

**SEMMELWEIS EGYETEM**  
**DOKTORI ISKOLA**

**Ph.D. értekezések**

**2100.**

**FÜREDI ANDRÁS**

**Patobiokémia**  
című program

Programvezető: Dr. Mandl József, egyetemi tanár  
Témavezető: Dr. Szakács Gergely, tudományos főmunkatárs

# Új megközelítések a multidrog rezisztens tumorok terápiájában

Doktori értekezés

**Füredi András**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szakács Gergely, MD PhD, tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Prof. Dr. Szebeni János, MD PhD DSc, intézetigazgató  
Dr. Szállási Zoltán, MD PhD, assistant professor

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kulka Janina, MD PhD, egyetemi tanár  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Ladányi Andrea, PhD, osztályvezető  
Dr. Kenessey István, MD PhD, szakorvos

Budapest  
2017

## Tartalomjegyzék

<b>1. Rövidítések jegyzéke</b> .....	6
<b>2. Bevezetés</b> .....	8
2.1 A tumor sejtek jellemzői és a kemoterápia fejlődése .....	8
2.1.1 A modern kemoterápiák megszületése .....	9
2.1.2 A tumor sejtek speciális tulajdonságai .....	10
2.1.3 Biológiai terápiák a rákos megbetegedések kezelésében .....	12
2.1.4 Anti-tumor immunterápiák .....	13
2.2 Multidrog rezisztencia (MDR) .....	15
2.2.1 Bevezetés.....	15
2.2.2 A P-glikoprotein felfedezése .....	16
2.2.3 A P-glikoprotein fiziológiai szerepe .....	18
2.2.4 A P-glikoprotein szerepe a tumorok multidrog rezisztenciájában .....	19
2.2.5 P-glikoprotein gátlószerek: remények és kudarcok.....	20
2.2.6 A P-glikoprotein okozta MDR bemutatása <i>in vitro</i> .....	21
2.2.7 Járulékos érzékenység ( <i>collateral sensitivity</i> ) és az MDR-szelektív vegyületek felfedezése .....	23
2.2.8 Az MDR-szelektív vegyületek generációi.....	26
2.2.9 P-glikoprotein és tumor őssejtek .....	27
2.3 Preklinikai állatmodellek a gyógyszerkutatásban.....	28
2.3.1 A hatóanyag keresésben használt <i>in vitro</i> modellrendszerek hátrányai .....	28
2.3.2 A daganat-modellek fejlődése, xenograft tumorok.....	29
2.3.3 Tumormodellek a drog rezisztencia kutatásában .....	30
2.3.3.1 A P388 – P388/ADR egér limfoblasztikus leukémia allograft modell ..	30
2.3.3.2 MES-SA és MES-SA/Dx5 uterin szarkóma xenograft modell .....	32
2.3.4 A xenograft tumormodellek korlátai .....	33
2.3.5 Genetikailag módosított tumormodellek.....	35
2.3.6 A drog rezisztencia evolúciójának vizsgálata transzgenikus <i>brca1<sup>-/-</sup>;p53<sup>-/-</sup></i> spontán kialakuló egér emlő tumor modellben .....	36
2.4 Az MDR-szelektív vegyületek lehetséges támadáspontjai.....	38
2.5 A pegilált liposzómális doxorubicin (Doxil®/Caelyx®/PLD).....	39
<b>3. Célkitűzések</b> .....	41
<b>4. Anyagok és módszerek</b> .....	42
4.1 Vegyület adatbázis és az MDR-szelektív molekulák azonosítása. ....	42
4.2 Vegyületek.....	42

4.3 Drog érzékeny és drog rezisztens sejtvonal párok.....	42
4.4 Emlő tumor sejtvonal panel. ....	43
4.5 Vér-agy gát endotél sejtvonal. ....	43
4.6 BRCA1-WT és –KO DT40 csirke limfóma sejtvonal. ....	43
4.7 Citotoxicitási vizsgálatok.....	43
4.8 Immuncitokémia. ....	44
4.9 RNS izolálás és RT-PCR.....	44
4.10 Áramlási citometria. ....	45
4.11 Állatkísérletek. ....	45
4.12 Allograft tumorok. ....	45
4.13 Spontán kialakuló, átültethető <i>Brcal<sup>-/-</sup>;p53<sup>-/-</sup></i> egér emlő tumorok.....	46
4.14 Primer tumor sejtek izolálása spontán kialakuló egér emlő daganatokból. ....	46
4.15 DOX és PLD koncentráció kimutatása vérből. ....	47
4.16 Adatelemzés. ....	47
<b>5. Eredmények</b> .....	<b>48</b>
5.1 Új MDR-szelektív vegyületek azonosítása és jellemzése in vitro rendszerekben .....	48
5.1.1 Új MDR-szelektív molekulák <i>in silico</i> azonosítása a DTP adatbázisában.....	48
5.1.2 Az új MDR-szelektív vegyületek tesztelése in vitro citotoxicitási esszében .....	49
5.2 MDR-szelektív molekulák Pgp expresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata sejtvonalakon, primer tumorból izolált sejteken, valamint a vér-agy gát sejtes modelljén .....	51
5.2.1 Az új MDR-szelektív vegyületek képesek egyetlen, nagy dózisú kezeléssel megszüntetni az MDR-sejtek Pgp expresszióját és újra érzékenyíteni azokat a kemoterápiás szerekkel szemben .....	51
5.2.2 Az MDR-szelektív molekulák Pgp vesztést okozó hatása összehasonlítható és kategorizálható .....	54
5.2.3 Az NSC57969 hatékonyan képes csökkenteni a Pgp expressziót egy doxorubicin rezisztens <i>brca1<sup>-/-</sup>;p53<sup>-/-</sup></i> spontán egér emlő tumor modellből származó primer sejt kultúrában .....	58
5.2.4 Az MDR-szelektív vegyületek egészséges vér-agy gát endotél sejteken nem okoznak Pgp expresszió csökkenést .....	59
5.3 A PLD hatásának vizsgálata szenzitív és rezisztens in vitro és allograft modelleken .....	60
5.3.1 A doxorubicin nagyobb toxicitást mutat, mint a PLD egy humán emlő tumor sejtvonal panelen .....	61
5.3.2 A P-glikoprotein expresszáló sejtvonalak teljes rezisztenciát mutatnak a PLD-re .....	62

5.3.3 A PLD hatástalan egy Pgp túlexpresszázó egér B-sejtes leukémia allograft modellben .....	63
5.4 A PLD terápiás hatásának vizsgálata egy klinikailag releváns egér emlő tumor modellen .....	64
5.4.1 A PLD kezelés meglepően hatékony egy <i>Brca1<sup>-/-</sup>;p53<sup>-/-</sup></i> genetikailag módosított egér emlő tumor modellben .....	64
5.4.2 A drog rezisztens tumorok fokozottan expresszálják az egerekben P-glikoprotein fehérjét kódoló <i>Abcb1a</i> és <i>b</i> géneket .....	69
5.4.3 A DOX kezelés során drog rezisztenssé vált tumorok érzékenyek a PLD-re ....	70
5.4.4 A PLD kiemelkedő hatékonysága a DOX-hoz képest megmagyarázható a két vegyület eltérő farmakokinetikai tulajdonságaival.....	72
5.4.5 A BRCA1-kiütött sejtek kismértékben, de szignifikánsan érzékenyebbek a DOX, a PLD és egyéb topoizomeráz II gátló kezelésekre, mint a vad típusú sejtvonalak ...	73
<b>6. Megbeszélés .....</b>	<b>75</b>
<b>7. Következtetések .....</b>	<b>87</b>
<b>8. Összefoglalás .....</b>	<b>89</b>
<b>9. Summary .....</b>	<b>90</b>
<b>10. Irodalomjegyzék .....</b>	<b>91</b>
<b>11. Saját publikációk jegyzéke .....</b>	<b>112</b>
10.1 Dolgozat részét képező publikációk .....	112
10.2 Dolgozatban nem szereplő publikációk.....	112
<b>12. Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>114</b>

