanubrutinib se užívá perorálně, po podání se rychle vstřebává a ani po opakovaném užívání se v těle nehromadí. Rozpustnost zanubrutinibu je závislá na pH (Wang et al., 2021). Mezi nežádoucí účinky související s léčbou patří infekce horních dýchacích cest, vyrážka, modřiny či průjem (Tam et al., 2022).

Tab. 1: Přehled schválených BTK inhibitorů včetně chemické struktury, indikace a hodnot IC₅₀.

| Název | Chemická struktura | Indikace | Hodnota IC ₅₀ |
|---------------|---|-------------------------|--------------------------|
| ibrutinib |  | CLL MCL MZL WM | 0,5 nM ¹ |
| acalabrutinib |  | CLL MCL | 5,1 nM ² |
| zanubrutinib |  | CLL MCL WM | 0,3 nM ³ |

1 - Honigberg et al., 2010; 2 - Kaptein et al., 2018; 3 - Guo et al., 2019

2.6.2 Další BTK inhibitory v klinických studiích

Rezistence ibrutinibu a nežádoucí účinky způsobené inhibicí vedlejších cílů vedly ke klinickému vývoji BTK inhibitorů druhé generace. Nové inhibitory jsou navrženy tak, aby byly co nejúčinnější a dobře snášeny. Kromě toho jsou také více selektivní. V poslední době je velký zájem o vývoj inhibitorů BTK k léčbě autoimunitních onemocnění (Caldwell et al., 2019).

Mimo výše zmíněné schválené inhibitory se klinické studie zabývají novými inhibitory, jako je například ireverzibilně se vážící evobrutinib, tirabrutinib, či nejnovější branebrutinib a remibrutinib, nebo reverzibilně se vážící fenebrutinib a rilzabrutinib. Vybrané zajímavé zástupce uvádí Tabulka 2. Na základě již známých struktur účinných

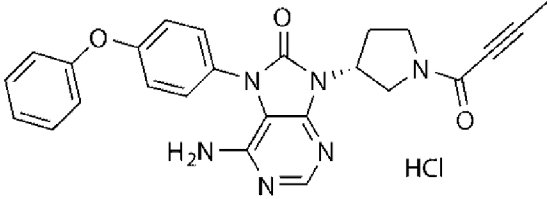
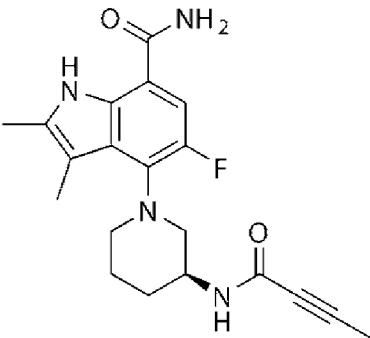
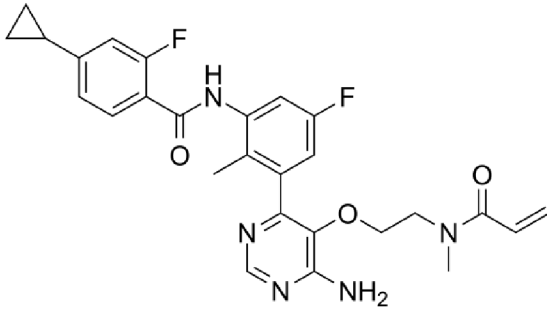
inhibitorů a díky metodám molekulového modelování a studiu závislosti aktivity na struktuře (SAR) dochází k významnému rozvoji v oblasti syntézy nových potenciálních inhibitorů BTK. Navíc se již nepoužívají pouze k léčbě B-buněčných malignit a autoimunitních onemocnění, ale také byly navrženy jako nová antitrombotika (Kaul et al., 2021; von Hundelshausen et al., 2021).

Nakročeno ke schválení pro léčbu od úřadu FDA má inhibitor tirabrutinib. Jedná se o selektivní, perorální inhibitor BTK působící proti řadě B-buněčných malignit. Tirabrutinib se ireverzibilně, kovalentně váže na BTK v místě C481 (Liclican et al., 2020). V roce 2020 byl v Japonsku schválen pro léčbu pacientů s relabovaným/refrakterním primárním lymfomem centrální nervové soustavy (PCNSL) (Narita et al., 2021).

Branebrutinib je vysoce selektivní inhibitor BTK, který lze podávat perorálně. Branebrutinib je dobře tolerován s málo nežádoucími účinky, a je vysoce účinný již při nízkých dávkách (Catlett et al., 2020). V klinických studiích je branebrutinib využíván k léčbě revmatoidní artritidy (RA), Sjögrenova syndromu (SS) a systémového lupus erythematoses (SLE) (Zheng et al., 2021).

Remibrutinib je jeden z nejnovějších BTK inhibitorů v preklinické fázi. Jedná se o silný, kovalentní inhibitor BTK s mírnějšími vedlejšími účinky (Huth et al., 2022). Remibrutinib má klinický potenciál v léčbě autoimunitních poruch, včetně chronické spontánní kopřivky (CSU) či Sjögrenova syndromu (Kaul et al., 2021).

Tab. 2: Přehled vybraných inhibitorů v preklinické fázi včetně chemické struktury, indikace a hodnot IC_{50} .

| Název | Chemická struktura | Indikace | Hodnota IC_{50} |
|---------------|--|-----------------|---------------------|
| tirabrutinib |  | PCNSL | 6,8 nM ¹ |
| branebrutinib |  | RA SLE SS | 0,1 nM ² |
| remibrutinib |  | CSU MS SS | 1,3 nM ³ |

1 - Licican et al., 2020;

2 - Watterson et al., 2019;

3 - Angst et al., 2020

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Použité chemikálie

- 2-merkptoethanol ($\geq 97\%$, Serva, Německo)
- akrylamid: AA (VWR, USA)
- aprotinin (Sigma-Aldrich, USA)
- bovinní sérový albumin: BSA (VWR, USA)
- bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, Rakousko)
- dihydrogenfosforečnan draselný: KH_2PO_4 (Lachema, ČR)
- dimethylsulfoxid: DMSO (PanReac AppliChem, Německo)
- dithiotreitol: DTT (Roche, Německo)
- dodecylsírán sodný: SDS ($\geq 98\%$, Lach-ner, ČR)
- ECL substrát (Thermo Fisher Scientific, USA)
- ethanol 96% (Lach-Ner, ČR)
- fenylmethansulfonylfluorid: PMSF (Sigma-Aldrich, Čína)
- fetální bovinní sérum: FBS (Biowest, Francie)
- fluorid sodný ($\geq 98\%$, Lach-Ner, ČR)
- glycin ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, USA)
- hydrogenfosforečnan draselný: K_2HPO_4 (Lachema, ČR)
- hydrogenfosforečnan sodný: Na_2HPO_4 (PENTA, ČR)
- hydrogenuhličitan sodný: NaHCO_3 (Lachema, ČR)
- chlorid draselný: KCl ($\geq 99\%$, Lachema, ČR)
- chlorid sodný: NaCl (PENTA, Česká republika)
- kultivační médium DMEM (Sigma-Aldrich, USA)
- kultivační médium IMDM (Sigma-Aldrich, USA)
- kyselina ethylendiamintetraoctová: EDTA ($\geq 98,5\%$ Sigma-Aldrich, Čína)
- kyselina ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová: EGTA ($\geq 97\%$, Sigma-Aldrich, USA)
- kyselina chlorovodíková: HCl 55% (Lach-Ner, ČR)
- kyselina octová 99% (Lach-Ner, ČR)
- kyselina trihydrogenfosforečná 85% (Penta, ČR)
- L-glutamin (Sigma-Aldrich, USA)

- leupeptin (Sigma-Aldrich, USA)
- marker molekulových hmotností proteinů Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (ThermoFisher, USA)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin: TEMED ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, Čína)
- N,N'-methylenbisakrylamid ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, Čína)
- nonidet: P 40 (Fluka, Švýcarsko)
- orthovanadičnan sodný (Sigma-Aldrich, USA)
- penicilin (Sigma-Aldrich, USA)
- peroxidisíran amonný: APS ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, Japonsko)
- Ponceau S (SERVA, Německo)
- propidium jodid ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, USA)
- resazurin (Sigma-Aldrich, USA)
- streptomycin (Sigma-Aldrich, USA)
- tris(hydroxymethyl)aminomethan: TRIS ($\geq 99\%$ Serva, Německo)
- TWEEN 20: polyoxyethylensorbitanmonolaurát (Sigma-Aldrich, USA)

3.1.2 Roztoky

- blokovací pufr: 5% BSA, 0,1% Tween 20 v TBS
- blotovací pufr: 25 mmol \cdot l $^{-1}$ TRIS, 192 mmol \cdot l $^{-1}$ glycin v dH₂O
- Bradfordovo činidlo: 0,01% Coomassie-Brilliant blue, 4,7% ethanol, 8,5% kyselina fosforečná v dH₂O
- ECL roztok: 1:1 luminol a H₂O₂
- elektroforetický roztok: 25 mmol \cdot l $^{-1}$ TRIS, 192 mmol \cdot l $^{-1}$ glycin, 0,1% SDS v dH₂O
- lyzační pufr RIPA: 20 mmol \cdot l $^{-1}$ TRIS (pH 7,4), 100 mmol \cdot l $^{-1}$ NaCl, 5 mmol \cdot l $^{-1}$ EDTA, 2 mmol \cdot l $^{-1}$ EGTA, 1 mmol \cdot l $^{-1}$ NaF, 0,2% nonidet P 40 (pH 7,4), 1 mmol \cdot l $^{-1}$ PMSF, 1 mmol \cdot l $^{-1}$ DTT, 0,5 μ g \cdot ml $^{-1}$ leupeptin, 2 μ g \cdot ml $^{-1}$ aprotinin, 1 mmol \cdot l $^{-1}$ vanadičnan sodný v dH₂O
- Ponceau S: 0,2% Ponceau S, 1% kyselina octová v dH₂O
- promývací roztok PBS: 137 mmol \cdot l $^{-1}$ NaCl, 2,7 mmol \cdot l $^{-1}$ KCl, 10 mmol \cdot l $^{-1}$ Na₂HPO₄, 2 mmol \cdot l $^{-1}$ KH₂PO₄ (pH 7,4) v dH₂O
- SDS vzorkovací pufr: 0,3 mol \cdot l $^{-1}$ TRIS (pH 6,8), 50% glycerol, 10% SDS, 5% 2-metkптоethanol, 0,05% bromfenolová modř v dH₂O

- Tris-HCl pH 6,8: $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris v dH_2O ; koncentrované HCl upraveno pH na hodnotu 6,8
- Tris-HCl pH 8,8: $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris v dH_2O ; koncentrované HCl upraveno pH na hodnotu 8,8
- Tris-pufr (TBS): $137 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl, $20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ TRIS (pH 6,8) v dH_2O
- Tris-pufr s Tweenem: $137 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl, $20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ TRIS, 0,1% Tween 20 v dH_2O

3.1.3 Kultivační média

- DMEM s 10% FBS: DMEM, 10% fetální bovinní sérum, $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ penicilin, $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ streptomycin, $0,3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ L-glutamin, $3,7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ NaHCO_3 , součástí kultivačního média byl acidobazický indikátor fenolová červeň.
- IMDM s 10% FBS: IMDM, 10% fetální bovinní sérum, $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ penicilin, $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ streptomycin, $0,3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ L-glutamin, $3,7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ NaHCO_3 , součástí kultivačního média byl acidobazický indikátor fenolová červeň.

