UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

In vitro profilování základních farmakokinetických vlastností nového cytokininového derivátu ve srovnání s jeho prekurzorem roskovitinem za použití moderních high-troughput technik

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: Jana Resutiková

Studijní program: B1501 Experimentální biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: Mgr. Michal Šiller, Ph.D.

Termín odevzdání práce: 2015

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jana Resutiková
Název práce	*In vitro* profilování základních farmakokinetických vlastností nového cytokininového derivátu ve srovnání s jeho prekurzorem roskovitinem za použití moderních high-troughput technik
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Ústav molekulární a translační medicíny
Vedoucí práce	Mgr. Michal Šiller, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2015
Abstrakt	Tato bakalářská práce se zabývá několika screeningovými testy pro zjištění farmakologických vlastností roskovitinu a od něj odvozené látky BP-14. Pozornost byla věnována stanovení jejich stability v mikrosomech i v plazmě, a jejich vazebnosti na plazmatické bílkoviny. Dále byly studovány jejich interakce se třemi formami biotransformačních enzymů – CYP1A2, CYP2C9 a CYP2C19. Obě testované látky jsou inhibitory cyklin-dependentních kináz, které regulují buněčný cyklus, a jsou potenciální protinádorová léčiva. Analýza vzorků byla zajištěna použitím RapidFire systému s detekcí hmotnostní spektrometrií. Výsledky ukázaly srovnatelnou stabilitu látek v mikrozomech, rozdílnou stabilitu v plazmě, kdy látka BP-14 vykazovala vyšší stabilitu, dále silnou vazebnost obou látek na plazmatické bílkoviny. Obě látky různou měrou interagovaly se všemi vybranými formami CYP.
Klíčová slova	roskovitin, ADME, cytochromy P450
Počet stran	43
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliografical identification

Author's first name and surname	Jana Resutiková
Title of thesis	*In vitro* profiling of basic pharmacokinetic parameters of novel cytokinine derivative in comparison to its precursor roscovitine using modern high-throughput techniques
Type of thesis	Bachelor
Department	Institute of molecular and translational medicine
Supervisor	Mgr. Michal Šiller, Ph.D.
The year of presentation	2015
Abstract	This thesis deals with several screening tests aiming to determine pharmacological properties of roscovitine and its derivative BP-14. Both tested compounds are inhibitors of cyclin-dependent kinases which regulate the cell cycle, and are potential anticancer drugs. Attention was put on determining their stability in microsomes, plasma stability, and plasma protein binding properties. We also studied their possible interactions with three forms of biotransformation enzymes - CYP1A2, CYP2C9 and CYP2C19. Analysis of our samples was performed via RapidFire system with mass spectrometric detection. Results showed comparable stability of studied substances in microsomes, different plasmatic stability, in which BP-14 demonstrated higher plasma stability than roscovitine. Both tested compounds are greatly bound to plasmatic proteins. Both substances interacted by varying degrees with all forms of selected CYP.
Keywords	roscovitine, ADME, cytochromes P450
Number of pages	43
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne Jana Resutiková

Ráda bych poděkovala svému školiteli Mgr. Michalu Šillerovi, Ph.D. za odborné vedení a poskytnutí cenných rad a konzultací při praktických experimentech i zpracování vlastní práce.

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Monice Harvanové a Mgr. Martině Michalové za všestrannou pomoc a odborný dohled při práci v laboratoři.

Obsah

Seznam zkratek a symbolů 8

Úvod 9

1 Metabolismus léčiv 10

2 Cytochromy P450 11

2.1 CYP1A2 13

2.2 CYP2C9 a CYP2C19 13

3 ADME metody 15

3.1 Absorpce 15

3.2 Distribuce 16

3.3 Metabolismus 16

3.3.1 Indukce a inhibice CYP 17

3.4 Exkrece 18

4 Roskovitin a jeho deriváty 20

5 RapidFire 300 22

6 Laboratorní pomůcky a chemikálie 23

6.1 Biologický materiál 23

6.2 Chemikálie 23

6.3 Laboratorní pomůcky 24

7 Laboratorní přístroje 25

8 Použité metody 26

8.1 Mikrosomální stabilita 26

8.2 Stabilita v plazmě 27

8.3 Vazba na plazmatické bílkoviny 28

8.4 Inhibiční vliv na CYP *in vitro* 29

8.5 Podmínky analýzy pomocí RapidFire technologie ve spojení s hmotnostní spektrometrií 31

9 Výsledky....33
9.1 Mikrosomální stabilita....33
9.2 Stabilita v plazmě....34
9.3 Vazba na plazmatické bílkoviny....34
9.4 Inhibiční vliv na CYP *in vitro*....35
10 Diskuze....37
11 Závěr....39
12 Použitá literatura....40

Seznam zkratek a symbolů

BP-14 – označení testované látky

C_4 – HPLC kolona s reverzní fází C_4

C_{18} – HPLC kolona s reverzní fází C_{18}

CE – kolizní energie

CXP – potenciál na výstupu kolizní cely

CYP – cytochrom P450

DMSO – dimethylsulfoxid

DP – deklasterizační potenciál

IS – interní standard

LL – léčivá látka

MS – hmotnostní spektrometrie

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfát redukovaná forma

NADP - nikotinamid adenin dinukleotid fosfát

RF – RapidFire

RH – substrát

ROH – monooxygenovaná či hydroxylovaná molekula substrátu

RPM – jednotka otáčky za minutu (revolution per minute)

TL – testovaná látka

UMTM – Ústav molekulární a translační medicíny

Úvod

Všechna potenciální léčiva musí před uvedením na trh projít několika fázemi testování. Vývoj dělíme na preklinické a klinické testování. Na počátku procesu může stát i několik tisíc látek, z nichž na trh jsou uvedeny 2-3. K výraznému selektování vhodných látek je vhodný preklinický screening – k minimalizaci finančních nákladů na další fáze výzkumu.

Mezi tyto látky se řadí i roskovitin a jeho derivát s označením BP-14. Obě látky jsou potenciálními protinádorovými léčivy. Roskovitin je již zařazen do první fáze klinických testů v USA. V mé práci slouží jako kontrolní a porovnávací bod. BP-14 je nově syntetizovaná látka na bázi roskovitinu s předpokladem lepších vlastností než jeho předchůdce.

Cílem bakalářské práce bylo především seznámení se s problematikou metabolismu léčiv se zaměřením na cytochromy P450 (CYP) a dále s principem základních farmakologických testů a jejich následná aplikace v klinické praxi při testování vybraných látek, roskovitinu a BP-14.

TEORETICKÁ ČÁST

1 Metabolismus léčiv

Obecně platí, že po podání léčiva, je účinná látka absorbována a následně distribuována do celého těla krevním oběhem (Anzenbacher *et* Anzenbacherová, 2012). Často je také léčivo metabolizováno a nakonec dochází k jeho vyloučení z těla.

Metabolismus xenobiotik (exogenních látek), tedy i léčiv, je zprostředkován za pomoci biotransformačních enzymů. Jedná se o jeden z hlavních mechanismů zachování homeostázy organismu při vystavení malým cizím molekulám (Parkinson, 2001). Na biotransformaci léčiv se podílí celá řada enzymů s širokou substrátovou specifitou. Tyto enzymy se podílejí nejen na metabolismu řady exogenních látek, kromě léčiv, také ethanolu, acetonu, průmyslových chemikálií, rostlinných látek, ale také se část těchto enzymů podílí i na syntéze a metabolismu endogenních látek, především steroidních hormonů, vitaminů A a D, bilirubinu, žlučových nebo mastných kyselin.

Všeobecně proces biotransformace sestává z fáze I a fáze II, které mohou následovat po sobě, není to ale pravidlem (Zanger, 2012). Některé látky jsou metabolizovány pouze v reakcích fáze I nebo fáze II, nebo dokonce v opačném pořadí. Látka ve fázi I prochází oxidačně redukčními reakcemi, které jsou katalyzovány hlavně monooxygenasami, a také hydrolytickými reakcemi, které odhalují existující funkční skupiny anebo do struktury léčiva zavádějí nové polární funkční skupiny. Reakce první fáze mají tedy dvojí účinek – odhalují či vnášejí funkční hydrofilní skupinu do molekuly patentního léčiva a případně připravují látky na reakce fáze II. Ve fázi II látka prochází konjugačními reakcemi, které přidávají cukr, sulfát, acetylové nebo methylové skupiny na polární funkční skupiny na molekule substrátu. Nový hydrofilní metabolit je následně vyloučen z buňky a exkretován z těla.

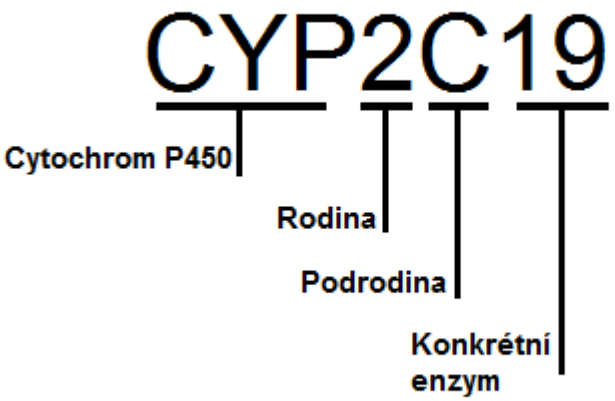
Enzymy zajišťující biotransformaci jsou rozšířené po celém těle, u obratlovců je největší zastoupení v játrech (Parkinson, 2001). Dále je můžeme najít v kůži, plicích, ledvinách či gastrointestinálním traktu a mnoha dalších.

2 Cytochromy P450

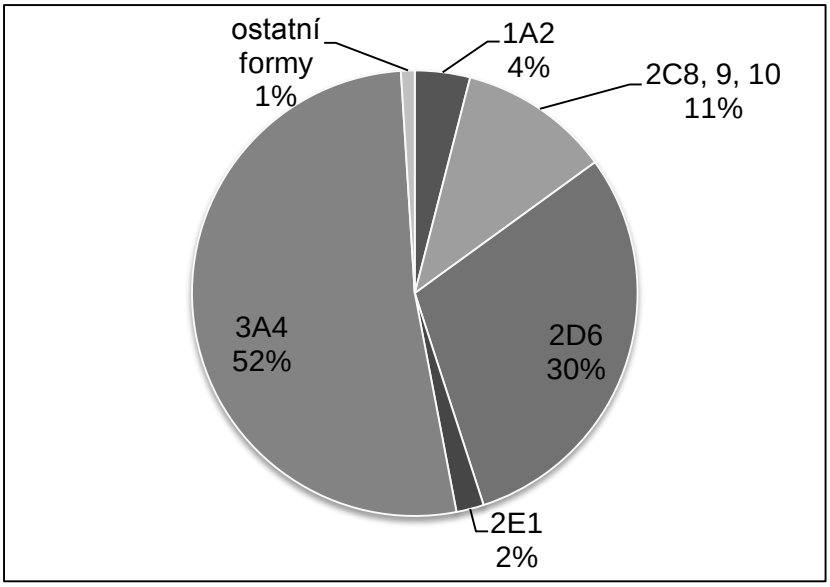
Cytochromy P450 (CYP) jsou velkou skupinou enzymových proteinů, které ve své struktuře obsahují hem. Gen pro tvorbu CYP je velmi starý a objevil se již před vývinem eukaryot, proto ho lze najít v obrovské škále organismů, od bakterií až po člověka (Nelson, 1996). Své označení (P450) získaly díky neobvyklému silnému absorpčnímu maximu při 450 nm vlnové délky (Klingenberg, 1958).