## 1. Rövidítések jegyzéke

1,10-fen – 1,10-fenantrolin

2-DG – 2-deoxy-D-glükóz

8OHQ – 8-hidroxikinolin

ABC – ATP-binding cassette

ABCB1 – ATP-binding cassette sub-family B member 1

ABCG2 – ATP-binding cassette sub-family G member 2

ABL – Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1

ALL – akut limfoblasztikus leukémia

AML – akut mieloid leukémia

ANLL – akut nem-limfoblasztikus leukémia

ATCC – American Type Culture Collection

ATP – adenzin-trifoszfát

AUC – area under the curve

BAX – bcl-2-like protein 4

BCG – Bacillus Calmette-Guérin

BCL-2 – B-cell lymphoma 2

BCR – breakpoint cluster region protein

BCS – Body Conditioning Scoring

BRCA1 – breast cancer type 1 susceptibility protein

BSA – borjú szérum albumin

CDDP – ciszplatin

CHO – chinese hamster ovary

CML – krónikus mieloid leukémia

CRISPR – clustered regularly interspaced short palindromic repeats

CTLA-4 – citotoxikus T-limfocita-asszociált antigén 4

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindol

DMEM – Dulbecco Modified Eagle's minimal essential medium

DOX – doxorubicin

DTP – Developmental Therapeutics Program

EGFR – epidermal growth factor receptor

FACS – fluorescent activated cell sorting

FBS – főtális borjú szérum  
FDA – Food and Drug administration  
FGF-2 – basic fibroblast growth factor  
GEMM – genetically engineered mouse model  
HCC – hepatocelluláris karcinóma  
HER2 – human epidermal growth factor receptor 2  
HMGA1 – high-mobility group protein 1  
IDK – invazív duktális karcinóma  
IFN $\alpha$  – interferon  $\alpha$   
IL2 – interleukin 2ú  
MBC – metastatic breast cancer  
MDR – multidrog rezisztencia  
MDR1 – multidrug resistance protein 1  
MPEG – metoxi-polietilén-glikol  
MTD – maximális tolerálható dózis  
NCI-60 – National Cancer Institute 60 sejtvoal panel  
PABA – para-amino-benzoosav  
PARP – Poly (ADP-ribose) polymerase  
Pgp – P-glikoprotein  
PLD – pegilált liposzomális doxorubicin  
PTEN – phosphatase and tensin homolog  
RB – retinoblasztóma  
ROS – reactive oxigen species  
RR – rezisztencia hányados  
RT-PCR – reverse transcription polymerase chain reaction  
SR – szelektivitási hányados  
TALEN – transcription activator-like effector nucleases  
TP53 – tumor protein p53  
TQ – tariquidar  
TSC – tioszemikarbazon  
VEGF – vascular endothelial growth factor  
WT – wild type

## 2. Bevezetés

### 2.1 A tumor sejtek jellemzői és a kemoterápia fejlődése

A daganatos megbetegedések következtében bekövetkező halálesetek száma világszerte növekszik. Míg 2008-ban 12,7 millió embert diagnosztizáltak rosszindulatú daganattal és 8,2 millió rákkal kapcsolatos halálesetet regisztráltak, addig 2012-ben a diagnózisok száma 11 százalékkal emelkedett, és 8 százalékkal magasabb volt a daganatos betegségek okozta halálesetek száma ([1],[2]). Annak ellenére, hogy az újabb, célzott rákellenes gyógyszerek jelentősen megnövelik a betegek várható túlélését több tumor típusnál is [3], a klinikai siker gyakran átmenetinek bizonyul a kemoterápiával szemben kialakuló rezisztencia miatt.

Az X kromoszóma inaktiválódásának vizsgálata, valamint mélyszekvenálási adatok szerint a tumorok gyakran egyetlen hibás sejtől keletkeznek. Ugyanakkor ez nem jelenti automatikusan egy eredeti progenitor sejt jelenlétét, ami a teljes tumor kialakulásáért felelős, épp ellenkezőleg, a karcinogenezis egy többlépcsős, összetett folyamat, melynek során a sejtek fokozatosan válnak rosszindulatúvá.

Az elképzelés, hogy a rákos megbetegedések a modern kor betegségei, közkeletű tévedés, amit mi sem cáfol meg jobban, mint a dinoszaurusz csontvázakon talált nagyszámú, különböző súlyosságú, jó- és rosszindulatú tumor felfedezése, amelyek kora néha még a 90 millió évet is meghaladja ([4],[5]). Nem csak a dinoszauruszok, de elődeink is küzdöttek a daganatos betegségekkel. Egy közelmúltban publikált tanulmány egy nagy valószínűséggel a Homo erectus és Homo neanderthalensis közötti időszakban élt előember lábujj oszteoszarkómájáról számol be, amit egy közel 1.7 millió éves leleten figyeltek meg [6], míg a legrégebbi neandervölgyi emberen talált tumort egy borda csonton azonosították [7].

Írásos emlékeink között először 3000 éves egyiptomi papiruszokon akadhatunk a daganatok leírására [8], azonban már ez az első híradás sem túl derűlátó a tumorokkal kapcsolatban. Konklúzióként csak annyit ír az agresszív emlőrákok kezeléséről, hogy „Nincs rá gyógymód”.



A rosszindulatú daganatokat 11 tulajdonság „fémjelzi” (Hallmarks of Cancer, [9]). A daganatos sejtek fenntartják a folyamatos osztódásért felelős jelátviteli útvonalaik aktivitását, elkerülik a növekedést gátló jelek által hordozott parancsokat, kivédik az immunrendszer támadásait, immortalizálódnak, gyulladást képeznek, invazívak és áttéteket hoznak létre, indukálják az érképződést (angiogenezis), genomjuk instabil és könnyen mutálódik, ellenállnak a sejthalálnak és képesek az energetikai rendszereik újraprogramozására, amivel még aerob környezetben is a glikolízisből nyerik az energiájukat (Warburg-effektus).

### *2.1.1 A modern kemoterápiák megszületése*

A modern onkológiai ellátás három alappillérre épül: a sebészi eltávolításra, a radioterápiára és a kemoterápiára. Míg a rosszindulatú daganatok sebészi kezelése évezredek óta elérhető (az első leírás az ókori Egyiptomból származik), addig a röntgensugárzáson alapuló módszerek csak a 20. század elejétől, a kemoterápiában használatos alkiláló szerek pedig csak a század közepétől váltak elérhetővé [8].

Érdekes módon, a megfigyelés, miszerint bizonyos daganatok kevésbé vagy egyáltalán nem reagálnak az alkalmazott kezelésre, a nem-sebészi eljárások megjelenésével egyidős. A nitrogén mustár alapú harci gázok származékaiként szintetizált alkiláló szerekkel kezelt leukémiás betegek rendkívül jól reagáltak a kezelésre, a legtöbbjükönél azonban a remissziót gyors relapszus követte [10], ami a gyógyszer rezisztencia kialakulásával volt magyarázható. A mustárgáz származékokat követő tumor ellenes vegyületek a különböző fertőző betegségek ellen kifejlesztett antibakteriális szerek voltak, amelyek túl toxikusnak bizonyultak a hétköznapi bakteriális fertőzések kezeléséhez, mint például a para-amino benzoésav (PABA, [11]).

Az antimikrobiális szerek daganat kemoterápiaként való alkalmazásának koncepciója vezetett az olyan antimetabolitok szintéziséhez, mint például az aminopterin és az amethopterin (metotrexát [12],[13]), melyekkel először értek el átmenetileg teljes remissziót gyermekkori akut limfoblasztikus leukémiában [14], majd pár évvel később teljes gyógyulást a kor egyik legagresszívabb daganatánál, a choriocarcinomanál ([15], [16]).

Ezek a felfedezések indították útjára és határozták meg a kemoterápiás vegyületek fejlődését a következő évtizedekben. Azonban a bakteriális fertőzések és a rosszindulatú daganatok között nem csak a kezelésében alkalmazott szerek hasonlatosak, hanem az is, hogy a kórokozó baktériumok, illetve a ráksejtek széleskörű rezisztenciát fejlesztenek ki a kezelésekkal szemben. Ahogy a baktériumok, úgy a tumor sejtek is képesek túlélni a kezelés kezdeti fázisait is, úgy, hogy a gyógyszerek számára elérhetetlen helyeken rejtőznek el. A baktériumokhoz hasonlóan a tumor sejtek esetében is írtak le hasonló megfigyeléseket, mikor is sebészi eltávolítást megelőzően a tumor térfogatcsökkentése céljából alkalmazott kombinált kemoterápia teljes remisszióhoz vezetett, azonban egy hónappal később a betegeknél agyi metasztázisok jelentkeztek, ami arra utal, hogy a kezelés alatt már az agyban voltak a később áttétet kialakító sejtek [17]. Ismert, hogy a vér-agy gát nem engedi át a legtöbb kemoterápiás vegyületet, így az agyban megbújó ráksejtek biztonságban túlélhetik a kezelést.

Az érdekes hasonlóságok mellett a baktériumok és a tumor sejtek alapvető jellegükben különböznek: míg a baktériumokra jellemző egyedi tulajdonságok a terápia számára célpontot jelentenek (pl. sejtfal szintézis gátlása), addig a ráksejtek a szervezet saját sejtjeiből alakulnak ki.

### *2.1.2 A tumor sejtek speciális tulajdonságai*

Az egészséges szövetek összetett módon szabályozzák az olyan növekedést serkentő faktorok előállítását és szekrécióját, amelyekkel a sejtosztódás beindítható és irányítható, ezzel tartva fenn a normál működésüket és struktúrájukat [18]. Ebben a rendszerben a sejtek csak adott jelre kezdenek növekedni és osztódni, így stabilizálva a szöveti homeosztázist. A tumor sejtek ezzel szemben szert tehetnek olyan mechanizmusokra, amik képessé teszik azokat a proliferáció folyamatos fenntartására.

Termelhetnek saját növekedési faktorokat, függetlenül magukat a környezetből érkező jelektől, ezzel autokrin szabályozási útvonalat létrehozva [19], vagy stimulálhatják a környezetükben lévő tumor-asszociált strómális sejteket, hogy azok lássák el őket különböző növekedéshez szükséges faktorokkal [20].