3.1.4 Použité protilátky

Tab. 3: Seznam použitých primárních protilátek (R = králíci, M = myši, p = phosphorylated).

| Protein | Molekulová hmotnost (kDa) | Protilátka | Typ | Ředění | Výrobce a původ |
|-------------------------|---------------------------|----------------------------|-----|--------|--------------------------------|
| BTK | 77 | anti-BTK | R | 1:1000 | Cell Signaling (USA) |
| pBTK (Y223) | 77 | anti-pBTK Y223 | R | 1:500 | Cell Signaling (USA) |
| PLC γ 2 | 150 | anti-PLC γ 2 | R | 1:1000 | Cell Signaling (USA) |
| pPLC γ 2 (Y1217) | 150 | anti-pPLC γ 2 Y1217 | R | 1:500 | Cell Signaling (USA) |
| AKT | 60 | anti-AKT | R | 1:1000 | Cell Signaling (USA) |
| pAKT (S473) | 60 | anti-pAKT S473 | R | 1:500 | Cell Signaling (USA) |
| ERK 1/2 | 42, 44 | anti-ERK1/2 | R | 1:500 | Cell Signaling (USA) |
| pERK 1/2 (T202/Y204) | 42, 44 | anti-pERK 1/2 T202/Y204 | R | 1:250 | Cell Signaling (USA) |
| PARP | 116, 89 | anti-PARP | R | 1:1000 | Cell Signaling (USA) |
| β -Aktin | 45 | anti- β -aktin | M | 1:1000 | Santa Cruz Biotechnology (USA) |

Tab. 4: Seznam použitých sekundárních protilátek (S = prasečí, R = králíci).

| Protilátka | Typ | Ředění | Výrobce a původ |
|-----------------------|-----|--------|----------------------|
| anti-Rabbit (SWAR/Px) | S | 1:1000 | Cell Signaling (USA) |
| anti-Mouse (RAM/Px) | R | 1:1000 | Cell Signaling (USA) |

3.1.5 Testované inhibitory

- **7471, 7487, 8605-8615**: látky byly syntetizovány týmem dr. Salase (Universidad de Chile). Látky byly připraveny jako zásobní roztok v DMSO, o koncentracích $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Testované nově syntetizované látky patří mezi 2,6,9-trisubstituované deriváty purinu.
- Ibrutinib: schválený BTK inhibitor byl použit jako standard. Látka byla připravena jako zásobní roztok v DMSO o koncentraci $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (MedChemExpress LLC, USA)
- Zanubrutinib: schválený BTK inhibitor byl použit jako standard. Látka byla připravena jako zásobní roztok v DMSO o koncentraci $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (MedChemExpress LLC, USA).

Zásobní roztoky testovaných látek byly uskladněny v lednici při $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Před použitím byly naředěny v kultivačním médiu tak, aby koncentrace v DMSO nebyla vyšší než 0,1 %.

3.1.6 Buněčné kultury

Pro experimenty byly použity tyto nádorové buněčné linie:

- K-562 (The European Collection of Authenticated Cell Cultures, Velká Británie) nádorová linie odvozená od chronické myeloidní leukemie. Linie byla kultivována v médiu DMEM s 10% FBS.
- Ramos (The European Collection of Authenticated Cell Cultures, Velká Británie) nádorová linie odvozená od Burkittova lymfomu. Linie byla kultivována v médiu IMDM s 10% FBS.

3.1.7 Přístrojové vybavení

- analytická váha KERN ABT 120-5DM (KERN, Německo)
- aparatura pro western blot Mini Trans-Blot Module (BioRad, USA)
- automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- CCD kamera s příslušenstvím Luminescent image analyzer LAS-4000 (Fujifilm, Japonsko)
- centrifuga ROTINA 420/420 R (HETTICH, Německo)
- CO_2 inkubátor MCO-17AIC (Sanyo, Japonsko)

- Fluoroskan Ascent Microplate Reader (Labsystems, Finsko)
- hlubokomrazicí box New Brunswick Innova U535 (New Brunswick Scientific, USA)
- inverzní mikroskop CK2 (Olympus, Japonsko)
- kývačka Mini-Rocker Shaker, MR-1 (Biosan, Lotyšsko)
- laboratorní váhy KERN PCB 200-2 (KERN, Německo)
- laminární box OS-N (Merci, Česká republika)
- laminární box VBH Compact, VBH36 C2 (Steril, Itálie)
- lednice Liebherr FKvsl 5413 (Liebherr, Německo)
- magnetická míchačka s ohřevem Arex-6 (VELP Scientifica, Itálie)
- mikrocentrifuga D1008 (DLAB, Čína)
- pipetor accu-jet-pro (BrandTech Scientific, USA)
- pipetor Swiftpet Pro (HTL, Polsko)
- souprava pro SDS-PAGE Mini-Protean Tetra Systém (Bio-Rad, USA)
- spektrofotometr UV-1800 (Shimadzu, Japonsko)
- termoblok Compact Digital Dry Bath/Block Heater (Thermo Fisher Scientific, USA)
- třepačka vířivá Vortex mixer (Velp Scientifics, Itálie)
- třepačka s kývavým pohybem MiniRocker MR-1 (Biosan, Lotyšsko)
- vodní lázeň (GFL, Německo)
- zdroj pro SDS-PAGE PowerPac Basic (Bio-Rad, USA)

Dále bylo použito spotřební laboratorní zboží:

- mikrozkušavky 0,5 ml; 1,5 ml a 2 ml (Eppendorf, Německo)
- nitrocelulosová membrány pro western blot (Bio-Rad, USA)
- sterilní 96-jamková mikrotitrační destička s kulatým dnem (Bio-Rad, USA)
- sterilní Petriho misky průměru 10 cm a 5 cm (TPP, Švýcarsko)
- sterilní zkumavky o objemu 10 ml a 15 ml (GAMA GROUP, Česká republika)

Běžné laboratorní vybavení: Bürkerova komůrka, kádinky, lžičky, odměrné válce, pinzety, skalpely, skleněné tyčinky, stojany na zkumavky a mikrozkušavky, stříčky, špičky, váženky, zkumavky

3.1.8 Programy

- BD FACSuite™ Software (Becton-Dickinson Company, USA)
- ModFit LT 5.0 (Verity Software House, USA)
- Multi Gauge Image Reader LAS-4000 3.2 (FujiFilm, Japonsko)
- Origin 6.0 (OriginLab Corporation, USA)

3.2 Metody

3.2.1 Buněčné kultury

Nádorové buněčné linie byly kultivovány v příslušném kultivačním médiu, na Petriho misce v inkubátoru při 37 °C v 5% CO₂. Navíc byla v inkubátoru udržována relativní vlhkost v hodnotách okolo 90 %. Ke kultivaci buněčné linie Ramos a linie K562 bylo použito médium IMDM, respektive DMEM s přidavkem 10% fetálního bovinního séra.

Dle potřeby byly buněčné linie 3x týdně pasážovány. Buněčná suspenze byla po přenesení do sterilní zkumavky centrifugována po dobu 5 minut za laboratorní teploty při 1000 g. Následně byl supernatant odstraněn a pelet buněk rozsuspendován v čerstvém médiu o požadovaném objemu. Před jakýmkoliv prováděným experimentem byly buňky pod mikroskopem spočítány pomocí Bürkerovy komůrky. Takto byl určen počet buněk v 1 ml a následně v celé suspenzi. Suspenze byla naředěna čerstvým kultivačním médiem na požadovanou koncentraci.

Kultivace buněk a veškerá práce s nimi probíhala za sterilních podmínek v laminárním boxu.

3.2.2 Ovlivnění a sklizení buněk

V případě buněk určených pro western blotting s následnou imunodetekcí proteinů byly do Petriho misek o průměru 55 mm nasazeny 4 miliony buněk do 5 ml kultivačního média. Pro cytometrickou analýzu buněčného cyklu byl do Petriho misek o průměru 55 mm nasazen 1 milion buněk do 5 ml média. Naředěné kultury byly před ovlivněním ponechány alespoň hodinu v inkubátoru.

Naředěním zásobních roztoků studovaných látek nebo standardů do roztoku DMSO byla připravena koncentrační řada. Takto naředěné látky byly přímo napipetovány k suspenzi buněčné kultury, a ovlivněné buňky byly inkubovány v inkubátoru požadovanou dobu (1 h – 24 h).

Po uplynutí inkubační doby byly buňky sklizeny podle použité metody detekce. Ovlivněné buňky pro western blotting s následnou imunodetekcí byly sklizeny pomocí pipety do předem vychlazených zkumavek na ledu a centrifugovány po dobu 8 minut při 1000 g a 4 °C. Po stočení byl supernatant odstraněn, pelet důkladně rozsuspendován v 1 ml PBS a opět centrifugován. Následně byl pelet rozsuspendován v 1,5 ml PBS a přenesen do mikrozkušavky. Po centrifugaci byl supernatant důkladně odstraněn a buněčný pelet byl uskladněn v hluboko mrazícím boxu při -80 °C.

V případě ovlivněných buněk pro cytometrickou analýzu byly buňky také sklizeny do předem vychlazených zkumavek na ledu. Zkušavky se vzorky byly stočeny v centrifuze po dobu 8 minut při 1000 g a 4 °C. Následně byl odstraněn supernatant, pelet rozsuspendován v 1 ml PBS a vzorky centrifugovány. Po odstranění supernatantu a rozsuspendování peletu v 100 µl PBS byly buňky zafixovány pomocí vychlazeného 70% ethanolu. Ethanol o objemu 1 ml byl po kapkách přidán na vířivé třepačce do zkušavky. Takto připravené vzorky byly uloženy v mrazáku při -20 °C.

3.2.3 Lyzace buněk

Buněčné pelety určené pro imunodetekci po western blottingu byly ponechány volně rozmraznout na ledu. Dále byly pelety rozsuspendovány v lyzačním pufru RIPA s inhibitory proteáz, fosfatáz a DTT. Vzorky byly inkubovány 30 minut na ledu, a každých 5-10 minut resuspendovány a nakonec sonikovány ultrazvukovým homogenizátorem. Po ukončení inkubace a sonikace byly vzorky centrifugovány po dobu 30 minut, při 14 000 g a 4 °C. Poté byl supernatant (lyzát) přenesen do nové mikrozkušavky, a zaznamenán jeho přenesený objem.

Stanovení celkových proteinů v lyzátu bylo provedeno pomocí Bradfordovy metody (Bradford, 1976). Do zkumavek s 1 ml Bradfordova činidla byl napipetován 1 µl lyzátu, roztok byl promíchán pomocí vortexové třepačky a inkubován 10 minut při laboratorní teplotě. Po ukončení inkubace byla pomocí spektrofotometru měřena absorbance při 595 nm. Měření každého vzorku bylo provedeno v duplikátu a ke stanovení koncentrace byla použita průměrná hodnota. Vzorky byly naředěny lyzačním pufrem na stejnou koncentraci. Navíc byl ke vzorkům přidán SDS vzorkovací pufr (5x), který zajišťuje denaturaci proteinu a jejich negativní náboj. Nakonec byly vzorky promíchány pomocí vortexové třepačky a zahřívány 5 minut v termobloku při 95 °C. Po stočení v mikrocentrifuze byly vzorky uskladněny v mrazáku (-20 °C).

3.2.4 SDS-PAGE, western blotting a imunodetekce

Pomocí SDS polyakrylamidové gelové elektroforézy byla provedena separace proteinů za denaturujících podmínek. Polyakrylamidový gel se skládal z 5% zaostřovací a 12,5% dělicí části o tloušťce 1 mm. Gely byly připraveny z roztoků dle Tabulky 5, přičemž jako poslední byl vždy přidán APS, k zahájení polymerace.

Tab. 5: Složení roztoků pro přípravu dvou 1 mm silných gelů.

| Složka | Dělicí gel 12,5% | Zaostřovací gel 5% |
|------------------|------------------|--------------------|
| AA/BIS | 3,90 ml | 0,84 ml |
| Destilovaná voda | 1,94 ml | 3,51 ml |
| Tris pH 6,8 | - | 0,63 ml |
| Tris pH 8,8 | 3,50 ml | - |
| SDS 10% | 94,00 μ l | 50,00 μ l |
| TEMED | 6,25 μ l | 5,00 μ l |
| APS 10% | 37,50 μ l | 30,00 μ l |

Připravený roztok pro dělicí gel byl napipetován mezi skleněné elektroforetické desky a převrstven destilovanou vodou. Směs byla ponechána cca 45 minut tuhnout, a po ztuhnutí gelu byla destilovaná voda vylita. Následně byl připraven roztok pro zaostřovací gel, který byl napipetován na dělicí gel až po okraj skleněných desek. Mezi skla byl vsunut plastový hřebínek k vytvoření jamek pro vzorky. Takto připravený gel tuhl dalších 30 minut, a poté byly skleněné desky i s gelem přeneseny do elektroforetické komory.