Cytochromy P450 byly poprvé objeveny M. Klingebergem v roce 1954 během studia metabolismu steroidních hormonů, kdy vyextrahoval nový protein z jaterních buněk (McDonell *et* Dang, 2013). Až o deset let později byla objevena jejich funkce a význam při katalýze metabolismu léčiv.

Nadrodina cytochromů P450 je označována jako CYP, následuje arabská číslice, která označuje rodinu (např. CYP2) (Anzenbacher *et* Anzenbacherová, 2001). Toto číslo může naznačovat funkci enzymu nebo může být selektováno náhodně. Pokud je nutno enzymy spadající do dané rodiny rozdělit dále, je použito písmeno a jednotlivé enzymy v podrodině označeny opět arabskou číslicí, která označuje jeden konkrétní enzym (např. CYP2C19).



V lidském genomu bylo identifikováno 57 aktivních genů pro CYP (Ingelman-Sundberg *et* Sim, 2010). Enzymy zařazené do rodin 1 – 3 se účastní zejména detoxifikace exogenních látek, kdežto enzymy v rodinách 4 – 51 se nejvíce uplatňují při metabolismu endogenních látek.



Obr. 1: Zobrazení podílu jednotlivých forem CYP na metabolismu léčiv, zpracováno dle: Zuber, 2002

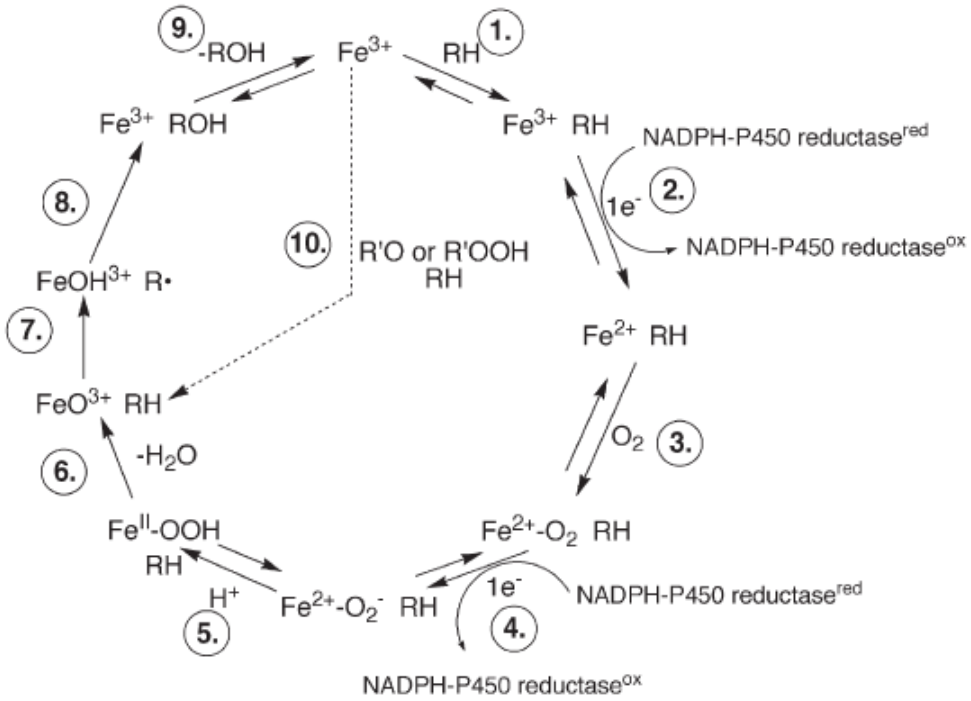
Systémem CYP jsou katalyzovány oxidační reakce první fáze biotransformace xenobiotik, což jsou nejběžnější reakce probíhající v této fázi (McDonell *et* Dang, 2013). CYP jsou klíčovými enzymy hydroxylace léčiv a steroidů.

Reakce shrnující proces, na kterém se CYP podílejí, může být popsána následovně (Rendic *et* Di Carlo, 1997):

$$RH + NADPH + H^+ + \mathbf{O2} \rightarrow R\mathbf{O}H + NADP^+ + H_2\mathbf{O}$$

Reakce se účastní zdroj elektronů (redukovaný NADPH), substrát (RH), molekula kyslíku. Produkty jsou oxidovaný NADP+ kofaktor, voda a monooxygenovaná či hydroxylovaná molekula substrátu (ROH).

Katalytický cyklus CYP se skládá z několika kroků a je znázorněn na Obr. 1 (Guengerich, 2012). Prvním krokem je navázání substrátu (RH), které bývá velmi rychlé. Ve druhém kroku dochází k redukci iontu Fe^{3+} zabudovaného v proteinu na Fe^{2+} za účasti NADPH-P450 reduktázy a k navázání kyslíku (třetí krok). Produkt této reakce je velmi podobný oxyhemoglobinu, ale je v této formě velmi nestabilní. Ve čtvrtém kroku je do komplexu P450 $FeO2^{2+}$ vpraven další elektron pomocí NADPH-P450 reduktázy. Dále dochází k zabudování kyslíku, navázaného na železnatý iont, do substrátu. Sedmý až devátý krok zobrazuje proces uvolnění produktu (ROH) z CYP a regeneraci cyklu.



Obr. 2: Obecný princip katalýzy za pomoci CYP (Guengerich, 2012)

2.1 CYP1A2

Tento enzym se nachází zejména v játrech a mezi jeho substráty patří látky na bázi aromatických aminů, polycyklických uhlovodíků. Mezi xenobiotika, která jsou přednostně metabolizována tímto enzymem, patří antipyretika acetaminofen a fenacetin, dále kofein, klozapin, tacrin a teofilin. Některá xenobiotika mohou být metabolizována současně více CYP enzymy (Anzenbacher *et* Anzenbacherová, 2001).

2.2 CYP2C9 a CYP2C19

Skupina enzymů CYP2C zahrnuje čtyři konkrétní enzymy: CYP2C8, 2C9, 2C10 a 2C19 (Anzenbacher *et* Anzenbacherová, 2001). Enzym CYP2C8 je v souvislosti s metabolismem léčiv méně významný, jelikož jeho substráty jsou pouze warfarin, tretionin a taxol. Naopak enzymy CYP2C9 a 2C19 metabolizují velké množství léčiv.

Enzymy CYP2C9 a 2C10 jsou si strukturně i specifitou velmi podobné, proto se často předpokládá jejich společná funkce (Anzenbacher *et* Anzenbacherová, 2001). Typickými substráty jsou nesteroidní protizánětlivá léčiva a hypoglykemika.

Mezi typické substráty enzymu CYP2C19 patří neutrální nebo mírně bazické, slabě lipofilní látky jako například diazepam, omeprazol či (S)-mefenytoin (Anzenbacher *et* Anzenbacherová, 2001).

3 ADME metody

Absorpční, distribuční, metabolické a exkreční vlastnosti chemické sloučeniny, tedy i potenciálního léčiva, jsou zásadními faktory při odhadu jejího farmakokinetického (PK) chování a možnosti vzniku mezilékových interakcí (Wu *et al*., 2012). Optimalizace těchto vlastností vede ke snížení nákladů na výzkum, filtraci nevhodných kandidátů z řady potenciálních léčiv a případné snížení počtu pokusných zvířat při následných *in vivo* testech. V posledních letech byly ADME metody charakterizující základní farmakokinetické vlastnosti léčiv zařazeny v moderním výzkumu léčiv jako nedílná součást při preklinickém výběru kandidátů pro postup do klinického testování.

3.1 Absorpce

Léčivá látka ve formě léčivého přípravku může být do těla podána perorálně (léčivo je absorbováno přes trávicí trakt) nebo parenterálně (léčivo přes trávicí trakt neprochází). Parenterální podání zahrnuje například intravenózní nebo topickou aplikaci.

Při absorpci léčiva dochází k přesunu léčivé látky z místa podání do krevního oběhu. Její účinnost a následná rychlost nástupu účinku léčiva je ovlivněna způsobem aplikace léčiva do organismu. Pro absorpci v prostředí organismu je důležitá zejména lipofilita a acidobazické vlastnosti látky, s rostoucí lipofilitou roste prostupnost buněčných membrán pro léčivo a tím se i zvyšuje jeho biologická dostupnost (Lin *e*t Lu, 1997). Z hlediska metabolismu léčiv, především z pohledu na oxidačně-redukční reakce katalyzované CYP, je také nutno u léčiv podávaných perorálně brát v úvahu first-pass efekt neboli efekt prvního průchodu játry (Pond *et* Tozer, 1984). Při tomto efektu dochází k významnému snížení koncentrace léčiva v plazmě průchodu játry následujícím po vstřebání léčiva z gastrointestinálního traktu díky metabolické přeměně jaterními oxidačně-redukčními enzymy.

3.2 Distribuce

Distribucí rozumíme transport látek krevním řečištěm ke tkáním. V plazmě dochází k vazebným interakcím léčiv s proteiny, zejména s albuminem anebo kyselým α1-glykoproteinem. Pouze volná frakce léčiva je zodpovědná za farmakologický účinek a vázaná frakce tedy slouží jako jakási dočasná „zásobárna“ léčiva v organismu.