Azonban a növekedés folyamatos fenntartása mellett a tumor sejteknek muszáj megküzdniük az olyan erőteljes hatásokkal is, mint a sejtosztódást visszatartó negatív

regulációs rendszerek, amik sok esetben tumorszupresszor gének expressziójával hozhatók összefüggésbe. Ilyen prototipikus fehérjéket kódolnak az RB (retinoblasztóma-asszociált) és TP53 gének, amelyek központi szerepet töltenek be annak eldöntésében, hogy a sejt osztódjon-e vagy lépjen az öregedés (szeneszcencia) vagy a sejthalál (apoptózis) útjára. Az RB fehérje több, intra- és extracelluláris jel integrált feldolgozását végzi, aminek eredményeképpen eldől, hogy a sejt osztódjon-e vagy sem [21]. A daganat sejtek, amikben az RB fehérje funkciója hiányzik, egy fontos ellenőrzőpontot veszítenek a sejtosztódás folyamatában, így gátlástalan, folyamatos növekedés indul be [22]. Ehhez hasonlóan a TP53 is képes megakasztani a sejtciklust, de ezt a leállást olyan belső, intracelluláris anomáliák indukálják, mint a DNS fokozott sérülése vagy a nukleotid raktárak, növekedési szignálok, glükóz és oxigén szintek szuboptimális állapota [23]. Tekintve a TP53 összetett szerepét a sejtciklus szabályozásában, érthető, hogy a legtöbb daganatban tetten érhető a fehérje funkciójának kiesése [24].

Az egészséges sejtek egy másik attribútuma, hogy az apoptózis (programozott sejthalál) útvonal maradéktalanul megvalósul a megfelelő intra- és/vagy extracelluláris jelzések hatására, vagyis hogy ezek a sejtek belső sérülés vagy külső inger eredményeképpen elpusztulnak. Az elméletet, miszerint az apoptózis természetes gátja a tumorok kialakulásának, már több kísérletes eredmény is alátámasztja ([25],[26],[27]). Az apoptózist beindító impulzus kibillenteli az anti- (pl. Bcl-2) és proapoptotikus (Bax és Bak) fehérjéket érzékeny egyensúlyi helyzetükből, ami végül a sejt halálához vezet [25]. Azonban a daganat sejtek képesek eltorzítani ezt az egyensúlyi állapotot, úgy, hogy párhuzamosan fokozzák az antiapoptotikus és csökkentik a proapoptotikus fehérjék expresszióját, ami az apoptózis útvonal megakadásához vezet. Ez nem csak a természetes növekedés szabályozás tekintetében jelent problémát. A kemoterápia során alkalmazott vegyületek legfőbb célja és hatásmechanizmusa a sejthalál indukálása. A sejtek, amelyekben sérültek az apoptózis útvonalhoz tartozó fehérjék, képesek túlélni az olyan toxikus inzultusokat is, mint a kemoterápiás kezelés.

Az apoptotikus reakció megváltozásának problematikájához kapcsolódik a tumor sejtekben megfigyelhető replikatív immortalizáció is. A testi sejtek csak meghatározott számú növekedés-osztódás cikluson mehetnek keresztül, de azt követően nem-osztódó szeneszcens állapotba kerülnek, vagy valamely sejthalál mechanizmussal elpusztulnak.

Ennek a jól szabályozott „replikatív gátnak” a kialakításában bizonyítottan szerepe van a telomereknek, amik a DNS kettős szálak végein található többszörösen ismétlődő szakaszok [28]. Ezek a hexanukleotid ismétlődések védik a különböző kromoszómavégeket az összetapadástól, valamint a DNS-t a folyamatos rövidülés káros hatásaitól. A telomeráz egy specializált DNS polimeráz, ami telomer szakaszokat épít a kromoszóma végekre és jellegzetesen hiányzik minden nem immortalizált sejtből, míg a spontán immortalizálódott sejtvonalak, mint az in vitro tenyésztett tumor sejtek, közel 90%-a kifejezi ezt a fehérjét.

Azonban néhány ritka esettől eltekintve a tumor sejtek nem rendelkeznek olyan egyedi tulajdonsággal, amelyek a baktériumokhoz hasonlóan, megalapozhatnák a kemoterápia szelektív toxicitását [29].

### *2.1.3 Biológiai terápiák a rákos megbetegedések kezelésében*

A modern onkológiai gyógyszerek mindazonáltal a ráksejtek speciális jellemzőinek terápiás kiaknázásán alapulnak. Elérhetővé váltak ún. biológiai terápiák (pl. tirozin kináz és más jelátviteli útvonal gátlók), immunterápiák, angiogenezis inhibitorok, a DNS javítás kiesését kihasználó PARP gátlók és a telomeráz aktivitást csökkentő vegyületek. Terápiás lehetőségek, amelyek a konvencionális kemoterápia mellett képesek más célpontokat és ezzel más tumor jellegzetességeket támadni.

A VEGF útvonal gátlásán alapuló angiogenezist gátló terápiák kezdetben azzal a lehetőséggel kecsegtettek, hogy az érképződés megakadályozásával a daganatok fejlődése lelassítható, sőt akár ezen keresztül elérhető a tumor szövet tartós visszahúzódása is [30]. Sajnos, a VEGF receptor gátló vegyületek (pl. bevacizumab, sorafenib, sunitinib) klinikai eredményei a vártnál kedvezőtlenebbek voltak a relapszusmentes és a teljes túlélés tekintetében, elsősorban a sejt-szintű és mikrokörnyezeti rezisztencia kialakulása miatt [31].

Régóta ismeretes, hogy a daganat sejtek képesek fenntartani saját rapid osztódásukat és fokozni túlélőképességüket. Mint kiderült, a sejt ezeket a folyamatokat ún. tirozin kinázokon keresztül valósítja meg, amelyek nagyon hatékonyan közvetítenek extracelluláris információkat a sejtek felé, valamint szabályoznak bizonyos celluláris történéseket, úgy, mint sejtosztódás, migráció, differenciáció és sejthalál ([32],[33]).

Normál körülmények között ezek a fehérjék jól szabályozottak és csak akkor aktívak, ha szükség van rájuk, azonban patológiás folyamatokban (pl. karcinogenezis) ez a szabályozás felborul és ezek az útvonalak permanensen aktívak maradhatnak. Ennek egy különleges példája a krónikus mieloid leukémiában (CML) tapasztalt BCR-ABL fúziós onkogén kialakulása. Ez a 22-es és 9-es kromoszómát érintő átrendeződés a BCR (22-es kromoszóma) és az ABL tirozin kinázt (9-es kromoszóma) kódoló géneket érinti és a CML betegek 95%-ában, valamint az akut limfoblasztikus leukémia (ALL) esetek 15-30%-ában megtalálható ([34],[35]). Ez az intracelluláris jelátvitelben bekövetkező hiba a hematopoetikus ős- vagy progenitor sejtek fokozott osztódásában és apoptózis-rezisztenciájában mutatkozik meg, ami a mieloid sejtek számának masszív emelkedésével végződik. A BCR-ABL tirozin kináz inhibitor imatinib megjelenése jelentős sikereket ért el a CML betegek kezelésében: az interferon- $\alpha$  kezelésre rezisztens betegek 65-90%-a, míg a korábban nem kezelt betegek 80-90%-a reagált a terápiára [36]. A hosszú távú követés során azonban kiderült, hogy a rezisztencia az imatinib kezelés során is fellép. A rezisztencia hátterében a fúziós fehérje kináz doménjének mutációja áll, melynek következtében a tirozinkináz gátló kötőhelye módosul [37].

Az EGFR-ről induló jelátviteli pályák is túlműködést mutatnak számos daganat típusban (pl. emlő, tüdő, ovárium, vese) ezzel befolyásolva az osztódást, apoptózis elkerülést, motilitást, inváziót és metasztázis képzést [38]. Míg normál, egészséges sejtekben az EGF receptorok száma nagyjából  $4 \times 10^4$  és  $10^5$  darab/sejt közé tehető, addig egyes tumor sejtek akár  $2 \times 10^6$  receptornál is többet expresszálnak [39]. A fehérje extracelluláris doménjéhez kötődő molekulák vagy antitestek képesek arra, hogy megakadályozzák a jelátviteli útvonal több elemének aktivációját [40]. Ennek az ígéretes megközelítésnek, azonban komoly gátat szab a terápia során fellépő szerzett, illetve a már a kezelés kezdetekor jelenlévő rezisztencia [41].