Elektroforetická komora i vana, ve které byla komora umístěna, byly naplněny Tris-glycinovým elektrolytem a plastový hřebínek byl opatrně vyjmut z gelu. Vzorky byly zahřáty v termobloku při 95 °C po dobu 2 minut, promíchány na vortexové třepačce a nanášeny do jamek v zaostřovacím gelu. Do jednotlivých jamek bylo nanášeno množství vzorku odpovídající 30-50 μ g proteinů. Navíc byl do krajních jamek nanášen marker molekulových hmotností proteinů. Vana byla po přikrytí víkem připojena ke zdroji napětí. Zpočátku probíhala separace při napětí 80 V a po přechodu proteinů do dělicího gelu bylo napětí zvýšeno na 120 V.

Po ukončení elektroforézy byl z gelu opatrně odstraněn zaostřovací gel, a dělicí gel byl spolu s nitroceluloseovou membránou, filtračními papíry a porézními houbičkami

vložen do blotovací kazety. Kazeta byla vložena do blotovací komory v blotovací vaně. Do vany byl nalit vychlazený blotovací pufr, přidán led a elektromagnetické míchátko. Přenos proteinů probíhal 3 hodiny při konstantním proudu 270 mA za stálého míchání a chlazení. Po přenosu byly proteiny na membráně vizualizovány pomocí roztoku Ponceau S. Membrána byla poté promyta v destilované vodě a osušena na filtračním papíře za laboratorní teploty.

Z membrány byly na základě markeru molekulových hmotností vyřezány části odpovídající hmotnostem cílových proteinů. Vyřezané proužky byly vhodně označeny, odbarveny pomocí TBS a následující hodinu blokovány v 4% roztoku BSA v TBS-TWEEN 20 na třepačce. Došlo tak k zablokování nespecifických vazeb protilátek v místech, kde nebyly navázány proteiny. Po zablokování a vysušení byly jednotlivé proužky přeneseny na destičku pokrytou parafilmem. Na jednotlivé proužky byla nanесena příslušná primární protilátka (viz Tabulka 3), se kterou byla membrána inkubována přes noc při 4 °C. Následující den byly membrány několikrát promyty v roztoku TBS a TBS-TWEEN 20, aby došlo k odmytí nenavázané protilátky. Poté byla nanесena sekundární protilátka (viz Tabulka 4) konjugovaná s křenovou peroxidázou. Následovala inkubace se sekundární protilátkou po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě a dále byly membrány opět několikrát promyty v roztoku TBS a TBS-TWEEN 20.

Membrány byly vysušeny na filtračním papíře, přeneseny na destičku s parafilmem, a byl na ně nanесen chemiluminiscenční roztok ECL. Po 5minutové inkubaci byly membrány přeneseny do vyvolávacího přístroje s kamerou. Chemiluminiscenční signál byl detekován pomocí CCD kamery LAS4000 (FujiFilm) a následně zpracován v programu Multi Gauge Image Reader 2.2.

3.2.5 Analýza buněčného cyklu průtokovým cytometrem

Fixované vzorky byly rozmrazeny, promíchány pomocí vortexu a poté centrifugovány 8 minut při 1000 g a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a buněčný pelet rozsuspendován v 1 ml PBS. Vzorky byly opět centrifugovány, a po odsátí supernatantu byl pelet rozsuspendován v 50 µl PBS. Do této doby byla veškerá práce prováděna na ledu. Za stálého míchání na vortexové třepačce byl ke každému vzorku po kapkách přidán 1 ml 2N HCl/Triton X-100 0,5%. Vzorky byly inkubovány 30 minut při laboratorní teplotě, a za tuto dobu alespoň třikrát promíchány. Poté byly vzorky centrifugovány, supernatant odsát a buněčný pelet rozsuspendován v 1 ml 0,1M dekahydrátu tetraboritanu sodného.

Vzorky byly znovu centrifugovány, a po odstranění supernatantu byl pelet rozsuspendován v 600 μ l filtrovaného PBS a přenesen do cytometrických zkumavek. Do každé zkumavky bylo na vortexové třepačce přidáno 6 μ l propidium jodidu (PI), aby byla výsledná koncentrace 100 μ g/ml. Vzorky byly inkubovány 30 minut ve tmě, za laboratorní teploty a občasného promíchání. Po uplynutí této doby byla provedena analýza buněčného cyklu pomocí průtokového cytometru.

Obsah jaderné DNA byl změřen pomocí průtokového cytometru BD FACS Verse s BD FACSuite Software s použitím excitačního laseru o vlnové délce 488 nm. Výsledný histogram byl zpracován pomocí programu Mod Fit LT 5.0 (Verity Software house) a bylo vyhodnoceno průměrné zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu.

3.2.6 Analýza cytotoxicity

Pro stanovení cytotoxických účinků látek bylo do 96-jamkové mikrotitrační destičky vysazeno 10 000 buněk linie Ramos na jamku do 80 μ l média. V případě buněčné linie K562 byly buňky nasazeny v počtu 5 000 buněk na jamku. Před ovlivněním byly buňky v inkubátoru ponechány po dobu 24 hodin.

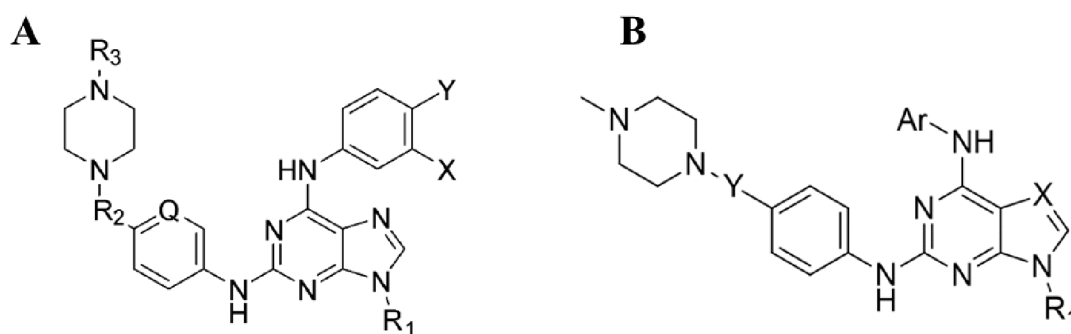
K ovlivnění buněk pro analýzu cytotoxicity byla nejprve do ředící mikrotitrační destičky připravena 6bodová koncentrační řada s faktorem ředění 3. Buněčná linie v 96-jamkové destičce byla ovlivněna touto koncentrační řadou v triplicátu po dobu 72 hodin.

Pro stanovení cytotoxických účinků byl proveden resazurinový test. Buněčné linie byly ovlivněny testovanými látkami po dobu 72 hodin. Poté byl přidán roztok resazurinu, který je uvnitř buněk převeden mitochondriálními reduktázami na fluorescenční barvivo resorufin. Po 4hodinové inkubaci byla měřena fluorescence při 544 nm / 590 nm (excitační λ / emisní λ) pomocí mikrodestičkového readeru Ascent. Z těchto hodnot byla za pomoci programu Origin vyhodnocena hodnota GI₅₀, tedy koncentrace způsobující 50% inhibici buněčného růstu.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Pro vlastní experimentální práci byl k testování vybrán komerčně dostupný a k léčbě schválený inhibitor ibrutinib, jakožto zlatý standard léčby a první léčivo svého druhu (2013) (de Claro et al., 2015). Jako zástupce léčiva nové generace byla pro porovnání použita látka zanubrutinib, zatím poslední schválený BTK inhibitor (2019) (Syed 2020). Jakožto potenciální BTK inhibitory byly testovány látky připravené týmem dr. Salase z univerzity Universidad de Chile. V rámci spolupráce byla již syntetizována a publikována jedna série látek, 2,6,9-trisubstituovaných derivátů purinu. Nejúčinnější sloučeniny této série byly charakterizovány jako potenciální inhibitory kináz BCR-ABL a BTK s jejich možnou indikací v leukemických onemocněních (Bertrand et al., 2020).

Nově syntetizované purinové deriváty staví na poznacích z publikovaných dat (série látek č. 7462-7492 a 8605-8628, Obrázek 3). Návrh a syntéza těchto látek vychází ze stejného strukturního základu za využití metod molekulové dokování a QSAR. Nové série nízkomolekulárních inhibitorů jsou připravovány s cílem zlepšení jejich biochemických a potenciálních farmakologických vlastností se zaměřením na inhibici kináz BTK a BCR-ABL. V laboratoři Katedry experimentální biologie byly laborantkou naměřeny hodnoty IC_{50} těchto sloučenin na rekombinantních kinázách BTK, BCR-ABL a dalších (nepublikovaná data). Na základě těchto získaných hodnot byly pro potřeby bakalářské práce vybrány látky pro pozorování jejich aktivity a účinku na signalizační dráhu kinázy BTK, konkrétně látky **7471** a **7487**, a **8605-8615**.



Obr. 3: Obecné strukturní vzorce nově syntetizovaných sloučenin ze série 7462-7492 (A) a 8605-8628 (B).

4.1 Analýza cytotoxicity

Míra cytotoxicity testovaných inhibitorů ibrutinibu, zanubrutinibu, vybraných látek **7471** a **7487**, a látek **8605–8615** byla stanovena pomocí resazurinového testu na dvou buněčných liniích. Testy byly provedeny na buněčné linii Ramos odvozené od Burkittova lymfomu, která je standardně zavedenou modelovou linií s aktivovanou BTK dráhou, a na linii K562, která je odvozena od chronické myeloidní leukemie a má aktivní onkogenní kinázu BCR-ABL. Buňky byly inhibitory ovlivněny po dobu 72 hodin, a z hodnot absorbance při 544 nm / 590 nm (excitační λ / emisní λ) byla stanovena hodnota GI₅₀. Tato hodnota (GI₅₀) odpovídá koncentraci způsobující 50% inhibici buněčného růstu, a byla vyhodnocena pomocí programu Origin 6.0.

Experiment prokázal, že buněčná linie Ramos byla nejcitlivější vůči působení látky **8608**, kdy hodnota GI₅₀ činila $1,687 \pm 0,039 \mu\text{M}$. Cytotoxická aktivita této látky byla vysoká i u buněčné linie K562, a hodnota GI₅₀ byla $0,828 \pm 0,005 \mu\text{M}$. Obdobné výsledky byly naměřeny u látky **8606**.

Ve studii Liu et al. (2021) byly testovány pyrazolo[3,4-d]pyrimidinové deriváty, vycházejících ze struktury ibrutinibu, obdobně jako látky studované v experimentální části této bakalářské práce. Hodnoty GI₅₀ v této studii v případě nejaktivnějších sloučenin **39** činily $4,100 \mu\text{M}$, a sloučeniny **40** činily $4,630 \mu\text{M}$. Tyto látky mají tedy v porovnání s látkami **8606** a **8608** nižší cytotoxicitu.

Naměřené hodnoty GI₅₀ ostatních vybraných látek byly již poměrně vysoké, a to větší než $5 \mu\text{M}$. Syntetizované deriváty ze starší série připravených látek (**7471** a **7487**) se v testu cytotoxicity na buňkách jeví méně účinné. Látky nové série (**8605–8615**) byly připraveny za účelem zvýšené účinnosti inhibice kináz BTK a BCR-ABL, tudíž i vylepšené antiproliferační aktivity v buněčných liniích Ramos a K562.

Naměřeny byly rovněž hodnoty GI₅₀ pro standardy léčby, ibrutinib a zanubrutinib. V obou případech byla koncentrace látek potřebná k 50% inhibici růstu buněk Ramos vyšší než $5 \mu\text{M}$. Schválené BTK inhibitory ibrutinib a zanubrutinib tak vykazovaly slabé cytotoxické účinky. Wu et al. (2014) rovněž studovali míru cytotoxicity ibrutinibu na buněčné linii Ramos, přičemž naměřená hodnota GI₅₀ byla vyšší než $10 \mu\text{M}$. Námi naměřené výsledky korespondují s publikovanými daty dřívějších studií a dokazují, že inhibitory BCR obecně vykazují menší cytotoxicitu (v rádech desítek mikromolů), přičemž detailní mechanismus jejich účinku je stále předmětem výzkumu (Balakrishnan et al., 2017; Krajčovičová et al., 2021).