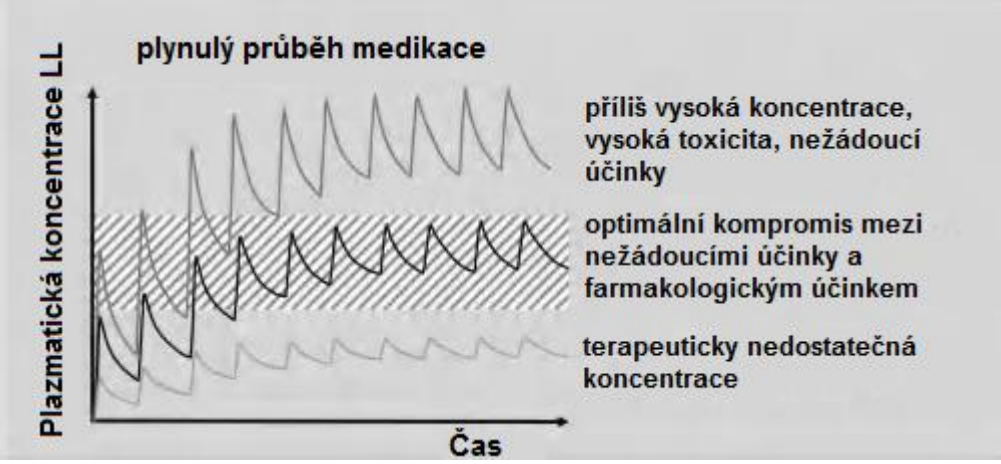
Při současném podání dvou léčiv může docházet k mezilékovým interakcím na úrovni distribuce, kdy dochází ke kompetici při vazbě na plazmatické bílkoviny. V případě, že jedna látka vytlačí z vazby na plazmatický protein druhou, dojde ke zvýšení koncentrace volné frakce “postiženého“ léčiva a s tím může být spojena zvýšená toxicita a vyšší výskyt nežádoucích účinků.

Vazba na plazmatické bílkoviny je přímo závislá na lipofilitě látky, tedy čím je látka víc lipofilní, tím se více váže na proteiny a tím vyšší je míra distribuce do různých tkání (Lin *et* Lu, 1997). Mezi látky s vysokou vazebností na plazmatické proteiny patří například warfarin, u něhož i malé zvýšení volné frakce léčiva vede k výskytu krvácivých stavů.

Kromě navázání léčiva na plazmatické bílkoviny může docházet v plazmě k rozpadu sloučenin. V případě léčiv s nízkou stabilitou v plazmě, dochází k rychlému snížení účinné koncentrace v krvi. Sloučeniny obsahující funkční skupiny, jako jsou estery, amidy, karbamidy, sulfonamidy, laktony, laktamy a peptidická mimetika, jsou více náchylné k hydrolytickému rozpadu (Di *et al.*, 2005).

3.3 Metabolismus

Proces biotransformace, na jejímž konci stojí zpravidla hydrofilnější metabolity, často vede ke ztrátě farmakologického účinku léčiva (Zanger, 2012). Někdy však může biotransformace vést ke vzniku produktů mnohem toxičtějších než je sama parentní látka. Z toho důvodu je nutné vyvážit pozitivní a negativní efekty přítomnosti léčiva v organismu zajištěním konstantní plazmatické koncentrace v rozmezí terapeutického okna pro dané léčivo.



Obr. 3: Vymezení terapeutického okna v závislosti koncentrace léčivé látky (LL) na čase působení, přeloženo (Zanger, 2012)

Jedním ze dvou hlavních ADME testů je stabilita látek v přítomnosti izolovaných hepatocytů nebo mikrosomální frakce (Wu *et al.*, 2012). Stabilita v mikrosomech je klíčovým kritériem pro postup látky do *in vivo* testování, jelikož více stabilní sloučenina bude pravděpodobně mít delší biologický poločas anebo nižší clearance při PK studiích na zvířatech.

Další testy sledují vliv testovaných látek na různé lidské cytochromy P450, zejména sledování jejich možného inhibičního účinku anebo jejich indukčního účinku na CYP metabolizující léčiva.

3.3.1 Indukce a inhibice CYP

Mnoho léčiv i jiných exogenních látek při průchodu játry interaguje s CYP enzymy a v důsledku toho často dochází ke zvýšení nebo snížení katalytické aktivity některého CYP enzymu. Interakce xenobiotik s CYP dělíme na dva typy: indukce a inhibice. Při současném podání takto interagujících látek dochází k zpravidla nežádoucím mezilékovým interakcím na úrovni metabolismu. Přehled některých induktorů a inhibitorů CYP je uveden v tab. 1.

Jedním z typických induktorů CYP (formy CYP2E1) je ethanol (Seitz *et* Mueller, 2012). Bylo prokázáno, že chronická konzumace i malých dávek (40 g / den) ethanolu během krátké doby (1 týden) vede k signifikantní indukci CYP2E1. Indukce CYP2E1 nastává i při hladovění nebo obesitě.

Z důvodu indukce této formy enzymu je zrychleno odbourávání ethanolu, ale případně i jiných látek, které jsou stejným enzymem metabolizovány. Může

pak docházet ke zvýšení produkce toxických metabolitů. Toto bylo pozorováno například u paracetamolu. (Roberts *et al.* 1995, Lee *et al.* 1996).

Metabolismus může být inhibován nejen léčivy, ale také látkami, které se běžně vyskytují v potravě (Guengerich, 1992). Typickým příkladem je bergamotin a některé jeho deriváty, vyskytující se v grapefruitovém džusu, které jsou významnými inhibitory CYP3A4 (Kousalová *et al*., 2003). Pokud je inhibován metabolismus léčiva, pak dochází ke zvýšení jeho koncentrace v plazmě, což může mít za následek výskyt nežádoucích účinků.

Inhibice metabolismu je jedním z hlavních důvodů vzniku mezilékových interakcí (Lin *et* Lu, 1997). Je známo několik mechanismů inhibice: kompetice o katalytické místo, nekompetitivní inhibice, sebevražedné zničení enzymu či kompetice o kofaktory. Z těchto je nejčastější kompetitivní inhibice.

Tab. 1: Příklady některých induktorů a inhibitorů CYP

CYP	Induktor	Inhibitor
1A1	kouření	7,8-benzoflavon, ellipticin
1A2	kouření, brukvovitá zelenina	7,8-benzoflavon
2C8, 9, 10	rifampicin, barbituráty	sulfafenazol
2E1	ethanol	disulfiram
3A4	rifampicin, barbituráty	gestoden, naringenin

Přeloženo a upraveno dle: Guengerich, 2012

V roce 2014 byla vytvořena databáze (Transformer database - http://bioinformatics.charite.de/transformer 18. 4. 2015) obsahující informace o všech fázích biotransformace pro 3000 léčiv a více jak 350 látek, vyskytujících se v potravě, a bylin, které jsou katalyzovány více než 400 enzymy. (Hoffmann *et al*., 2014). Za pomoci metody „text mining“ bylo objeveno celkem 100 000 interakcí. Databáze obsahuje i 3D struktury 200 souvisejících proteinů. Databáze umožňuje vyhledání léčiva se zobrazením známých interakcí s enzymy první i druhé fáze biotransformace. Pro každou interakci jsou poskytnuty příslušné reference pro PubMed.

3.4 Exkrece

Pouze několik málo léčiv je vyloučeno z těla v nepozměněné formě bez žádné metabolické degradace v moči nebo výkalech (Hoffmann *et al*., 2014).

Jak již bylo zmíněno, téměř každé léčivo je metabolizováno a poté je vyloučeno z těla několika hlavními cestami. Nejdůležitější cestou je vyloučení metabolitů a ostatních endogenních látek ledvinami za pomoci glomerulární filtrace, pasivní zpětné difúze, aktivní tubulární sekrece a aktivní tubulární reabsorpce.

Látky mohou být vyloučeny za pomoci jater, kdy se poté dostávají do žluče, střev a jsou vyloučeny stolicí.

Plícemi se z organismu vylučují těkavé látky bez ohledu na to, jakým způsobem byly do organismu dopraveny. Rychlost eliminace plícemi závisí na rychlosti exspirace a prokrvení plic.

Menšinově může být léčivo vyloučeno slinami či potem. Zvláštním případem je přechod léčiva či jeho metabolitů přes placentu, nebo do mateřského mléka.

4 Roskovitin a jeho deriváty

Nádorové buňky nejsou ovlivněny přirozenou kontrolou buněčného cyklu a získávají potenciál neomezeně proliferovat (Węsierska-Gądek *et al*., 2009). Toto může být mimo jiné způsobeno ztrátou nebo deaktivací endogenních inhibitorů cyklin-dependentních kináz (CDK). K vyrovnání tohoto deficitu se nabízí použití farmakologických inhibitorů CDK k léčbě rakoviny. Mezi tyto látky se řadí i roskovitin a některé jeho deriváty.

Jednou z testovaných látek s potenciálními protinádorovými účinky je roskovitin, což je látka se purinovým základem se třemi subtituenty na pozicích 2, 6, a 9. Roskovitin se ukázal být účinným inhibitorem několika typů CDK (CDK 1, 2, 5, 7 a 9) (Khalil *et al.,* 2015). Při testování na buněčných kulturách (např. MCF-7 prsní nebo HeLa cervikální rakovinné buňky) vedlo jeho podání k akumulaci buněk v G2/M přechodu buněčného cyklu a v některých liniích indukoval apoptózu. Roskovitin byl pod generickým názvem Seliciclib testován v několika klinických testech fáze I a II biofarmaceutickou společnosti Cyclacel Pharmaceuticals Inc.

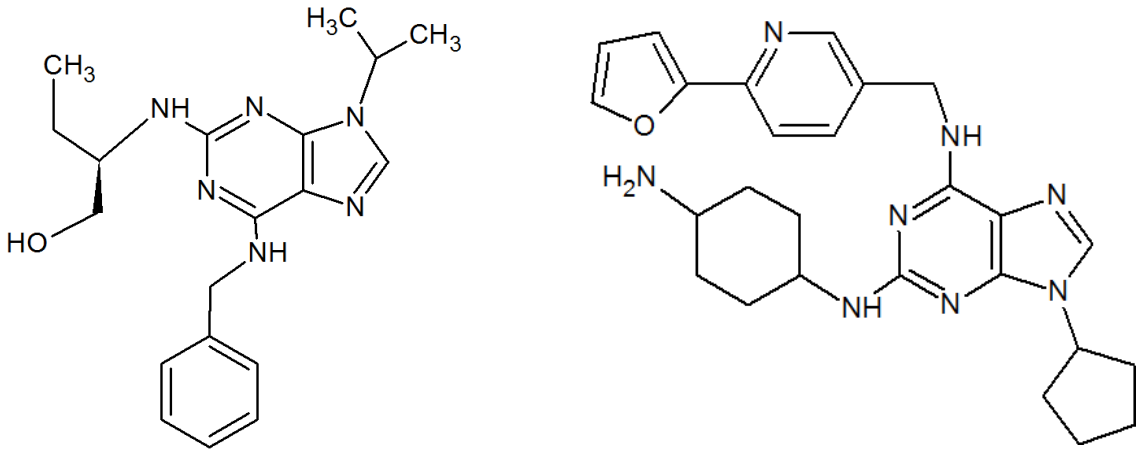
Úspěch roskovitinu vedl k syntéze jemu podobných látek s vylepšenými účinky či vlastnostmi (Jorda, Paruch *et* Kryštof, 2012). Syntéza nových látek může být na základě optimalizace substituentů purinu, změnou počtu a pozic dusíků na základním skeletu molekuly či kombinací obou výše uvedených způsobů. Mnoho nově syntetizovaných látek odvozených od roskovitinu má až stonásobně vyšší inhibující účinky na CDK. Záměnou substituentů na základním skeletu vzniklo velké množství strukturálně rozmanitých CDK inhibitorů v některých případech se zlepšenými biochemickými i biologickými vlastnostmi.