#### *2.1.4 Anti-tumor immunterápiák*

A biológiai terápiák egy másik csoportját alkotják az immunterápiák, melyeket 4 csoportba sorolnak: nem-specifikus immun stimuláció, immun-ellenőrzőpont blokád, adoptív sejt átültetés és vakcináció. Az első immunterápia William B. Coley nevéhez fűződik, aki 1891-ben streptococcus baktériumokat fecskendezett egy inoperábilis beteg daganatába. Feltételezte ugyanis, hogy az indukált fertőzés mellékhatásaként a tumor

térfogata csökkeni fog. Próbálkozását siker koronázta és az ezt követő 40 évben több, mint 1000 betege tumorát oltotta be baktériumokkal vagy bakteriális termékekkel („Coley toxinjai”, [42]). Az elméletben Coley technikájához hasonló nem-specifikus immun stimulációs eljárások a tumor elpusztítására képes T-sejteket aktiválják. A BCG (Bacillus Calmette-Guérin) oltás kisgyermek tuberkulózis elleni immunizálásához használt vakcina, ami irreverzibilisen legyengített *M. bovis* baktériumokat tartalmaz, de tumor ellenes terápiaként is igen hatékonynak bizonyult hólyag daganatok ellen alkalmazva [43] és napjainkban is bizonyos hólyagrákok standard kezeléseként használják [44]. Hasonló elven, a szervezet immunválaszának befolyásolásán keresztül hatnak az interferon- $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) és interleukin-2 (IL2) citokinek használatán alapuló terápiák is ([45],[46]).

Az immun-ellenőrzőpont (immune-checkpoint) blokkolás is ígéretes stratégia lehet. Ez a megoldás szintén nem-specifikusan stimulálja az immunrendszert, célja az immunválasz mértékének növelése. A citotoxikus T-limfocita-asszociált antigén 4 (CTLA-4) egy fontos immun-ellenőrzőpont molekula, ami képes a T-sejt aktivációs útvonalak negatív regulációjára [47]. A CTLA-4 meggátolja, hogy a T-sejtek megtámadják az egészséges szöveteket. Azok a tumor sejtek, amelyek kifejezik a CTLA4 partner fehérjét (B7), védettek a T-sejtek támadásától. Az ipilimumab monoklonális antitest képes specifikusan gátolni a CTLA-4 fehérjét és ezen keresztül fokozni a T-sejt aktivációt, ami melanómás betegeknél növeli a túlélés hosszát [48]. Az ipilimumabot 2011 nyarán engedélyezték metasztatikus melanómák kezeléséhez.

Az adoptív sejt terápia a beteg saját, tumor-infiltráló limfocitáinak izolálását, aktiválását és újra keringésbe juttatását jelenti. Ez az eljárás bizonyos esetekben a tumor ellenes T-sejtek klonális repopulációjához vezet [49]. A kezdeti kezelésekre már nem reagáló metasztatizáló melanómák esetében ez a megközelítés a betegek 50%-ban objektív (mérhető) választ váltott ki, néhány komplett remisszióval (a tumor teljes visszahúzódásával) együtt [50]. Ugyan a T-sejtek daganatokból való izolálása komoly kihívás, az új gén editálási technikák (CRISPR, TALEN) segítségével a keringésből kinyert T-sejtek genetikai módosítása is lehetővé vált, ami megkönnyíti az adoptálható limfociták számának növelését.

A vakcinációs stratégia alapja az, hogy felkészíti az immunrendszert a tumor sejtek felismerésére és elpusztítására. Ez több technikával is történhet. A Sipuleucel-T kezelés

során például autológ antigén prezentáló sejteket aktiválnak *ex vivo* a rekombináns PA2024 fúziós fehérjével, ami a visszaoltást követően képessé teszi a T-sejteket a prosztata tumor sejtek célzott felismerésére és elpusztítására [51]. Ezzel szemben a kísérleti stádiumban lévő NeuVax™ a HER2 egy igen jellegzetes peptid szakaszát használja fel a szervezet immunizálására, aminek hatására hosszantartó immunmegfigyelés indul a szervezetben a HER2-pozitív tumor sejtek megtalálására és eliminálására. Érdekes módon ez nem, mint neoadjuváns terápia (a fő kezelési protokollt megelőző terápia) kerül alkalmazásra, hanem mint a kiújulást, relapszust megakadályozó preventív kezelést tervezik használni. A kezdeti eredmények igen meggyőzőek, a közelmúltban kezdődött a vakcina klinikai III. fázisban történő tesztelése [52].

## 2.2 Multidrog rezisztencia (MDR)

### 2.2.1 Bevezetés

A kemoterápiák megjelenését követően hamar kiderült, hogy a kialakuló rezisztencia miatt tartós eredmény csak a betegek egy részénél remélhető [53]. A 2013-as összesítő globális rákstatistika rámutatott, hogy míg a jól lokalizált emlődaganatoknál várható 5 éves túlélés 98%-os, addig ez a szám 84%-ra csökken az első regionális és 24%-ra az első távoli metasztázis megjelenésével [54]. Prosztataráknál az arányok talán még jobban mutatják az áttétek megjelenésével járó kedvezőtlen prognózist: a lokalizált és helyi metasztázisokkal diagnosztizált betegek 100%-a él 5 évvel a diagnózis után; az első disztális áttét megjelenése az 5 éves túlélést 24%-ra redukálja.

A kezelésnek ellenálló daganatsejtek számos mechanizmussal biztosíthatják túlélésüket: csökkenthetik a gyógyszerek célpontjául szolgáló fehérjék mennyiségét, módosíthatják az apoptotikus útvonalakat, fokozhatják a toxikus vegyületeket lebontó enzimfehérjék számát, vagy növelhetik a DNS-hibajavítás mértékét [55]. A sejt szintű rezisztenciamechanizmusok egyik leggyakoribb és leghatásosabb formája a toxikus vegyületek sejtől való eltávolítása, mielőtt azok kifejthetnék intracelluláris hatásukat [56].

A sejten belüli és kívüli tereket a membránok kettős lipid rétege és az ahhoz kapcsolt fehérjék választják el. Ennek a dinamikusan működő barriernek a feladata az intracelluláris és extracelluláris terek közötti kommunikáció és két térrész eltérő

milióinak fenntartása, amihez a nélkülözhetetlen membrán-mediált anyagáramlást transzmembrán fehérjék szabályozzák. A rosszindulatú daganatoknál tapasztalt kemoterápia-rezisztencia gyakran az ATP Binding Cassette (ABC) transzporterek közé tartozó P-glikoprotein (ABCB1, MDR1, Pgp) működésével függ össze. A mutidrog transzporterek az ATP energiáját felhasználva kipumpálják a citosztatikus vegyületeket a sejtekből.

### 2.2.2 A P-glikoprotein felfedezése

A mára jól ismert mechanizmus felfedezése és karakterizálása kalandos úton történt és hosszú ideig meghatározta azt, hogy miként képzeljük el a ráksejtek kemoterápiával szemben kialakuló rezisztenciáját.

1973-ban Dano Koppenhágában Ehrlich-féle ascitesz egér tumor sejtekben próbálta meg azonosítani azt a mechanizmust, ami rezisztenssé teszi a sejteket a daunomycin kezeléssel szemben [57]. Észrevette, hogy a rezisztens sejtek kereszt-rezisztensek doxorubicinra, vinkrisztinra és vinblasztinra és, hogy a daunomycinből jelentősen kevesebbet vesznek fel. Kinetikai méréseket végzett, amivel igazolta, hogy más, szerkezetében hasonló vegyületekkel (pl. doxorubicin) együtt adva, a daunomycin felvétel megnövekszik a rezisztens sejtekben, sőt a metabolizmus gátló 2-deoxy-D-glükóz használatával vissza tudta fordítani a rezisztenciát. Feltételezte, hogy létezik egy daunomycin-pumpa, ami energiát felhasználva képes csökkenteni a szerkezetileg hasonló kemoterápiás szerek koncentrációját az intracelluláris térben. Ez az elegáns elmélet képes volt magyarázatot adni a daunomycin rezisztenciára, mi több, a vele párhuzamosan fellépő kereszt-rezisztenciákra is. A „pumpa” azonosítására további három évet kellett várni, mivel annak ellenére, hogy mások is kimutatták a rezisztencia energia-függését [58], magát a pumpát nem tudták azonosítani.