Tab. 6: Cytotoxicita studovaných látek vyjádřena hodnotami GI₅₀ [μM].

| Testovaná látka | Buněčná linie | | | |
|-----------------|-----------------------|-------|-----------------------|-------|
| | Ramos | | K562 | |
| | GI ₅₀ [μM] | SD | GI ₅₀ [μM] | SD |
| ibrutinib | >5 | - | >5 | - |
| zanubrutinib | >5 | - | >5 | - |
| 7471 | 2,727 | 0,674 | >5 | - |
| 7487 | >5 | - | >5 | - |
| 8605 | 3,471 | 1,420 | 1,752 | 0,049 |
| 8606 | 1,707 | 0,101 | 1,406 | 0,053 |
| 8607 | 3,453 | 0,638 | 2,341 | 0,135 |
| 8608 | 1,687 | 0,039 | 0,828 | 0,005 |
| 8609 | 2,135 | 0,528 | 2,537 | 0,569 |
| 8610 | >5 | - | 2,488 | 0,549 |
| 8611 | >5 | - | >5 | - |
| 8612 | 4,748 | 1,437 | 1,492 | 0,039 |
| 8613 | >5 | - | 4,692 | 0,187 |
| 8614 | >5 | - | 3,037 | 0,223 |
| 8615 | >5 | - | 3,153 | 0,066 |

4.2 Imunodetekce proteinů zapojených v signální dráze BTK

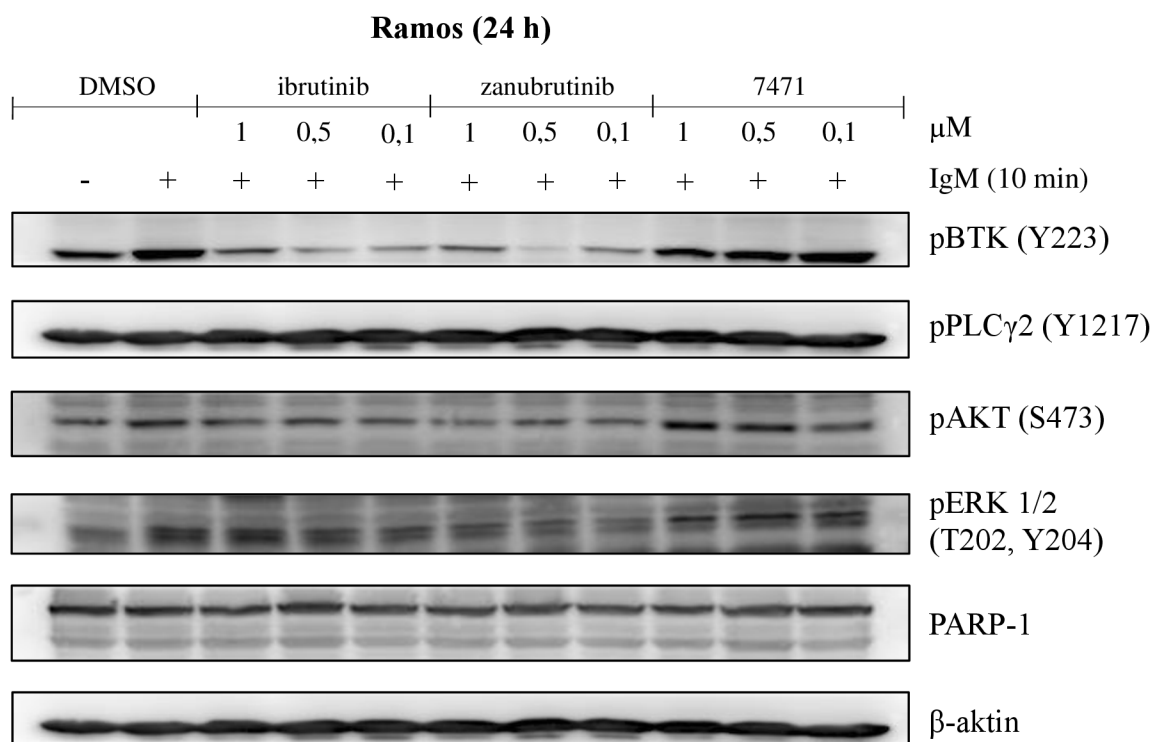
Na základě naměřených hodnot GI₅₀ testovaných látek (viz Tabulka 6) a hodnot IC₅₀ pro rekombinantní kinázu BTK (nepublikovaná data) byla pro další experimenty vybrána látka **7471** za dříve připravenou sérii látek a derivát **8608** ze série nové generace potenciálních BTK inhibitorů. K ověření mechanismu účinků vybraných látek byla provedena imunodetekce klíčových proteinů zapojených do signalizační dráhy kinázy BTK v nádorové buněčné linii Ramos. Signalizace byla v buňkách aktivována přidavkem imunoglobulinu M (5 μg/ml). Detekována byla klíčová kináza přenosu signálu v B-buněčné signalizaci, fosforylovaná forma Brutonovy tyrozinkinázy a jí podřízené signální molekuly, tedy aktivní fosforylované formy enzymů PLCγ2, ERK1/2 a AKT. Dále byl detekován štěpný fragment proteinu PARP-1, který je významným markerem apoptózy. Přítomnost štěpného fragmentu naznačuje, že zkoumané látky v buňkách navozují programovanou buněčnou smrt (Chaitanya et al., 2010). Pro kontrolu rovnoměrného nanesení vzorků byl navíc detekován protein β-aktin.

V první fázi experimentální práce byly buňky Ramos ovlivněny látkou z první série syntetizovaných derivátů, **7471**, a ibrutinibem a zanubrutinibem pro srovnání účinků potenciálního nového BTK inhibitoru a zavedených léčiv. Buňky byly vystaveny přítomnosti látek o koncentraci 0,1 μM , 0,5 μM a 1 μM po dobu 24 hodin. V případě schválených inhibitorů ibrutinibu a zanubrutinibu došlo k poklesu fosforylované formy kinázy BTK již při nejnižší použité koncentraci, a to 0,1 μM . V porovnání s neovlivněnými buňkami byly nižší hladiny fosforylované formy enzymu patrné také u podřízené kinázy AKT. V případě nové látky **7471** nebyly pozorovány změny hladin fosforylovaných kináz zkoumané signální kaskády (Obrázek 4). Látka **7471** v námi použitých koncentracích nezasahuje do přenosu signálu v rámci dráhy kinázy BTK, na rozdíl od zavedených léčiv.

Navíc byl detekován protein PARP-1, a to jak jeho celková forma (116 kDa), tak štěpný fragment zapojený v apoptóze (89 kDa). V popisovaném uspořádání experimentu (24 hodin, nejvyšší koncentrace 1 μM použité látky) nebyla pozorována významná fragmentace proteinu PARP-1 oproti neovlivněným kontrolním vzorkům ani u jedné použité sloučeniny. Výsledek naznačuje, že v této koncentraci nedochází u buněk působením použitých látek ke spuštění programované buněčné smrti, a možný efekt by mohl být pozorován při použití delšího časového intervalu působení látek.

Stejný účinek ibrutinibu na buněčné linii Ramos byl popsán ve studii Chu et al. (2018), kdy byly buňky ovlivněny po dobu 5 dní. Vzhledem k delšímu času působení inhibitoru na buňky v této publikaci, byl pozorovaný efekt látky již v nižších koncentracích (0,1 μM).

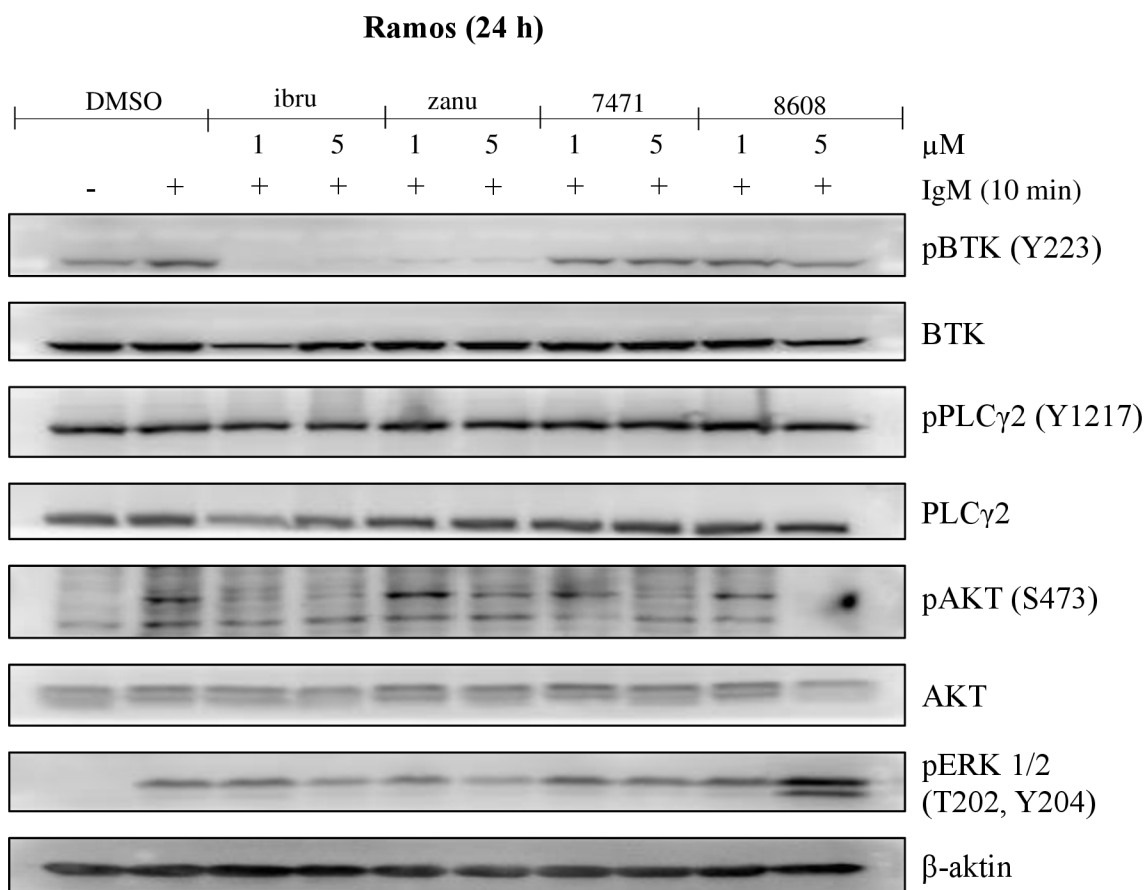
Vliv zanubrutinibu na signalizaci BTK byl prokázán v publikaci Li et al. (2019). Účinnost tohoto BTK inhibitoru druhé generace byla testována na buněčných liniích odvozených od MCL a byl detekován pokles fosforylovaných forem klíčových kináz studované signální kaskády. Navíc byla zaznamenána fragmentace proteinu PARP-1, avšak při ovlivnění několikanásobně vyššími koncentracemi inhibitoru než v našem experimentu (15 μM).



Obr. 4: Imunodetekce vybraných proteinů buněčné linie Ramos ovlivněné ibrutinibem, zanubrutinibem a látkou 7471 po dobu 24 hodin.