Záměnou primární hydroxylové skupiny v postranním řetězci roskovitinu za aminoskupinu nebo její změna na sekundární či terciální hydroxy skupinu, zabránila přeměně derivátů na kyselinu roskovitinovou, což jeden z nejhlavnějších metabolitů roskovitinu, bohužel ale nenese žádný farmakologický účinek (Zatloukal *et al.*, 2013).

Mezi deriváty roskovitinu tedy řadíme i druhou testovanou látku BP-14. Látka byla syntetizována v Laboratoři růstových regulátorů v Olomouci. Látka BP-14 se ukázala jako velmi potentní cytotoxická (bez získání rezistence) pro HHC

tkáňové kultury specifickou inhibicí CDK 1, 2, 5, 7 a 9 (Haider, Grubinger *et* Řezníčková, 2013). Také byla schopna akumulovat buňky v G2/M a S/G2 fázi buněčného cyklu. Celkově vykazuje vyšší potenciál než roskovitin.

Struktury obou látek jsou zobrazeny na obrázku 4a a 4b.

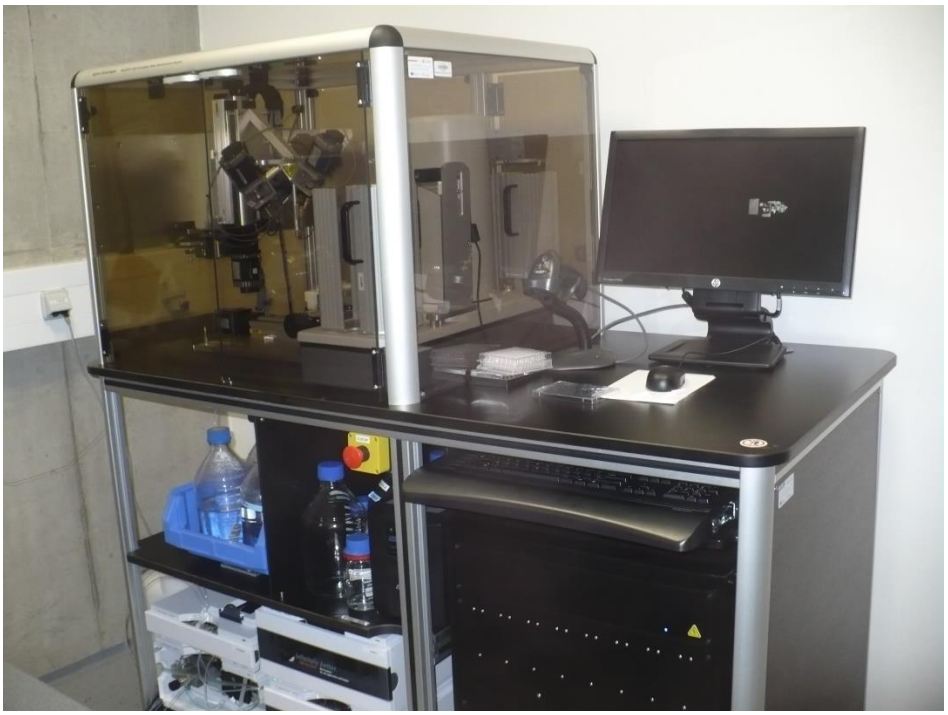


a) b)

Obr. 4: Struktury testovaných látek a) roskovitin b) BP-14

5 RapidFire 300

Analýza vzorků byla provedena pomocí přístroje RapidFire 300 s následnou detekcí hmotnostním spektrometrem. Přístroj, který je umístěn na Ústavu molekulární a translační medicíny, je zachycen na obrázku 5.



Obr. 5: RapidFire systém, UMTM, fotografie pořízena 22. 4. 2015

U technologie RapidFire dochází ke snižování času potřebného pro analýzu (Agilent Technologies, 2011). Každý vzorek je zpracován během šesti až deseti sekund, což zajišťuje mnohem rychlejší propustnost než při použití tradičních metod založených na MS. RapidFire technologie kombinuje rychlou online extrakci na pevné fázi s přímým nástřikem na hmotnostní spektrometr. RapidFire systém je částečně oproštěn od potřeby předběžné přípravy vzorku, jelikož je vzorek aplikován na extrakční kolonu přímo z mikrotitrační destičky. K analýze je zapotřebí pouze 5 kroků: nasátí vzorku, nástřik na extrakční kolonu, promytí kolony, eluce a vstřik do MS a posledním krokem je regenerace kolony.

Součástí přístroje je 6-ti místný měnič kolon pro automatizované zpracování. Zmenšení kolon pracujících na principu extrakce na pevné fázi společně s automatizací podavače mikrotitračích destiček a nástřiků vzorků vede k urychlení práce ve farmakologické laboratoři.

6 Laboratorní pomůcky a chemikálie

6.1 Biologický materiál

Směsné lidské jaterní mikrosomy 20mg/ml (Gibco®, LifeTechnologies, Česká republika)

Lidská plasma citrátová (Sigma Aldrich, ČR)

6.2 Chemikálie

- cytokininové deriváty roskovitin a BP-14 pro experimenty (darováno Laboratoří růstových regulátorů, prof. Miroslav Strnad, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého)

- markerové substráty CYP: mefenytoin, tacrin hydrochlorid (SantaCruz Biotech, Německo)

- metabolity markerových substrátů CYP: *S*-hydroxymefenytoin, OH-tacrine (SantaCruz Biotech, Německo)

- interní standardy: S-methoxymefenytoin, bucetin (Sigma Aldrich, Česká republika)

- chemikálie pro přípravu pufrů: dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma Aldrich, Česká republika), kyselina fosforečná, chlorid sodný, hydroxid draselný (Sigma Aldrich, Česká republika)

- methanol, kyselina octová, acetonitril (Sigma Aldrich, ČR) pro přípravů mobilních fází

- NADPH generující systém: nikotinamid adenin dinukleotid fosfát, isocitrát, síran hořečnatý, isocitrát dehydrogenasa (Sigma Aldrich, ČR)

- dimethylsulfoxid pro rozpouštění cytokininových derivátů (Sigma Aldrich, ČR)

6.3 Laboratorní pomůcky

- automatické pipety o objemu: 0,1 – 2,5 µl; 0,5 – 10 µl; 2 -20 µl; 10 – 100 µl; 20 – 200 µl; 100 – 1000 µl, 1 - 5 ml (Eppendorf, Hamburg, Německo)

- pipetovací špičky (Eppendorf, Hamburg, Německo)

- mikrozkumavky(Eppendorf, Hamburg, Německo)

- parafilm (BEMIS, USA)

- ELISA destičky (Merck&Millipore, ČR)

- skleněné vialky (Labicom, ČR)

7 Laboratorní přístroje

- analytické váhy (Shoeller Instruments s r. o., ČR)
- mini třepačka laboratorní MS 3A Basic (IKA, USA)
- centrifuga (Hanil Science Industrial, Korea)

  typ rotoru: A1.5S-24 (Hanil Science Industrial, Korea)
- termoblok (MS major science, Taiwan)
- RapidFire (Agilent Technologies, Lexington, USA)
- třepačka Thermo-shaker TS-100C (Biosan, Litva)

8 Použité metody

8.1 Mikrosomální stabilita

Pro stanovení mikrosomální stability testovaných látek, roskovitinu a BP-14, byla využita metoda inkubace látek v přítomnosti lidských mikrosomů. Jaterní mikrosomy jsou subcelulární frakce endoplazmatického retikula obsahující membránové proteiny, které se podílejí na metabolismu léčivých látek.

Stabilita v mikrosomech byla sledována v průběhu času po 0, 15, 30 a 60 minutách inkubace při 37 °C. Vzorek, kde byla reakce zastavena v čase 0 minut, byl použit pro stanovení 100% detekované koncentrace testované látky (kontrolní hodnota).

Testované látky ze zásobního 25 mM roztoku v dimethylsulfoxidu byly naředěny ve fosfátovém pufru a 100% metanolu (v poměru 3:1) na 2,5mM roztok, který byl dále naředěn na pracovní roztok o koncentraci 10 $\mu mol.l^{-1}$.

Vzorky s jaterními mikrosomy, NADPH generujícím systémem a testovanou látkou vždy o stejné koncentraci byly v pufru inkubovány po daný čas. Po uplynutí doby inkubace byly reakce zastaveny, proteiny v roztoku sraženy 100% acetonitrilem s obsahem 0,1 % kyseliny mravenčí a byl přidán interní standard. Po centrifugaci (14 000 rpm, 10 min, 4°C) byla stanovena koncentrace parentní testované látky v supernatantu s pomocí systému RF-MS. Vzorky byly připravovány v duplikátech.

Výstup z RF-MS byl vyhodnocen softwarem RapidFire Integrator a zpracován v programu Excel (Microsoft Office). Na osu x byl vynesen čas v minutách a na osu y relativní hodnoty koncentrace zbylé testované látky v procentech.

Tab. 2: Shrnutí složek a kroků stanovení mikrosomální stability a podmínky pro analýzu

Mikrosomální stabilita		Podmínky pro analýzu	
Objem reakční směsi:	200 µl	Extrakční fáze:	C18
Pufr:	50 mM KH_2PO_4, pH = 7,4	Mobilní fáze A:	0,1% HCOOH:ACN (95:5)
Lidské jaterní mikrosomy:	0,1 mg proteinu v RS	Mobilní fáze B:	0,1% HCOOH:ACN (5:95)
NADPH generující systém:	4 µmol	Eluce:	100% mobilní fáze B
Preinkubace 5 min, 37°C		Průtok mobilní fáze:	0,4 ml/min
TL - roskovitin nebo BP-14:	1 µmol.l^{-1}		
Inkubace 0, 15, 30 a 60 min, 37°C		Objem nástřiku:	10 µl
Zastavení reakce:	100% ACN + 0,1% HCOOH	Detekce:	hmotnostní spektrometrie
IS - látka opačná k TL:	0,5 µmol.l^{-1}		
Centrifugace 14000 rpm, 10 min, 4°C			
Pro analýzu bylo odebráno 200 µl supernatantu			

8.2 Stabilita v plazmě

Pro stanovení stability roskovitinu a BP-14 v plasmě byla použita metoda inkubace látek v lidské 100 % plazmě.