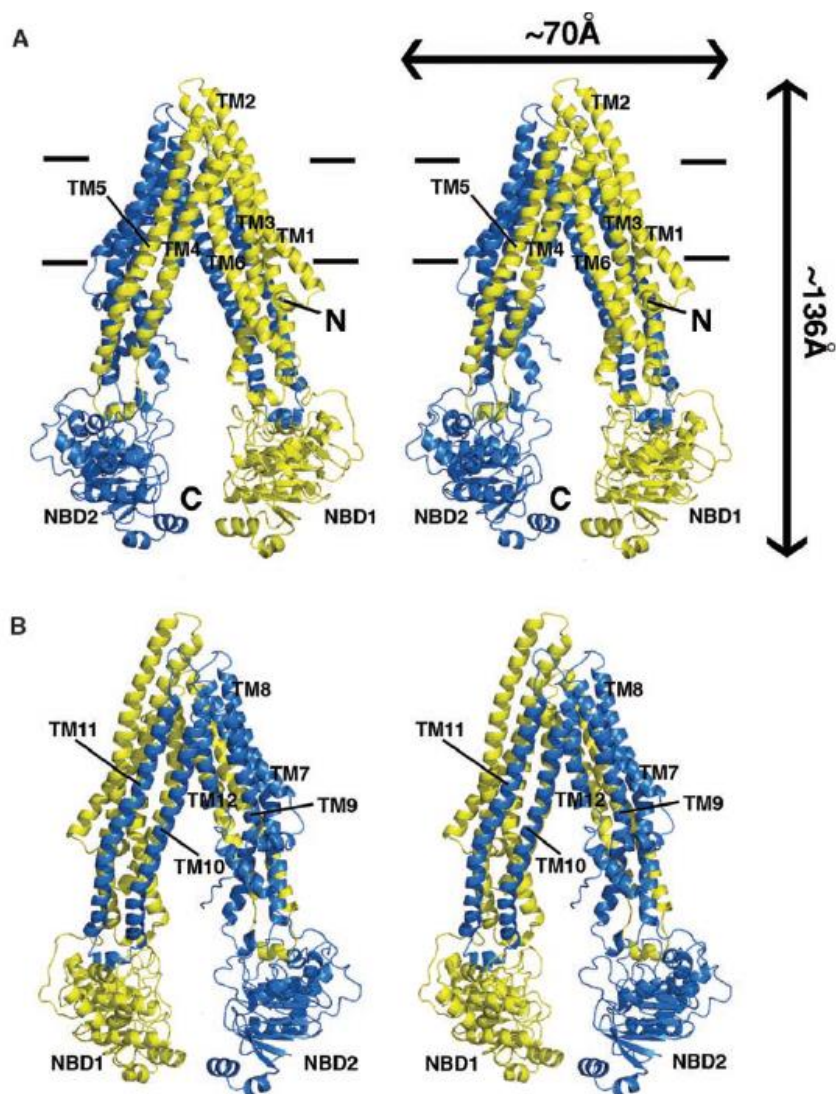
Juliano és Ling kolhicin rezisztens CHO sejtek membránjának autoradiográfias technikával történő vizsgálata közben egy olyan glikoproteint fedeztek fel, ami nem volt jelen a vad típusú sejtek membránjában, de a rezisztens sejtek esetében nagy mennyiségben kimutatható volt ([59],[60]). Rájöttek, hogy a kezelésre mutatott rezisztenciával korreláló fehérje egy 170 kDa tömegű membránkapcsolt glikoprotein (a fehérjét P (Permeabilitás)-glikoproteinnek nevezték el). Érdekesség, hogy a jelentős



mennyiségű kísérleti adat és logikus következtetés ellenére, nehezen elképzelhetőnek tartották, hogy a több vegyülettel szemben fellépő (multidrog) rezisztencia jelenségét *egyetlen* pleiotrop efflux transzporter magyarázhatja [61].

A P-glikoprotein megklónozásának első fontos lépése az volt, hogy kimutatták, hogy a rezisztens sejtekből szenzitív sejtekbe történő DNS átvitel hatására az MDR fenotípus is átvihető [62]. Ezt követően a terület robbanásnak indult: sikerült bebizonyítani, hogy a CHO sejtek rezisztenciája a DNS egy bizonyos szakaszának amplifikációjával függ össze [63], akárcsak az emberi KB sejtvonala esetében [64]. Azonban humán MDR sejtvonalaikat vizsgálva kiderült, hogy ennek a bizonyos génnek a megemelkedett expressziója (amplifikáció nélkül) is elég a rezisztencia kialakításához [65]. A gént MDR1-nek nevezték el (multidrog rezisztencia 1).

Közel 20 évvel az első leírását követően, a P-glikoproteinnél kiderült, hogy szubsztátjait a plazmamembránban ismeri fel és onnan transzportálja azokat az extracelluláris térbe („membrán porszívó” [66]), majd 2009-ben megszületett a fehérje kristályszerkezete is (*1. ábra*, [67]).



**1. ábra A P-glikoprotein szerkezete.** A fehérje elülső (A) és hátulsó (B) nézetből. A 12 transzmembrán domén (TM1-12), a 2 nukleotid kötőhely (NBD1-2), valamint a fehérje N- (sárga) és C-terminális (kék) fele jelölve van az ábrán. (Átvéve Allert et al, Science, 2009)

### 2.2.3 A P-glikoprotein fiziológiai szerepe

A Pgp nagyszámú, változatos szerkezetű szubsztrátot képes felismerni, és védelmet nyújt bizonyos antivirális, antibakteriális és tumorelles kezelésekkel szemben is [67].

Normál szöveti környezetben a Pgp a farmakológiai határokon (például vér-agy gát, vér-here gát) támogatja a szervezet xenobiotikumokkal szembeni védekezését [68]. A Pgp fiziológiai szerepét a génkiütött egerek vizsgálatával tisztázták. Egy véletlen kísérlet eredményeként kiderült, hogy a Pgp-kiütött egerek hiperérzékenységet mutatnak például

az ivermectin kezeléssel szemben [69]. A fokozott érzékenység háttérében a vér-agy-gát megemelkedett áteresztőképessége volt kimutatható. Kiderült, hogy a Pgp magas szinten kifejeződik a vér-agy gát endotéliumában, megakadályozva transzportált szubsztrátjainak agyba jutását.

A P-glikoprotein magas expressziót mutat a gasztrointesztinális traktus epitél sejteinek luminális, a vese proximális tubulusait felépítő sejtek apikális, a máj kanalikuláris hepatocitáinak, valamint az agy és a here kapilláris endotél sejteinek membránjában, főleg olyan határfelületeken, ahol a szervezet a környezetből érkező idegen anyagokkal érintkezhet [70]. Ennek jelentőségét nem csak a fentebb leírt génkiütött egér modell bizonyítja, de a bel-tenyésztett kutya fajták, mint a collie-k vagy az ausztrál juhászkutya ismert ivermectin érzékenysége is, ami egy frame-shift mutáció eredményeként a Pgp expresszió teljes elvesztéséhez vezet [71].

A Pgp, a szöveti elhelyezkedése és funkciója miatt, három módon képes a szervezetbe jutó hatóanyagok megoszlásának befolyásolására: limitálja a bélrendszerből való felszívódást, növeli a májon, vesén és bélrendszeren keresztüli kiválasztódást, valamint szabályozza a sejtek és szövetek hatóanyag felvételét [70].

#### *2.2.4 A P-glikoprotein szerepe a tumorok multidrog rezisztenciájában*

Azonban a fehérje detoxifikáló képessége, amely hatékony védelmet nyújt az egészséges szövetek számára, a rákos sejtekben expresszáldva megvédi azokat a kemoterápia alatt bekövetkező toxikus támadásoktól, ezzel jelentősen csökkentve a kezelés hatékonyságát.

A Pgp expressziója független prognosztikai faktor akut mieloid leukémiában (AML) [72]: a Pgp expressziója AML-ben [73] és akut nem-limfoblasztikus leukémiában (ANLL) [74] negatív korrelációt mutat a kezelésre adott válasszal [75]. Egy közelmúltban publikált tanulmány kimutatta, hogy akut limfoblasztikus leukémiában (ALL) szenvedő betegek esetében a P-glikoprotein magas kifejeződése közel 50%-kal alacsonyabb medián relapszus-mentes túléléshez vezetett, mint az alacsony expressziót mutató daganattal diagnosztizáltak körében [76]. Ovárium daganatok vizsgálatokor a kezelés kezdetekor mért ABCB1 magas expressziós szintje a rövidebb teljes túléléssel volt korreláltható, de érdekes módon nem volt hatással a relapszus-mentes túlélésre [77]. Az

utóbbi években összegyűlt adatok azt sugallják, hogy a gyermekkori agydaganatok esetében a kezelés kezdetén jelentkező terápia-rezisztencia kialakításában is fontos szerepe lehet az ABCB1-nek, sőt a Pgp hatását a gyermekkori ependymomak kemoterápiára adott válaszára jelenleg is vizsgálják [78]. Egy tanulmány az efflux transzporter fokozott kifejeződését találta medulloblastoma esetek 43%-ban, ami jelentősen korrelált azzal, hogy az adott daganat magas kockázatú („high-risk”, a tumor magas valószínűséggel vissza fog térni a kezelés ellenére is) besorolást kapott-e [79]. Diagnóziskor és a kemoterápia után vett neuroblasztóma minták összehasonlító vizsgálatakor a relapszált tumorok 60%-ában a Pgp mRNS szintjének növekedését találták, míg a kezelésre jól reagáló tumorok esetében ez a változás nem volt kifejezett [80]. Klinikailag eltávolított melanómákban olyan összejt-jellegű szubpopulációt azonosítottak, ami funkcionális ABCB1-et expresszált és kemorezisztensnek bizonyult a paclitaxel kezeléssel szemben [81]. Hepatocelluláris karcinómák (HCC) klinikai vizsgálata érdekes mintázatot mutatott az ABCB1 tekintetében: míg a jól differenciált, korai stádiumú HCC tumorokban magas expressziót találtak, addig a kései, gyengén differenciált daganatokban már csökkent P-glikoprotein szinteket mértek, ami arra utal, hogy a fehérjére csak a hepatokarcinogenezis első szakaszában játszhat szerepet [82].