V následujícím experimentu byly buňky opět ovlivněny různými koncentracemi vybraných látek: ibrutinibu, zanubrutinibu a **7471** po dobu 24 hodin. Navíc byla testována látka **8608**, z novější série inhibitorů. Na základě výsledků prezentovaných na Obrázku 4 byly v experimentu upraveny použité koncentrace (1 a 5 μM). Z Obrázku 5 je patrné, že látka nové generace purinových derivátů, **8608**, je oproti **7471** do jisté míry účinnější. Po 24hodinovém působení látky **8608** v 5 μM koncentraci na linii Ramos byl zaznamenán mírný pokles fosforylované formy proteinu BTK oproti imunoglobulinem M aktivované kontrole. Dále ve srovnání s ibrutinibem a zanubrutinibem způsobovala látka **8608** významnější inhibici aktivační fosforylace proteinu AKT, a kromě toho byl pozorován i pokles celkového množství tohoto proteinu. Látka **8608** při koncentraci 5 μM nejspíš působí nespecificky, a jelikož je protein AKT zapojený i do jiných signálních drah, dochází v této koncentraci k jeho výraznému poklesu (Qiao et al., 2008). Ovlivnění buněk látkou **8608** v nejvyšší koncentraci však navíc provázal nárůst hladiny fosforylované formy enzymu ERK 1/2. Podobný adaptivní mechanismus byl pozorován u tyrozinkinázových inhibitorů ve studii Bruner et al. (2017), a tento výsledek naznačuje aktivaci alternativních drah a kompenzaci inhibice kináz.

Inhibitory ibrutinib a zanubrutinib v tomto experimentu opět způsobily pokles fosforylované formy kinázy BTK. Inhibice fosforylace kináz BTK a AKT byla oproti výše prezentovaným výsledkům (Obrázek 4) prohloubena díky použití vyšší koncentrace látek. Až na zmíněnou kinázu AKT v případě vlivu 5 μM látky **8608** zůstaly hladiny celkových proteinů při ovlivnění použitými inhibitory bez pozorovatelných změn; látky tedy potenciálně brání fosforylaci proteinů, ale nesnižují jejich celkové množství.

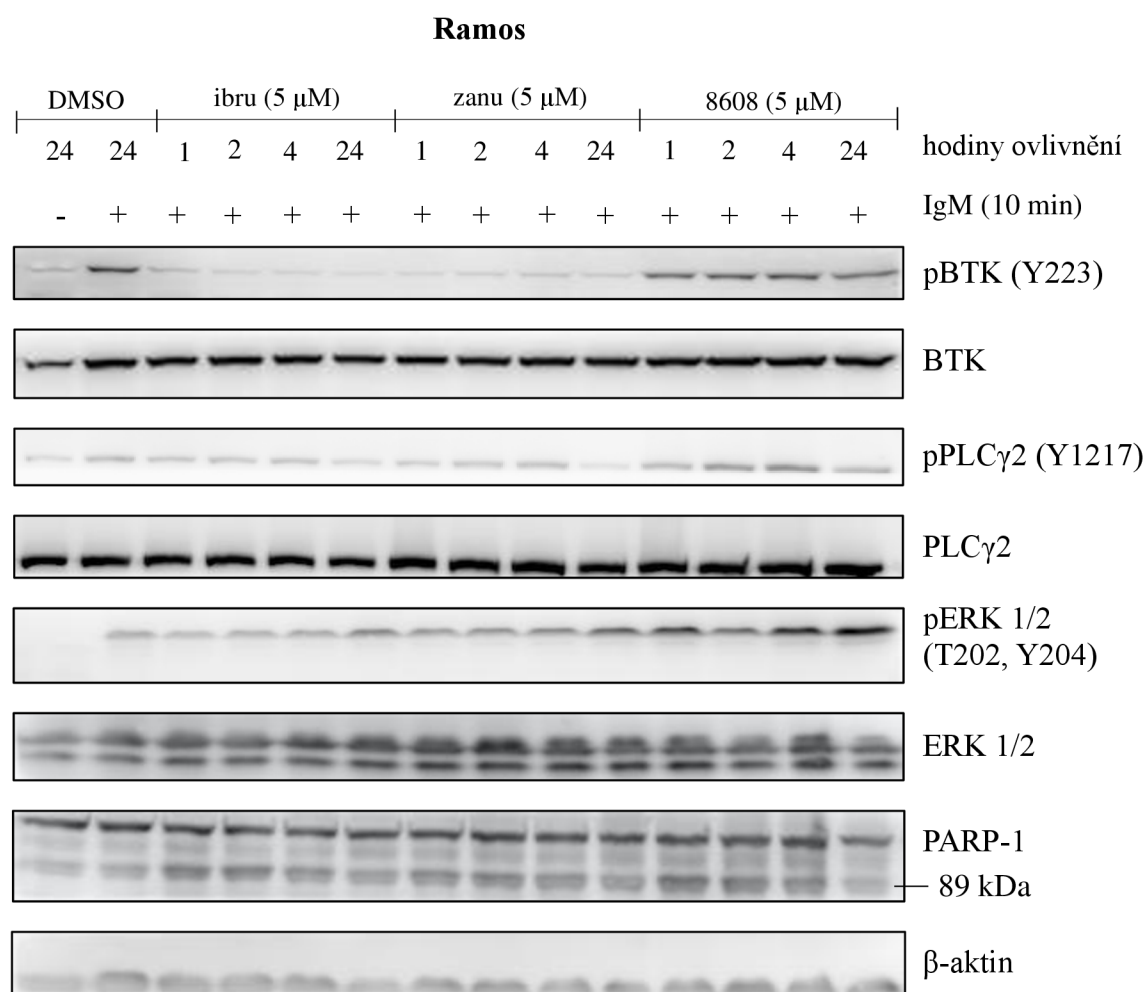


Obr. 5: Imunodetekce vybraných proteinů buněčné linie Ramos ovlivněné ibrutinibem (ibru), zanubrutinibem (zanu) a látkou 7471, 8608 po dobu 24 hodin.

Poslední experiment byl zaměřen na ovlivnění látkami v čase (Obrázek 6). Vybrané sloučeniny (ibrutinib, zanubrutinib a v předchozím experimentu účinná látka **8608**) byly v nejvyšší použité koncentraci (5 μM) testovány v různých časových intervalech. Buňky Ramos byly kultivovány v přítomnosti látek po dobu 1, 2, 4 a 24 hodin. Schválené inhibitory ibrutinib a zanubrutinib byly účinné již po 1 hodině působení. Tyto inhibitory způsobily pokles fosforylované formy kinázy BTK ve všech studovaných časech ovlivnění. Výraznější pokles po 24 hodinách oproti krátkému 1hodinovému ovlivnění byl pozorován v případě zanubrutinibu u podřízené lipázy

PLC γ 2. V případě látky **8608** však nejsou viditelné rozdíly mezi ovlivněním po dobu 1 hodiny a 24 hodin. Oproti neovlivněným kontrolním buňkám došlo k mírné inhibici fosforylace BTK, stejně jako bylo pozorováno u předchozích použití této látky, efekt však s časem prohlouben nebyl.

V případě proteinu PARP-1 je viditelný mírný nárůst štěpného fragmentu 89 kDa oproti neovlivněným kontrolním vzorkům, a to u schválených inhibitorů i u látky **8608**. Tento výsledek dokazuje, že při použité koncentraci 5 μ M dochází k indukci apoptózy (Chaitanya et al., 2010).



Obr. 6: Imunodetekce vybraných proteinů buněčné linie Ramos ovlivněné ibrutinibem (ibru), zanubrutinibem (zanu) a látkou 8608 po dobu 1, 2, 4 a 24 hodin.

4.3 Analýza buněčného cyklu

Dalším cílem práce bylo prozkoumat vliv vybraných potenciálních inhibitorů BTK na buněčný cyklus. Byla provedena analýza buněčného cyklu buněk Ramos pomocí průtokového cytometru. Buněčná linie byla ovlivněna schválenými inhibitory ibrutinibem, zanubrutinibem, a novými látkami **7471** a **8608** o koncentraci 1 μM a 5 μM . Po 24hodinovém ovlivnění byly buňky sklizeny a analyzovány průtokovým cytometrem.

Souhrnný graf znázorňující zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu je zobrazen na Grafu 1. Z grafu je patrné, že v případě schváleného inhibitoru nové generace, zanubrutinibu, docházelo ke G1 bloku, a to při vyšší koncentraci 5 μM .

Stejné účinky zanubrutinibu byly prokázány v publikaci Tarantelli et al. z roku 2019. Zanubrutinib způsoboval klasický G1 blok již v submikromolekulárních koncentracích, přičemž se studie zaměřovala na jiný typ lymfomu než v případě předložené bakalářské práce.

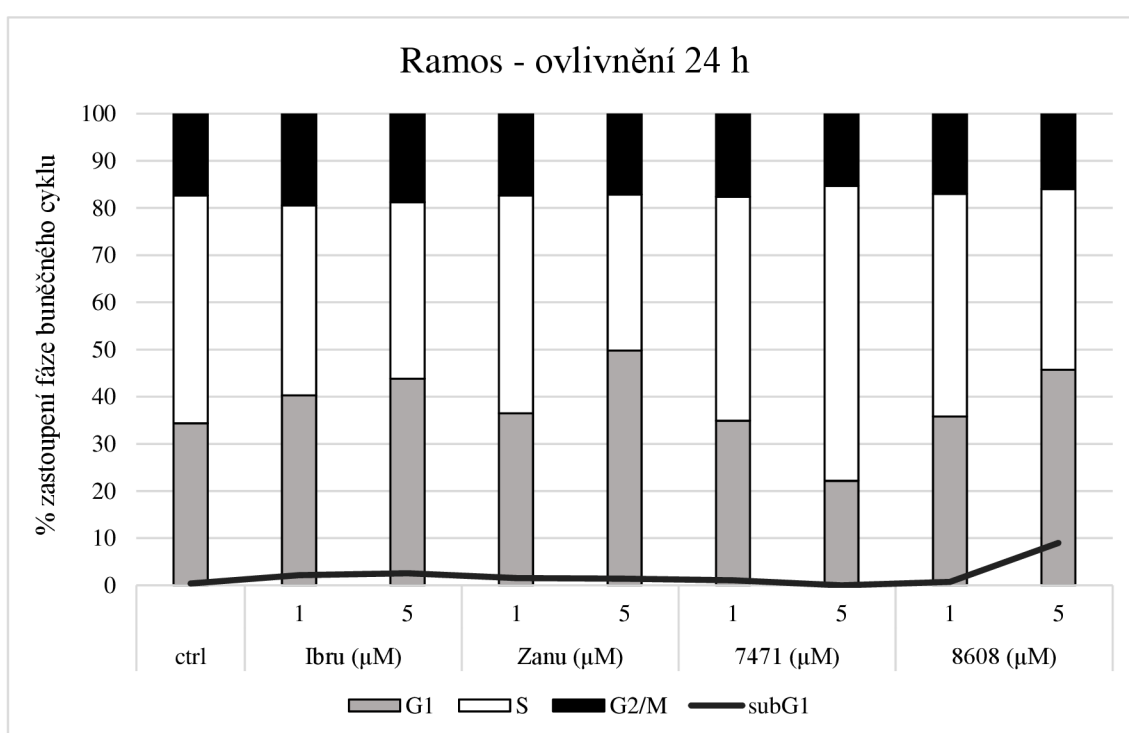
Ve studii Guo et al. (2019) byl pozorován blok G1 fáze cyklu u linie Ramos po použití 1 μM koncentrace ibrutinibu. V našem případě byl pozorován pouze mírný nárůst zastoupení buněk v G1 fázi oproti neovlivněnému kontrolnímu vzorku až při koncentraci 5 μM . Oproti publikovaným výsledkům nešlo navíc o významný blok G1 fáze, jako bylo možné pozorovat ve výše popsaném případě zanubrutinibu.

Po použití látky **8608** z nové série byl výsledek obdobný jako u ibrutinibu, sledovali jsme zvýšené zastoupení buněk ve fázi G1, a to po použití koncentrace 5 μM . Při této koncentraci navíc mírně vzrůstal podíl buněčných fragmentů v populaci subG1, což značí úmrtí buněk vlivem látky **8608**. U schválených inhibitorů BTK nebyl zvýšený podíl odumřelých buněk pozorován.