Stabilita v plazmě byla sledována v průběhu času po 0, 15, 30 a 60 minutách inkubace při 37 °C. Vzorek, kde byla reakce zastavena v čase 0 minut, byl použit jako kontrolní vzorek, kde byla stanovená koncentrace testované látky považována za 100 %, tj. pokles koncentrace testované látky byl v tomto případě považován za nulový.

Testované látky ze zásobního 25 mM roztoku v DMSO byly naředěny v PBS pufru a 100% methanolu (v poměru 3:1) na 250µM roztok, který byl dále naředěn na pracovní roztok o koncentraci 20 µmol.l^{-1}.

Testované látky byly v plazmě inkubovány po daný čas. Po uplynutí doby inkubace byly reakce zastaveny, proteiny v roztoku sraženy 100% acetonitrilem s obsahem 0,1 % kyseliny mravenčí a byl přidán interní standard. Po centrifugaci (14 000 rpm, 10 min, 4°C) byla stanovena koncentrace parentní testované látky s pomocí systému RF-MS. Vzorky byly připravovány v duplikátech.

Vzorky byly analyzovány a výsledky zpracovány stejným způsobem jako při stanovení mikrosomální stability. Na osu x byly vyneseny hodnoty času inkubace

v minutách a na osu y relativní hodnoty koncentrace zbylé testované látky v procentech.

Tab. 3: Shrnutí složek a kroků stanovení stability v plazmě a podmínky pro analýzu

Stabilita v plazmě		Podmínky pro analýzu	
Objem reakční směsi:	300 µl	Extrakční fáze:	C18
Plazma:	100%	Mobilní fáze A:	0,1% HCOOH : ACN (95:5)
TL - roskovitin nebo BP-14:	6 µmol.l^{-1}	Mobilní fáze B:	0,1% HCOOH : ACN (5:95)
Inkubace 0, 15, 30 a 60 min, 37°C		Eluce:	100% mobilní fáze B
Zastavení reakce:	100% ACN + 0,1% HCOOH	Průtok mobilní fáze:	0,4 ml/min
IS - látka opačná k TL:	3 µmol.l^{-1}		
Centrifugace 14000 rpm, 10 min, 4°C		Objem nástřiku:	10µl
Pro analýzu bylo odebráno 200 µl supernatantu		Detekce:	hmotnostní spektrometrie

8.3 Vazba na plazmatické bílkoviny

Stanovení vazby na plazmatické proteiny proběhlo za pomocí RED (Rapid Equilibrium Dialysis) testu (LifeTechnologies, ČR), který je založen na principu dialýzy. Inserty pro tento test se skládají ze dvou komůrek oddělených dialyzační membránou. Do komůrky R byl umístěn roztok testované látky v 50% anebo 100% plazmě, do komůrky W PBS pufr. Testované látky byly naředěny stejným způsobem jako pro stabilitu v plazmě, pracovní roztok měl koncentraci 10µmol.l^{-1}. Koncentrace testované látky byla v plazmě 2 µmol.l^{-1}.

Látky v komůrkách byly inkubovány při 37°C za stálého třepání po dobu 2 hodin. Po inkubaci byly stejné objemy roztoků přeneseny do mikrozkumavek. K roztoku pufru bylo přidáno stejné množství plazmy a k roztoku testované látky byl přidán pufr. Do obou roztoků bylo přidáno srážecí činidlo (100% ACN / 0,1% HCOOH). Do vzorků byl taktéž přidán interní standard. Po centrifugaci (14 000 rpm, 10 min, 4°C) byla zjištěna koncentrace testované látky v supernatantu s pomocí systému RF-MS. Vzorky byly připravovány opět v duplikátech.

Vzorky byly analyzovány pomocí RapidFire technologie a na základě koncentrací změřených v rozdílných komůrkách bylo vypočítáno, kolik procent látky se navázalo na plasmatické bílkoviny a jaké množství látky tvořilo volnou, tedy nevázanou frakci. Pro výpočet volné frakce testované látky byl využit vzorec z www.cyprotex.com.

$$\mathbf{fu} = \mathbf{1} - \left(\frac{\mathbf{PC} - \mathbf{PF}}{\mathbf{PC}}\right)$$

http://www.cyprotex.com/admepk/protein_binding/plasma-protein-binding, 4. 5. 2015

fu – nevázaná frakce

PC – koncentrace TL v červené komůrce (s plazmou)

PF – koncentrace TL v bílé komůrce (pufr)

Tab. 4: Shrnutí složek a kroků stanovení vazby na plazmatické bílkoviny a podmínky pro analýzu

Vazba na plazmatické bílkoviny		Podmínky pro analýzu	
Objem reakční směsi v červené komůrce:	200 µl	Extrakční fáze:	C18
Objem reakční směsi v bílé komůrce:	350 µl	Mobilní fáze A:	0,1% HCOOH : ACN (95:5)
		Mobilní fáze B:	0,1% HCOOH : ACN (5:95)
		Eluce:	100% mobilní fáze B
		Průtok mobilní fáze:	0,4ml/min
Plazma:	100% anebo 50%	Objem nástřiku:	10µl
Pufr:	PBS		
TL - roskovitin nebo BP-14:	2 µmol.l^{-1}	Detekce:	hmotnostní spektrometrie
Inkubace 120 min, 37°C, třepání 250 rpm orbitálně			
Zastavení reakce:	100% ACN + 0,1% HCOOH		
IS - látka opačná k TL:	1 µmol.l^{-1}		
Centrifugace 14000 rpm, 10 min, 4°C			
Pro analýzu bylo odebráno 200 µl supernatantu			

8.4 Inhibiční vliv na CYP *in vitro*

Pro stanovení inhibičního vlivu testovaných látek, roskovitinu a BP-14, byly využity markerové substráty. Na metabolismu těchto substrátů se podílí ten CYP, jehož ovlivnění je sledováno.

Inhibiční vliv testovaných látek na enzymovou aktivitu jednotlivých CYP byl sledován ve vzrůstající koncentraci (0µM; 0,1 µM; 0,5 µM; 1 µM; 5 µM; 10µM; 25 µM; 50µM). Vzorky bez obsahu testované látky byly použity ke stanovení kontroly 100% enzymové aktivity jednotlivých CYP.

Testované látky byly naředěny jako v předchozích testech na koncentraci pracovního roztoku 100 µmol.l^{-1}.

Vzorky obsahující jaterní mikrosomy, NADPH generující systém a testovanou látkou o vzrůstající koncentraci byly v pufru inkubovány společně se

substrátem příslušného CYP po 30 minut. Po uplynutí doby inkubace byly reakce zastaveny, proteiny v roztoku sraženy 100% acetonitrilem s obsahem 0,1 % kyseliny mravenčí a byl přidán interní standard. Po centrifugaci (14 000 rpm, 10 min, 4°C) byla stanovena koncentrace metabolitu s pomocí systému RF-MS. Vzorky byly připravovány v duplikátech.

Výsledky byly analyzovány a zpracovány stejným způsobem jako při ostatních testech. Na osu x byly vyneseny hodnoty koncentrace inhibitoru v $\mu mol.l^{-1}$ a na osu y relativní hodnoty aktivity CYP v procentech.

Tab. 5: Shrnutí složek a kroků stanovení inhibičního vlivu na CYP2C19 a podmínky pro analýzu

Inhibice CYP2C19		Podmínky pro analýzu	
Objem reakční směsi:	200 µl	Extrakční fáze:	C_4
Pufr:	50 mM KH_2PO_4, pH = 7,4	Mobilní fáze A:	5 mM HCOONH4 : ACN (95:5)
Lidské jaterní mikrosomy:	0,04 mg	Mobilní fáze B:	5 mMHCOONH4 : ACN (5:95)
NADPH generující systém:	0,2 µmol		
TL - roskovitin nebo BP-14:	0 $\mu mol.l^{-1}$ - 50 $\mu mol.l^{-1}$	Eluce:	100% mobilní fáze B
Preinkubace 5 min, 37°C		Průtok mobilní fáze:	0,4 ml/min
Substrát (mefenytoin):	35 $\mu mol.l^{-1}$		
Inkubace 30 min, 37°C		Objem nástřiku:	10µl
Zastavení reakce:	100% ACN + 0,1% HCOOH	Detekce:	hmotnostní spektrometrie
IS - methoxymefenytoin:	12,5 $\mu mol.l^{-1}$		
Centrifugace 14000 rpm, 10 min, 4°C			
Pro analýzu bylo odebráno 200 µl supernatantu			

Tab. 6: Shrnutí složek a kroků stanovení inhibičního vlivu na CYP1A2 a podmínky pro analýzu

Inhibice CYP1A2		Podmínky pro analýzu	
Objem reakční směsi:	200 µl	Extrakční fáze:	C_4
Pufr:	50 mM KH_2PO_4, pH = 7,4	Mobilní fáze A:	0,1% HCOOH : ACN (95:5)
Lidské jaterní mikrosomy:	0,02 mg	Mobilní fáze B:	0,1% HCOOH : ACN (5:95)
NADPH generující systém:	0,2 µmol		
TL - roskovitin nebo BP-14:	0 $\mu mol.l^{-1}$ - 50 $\mu mol.l^{-1}$	Eluce:	100% mobilní fáze B
Preinkubace 5 min, 37°C		Průtok mobilní fáze:	0,4 ml/min
Substrát (tacrine):	5 $\mu mol.l^{-1}$		
Inkubace 30 min, 37°C		Objem nástřiku:	10µl
Zastavení reakce:	100% ACN + 0,1% HCOOH	Detekce:	hmotnostní spektrometrie
IS - bucetin:	2 $\mu mol.l^{-1}$		
Centrifugace 14000 rpm, 10 min, 4°C			
Pro analýzu bylo odebráno 200 µl supernatantu			

Tab. 7: Shrnutí složek a kroků stanovení inhibičního vlivu na CYP2C9 a podmínky pro analýzu

Inhibice CYP2C9		Podmínky pro analýzu	
Objem reakční směsi:	200 µl	Extrakční fáze:	C_4
Pufr:	50 mM KH_2PO_4, pH = 7,4	Mobilní fáze A:	0,1% HCOOH : ACN (95:5)
Lidské jaterní mikrosomy:	0,04 mg	Mobilní fáze B:	0,1% HCOOH : ACN (5:95)
NADPH generující systém:	0,2 µmol		
TL - roskovitin nebo BP-14:	0 µmol.l^{-1} - 50 µmol.l^{-1}	Eluce:	100% mobilní fáze B
Preinkubace 5 min, 37°C		Průtok mobilní fáze:	0,4 ml/min
Substrát (diklofenak):	16 µmol.l^{-1}		
Inkubace 30 min, 37°C		Objem nástřiku:	10 µl
Zastavení reakce:	100% ACN + 0,1% HCOOH	Detekce:	hmotnostní spektrometrie
IS - bucetin:	2 µmol.l^{-1}		
Centrifugace 14000 rpm, 10 min, 4°C			
Pro analýzu bylo odebráno 200 µl supernatantu			

8.5 Podmínky analýzy pomocí RapidFire technologie ve spojení s hmotnostní spektrometrií

Všechny vzorky byly analyzovány pomocí RapidFire technologie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Pro detekci analytů byl použit hmotnostní spektrometr QTrap 5500 (AB Sciex, Framingham, MA, USA). Hmotnostní spektrometr byl optimalizován na jednotlivé stanovované analyty a pracoval v MRM módu.