#### 2.2.5 P-glikoprotein gátlószerek: remények és kudarcok

A Pgp-felfedezés történetének ismeretében könnyen érthető a tudományos társadalom korai lelkesedése, hiszen egy olyan univerzális magyarázattal szolgált az MDR jelenségre, ami a rezisztencia legyőzésével kecsegtetett. Amennyiben ez a pumpa okozza a rezisztencia kialakulását, akkor annak gátlásával felül lehetne kerekedni az MDR-en: megindult a Pgp gátlószerek keresése.

Mára három különböző generációt különítünk el, amelyek egymást követték, generációnként növelve a specifikusságot, ezzel csökkentve a toxicitást is. Ugyan az *in vitro* vizsgálatok több olyan vegyületet azonosítottak, melyek hatékonyan gátolták a Pgp transzporter funkcióját, ám ezek a vegyületek rendre elbuktak a klinikai próbákon [83]. Kezdetben a kudarcot az első generációs gátlószerek (például a szívgyógyászatban is alkalmazott kalcium csatorna blokkoló verapamil vagy az immunoszuppresszáns ciklosporin A) elsődleges farmakológiai hatása, valamint a klinikai próbák hibás tervezése okozta. Előfordult, hogy a klinikai próbák során nem-kissejtes tüdőrákos

betegeket kezeltek Pgp gátlószerekkel, annak ellenére, hogy ebben a tumor típusban a Pgp drog rezisztenciában betöltött szerepe soha nem nyert bizonyítást.

Az utóbbi években történtek olyan klinikai próbák, amelyek megfeleltek a szigorú szakmai kritériumoknak, a zosuquidarral vagy placebóval kiegészített kemoterápiás kezelés eredménye (medián túlélés és remissziós arány) között mégsem mutatkozott eltérés [84].

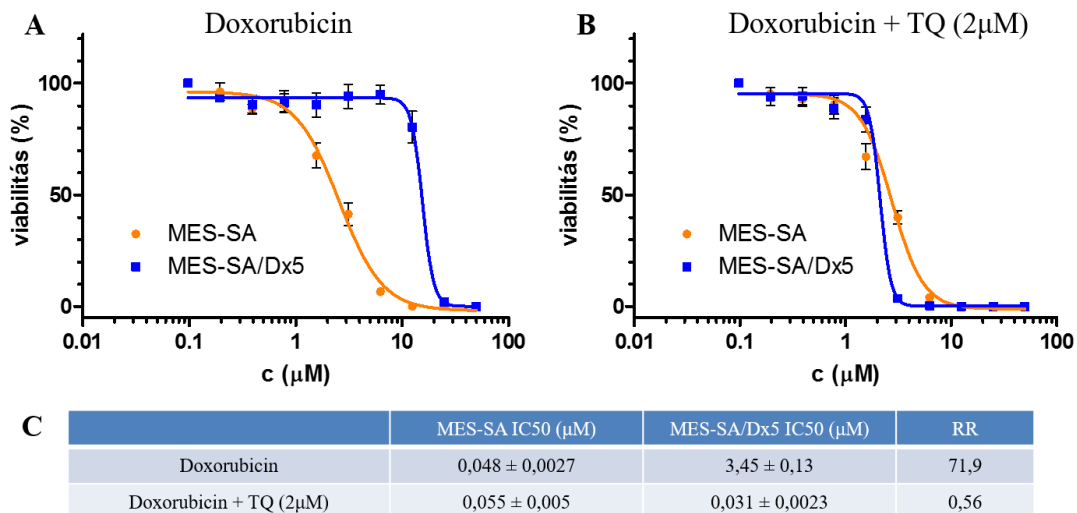
Azonban ezek a kudarcok az olyan helytelenül tervezett klinikai próbákkal is magyarázhatóak, amelyekben olyan tumorokat kezeltek gátlószerekkel, amikben vagy nem volt bizonyított a Pgp rezisztenciához való hozzájárulása vagy nem tesztelték, hogy a betegekben tényleg kimutatható-e a transzporter jelenléte, esetleg olyan kemoterápiás kezelést alkalmaztak, amely nem volt szubsztrátja a P-glikoproteinnak [83]. Ezen klinikai próbák, a nem várt toxicitás megjelenése és az egyáltalán nem meggyőző beteg adatok miatt kijelenthető, hogy a Pgp célzott gátlásán alapuló terápiai megközelítés nem váltotta be az *in vitro* eredmények által táplált reményt.

A gátlószerek bukása nagyrészt a Pgp fiziológiai funkciójának járulékos gátlásával és a barrier feladatot ellátó szövetek működésének megzavarásával magyarázható. A P-glikoprotein élettani funkciója, hogy megóvja a legfontosabb szerveket a szervezetbe jutó különböző mérgektől és xenobiotikumoktól. A Pgp kifejeződése kimutatható több szövet határon (vér-agy és vér-here gát, placenta), illetve méregtelenítő szervekben, így a májban, vesében vagy a bélhám sejtjeiben. A klinikai kísérletekben a Pgp gátlószereit konvencionális kemoterápiás vegyületekkel együtt adagolták a betegeknek, és ez a kemoterapeutikumok nem várt feldúsulásához vezetett több szervben is [85]. A toxikus mellékhatások láttán az orvosok kényszerűen redukálták a kemoterápiás kezelés intenzitását és csökkentették a dózisok méretét, azonban ez, sajnos, elkerülhetetlenül a kezelés hatékonyságának elvesztéséhez vagy gyengüléséhez vezetett.

#### 2.2.6 A P-glikoprotein okozta MDR bemutatása *in vitro*

A Pgp rezisztenciát kialakító hatása sejtes rendszerekben könnyen reprodukálható és befolyásolható. A MES-SA sejtvonalat 1983-ban alapították egy 56 éves betegből eltávolított szarkómából [86]. A drog-naiv MES-SA sejteket 9 hónapon át doxorubicin kezeléssel szelektálták, folyamatosan emelve a kezdeti szubtoxikus koncentrációt (ezt a

módszert alkalmazzák azóta is MDR sejtvonalak alapításához), ami rezisztens sejtek kialakulásával járt (MES-SA/Dx5). Az *in vitro* citotoxicitási tesztek eredménye szerint a MES-SA/Dx5 sejtek mintegy két nagyságrenddel magasabb doxorubicin koncentrációt tolerálnak (2A és 2C ábra).



**2. ábra A P-glikoprotein hatása humán uterin szarkómasejtek *in vitro* doxorubicin érzékenységére.**

(A) A Pgp-t expresszáló MES-SA/Dx5 sejtvonal (kék vonal) jelentős doxorubicin rezisztenciát mutat a drog-naív MES-SA sejtekhez képest (narancs vonal). (B) A Pgp specifikus inhibitora (tariquidar (TQ), 2 μM) a MES-SA/Dx5 sejtek érzékennyé válnak. Az ábrán feltüntettük a citotoxicitási görbékéből számolt IC50 értékeket (a sejtek 50%-át elpusztító doxorubicin koncentráció), valamint a rezisztens és szenzitív sejteken mért IC50 értékek hányadosát (resistance ratio, RR). (Füredi et al, Magyar Onkológia, 2015)

A MES-SA/Dx5 sejtek rezisztenciát mutatnak a doxorubicinnal és több másik, szerkezetileg és hatásmechanizmusában különböző kemoterápiás vegyülettel szemben is és bizonyítható, hogy az MDR fenotípust a P-glikoprotein emelkedett expressziója okozza [87]. A fenotípust előidéző magas Pgp kifejeződés stabil, azaz a MES-SA/Dx5 sejtek doxorubicin rezisztens állapotban fenntarthatóak. A MES-SA/Dx5 sejtek rezisztenciája megszüntethető, ha a Pgp fehérje funkcióját farmakológiai úton, kismolekula gátlószerekkel, mint például a tariquidar, megakadályozzuk (2B és 2C ábra), ezzel igazolva, hogy a célzott gátlással a doxorubicin érzékenység *in vitro* helyreállítható (2C ábra).