Li et al. v roce 2019 syntetizovali 2-fenylpyrimidinové deriváty, přičemž stanovili jejich předběžné účinky na B-lymfocyty a kinázu BTK. Analýza buněčného cyklu byla provedena taktéž na buněčné linii Ramos, přičemž linie byla ovlivněna látkami o koncentraci 5 μM po dobu 48 hodin. Sloučenina **11g** vykazovala nejlepší inhibiční účinky, a stejně jako látka **8608** způsobila zvýšení podílu buněk Ramos ve fázi G1, přičemž účinek byl prohlouben dobou působení látky.

Publikovaná data prezentují inhibitory BTK jako látky způsobující blokaci buněčného cyklu v jeho G1 fázi. Námi získané výsledky nenaznačily srovnatelně signifikantní G1 blok, nicméně nárůst buněk v této fázi cyklu byl pozorován pro schválené inhibitory i látku nové generace, **8608**.

Látka **7471** ze starší série naopak způsobila překvapivě nárůst počtu buněk v S fázi buněčného cyklu, což mohlo být způsobeno její nízkou selektivitou. Mizenina et al. (2004) prezentovali vliv nových pyrido[2,3-d]pyrimidinových derivátů na buněčný cyklus linie MDA-MB-468. Jedná se o selektivní SRC inhibitory, přičemž do SRC rodiny patří například kináza SRC, BLK, YES, ale také kináza LYN, zapojená v signalizaci B-buněčného receptoru (Boggon et al., 2004). Bylo zjištěno, že jimi testované látky **PD173952**, **PD179483** a **PD166326** způsobily zvýšení podílu buněk v S fázi buněčného cyklu, stejně jako námi testovaná látka **7471**. Blok S fáze je v této studii spojován s *in vitro* inhibicí kinázy WEE1, která zprostředkovává regulaci buněčného cyklu.



Graf 1: Výsledky analýzy buněčného cyklu u linie Ramos - procentuální zastoupení v jednotlivých fázích buněčného cyklu ovlivněné ibrutinibem (ibru), zanubrutinibem (zanu), látkou 7471 a 8608 po dobu 24 hodin.

5 ZÁVĚR

Brutonova tyrozinkináza (BTK) představuje nezbytnou součást signální dráhy B-buněčného receptoru, kaskády klíčové pro proliferaci, zrání a přežití B-lymfocytů. Alterace v expresi a aktivitě kinázy BTK bývá spojována s vývojem B-buněčných malignit, a právě proto je důležitým terapeutickým cílem. Dynamický rozvoj na poli výzkumu a syntézy BTK inhibitorů, jejich zavedení do klinických studií a praxe v posledních letech významně rozšířily možnosti léčby hematologických malignit.

V rámci teoretické části předložené bakalářské práce byla charakterizována Brutonova tyrozinkináza a její zapojení v signalizaci B-buněčného receptoru. Rešerše se dále zabírala popisem regulace signalizační dráhy BTK, jejím možným ovlivněním nízkomolekulárními inhibitory včetně schválených léčiv a popisem indikovaných onkologických onemocnění.

V rámci experimentální části práce byla posouzena cytotoxická aktivita látek ze série nově připravených, dosud nepublikovaných 2,6,9-trisubstituovaných purinových derivátů. Látky byly vyvinuty jako potenciální inhibitory kináz BTK a BCR-ABL. Na základě těchto dat a výsledků biochemické inhibice rekombinantních kináz BTK a BCR-ABL byly vybrány dvě kandidátní látky, **7471** a **8608**. Pomocí molekulárně-biochemických metod byly dále charakterizovány některé biologické účinky vybraných potenciálních BTK inhibitorů se zaměřením na jejich srovnání s komerčními, k léčbě schválenými inhibitory ibrutinibem a zanubrutinibem. Konkrétně byl zkoumán vliv látek na proteiny zapojené v signální dráze BTK a jejich efekt na průběh buněčného cyklu.

Z výsledků imunodetekce byl patrný významný efekt schválených BTK inhibitorů, ibrutinibu a zanubrutinibu, v porovnání s nově syntetizovanými látkami. Mírnou inhibicí fosforylace klíčové kinázy BTK bylo možné sledovat pouze při použití vysoké koncentrace látky **8608** při 24h ovlivnění, nikoliv však v případě vystavení buněk látce **7471**.

V analýze buněčného cyklu byl pozorován nárůst počtu buněk v G1 fázi u obou schválených inhibitorů a u látky **8608**. Výsledek naznačuje potenciální schopnost nově syntetizované látky způsobovat blokaci cyklu v této fázi, což je v souladu s jinými publikacemi studující inhibitory BCR dráhy. Látka **7471** způsobila na rozdíl od ostatních studovaných sloučenin překvapivě nárůst počtu buněk v S fázi buněčného cyklu.

Výsledky imunodetekce proteinů i analýzy buněčného cyklu poukazují na nespecifitu a nízkou selektivitu látky **7471**. Co se týče efektivity inhibice signalizační

kaskády BTK však není ani oproti **7471** potentnější látka **8608** zdaleka tak účinná jako schválená léčiva. Předmětem dalšího zkoumání by mohl být vliv nově syntetizovaných látek na jiné onkogenní kinázy, jako je například BCR-ABL.

6 POUŽITÁ LITERATURA

Alizadeh A. A., Eisen M. B., Davis R. E., Ma C., Lossos I. S., Rosenwald A., Boldrick J. C., Sabet H., Tran T., Yu X., Powell J. I., Yang L., Marti G. E., Moore T., Hudson J. Jr., Lu L., Lewis D. B., Tibshirani R., Sherlock G., Chan W. C., Greiner T. C., Weisenburger D. D., Armitage J. O., Warnke R., Levy R., Wilson W., Grever M.R., Byrd J. C., Botstein D., Brown P. O., Staudt L. M. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, **403**, 503-11.

Angst D., Gessier F., Janser P., Vulpetti A., Wälchli R., Beerli C., Littlewood-Evans A., Dawson J., Nuesslein-Hildesheim B., Wieczorek G., Gutmann S., Scheufler C., Hinniger A., Zimmerlin A., Funhoff E. G., Pulz R., Cenni B. (2020). Discovery of LOU064 (Remibrutinib), a Potent and Highly Selective Covalent Inhibitor of Bruton's Tyrosine Kinase. *Journal of Medicinal Chemistry*, **63**, 5102-5118.

Balakrishnan K., Bojja K., Decker W. K. Keating M. J. (2017). Hide and seek: the game between chronic lymphocytic leukaemia cells and b cell receptor signalling inhibitors. *European Medical Journal*, **2**, 24-30.

Bence K., Ma W., Kozasa T., Huang X. Y. (1997). Direct stimulation of Bruton's tyrosine kinase by G(q)-protein alpha-subunit. *Nature*, **389**, 296-9.

Berglöf A., Hamasy A., Meinke S., Palma M., Krstic A., Månsson R., Kimby E., Österborg A., Smith C. I. (2015). Targets for Ibrutinib Beyond B Cell Malignancies. *Scandinavian journal of immunology*, **82**, 208–217.

Bernard S., Danglade D., Gardano L., Laguillier C., Lazarian G., Roger C., Thieblemont C., Marzec J., Gribben J., Cymbalista F., Varin-Blank N., Ledoux D., Baran-Marszak F. (2015). Inhibitors of BCR signalling interrupt the survival signal mediated by the micro-environment in mantle cell lymphoma. *International Journal of Cancer*, **136**, 2761-74.

Bertrand J., Dostálová H., Krystof V., Jorda R., Castro A., Mella J., Espinosa-Bustos C., María Zarate A., Salas C. O. (2020). New 2,6,9-trisubstituted purine derivatives as Bcr-Abl and Btk inhibitors and as promising agents against leukemia. *Bioorganic Chemistry*, **94**, 103361.

Boggon T., Eck M. (2004). Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene*, **23**, 7918–7927.

Brullo C., Villa C., Tasso, B., Russo E., Spallarossa A. (2021). Btk Inhibitors: A Medicinal Chemistry and Drug Delivery Perspective. *International journal of molecular sciences*, **22**, 7641.

Bruner J. K., Ma H. S., Li L., Qin A., Rudek M. A., Jones R. J., Levis M. J., Pratz K. W., Pratilas C. A., Small D. (2017). Adaptation to TKI Treatment Reactivates ERK Signaling in Tyrosine Kinase-Driven Leukemias and Other Malignancies. *Cancer research*, **77**, 5554–5563.

Caldwell R. D., Qiu H., Askew B. C., Bender A. T., Brugger N., Camps M., Dhanabal M., Dutt V., Eichhorn T., Gardberg A. S., Goutopoulos A., Grenningloh R., Head J., Healey B., Hodous B. L., Huck B. R., Johnson T. L., Jones C., Jones R. C., Mochalkin I., Morandi F., Nguyen N., Meyring M., Potnick J. R., Santos D. C., Schmidt R., Sherer B., Shutes A., Urbahns K., Follis A. V., Wegener A. A., Zimmerli S. C., Liu-Bujalski L. (2019). Discovery of Evobrutinib: An Oral, Potent, and Highly Selective, Covalent Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) Inhibitor for the Treatment of Immunological Diseases. *Journal of Medicinal Chemistry*, **62**, 7643-7655.

Catlett I. M., Nowak M., Kundu S., Zheng N., Liu A., He B., Girgis I. G., Grasela D. M. (2020). Safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of branebrutinib (BMS-986195), a covalent, irreversible inhibitor of Bruton's tyrosine kinase: Randomised phase I, placebo-controlled trial in healthy participants. *British journal of clinical pharmacology*, **86**, 1849–1859.

Chaitanya G. V., Steven A. J., Babu P. P. (2010). PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell communication and signaling*, **8**, 31.

Charalambous A., Schwarzbich M. A., Witzens-Harig M. (2018) Ibrutinib. *Recent Results Cancer Research*, **212**, 133-168.

Chu Y., Lee S., Shah T., Yin C., Barth M., Miles R. R., Ayello J., Morris E., Harrison L., Van de Ven C., Galardy P., Goldman S. C., Lim M. S., Hermiston M., McAllister-Lucas L. M., Giulino-Roth L., Perkins S. L., Cairo M. S. (2018). Ibrutinib significantly inhibited Bruton's tyrosine kinase (BTK) phosphorylation, in-vitro proliferation and enhanced overall survival in a preclinical Burkitt lymphoma (BL) model. *Oncoimmunology*, **8**, e1512455.

Cinar M., Hamedani F., Mo Z., Cinar B., Amin H. M., Alkan S. (2013). Bruton tyrosine kinase is commonly overexpressed in mantle cell lymphoma and its attenuation by Ibrutinib induces apoptosis. *Leukemia Research*, **37**, 1271-7.

Colomer D., Campo E. (2014). Unlocking new therapeutic targets and resistance mechanisms in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell*, **25**, 7-9.

Conconi A., Franceschetti S., Aprile von Hohenstaufen K., Margiotta-Casaluci G., Stathis A., Moccia A. A., Bertoni F., Ramponi A., Mazzucchelli L., Cavalli F., Gaidano G., Zucca E. (2015). Histologic transformation in marginal zone lymphomas. *Annals of Oncology*, **26**, 2329-35.

Corneth O. B. J., Klein Wolterink R. G. J., Hendriks R. W. (2015). BTK Signaling in B Cell Differentiation and Autoimmunity. *Current Topics in microbiology and immunology*, **393**, 67.

Damm F., Mylonas E., Cosson A., Yoshida K., Della Valle V., Mouly E., Diop M., Scourzic L., Shiraishi Y., Chiba K., Tanaka H., Miyano S., Kikushige Y., Davi F., Lambert J., Gautheret D., Merle-Béral H., Sutton L., Dessen P., Solary E., Akashi K., Vainchenker W., Mercher T., Droin N., Ogawa S., Nguyen-Khac F., Bernard O. A. (2014). Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients. *Cancer Discovery*, **4**, 1088-101.