Hmotnostně spektrometrická detekce hydroxylovaného metabolitu mephenytoinu probíhala v negativním módu za ionizace turbosprejem, v ostatních případech se jednalo o detekci v pozitivním módu za použití ionizace turbosprejem.

Extrakce analytů pomocí RapidFire technologie byla taktéž optimalizována, byl kladen důraz obzvlášť na výběr vhodné extrakční kolonky a také na časový průběh celého extrakčního cyklu. V případě testování stability v plazmě, mikrozomální stability a vazby na plazmatické proteiny byla použita extrakční kolonka s náplní C18 a extrakční cyklus měl následující průběh: nasátí vzorku – 600 ms, nástřik vzorku na kolonku – 3000 ms, eluce – 7000 ms a reekvilibrace – 1500 ms.

V případě testování inhibičního účinku roskovitinu a jeho derivátu na CYP aktivity byla využita kolonka s náplní C4 a cyklus byl: nasátí vzorku – 600 ms,

nástřik vzorku na extrakční kolonku – 3000 ms, eluce – 5000 ms a reekvilibrace – 500 ms.

Průtok na jednotlivých pumpách RapidFire extraktoru byl následující: pumpa 1 – 1,5 ml/min, pumpa 2 - 1,25 ml/min, pumpa 3 – 0,4 ml/min. Hmotnostně spektrometrická analýza byla založena na detekci mrm přechodů pro jednotlivé analyty (viz tabulka 8)

Tab. 8: MRM přechody pro hmotnostně spektrometrickou analýzu vzorků a ostatní parametry (DP – deklasterizační potenciál, CE – kolizní energie, CXP – potenciál na výstupu kolizní cely

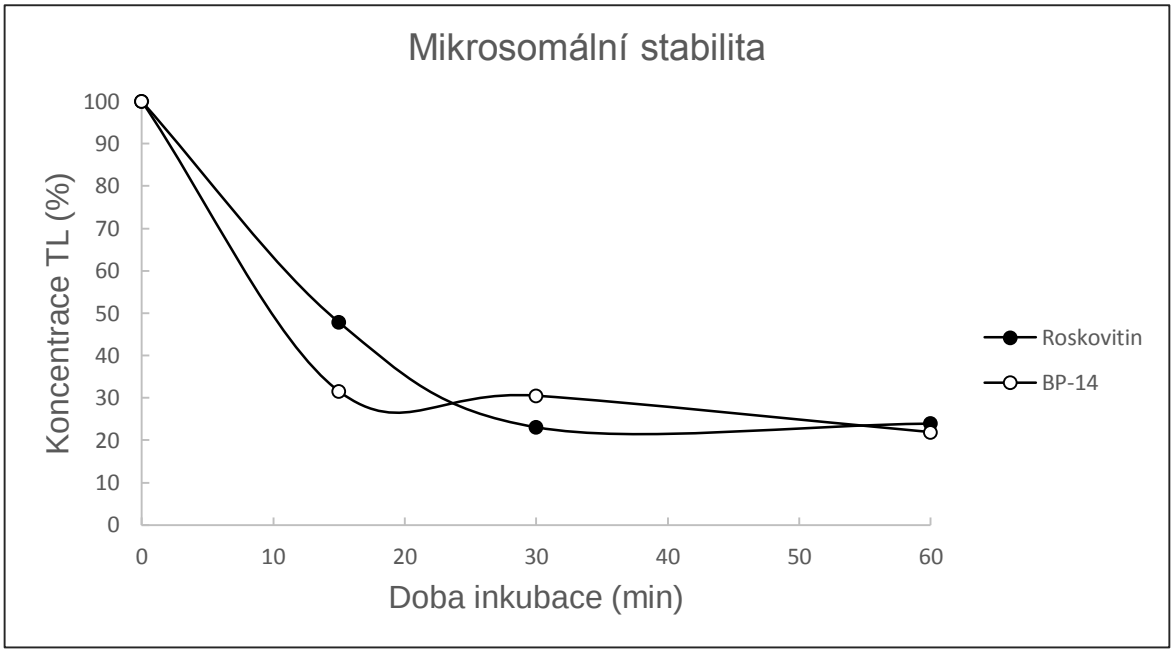
Testovaná látka	MRM přechod	DP	CE	CXP
BP-14	473,221 – 158,2	161	53	10
roskovitin	355,131 – 233,2	121	39	10
1-hydroxytacrin	331,227 – 313,3	76	13	12
4-hydroxymephenytoin	232,953 – 190,2	-85	-20	-9
1-hydroxydiclofenak	313,996 – 268,0	101	19	8
bucetin	224,160 – 136,0	56	25	10
4-methoxymephenytoin	247,019 – 118,0	-110	-56	-9

Pro všechy analýzy byl iontový zdroj optimalizován následovně: iontový zdroj – Turbo Spray, curtain gas: 20 arbitrárních jednotek, collision gas: medium, ion spray voltage: 5500V, teplota iontového zdroje: 600 ºC, ion source gas GS1: 60 arbitrárních jednotek, ions source gas GS2: 60 arbitrárních jednotek.

9 Výsledky

9.1 Mikrosomální stabilita

Mikrosomální stabilita testovaných látek byla testována v průběhu jedné hodiny (vzorky byly odebírány po 0, 15, 30 a 60 minutách). Grafické znázornění stability v čase je shrnuto v obrázku 6.

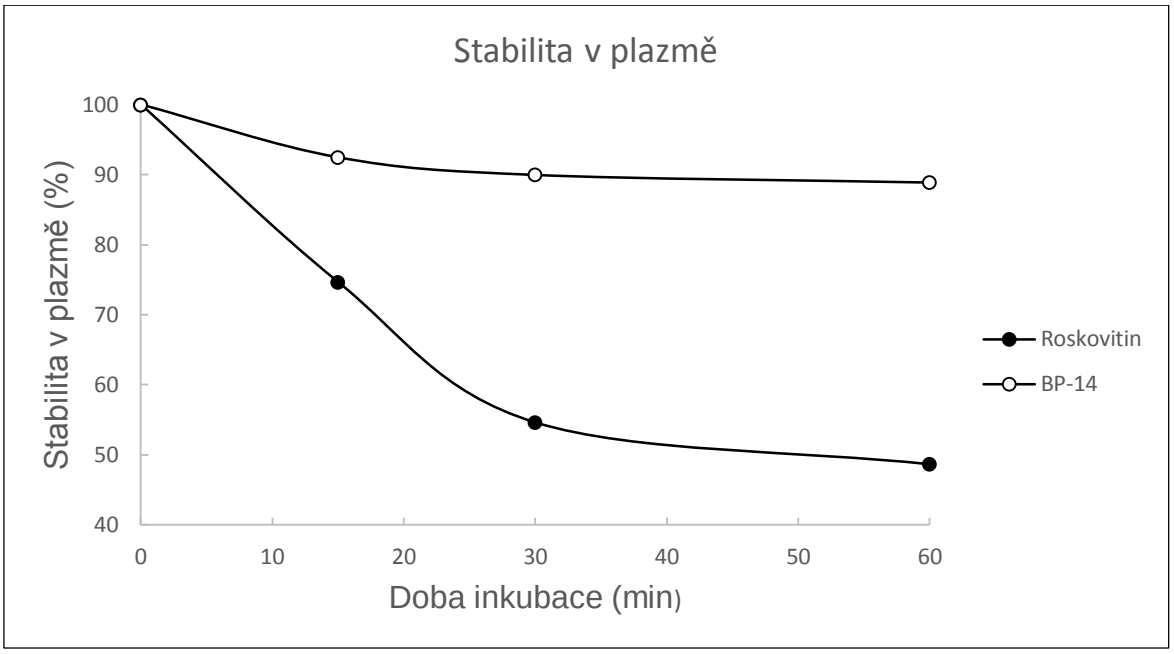


Obr. 6: Závislost mikrosomální stability (%) testovaných látek na době inkubace (min)

Orientačním ADME testem byl pozorován výrazný pokles koncentrace testované látky roskovitinu i jeho derivátu BP-14 v závislosti na čase. Již po 30 minutách od začátku experimentu byl pozorován výrazný úbytek testovaných látek a to až pod 50 % z původní koncentrace v kontrolním vzorku.

9.2 Stabilita v plazmě

Stabilita v plazmě byla stanovena pro obě látky v průběhu jedné hodiny (analýza při 0, 15, 30 a 60 minutách). Grafické znázornění poklesu koncentrací v časovém průběhu je zobrazeno na obrázku 7.



Obr. 7: Závislost stability v plazmě (%) testovaných látek na době inkubace (min)

U roskovitinu dochází k velmi výraznému poklesu koncentrace během jedné hodiny až na 20 % původní koncentrace v kontrolním vzorku. U látky BP-14 dochází k nevýraznému poklesu do hladiny 90 % původní koncentrace.

9.3 Vazba na plazmatické bílkoviny

Vazba na plazmatické bílkoviny byla stanovena v 50% a 100% lidské plazmě pro obě testované látky. Inkubace probíhala po dobu 2 hodin. Bylo vypočteno procentuální zastoupení vázané frakce a volné frakce testovaných látek a výsledky jsou znázorněny v tabulce 9.