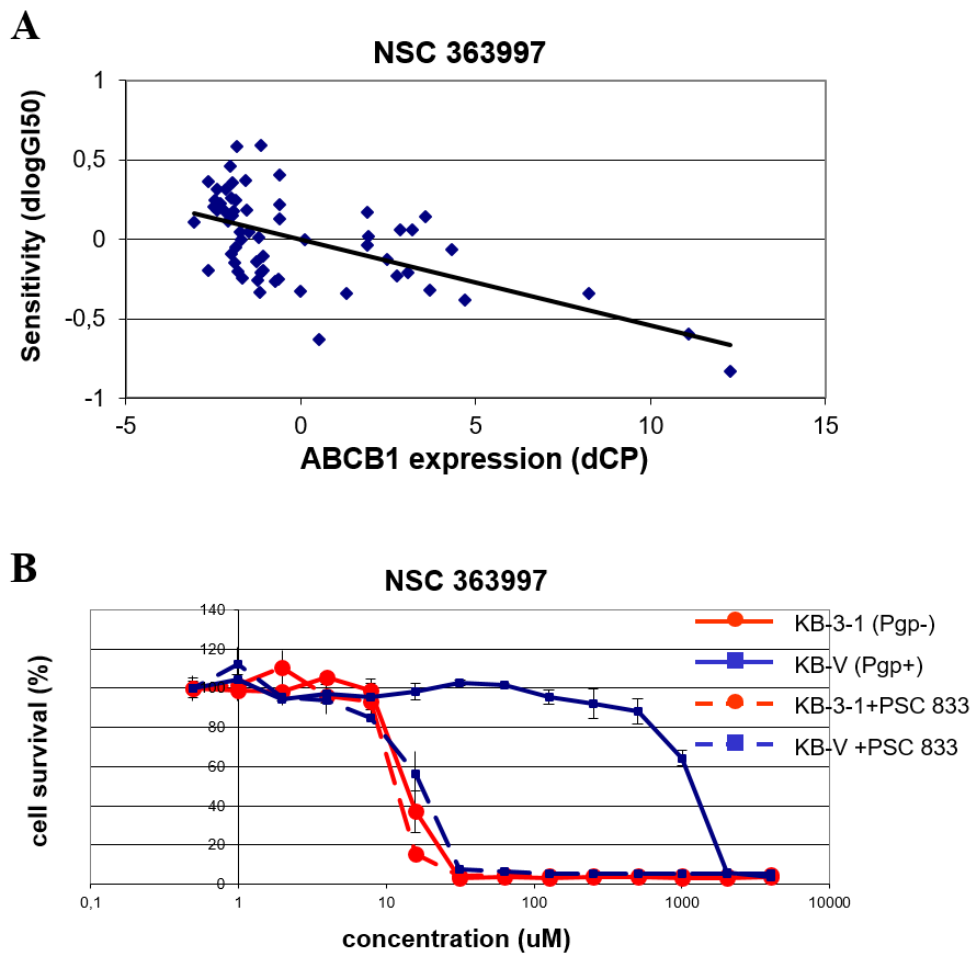
### 2.2.7 Járulékos érzékenység (*collateral sensitivity*) és az MDR-szelektív vegyületek felfedezése

A kiábrándító klinikai eredmények új megközelítéseket hívtak életre [83]. Felmerült, hogy a transzporter gátlása helyett kikerülése (új gyógyszerhordozó rendszerekkel, esetleg célzott vegyülettervezéssel) vagy kihasználása (a Pgp okozta „Achillesz-sarok” megcélzásával) még hatékonyabb stratégia lehet.

A biológiai változások, melyek bizonyos körülmények között képesek egy tumor sejt túlélését biztosítani, egyben terápiásan kihasználható „gyengeségeket” is létrehozhatnak [88]. Szybalski és Bryson 1952-ben írta le a paradox jelenséget, melynek során „egy vegyülettel szemben kialakuló rezisztencia egyben nagyobb érzékenységet eredményez egy másik kezeléssel szemben” [89]. Ezt később kollaterális (járulékos) érzékenységnek nevezték el.

Csoportunk korábban olyan vegyületeket azonosított, amelyek egy eddig ismeretlen mechanizmuson keresztül, éppen az MDR tumor sejteket célozzák, vagyis képesek a Pgp-t kifejező daganatos sejtek szelektív elpusztítására. Az ún. MDR-szelektív molekulák alkalmazásával lehetőség nyílt a már rezisztenssé vált tumorok visszaszorítására, a kemoterápia alatt megjelenő rezisztens sejtek elpusztítására, vagy a rezisztens daganatok újraérezékenyítésére [90]. Mára az MDR-szelektív vegyületeket is 3 generációba sorolhatjuk felfedezésük ideje szerint.

2004-ben Szakács és kollégái 60 emberi daganat sejtvonal (NCI-60) citotoxicitási adatait vizsgálta 1429 vegyület bevonásával, úgy, hogy ezeket korreláltatta a sejtvonalak 48 ABC transzporter expressziós mintázatával (1. generáció, [91]). Tették ezt annak reményében, hogy (az addigra köztudottá vált) rezisztenciát előidéző ABC transzporterek expressziójának birtokában megjósolják mely vegyületekkel szemben várható a rezisztencia kialakulása (3. ábra).

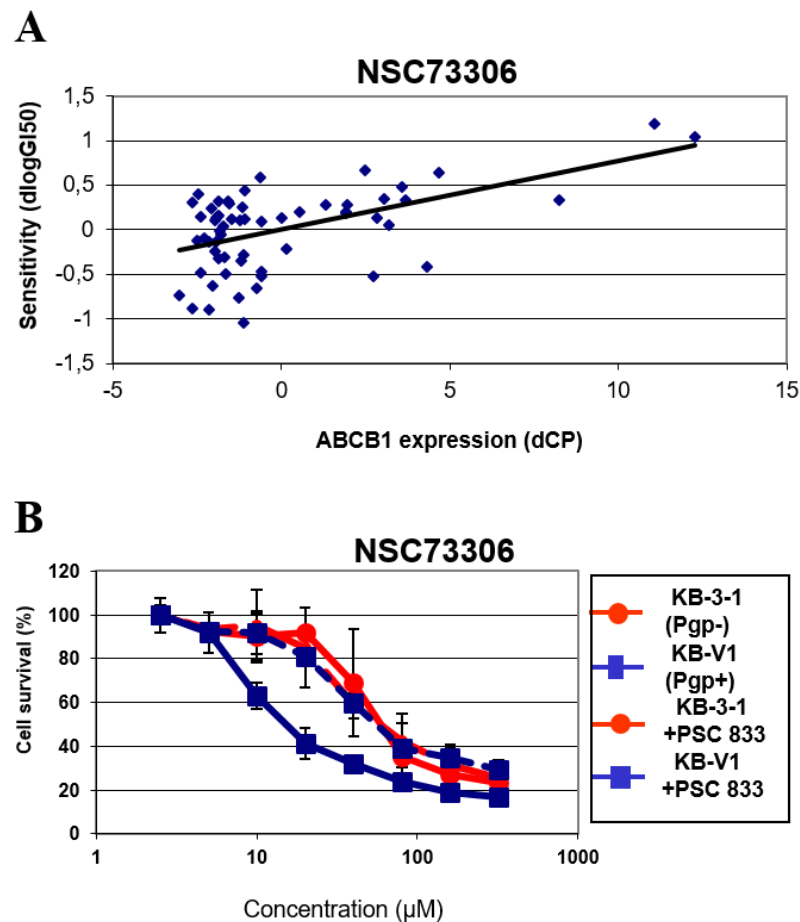


**3. ábra A P-glikoprotein kifejeződés és a vegyületekkel szemben mutatott érzékenység kapcsolatának demonstrációja az NCI-60 sejtvonal panelben. (A) Minden kék pont egy sejtvonalat reprezentál. Az összefüggés megmutatja, hogy alacsonyabb Pgp expresszió esetén magasabb érzékenységgel rendelkezik az adott sejtvonal az NSC363997 vegyülettel szemben. (B) Az NSC363997 vegyület toxicitási profilja drog érzékeny KB-3-1 (piros folytonos vonal) és rezisztens KB-V (kék folytonos vonal) sejteken mérve. Látható, hogy a Pgp-gátló PSC 833 hatására KB-V sejtek érzékenysége helyreáll, míg a KB-3-1 sejteké nem változik (piros és kék szaggatott vonalak). (Szakács et al, Cancer cell, 2004)**

A nagy áteresztőképességű szűrés a 3A. ábrán látható eredményekhez vezetett. Minden vizsgált vegyület esetében meghatározásra került, hogy az ABCB1 expressziója miként befolyásolja az adott molekulára mutatott érzékenységet és a vártak megfelelően a Pgp szubsztrátok hatékonysága jelentősen csökkent a transzportert kifejező sejtekben (3A ábra), amit a citotoxicitási kísérletek is megerősítettek (3B ábra). Ezt a korrelációt más ABC fehérjékre is elvégezve, megtalálhatóak azok a gyógyszer-jelölt vegyületek,



amelyek nagy valószínűséggel valamelyik transzporter szubsztrátjai lesznek. Azonban ez a szűrés váratlan módon nem csak olyan hatóanyagokat azonosított, amelyeket kipumpáltak a Pgp-pozitív sejtek, épp ellenkezőleg, voltak, amelyek hatékonysága jelentősen növekedett a Pgp expresszió mértékének növekedésével (4. ábra).



**4. ábra A P-glikoproteint kifejező sejteket szelektíven elpusztító vegyületek azonosítása az NCI-60 sejtvonal panelen.** (A) A Pgp expresszió és az NSC73306 vegyülettel szemben mutatott érzékenység növekedése közti összefüggés bemutatása. (B) Az NSC73306 vegyület toxicitási profilja drog érzékeny KB-3-1 (piros folytonos vonal) és rezisztens KB-V (kék folytonos vonal) sejteken mérve. Látható, hogy az NSC73306 a Pgp-pozitív sejtekre szelektív és, hogy a Pgp-gátló PSC 833 hatására ez a szelektivitás megszűnik. (Szakács et al, Cancer cell, 2004)

Ezek az eredmények arra utaltak, hogy a P-glikoprotein, amely egészséges szervezetben a szöveteket, míg rosszindulatú daganatokban a tumor sejteket védi,

bizonyos körülmények között képesek a daganat sejteket érzékenyíteni egyes molekulákkal szemben.