Davis R. E., Ngo V. N., Lenz G., Tolar P., Young R. M., Romesser P. B., Kohlhammer H., Lamy L., Zhao H., Yang Y., Xu W., Shaffer A. L., Wright G., Xiao W., Powell J., Jiang J. K., Thomas C. J., Rosenwald A., Ott G., Muller-Hermelink H. K., Gascoyne R. D., Connors J. M., Johnson N. A., Rimsza L. M., Campo E., Jaffe E. S., Wilson W. H., Delabie J., Smeland E. B., Fisher R. I., Braziel R. M., Tubbs R. R., Cook J. R., Weisenburger D. D., Chan W. C., Pierce S. K., Staudt L. M. (2010). Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*, **463**, 88-92.

de Claro R. A., McGinn K. M., Verdun N., Lee S. L., Chiu H. J., Saber H., Brower M. E., Chang C. J., Pfuma E., Habtemariam B., Bullock J., Wang Y., Nie L., Chen X. H., Lu D. R., Al-Hakim A., Kane R. C., Kaminskas E., Justice R., Farrell A. T., Pazdur R. (2015). FDA Approval: Ibrutinib for Patients with Previously Treated Mantle Cell Lymphoma and Previously Treated Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clinical Cancer Research*, **21**, 3586-90.

de Rooij M. F., Kuil A., Geest C. R., Eldering E., Chang B. Y., Buggy J. J., Pals S. T., Spaargaren M. (2012). The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor- and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **119**, 2590-4.

Estupiñán H. Y., Berglöf A., Zain R., Smith C. I. E. (2021). Comparative Analysis of BTK Inhibitors and Mechanisms Underlying Adverse Effects. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **9**, 630942.

George B., Chowdhury S. M., Hart A., Sircar A., Singh S. K., Nath U. K., Mamgain M., Singhal N. K., Sehgal L., Jain N. (2020). Ibrutinib Resistance Mechanisms and Treatment Strategies for B-Cell lymphomas. *Cancers*, **12**, 1328.

Guo X., Yang D., Fan Z., Zhang N., Zhao B., Huang C., Wang F., Ma R., Meng M., Deng Y. (2019). Discovery and structure-activity relationship of novel diphenylthiazole derivatives as BTK inhibitor with potent activity against B cell lymphoma cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **178**, 767-781.

Guo Y., Liu Y., Hu N., Yu D., Zhou C., Shi G., Zhang B., Wei M., Liu J., Luo L., Tang Z., Song H., Guo Y., Liu X., Su D., Zhang S., Song X., Zhou X., Hong Y., Chen S., Cheng Z., Young S., Wei Q., Wang H., Wang Q., Lv L., Wang F., Xu H., Sun H., Xing H., Li N., Zhang W., Wang Z., Liu G., Sun Z., Zhou D., Li W., Liu L., Wang L., Wang Z. (2019). Discovery of Zanubrutinib (BGB-3111), a Novel, Potent, and Selective Covalent Inhibitor of Bruton's Tyrosine Kinase. *Journal of Medicinal Chemistry*, **62**, 7923-7940.

Hansson H., Okoh M. P., Smith C. I. E., Vihinen M., Härd T. (2001). Intermolecular interactions between the SH3 domain and the proline-rich TH region of Bruton's tyrosine kinase. *FEBS Letters*, **489**, 67-70.

Hazen A. L., Smith M. J., Despons C., Winter O., Moser K., Kerr W. G. (2009). SHIP is required for a functional hematopoietic stem cell niche. *Blood*, **113**, 2924–2933.

Hendriks R., Yuvaraj S., Kil L. (2014). Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. *Nature Reviews Cancer*, **14**, 219–232.

Herman S. E., Gordon A. L., Hertlein E., Ramanunni A., Zhang X., Jaglowski S., Flynn J., Jones J., Blum K. A., Buggy J. J., Hamdy A., Johnson A. J., Byrd J. C. (2011). Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood*, **117**, 6287–6296.

Hillmen P., Brown J. R., Eichhorst B. F., Lamanna N., O'Brien S. M., Qiu L., Salmi T., Hilger J., Wu K., Cohen A., Huang J., Tam C. S. (2020). ALPINE: zanubrutinib versus ibrutinib in relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Future Oncology*, **16**, 517-523.

Honigberg L. A., Smith A. M., Sirisawad M., Verner E., Loury D., Chang B., Li S., Pan Z., Thamm D. H., Miller R. A., Buggy J. J. (2010). The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 13075–13080.

Horsman D. E., Okamoto I., Ludkovski O., Le N., Harder L., Gesk S., Siebert R., Chhanabhai M., Sehn L., Connors J. M., Gascoyne R. D. (2003). Follicular lymphoma lacking the t(14;18)(q32;q21): identification of two disease subtypes. *British Journal of Haematology*, **120**, 424-33.

Hu N., Wang F., Sun T., Xu Z., Zhang J., Bernard D., Xu S., Wang S., Kaminski M., Devata S., Phillips T., Malek S. N. (2021). Follicular Lymphoma-associated BTK Mutations are Inactivating Resulting in Augmented AKT Activation. *Clinical Cancer Research*, **27**, 2301-2313.

- Huth F., Schiller H., Jin Y., Poller B., Schuhler C., Weis W., Woessner R., Drollmann A., End P. (2022). Novel Bruton's Tyrosine Kinase inhibitor remibrutinib: Drug-drug interaction potential as a victim of CYP3A4 inhibitors based on clinical data and PBPK modeling. *Clinical and Translational Science*, **15**, 118-129.
- Inabe K., Ishiai M., Scharenberg A. M., Freshney N., Downward J., Kurosaki T. (2002). Vav3 modulates B cell receptor responses by regulating phosphoinositide 3-kinase activation. *The Journal of experimental medicine*, **195**, 189–200.
- Issa G. C., Ghobrial I. M., Roccaro A. M. (2011). Novel agents in Waldenström macroglobulinemia. *Clinical investigation*, **1**, 815–824.
- Jiang Z., Liang Z., Shen B., Hu, G. (2015). Computational Analysis of the Binding Specificities of PH Domains. *BioMed research international*, 792904.
- Kapteijn A., de Bruin G., Emmelot-van Hoek M., van de Kar B., de Jong A., Gulrajani M., Demont D., Covey T., Mittag D., Barf T. (2018). Potency and Selectivity of BTK Inhibitors in Clinical Development for B-Cell Malignancies. *Blood*, **132**, 1871.
- Kaul M., End P., Cabanski M., Schuhler C., Jakab A., Kistowska M., Kinshikar A., Maiolica A., Sinn A., Fuhr R., Cenni B. (2021). Remibrutinib (LOU064): A selective potent oral BTK inhibitor with promising clinical safety and pharmacodynamics in a randomized phase I trial. *Clinical and Translational Science*, **14**, 1756-1768.
- Kim E., Hurtz C., Koehrer S., Wang Z., Balasubramanian S., Chang B. Y., Müschen M., Davis R. E., Burger J. A. (2017). Ibrutinib inhibits pre-BCR+ B-cell acute lymphoblastic leukemia progression by targeting BTK and BLK. *Blood*, **129**, 1155-1165.
- Krajčovičová S., Jorda R., Vanda D., Soural M., Kryštof V. (2021). 1,4,6-Trisubstituted imidazo[4,5-c]pyridines as inhibitors of Bruton's tyrosine kinase. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **211**, 113094.
- Krens S. F., Spaink H. P., Snaar-Jagalska B. E. (2006). Functions of the MAPK family in vertebrate-development. *FEBS Letters*, **580**, 4984-90.
- Kriegsmann K., Kriegsmann M., Witzens-Harig M. (2018). Acalabrutinib, A Second-Generation Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor. *Recent Results in Cancer Research*, **212**, 285-294.
- Li C. J., Jiang C., Liu Y., Bell T., Ma W., Ye Y., Huang S., Guo H., Zhang H., Wang L., Wang J., Nomie K., Zhang L., Wang M. (2019). Pleiotropic Action of Novel Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor BGB-3111 in Mantle Cell Lymphoma. *Molecular cancer therapeutics*, **18**, 267–277.
- Licican A., Serafini L., Xing W., Czerwieńiec G., Steiner B., Wang T., Brendza K. M., Lutz J. D., Keegan K. S., Ray A. S., Schultz B. E., Sakowicz R., Feng J. Y. (2020). Biochemical characterization of tirabrutinib and other irreversible inhibitors of Bruton's tyrosine kinase reveals differences in on - and off - target inhibition. *Biochimica et Biophysica Acta General Subjects*, **1864**, 129531.
- Limon J. J., Fruman D. A. (2012). Akt and mTOR in B Cell Activation and Differentiation. *Frontiers in immunology*, **3**, 228.
- Liu J., Chen C., Wang D., Zhang J., Zhang T. (2021). Emerging small-molecule inhibitors of the Bruton's tyrosine kinase (BTK): Current development. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **217**, 113329.

- Liu W., Meckel T., Tolar P., Sohn H. W., Pierce S. K. (2010). Intrinsic properties of immunoglobulin IgG1 isotype-switched B cell receptors promote microclustering and the initiation of signaling. *Immunity*, **32**, 778–789.
- Liu Y., Dong Y., Jiang Q. L., Zhang B., Hu A. M. (2014). Bruton's tyrosine kinase: potential target in human multiple myeloma. *Leukemia & Lymphoma*, **55**, 177-81.
- Marcotte D. J., Liu Y. T., Arduini R. M., Hession C. A., Miatkowski K., Wildes C. P., Cullen P. F., Hong V., Hopkins B. T., Mertsching E., Jenkins T. J., Romanowski M. J., Baker D. P., Silvian L. F. (2010). Structures of human Bruton's tyrosine kinase in active and inactive conformations suggest a mechanism of activation for TEC family kinases. *Protein Science*, **19**, 429-39.
- Markham A., Dhillon S. (2018). Acabrutinib: First Global Approval. *Drugs*, **78**, 139-145.
- Miao Y, Xu W, Li J. (2021). Assessing the pharmacokinetics of acalabrutinib in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, **17**,1023-1030.
- Mizenina O. A., Moasser M. M. (2004). S-phase inhibition of cell cycle progression by a novel class of pyridopyrimidine tyrosine kinase inhibitors. *Cell Cycle*, **3**, 796-803.
- Mohamed A. J., Yu L., Bäckesjö C. M., Vargas L., Faryal R., Aints A., Christensson B., Berglöf A., Vihinen M., Nore B. F., Smith C. I. (2009). Bruton's tyrosine kinase (Btk): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain. *Immunological Reviews*, **228**, 58-73.
- Murdoch C., Finn A. (2000). Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*, **95**, 3032-43.
- Navarro A., Beà S., Jares P., Campo E. (2020). Molecular Pathogenesis of Mantle Cell Lymphoma. *Hematology oncology clinics of North America*, **34**, 795–807.
- Narita Y., Nagane M., Mishima K., Terui Y., Arakawa Y., Yonezawa H., Asai K., Fukuhara N., Sugiyama K., Shinjima N., Kitagawa J., Aoi A., Nishikawa R. (2021). Phase I/II study of tirabrutinib, a second-generation Bruton's tyrosine kinase inhibitor, in relapsed/refractory primary central nervous system lymphoma. *Neuro-oncology*, **23**, 122–133.
- Nicolson P., Hughes C. E., Watson S., Nock S. H., Hardy A. T., Watson C. N., Montague S. J., Clifford H., Huissoon A. P., Malcor J. D., Thomas M. R., Pollitt A. Y., Tomlinson M. G., Pratt G., Watson S. P. (2018). Inhibition of Btk by Btk-specific concentrations of ibrutinib and acalabrutinib delays but does not block platelet aggregation mediated by glycoprotein VI. *Haematologica*, **103**, 2097–2108.
- Nimmerjahn F., Ravetch J. V. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews Immunology*, **8**, 34-47.
- Nishizumi H., Horikawa K., Mlinaric-Rascan I., Yamamoto T. (1998). A double-edged kinase Lyn: a positive and negative regulator for antigen receptor-mediated signals. *The Journal of experimental medicine*, **187**, 1343–1348.
- Noble M. E., Musacchio A., Saraste M., Courtneidge S. A., Wierenga R. K. (1993). Crystal structure of the SH3 domain in human Fyn; comparison of the three-dimensional structures of SH3 domains in tyrosine kinases and spectrin. *The EMBO journal*, **12**, 2617–2624.