Tab. 9: Vyjádření volné a navázané frakce testované látky na plazmatické bílkoviny v plazmě.

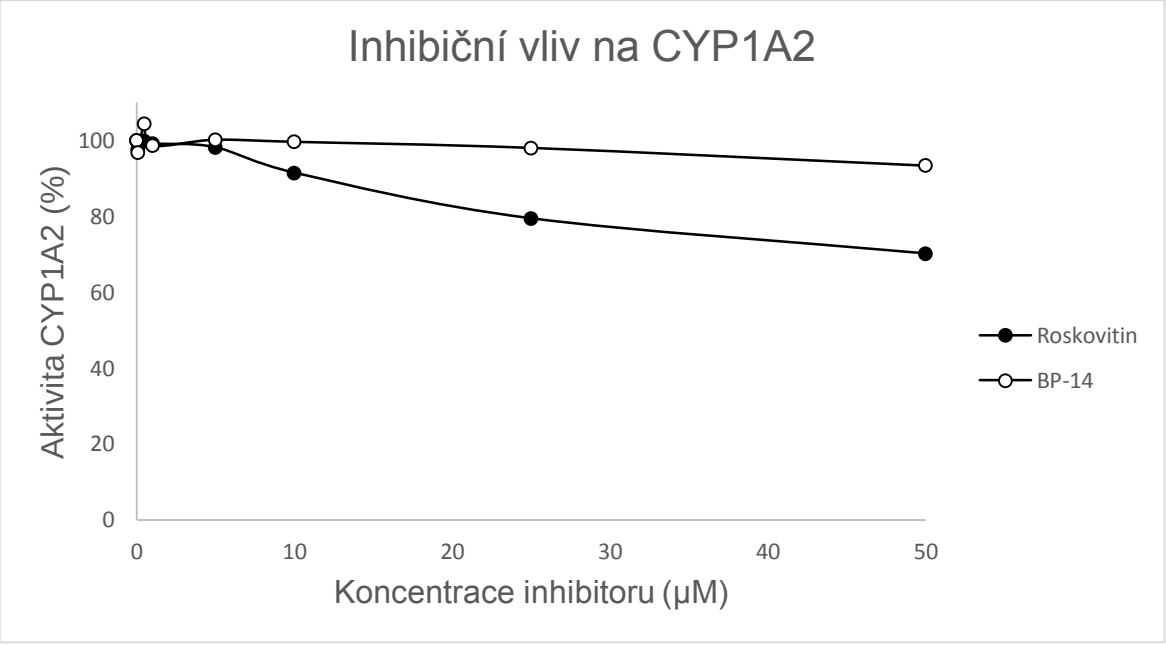
	100% plazma		50% plazma	
TL	Vázaná frakce	Volná frakce	Vázaná frakce	Volná frakce
Roskovitin	94%	6%	89%	11%
BP-14	99%	1%	94%	6%

Vazba na plazmatické bílkoviny u látky BP-14 dosahuje 99 % v přítomnosti 100% plazmy. Toto může mít významný vliv na vznik mezilékových interakcí (podobně jako u warfarinu).

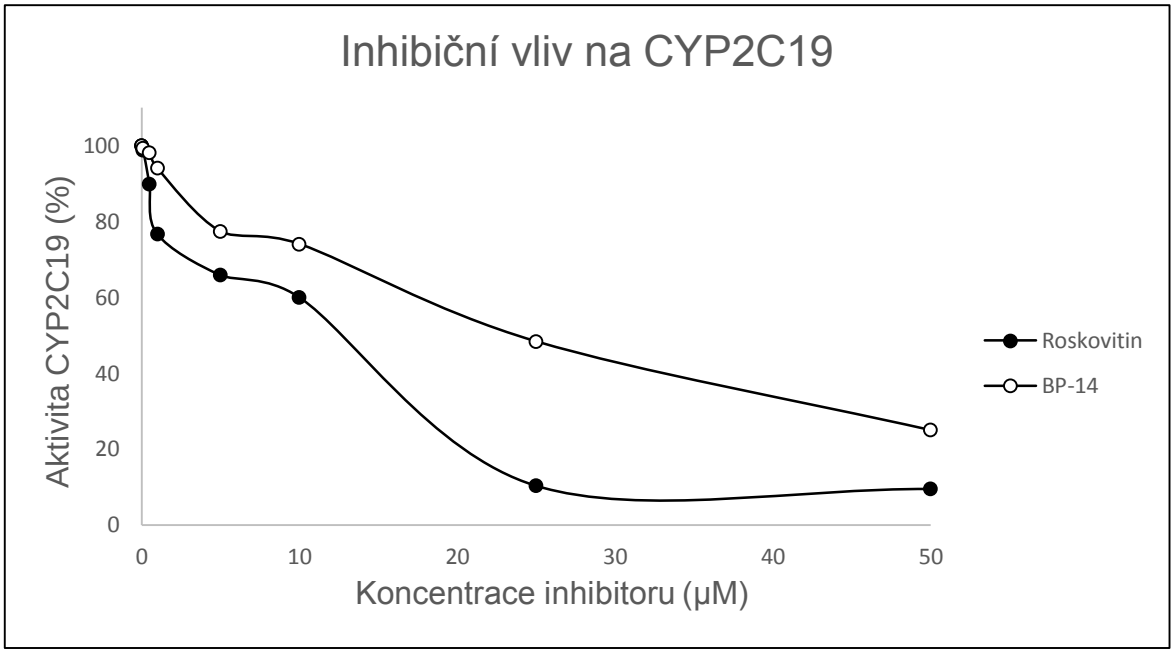
Vazebnost ve 100% plazmě u roskovitinu byla 94 %, tj. volná frakce léčiva je 6 %.

9.4 Inhibiční vliv na CYP *in vitro*

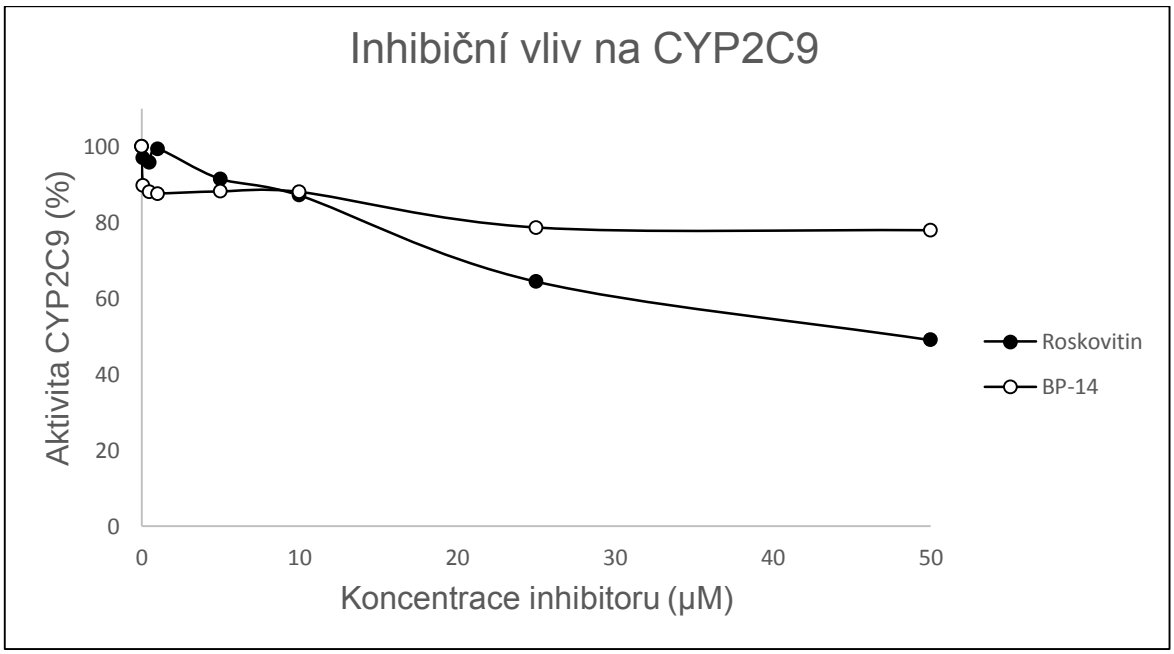
V rámci mé bakalářské práce jsem si také vyzkoušela testování účinku studovaných látek na aktivitu významných lidských jaterních cytochromů P450, které se účastní významnou měrou na metabolismu léčiv. Konkrétně byl inhibiční vliv testovaných látek, roskovitinu a BP-14, sledován u třech forem jaterních biotransformačních enzymů (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9). Při analýze byla detekována koncentrace vznikajícího metabolitu z prototypického substrátu a případný úbytek této koncentrace v závislosti na zvyšující se koncentraci testované látky vlivem jejího inhibičního účinku. Inhibiční vliv byl sledován na sedmi koncentračních úrovních testované látky (inhibitoru). Shrnutí výsledků interakce bylo graficky znázorněno na obrázkách 8 – 10.



Obr. 8: Ovlivnění specifické aktivity enzymu (%) CYP1A2 v závislosti na koncentraci inhibitoru (μM)



Obr. 9: Ovlivnění aktivity enzymu (%) CYP2C19 v závislosti na koncentraci inhibitoru (μM)



Obr. 10: Ovlivnění aktivity enzymu (%) CYP2C9 v závislosti na koncentraci inhibitoru (μM)

Jak roskovitin, tak jeho derivát BP-14 interagovaly určitou měrou se všemi vybranými CYP. Roskovitin oproti látce BP-14 vykazoval vyšší schopnost inhibovat enzymovou aktivitu testovaných cytochromů P450. BP-14 inhibovala nejvýrazněji CYP2C19, kde byl pozorován pokles aktivity daného enzymu při vyšších koncentracích látky BP-14 až pod 40 % z celkové enzymové aktivity v kontrolním vzorku (tj. vzorek bez testované látky).

10 Diskuze

Roskovitin je nový derivát rostlinných hormonů cytokininů s potenciálními protinádorovými účinky. V současné době je zahrnut do fáze I a II klinického testování v zahraničí. Na základě úspěchu roskovitinu a jemu podobných látek (olomoucin a olomoucin II) dochází ke snahám syntetizovat podobné látky s mírně odlišnou strukturou (jiné substituenty nebo počty dusíků) k navýšení účinnosti těchto nových látek a zároveň k zajištění jejich vyšší farmakologické účinnosti. Podobným způsobem vznikla i látka s označením BP-14, která je společně s roskovitinem předmětem zájmu této bakalářské práce.

U obou látek byly provedeny screeningové testy pro zjištění stability v mikrosomech a v plazmě. Dále bylo zjišťováno, z kolika procent se látky váží na plazmatické bílkoviny. Pozornost byla také věnována zjištění jejich vlivu na tři formy biotransformačních enzymů – CYP1A2, CYP2C9 a CYP2C19.

Roskovitin je za účasti CYP3A4 metabolizován na pět různých metabolitů, z nichž je nejvíce zastoupena kyselina roskovitinová (McClue *et* Stuart, 2008). Tento hlavní metabolit bohužel nemá žádné farmakologické účinky. Proto je zásadní určení jeho stability v přítomnosti mikrosomů, čím je rychlejší metabolismus, tím rychleji je eliminován žádoucí účinek podaného léčiva. Metodou analýzy pomocí RF-MS bylo zjištěno, že koncentrace roskovitinu v přítomnosti lidských mikrosomů klesá až o 50 % již po 15 minutách. Toto zjištění odpovídá předchozím výzkumům, kdy byl určen biologický poločas roskovitinu na 16 minut (McClue *et* Stuart, 2008). Výrazný úbytek koncentrace byl pozorován i u látky BP-14, který byl po 30 minutách na hranici 30 % z původní hodnoty.

V dalších testech byl prokázán výrazný rozdíl ve stabilitě v plazmě mezi oběma testovanými látkami. Po hodině inkubace klesla koncentrace roskovitinu přibližně o 50 % z původní koncentrace, kdežto hladina BP-14 se ustálila již mezi 15 a 30 minutami na hladinu 90% z původní koncentrace.

Obě látky vykazují vysokou vazebnost na plazmatické proteiny, v případě roskovinu se jedná o 94% vazebnost a BP-14 se váže až z 99 %. Takto vysoká míra vazby na plazmatické bílkoviny zvyšuje riziko vzniku nežádoucích mezilékových interakcí v případě podání více léčiv z důvodu kompetice o vazbu na

jednotlivé proteiny. Důsledkem toho může být navýšení toxicity dotčeného léčiva nebo nárůst výskytu nežádoucích účinků. Toto je problém například u používaného warfarinu, u kterého je volná frakce léčiva kolem 1% (http://www.drugs.com/pro/warfarin.html, 9. 5. 2015) a při podání jiných léků s vysokou vazebností na plazmatické bílkoviny dochází ke zvýšení rizika krvácení.

U všech třech sledovaných forem CYP (1A2, 2C9 a 2C19) byly zaznamenány potenciální interakce s testovanými látkami. Míra inhibice byla u všech třech forem nižší v přítomnosti BP-14 než v přítomnosti roskovitinu. Inhibice všech tří forem sledovaných CYP roskovitinem je srovnatelná z předchozím výzkumům (McMlue *et* Stuart, 2008). BP-14 vykazovala největší inhibiční vliv na CYP2C19, kdy pokles enzymové aktivity v přítomnosti nejvyšší koncentrace testované látky dosahoval až zhruba 40 % z celkové aktivity enzymu.

I přesto, že dle literatury výsledky screeningových studií získané pomocí RF-MS korelují s výsledky získanými konvenčními metodami, jako je například LC-MS (Wu *et al.*, 2012), by bylo vhodné výsledky ověřit pomocí dalších zavedených metod ve farmakologické laboratoři (např. HPLC s UV detekcí), případně určit hodnotu IC_{50} v případě inhibičních studií s CYP pro částečnou kvantifikaci inhibičního účinku. Dále je potřeba rozšířit testování inhibičního vlivu o další formy CYP enzymů, které se podílejí na metabolismu léčiv.

11 Závěr

Cíle vytyčené v úvodu práce byly splněny, farmakologické testy, které byly vybrány pro bakalářskou práci, byly provedeny. V rámci bakalářské práce jsem si vyzkoušela stanovení mikrosomální stability, stability v plazmě, vazby na plazmatické bílkoviny a stanovení inhibičního vlivu na tři významné formy CYP pro dvě testované látky, které jsou potenciální protinádorová léčiva.

K analýze byl použit nový systém RapidFire s MS detekcí, který umožňuje velmi rychlou analýzu vzorku.

Dle získaných výsledků je roskovitin látka velmi nestabilní v mikrosomech i v plazmě, která se váže na plazmatické bílkoviny z 94 %. Byl prokázán výrazný inhibiční účinek na CYP2C9 a CYP2C19. Tato látka sloužila v mé bakalářské práci jako kontrolní látka.

Látka BP-14 byla nestabilní v mikrozomech v podobné míře jako roskovitin, ale výrazně stabilnější v plazmě. Na plazmatické bílkoviny se váže až z 99 %, což nevylučuje možnost vzniku závažných lékových interakcí. Látka BP-14 inhibovala enzymovou aktivitu CYP2C9 a CYP2C19 ve vyšší míře ve srovnání s inhibičním účinkem na CYP1A2.

12 Použitá literatura

ANZENBACHER P., ANZENBACHEROVÁ E. (2001) Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 737-747.

ANZENBACHER P., ANZENBACHEROVÁ E. (2012) Drug-Metabolizing enzymes – An overview. *Metabolism of drugs and other xenobiotics*, str. 3-20.

DI L., KERNS E. H., HONG Y., CHEN H. (2005) Development and application of high throughput plasma stability assay for drug discovery. *International Journal of Pharmaceutics* 297: str. 110-119.

GUENGERICH F. P. (2012) Cytochromes P450. *Metabolism of drugs and other xenobiotics*, str. 27-66.

HAIDER CH., GRUBINGER M., ŘEZNÍČKOVÁ E. (2013) Novel inhibitor sof cyklin-dependent kinases combat hepatocellular carcinoma without inducing chemoresistance. *Molecular Cancer Therapeutics*

HOFFMANN M. F., PREISSNER S. C., NICKEL J., DUNKEL M., PREISSNER R., PREISSNER S. (2014) The Transformer database: biotransformation of xenobiotics. *Nucleic acids research*; 42(Database issue): D1113-D1117..

INGELMAN-SUNDBERG M., SIM S. C. (2010) Pharmacogenetic biomarkers as tools for improved drug therapy; emphasis on the cytochrome P450 system. *Biochemical and Biophysical Research Communications 396*, str. 90-94.

JORDA R., PARUCH K., KRYŠTOF V. (2012) Cyklin-dependent kinase inhibitors inspired by roscovitine: Purine bioisosteres. *Current Pharmaceutical Design* 18, str. 2974-2980

KHALIL H. S., MITEV V., VLAYKOVA T., CAVICCHI L., ZHELEV N. (2015) Discovery and development of Seliciclib. How systems biology approaches can lead to better drug performance. *Journal of Biotechnology* 202, str. 40-49

KLINGENBERGR M. (1958): Pigments of rat liver microsomes. *Archives of biochemistry and biophysics 75*, str. 376-386.

KOUSALOVÁ L., BARANOVÁ J., ANZENBACHER P. (2003) Lékové interakce na úrovni cytochromů P450 – Část I. Interakce na úrovni CYP3A4, *Klinická farmakologie a farmacie* 17, 151-157.

LEE S. S., BUTERS J. T., PINEAU T., FERNANDEZ-SALGUERO P., GONZALEZ F. J. (1996) Role of CYP2E1 in the hepatotoxicity of acetaminophen. *Journal of Biooicall Chemistry.;* 271(20): str. 12063-7.

LIN JIUNN H., LU ANTHONY Y. H. (1997) Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. *Pharmacological reviews* 49(4): str. 404-449.

MCDONELL, A. M., DANG, C. H. (2013) Basic Review of the Cytochrome P450 System. *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology*, 4(4), str. 263-268.

NELSON D. R., KOYMANS L., KAMATAKI T., STEGEMAN J. J., FEYREISEN R., WAXMAN D. J. *et* al. (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6, str. 1-42.

PARKINSON A. (2001) Biotransformation of xenobiotics. *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 6th edn (ed. C. D. Klaasen), McGraw – Hill, New York, str. 133-224.

POND S. M., TOZER T. N. (1984) First-pass elimination. Basic concepts and clinical consequences. *Clinical Pharmacokinetics,* 9(1),1-25.

RENDIC S., DI CARLO F. J. (1997) Human Cytochrome P450 Enzymes: A Status Report Summarizing Their Reactions, Substrates, Inducers, and Inhibitors. *Drug Metabolism Reviews*, 29 (1&2, 413-580)

ROBERTS B. J., SONG B. J., SOH Y., PARK S. S., SHOAF S. E. (1995) Ethanol induces CYP2E1 by protein stabilization. Role of ubiquitin conjugation in the rapid degradation of CYP2E1. *Journal of Biological Chemistry*; 270(50): str. 29632-5.

SEITZ H. K., MUELLER S. (2012) Metabolism of alcohol and its consequences. *Metabolism of drugs and other xenobiotics*, str. 493-516.

WĘSIERSKA-GĄDEK J., BORZA A., KOMINA O., MAURER M. (2009) Impact of roscovitine, a selective CDK inhibitor, on cancer cells: bifunctionality increases its therapeutic potential. *Acta Biochimica Polonica* 56(3), str. 495-501

XIANG WU, JING WANG, LORY TAN, JOHN BUI, ERIK GJERSTAD, KIRK MCMILLAN a WENTAO ZHANG (2012) In vitro ADME profiling using high-throughput RapidFire mass spectrometry: Cytochrome P450 inhibition and metabolic stability assays. *Journal of biomolecular screening* 17(6), str. 761-772.

ZANGER U. M. (2012): Introduction to drug metabolism. *Metabolism of drugs and other xenobiotics*, str. 287-296.

ZATLOUKAL M., JORDA R., GUCKÝ T., ŘEZNÍČKOVÁ E., VOLLER J., POSPÍŠIL T., MALÍNKOVÁ V., ADAMCOVÁ H., KRYŠTOF V, STRNAD M. (2013) Synthesis and in vitro biological evaluation of 2,6,9-trisubstituted purines targeting multiple cyclin-dependent kinases. *European journal of medicinal chemistry* 61, str. 61-72

ZUBER R., ANZENBACHEROVÁ E., ANZENBACHER P. (2002) Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 6, 189-198.

Internetové zdroje:

Agilent Technologies, Inc. (2011)

http://www.chem.agilent.com/Library/brochures/Agilent%20RapidFire%20300%20High%20Throughput%20Mass%20Spectrometry%20System.pdf, 25. 4. 2015.

http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/Instruments-Systems/Mass-Spectrometry/RapidFire-360/Pages/rapidfireoverview.aspx, 25. 4. 2015

http://www.drugs.com/pro/warfarin.html, 9. 5. 2015

http://www.cyprotex.com/admepk/protein_binding/plasma-protein-binding, 4. 5. 2015