- Novero A., Ravella P. M., Chen Y., Dous G., Liu D. (2014). Ibrutinib for B cell malignancies. *Experimental hematology & oncology*, **3**, 4.
- Noy A., de Vos S., Thieblemont C., Martin P., Flowers C. R., Morschhauser F., Collins G. P., Ma S., Coleman M., Peles S., Smith S., Barrientos J. C., Smith A., Munneke B., Dimery I., Beaupre D. M., Chen R (2017). Targeting Bruton tyrosine kinase with ibrutinib in relapsed/refractory marginal zone lymphoma. *Blood*, **129**, 2224-2232.
- Okada T., Ngo V. N., Ekland E. H., Förster R., Lipp M., Littman D. R., Cyster J. G. (2002). Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *The Journal of experimental medicine*, **196**, 65-75.
- Ondrisova, L., Mraz, M. (2020). Genetic and Non-Genetic Mechanisms of Resistance to BCR Signaling Inhibitors in B Cell Malignancies. *Frontiers in oncology*, **10**, 591577.
- Palma M., Mulder T. A., Österborg A. (2021). BTK Inhibitors in Chronic Lymphocytic Leukemia: Biological Activity and Immune Effects. *Frontiers in immunology*, **12**, 686768.
- Petro J. B., Khan W. N. (2001). Phospholipase C-gamma 2 couples Bruton's tyrosine kinase to the NF-kappaB signaling pathway in B lymphocytes. *The Journal of biological chemistry*, **276**, 1715-9
- Phadnis-Moghe A. S., Li J., Crawford R. B., Kaminski N. E. (2016). SHP-1 is directly activated by the aryl hydrocarbon receptor and regulates BCL-6 in the presence of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Toxicology and applied pharmacology*, **310**, 41-50.
- Ponader S., Burger J. A. (2014). Bruton's tyrosine kinase: from X-linked agammaglobulinemia toward targeted therapy for B-cell malignancies. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **32**, 1830-1839.
- Pontoriero M., Fiume G., Vecchio E., de Laurentiis A., Albano F., Iaccino E., Mimmi S., Pisano A., Agosti V., Giovannone E., Altobelli A., Caiazza C., Mallardo M., Scala G., Quinto I. (2019). Activation of NF-κB in B cell receptor signaling through Bruton's tyrosine kinase-dependent phosphorylation of IκB-α. *Journal of Molecular Medicine (Berl)*, **97**, 675-690.
- Qiao M., Sheng S., Pardee A. B. (2008). Metastasis and AKT activation. *Cell Cycle*, **7**, 2991-6.
- Rajkumar S. V., Gahrton G., Bergsagel P. L. (2011). Approach to the treatment of multiple myeloma: a clash of philosophies. *Blood*, **118**, 3205-3211.
- Rip J., de Bruijn M. J. W., Appelman M. K., Pal Singh S., Hendriks R. W., Corneth O. B. J. (2019). Toll-Like Receptor Signaling Drives Btk-Mediated Autoimmune Disease. *Frontiers in Immunology*, **10**, 95.
- Saito K., Scharenberg A.M., Kinet J.P. (2001). Interaction between the Btk PH domain and phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate directly regulates Btk. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 16201-6.
- Satterthwaite A. B., Cheroutre H., Khan W. N., Sideras P., Witte O. N. (1997). Btk dosage determines sensitivity to B cell antigen receptor cross-linking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 13152-13157.
- Singh P. S., Dammeijer F., Hendriks R. W. (2018). Role of Bruton's tyrosine kinase in B cells and malignancies. *Molecular cancer*, **17**, 57.

Syed Y. Y. (2020). Zanubrutinib: First Approval. *Drugs*, **80**, 91-97.

Tam C. S., Dimopoulos M., Garcia-Sanz R., Trotman J., Opat S., Roberts A. W., Owen R., Song Y., Xu W., Zhu J., Li J., Qiu L., D'Sa S., Jurczak W., Cull G., Marlton P., Gottlieb D., Munoz J., Phillips T., Du C., Jurczak W., Cull G., Marlton P., Gottlieb D., Munoz J., Phillips T., Du C., Ji M., Zhou L., Guo H, Zhu H, Chan WY, Cohen A, Novotny W., Huang J., Tedeschi A. (2022). Pooled safety analysis of zanubrutinib monotherapy in patients with B-cell malignancies. *Blood advances*, **6**, 1296–1308.

Tam C. S., Opat S., D'Sa S., Jurczak W., Lee H. P., Cull G., Owen R. G., Marlton P., Wahlin B. E., Sanz R. G., McCarthy H., Mulligan S., Tedeschi A., Castillo J. J., Czyz J., Fernández de Larrea C., Belada D., Libby E., Matous J. V., Motta M., Siddiqi T., Tani M., Trneny M., Minnema M. C., Buske C., Leblond V., Trotman J., Chan W. Y., Schneider J., Ro S., Cohen A., Huang J., Dimopoulos M. (2020). A randomized phase 3 trial of zanubrutinib vs ibrutinib in symptomatic Waldenström macroglobulinemia: the ASPEN study. *Blood*, **136**, 2038-2050.

Tam C. S., Trotman J., Opat S., Burger J. A., Cull G., Gottlieb D., Harrup R., Johnston P. B., Marlton P., Munoz J., Seymour J. F., Simpson D., Tedeschi A., Elstrom R., Yu Y., Tang Z., Han L., Huang J., Novotny W., Wang L., Roberts A. W. (2019). Phase 1 study of the selective BTK inhibitor zanubrutinib in B-cell malignancies and safety and efficacy evaluation in CLL. *Blood*, **134**, 851–859.

Taneichi H., Kanegane H., Sira M. M., Futatani T., Agematsu K., Sako M., Kaneko H., Kondo N., Kaisho T., Miyawaki T. (2008). Toll-like receptor signaling is impaired in dendritic cells from patients with X-linked agammaglobulinemia. *Clinical Immunology*, **126**, 148-54.

Tarantelli C., Zhang L., Curti E., Gaudio E., Spriano F., Priebe V., Cascione L., Arribas A. J., Zucca E., Rossi D., Stathis A., Bertonni F. (2019). The Bruton tyrosine kinase inhibitor zanubrutinib (BGB-3111) demonstrated synergies with other anti-lymphoma targeted agents. *Haematologica*, **104**, e307–e309.

Thomas J.D., Sideras P., Smith C.I., Vorechovský I., Chapman V., Paul W.E. (1993). Colocalization of X-linked agammaglobulinemia and X-linked immunodeficiency genes. *Science*, **261**, 355-8.

Tzeng S. R., Pai M. T., Lung F. D., Wu C. W., Roller P. P., Lei B., Wei C. J., Tu S. C., Chen S. H., Soong W. J., Cheng J. W. (2000). Stability and peptide binding specificity of Btk SH2 domain: molecular basis for X-linked agammaglobulinemia. *Protein Science*, **9**, 2377-85.

von Hundelshausen P., Siess W. (2021). Bleeding by Bruton Tyrosine Kinase-Inhibitors: Dependency on Drug Type and Disease. *Cancers*, **13**, 1103.

Walliser C., Wist M., Hermkes E., Zhou Y., Schade A., Haas J., Deinzer J., Désiré L., Li S., Stilgenbauer S., Milner J. D., Gierschik P. (2018). Functional characterization of phospholipase C- γ 2 mutant protein causing both somatic ibrutinib resistance and a germline monogenic autoinflammatory disorder. *Oncotarget*, **9**, 34357–34378.

Wang J. Y. (2020). B Cell Receptor Signaling. In: *B Cells in Immunity and Tolerance*, editorial. Singapore: Springer Singapore, 23-36.

Wang K., Yao X., Zhang M., Liu D., Gao Y., Sahasranaman S., Ou Y. C. (2021). Comprehensive PBPK model to predict drug interaction potential of Zanubrutinib as a victim or perpetrator. *CPT: pharmacometrics & systems pharmacology*, **10**, 441–454.

Watterson S. H., Liu Q., Beaudoin Bertrand M., Batt D. G., Li L., Pattoli M. A., Skala S., Cheng L., Obermeier M. T., Moore R., Yang Z., Vickery R., Elzinga P. A., Discenza L., D'Arienzo C., Gillooly K. M., Taylor T. L., Pulicicchio C., Zhang Y., Heimrich E., McIntyre K. W., Ruan Q., Westhouse R. A., Catlett I. M., Zheng N., Chaudhry C., Dai J., Galella M. A., Tebben A. J., Pokross M., Li J., Zhao R., Smith D., Rampulla R., Allentoff A., Wallace M. A., Mathur A., Salter-Cid L., Macor J. E., Carter P. H., Fura A., Burke J. R., Tino J. A. (2019). Discovery of Branebrutinib (BMS-986195): A Strategy for Identifying a Highly Potent and Selective Covalent Inhibitor Providing Rapid in Vivo Inactivation of Bruton's Tyrosine Kinase (BTK). *Journal of Medicinal Chemistry*, **62**, 3228-3250.

Wilson W. H., Young R. M., Schmitz R., Yang Y., Pittaluga S., Wright G., Lih C. J., Williams P. M., Shaffer A. L., Grecitano J., de Vos S., Goy A., Kenkre V. P., Barr P. M., Blum K. A., Shustov A., Advani R., Fowler N. H., Vose J. M., Elstrom R. L., Habermann T. M., Barrientos J. C., McGreivoy J., Fardis M., Chang B. Y., Clow F., Munneke B., Moussa D., Beaupre D. M., Staudt L. M. (2015). Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nature Medicine*, **21**, 922-6.

Woyach J. A., Bojnik E., Ruppert A. S., Stefanovski M. R., Goettl V. M., Smucker K. A., Smith L. L., Dubovsky J. A., Towns W. H., MacMurray J., Harrington B. K., Davis M. E., Gobessi S., Laurenti L., Chang B. Y., Buggy J. J., Efremov D. G., Byrd J. C., Johnson A. J. (2014). Bruton's tyrosine kinase (BTK) function is important to the development and expansion of chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood*, **123**, 1207-13.

Woyach J. A., Ruppert A. S., Guinn D., Lehman A., Blachly J. S., Lozanski A., Heerema N. A., Zhao W., Coleman J., Jones D., Abruzzo L., Gordon A., Mantel R., Smith L. L., McWhorter S., Davis M., Doong T. J., Ny F., Lucas M., Chase W., Jones J. A., Flynn J. M., Maddocks K., Rogers K., Jaglowski S., Andritsos L. A., Awan F. T., Blum K. A., Grever M. R., Lozanski G., Johnson A. J., Byrd, J. C. (2017). BTKC481S-Mediated Resistance to Ibrutinib in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **35**, 1437-1443.

Wu H., Wang W., Liu F., Weisberg E. L., Tian B., Chen Y., Li B., Wang A., Wang B., Zhao Z., McMillin D. W., Hu C., Li H., Wang J., Liang Y., Buhrlage S. J., Liang J., Liu J., Yang G., Brown J. R., Treon S. P., Mitsiades C. S., Griffin J. D., Liu Q., Gray N. S. (2014). Discovery of a potent, covalent BTK inhibitor for B-cell lymphoma. *ACS Chemical Biology*, **9**, 1086-91.

Wu J., Zhang M., Liu D. (2016). Acalabrutinib (ACP-196): a selective second-generation BTK inhibitor. *Journal of hematology & oncology*, **9**, 21.

Young R. M., Staudt L. M. (2013). Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nature reviews. Drug discovery*, **12**, 229-243.

Yu L., Mohamed A. J., Simonson O. E., Vargas L., Blomberg K. E., Björkstrand B., Arteaga H. J., Nore B. F., Smith C. I. (2008). Proteasome-dependent autoregulation of Bruton tyrosine kinase (Btk) promoter via NF-kappaB. *Blood*, **111**, 4617-26.

Zanette D. L., Rivadavia F., Molfetta G. A., Barbuzano F. G., Proto-Siqueira R., Silva W. A. Jr, Falcão R. P., Zago M. A. (2007). miRNA expression profiles in chronic lymphocytic and acute lymphocytic leukemia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **40**, 1435-40.

Zheng J., Wu J., Ding X., Shen H. C., Zou G. (2021). Small molecule approaches to treat autoimmune and inflammatory diseases (Part I): Kinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **38**, 127862.