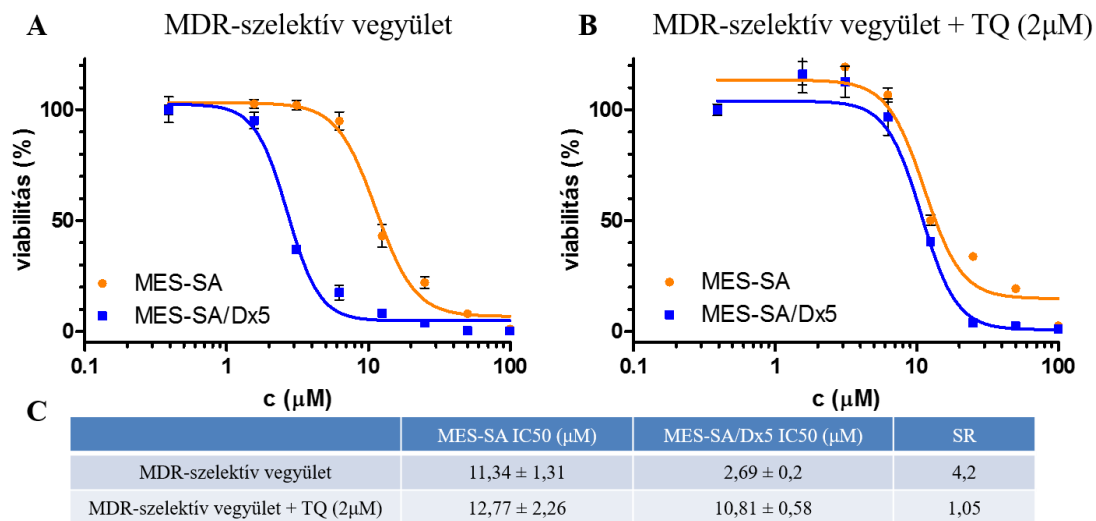
Az MDR-szelektív vegyületek felfedezésében fontos lépés volt a talált vegyületek egy független Pgp-negatív és pozitív sejtvonal páron való tesztelése (3B és 4B ábrák). A drog naiv KB-3-1 karcinóma vonal és a belőle folyamatos vinblasztin szelekcióval előállított Pgp kifejező KB-V1 sejtvonal alkalmazásával bemutatható volt, hogy a P-glikoprotein szükséges és elégséges feltétele az NSC73306-ra mutatott érzékenységnek, mert a transzporter gátlásával ez az érzékenység is megszűnt. Ezek a kísérletek már maradéktalanul bebizonyították, hogy a szelektív toxicitás a Pgp funkciójához köthető.

#### 2.2.8 Az MDR-szelektív vegyületek generációi

Az NSC73306 volt az első ilyen molekula, amit a korrelációs szűrés azonosított, és amiről bebizonyosodott, hogy a Pgp funkciójának gátlásával a szelektív toxicitása is megszűnik.

Három évvel később csoportunk újra korreláltatta az NCI-60 sejtvonalon kapott citotoxicitási adatokat a sejtek Pgp expressziójával és így már 42657 vegyületből 22 új MDR-szelektív vegyületet sikerült azonnal és további 15 vegyületet szerkezeti hasonlóságon alapuló kereséssel azonosítani (2. generáció, [92]). A tanulmány kimutatta, hogy ezek a vegyületek mind fémkelációs képességekkel rendelkeznek, de maga a fémkeláció még nem jelenti automatikusan az MDR-szelektív tulajdonságok meglétét.

A szűrést megismételve a legfrissebb NCI-60 toxicitási adatokon, újabb MDR-szelektív vegyületeket találtunk, amik a későbbiekben részletesen is bemutatásra kerülnek (3. generáció [93]). Az MDR-szelektív vegyületek paradox hatásának fontos bizonyítéka volt, hogy más, független, Pgp-negatív és -pozitív sejtvonal párokon is bizonyítható volt a hatásuk. A 5. ábrán egy ilyen kísérlet eredménye látható. Míg a korábbi szűrésekben főleg karcinóma sejteket használtunk, addig ebben a kísérletben humán szarkóma tumorokból származó sejteket (MES-SA és MES-SA/Dx5) kezeltünk az MDR-szelektív vegyületekkel, így bizonyítva a hatás sejtvonal- és szöveti eredet-függetlenségét.



**5. ábra** Az MDR-szelektív vegyületek célzottan elpusztítják a Pgp-t expresszáló, multidrog rezisztens tumorsejteket. (A) Az MDR-szelektív vegyület szelektíven toxikus a Pgp-t magasan expresszáló MES-SA/Dx5 sejtvonalra (kék vonal) a Pgp-mentes MES-SA (narancs vonal) sejtvonalhoz képest. (B) A transzporter tariquidarral (TQ) történő gátlásával az MDR-szelektív vegyület toxicitása csökken a Pgp-expresszáló MES-SA/Dx5 sejtekre nézve, de változatlan marad a Pgp-t nem expresszáló MES-SA sejtek esetében. (C) A MES-SA és Dx5 sejteken mért IC<sub>50</sub> értékek. A szelektivitási hányadost (SR) a következő formula alapján számoltuk ki:  $IC_{50}^{Pgp\text{-negatív sejtvonal}}/IC_{50}^{Pgp\text{-pozitív sejtvonal}}$  (Füredi et al, Magyar Onkológia, 2015)

A Pgp fehérjét túlexpresszáló MES-SA/Dx5 sejtek ugyan 72-szeres rezisztenciát mutatnak a doxorubicinre a MES-SA sejtvonalhoz képest (2. ábra), de hiperérzékenyek az MDR-szelektív molekulával szemben (5A és 5C ábra). Azonban a transzporter gátlásával (tariquidar, Pgp inhibítor) a Dx5 sejtek fokozott érzékenysége elmarad, ami arra utal, hogy az MDR-szelektív vegyületek paradox toxicitása a P-glikoprotein funkciójának következménye (5B és 5C ábra).

### 2.2.9 P-glikoprotein és tumor őssejtek

Bizonyos leukémiákban, ill. szolid daganatokban a tumor sejtek egy jól körülírt, önmegújulásra és differenciálódásra egyaránt képes szubpopulációja felelős a tumor szövet utánpótlásáért és újraépítéséért. Ezeket a sejteket, melyek a legtöbb esetben kevesebb, mint egy százalékát adják a tumort felépítő sejteknek, mivel számos tulajdonságukban emlékeztetnek a szöveti őssejtekre, tumor őssejteknek nevezték el.

Feltételezések szerint, a konvencionális kemoterápiás szerek ugyan hatékonyan elpusztítják a gyorsan osztódó, differenciálódó vagy már differenciálódott sejteket, amivel jelentősen csökkenthetik a tumor sejtek számát, azonban a kezelésnek ellenálló tumor őssejtek újratermelik a malignus sejteket, előidézve ezzel a relapszust. A modern onkológiai kutatások egyik kiemelt célja olyan célzott („targeted”) vegyületek kifejlesztése, melyek alkalmasak a tumor őssejtek hatékony eliminálására.

Az embrionális és a szöveti őssejtekhez hasonlóan azonban a tumor őssejtek is magas szinten expresszálnak ABC-transzportereket, amelyek így hatékony védelmet nyújtanak a legtöbb kemoterápiás kezelés alatt [94]. A klinikai drog rezisztencia univerzális markere, a P-glikoprotein, az MDR tumor őssejtek molekuláris targetje lehet. A multidrog rezisztens tumor sejtek hatékony elpusztítása jelentősen hozzájárulhatna a tumor méretének csökkentéséhez, és az őssejtek kiirtása révén megakadályozná újraképződésüket is.

## 2.3 Preklinikai állatmodellek a gyógyszerkutatásban

### 2.3.1 A hatóanyag keresésben használt *in vitro* modellrendszerek hátrányai

Azonban az MDR-szelektív molekulák érdekes koncepciója mellett sem szabad figyelmen kívül hagyni a Pgp-gátlók klinikai kudarcait. Az ott szerzett tapasztalatok rávilágítottak, hogy az MDR tumorok hatékony leküzdése csak a megfelelő *in vitro* és *in vivo* modellek alkalmazásával sikerülhet. Az új gyógyszerjelölt vegyületek azonosításának egyik első lépése többnyire *in vitro* modelleken történik. Bár a gyógyszermolekulák szervezetre gyakorolt hatása összetett folyamat eredménye, a sejtvonalakon mért biológiai adatok többnyire jó megközelítést adnak a tesztelt vegyületek hatásosságáról. A preklinikai modelleken történő több millió dolláros célpont validálás és hatóanyag optimalizálást követően a gyógyszerjelöltek jelentős része azonban mégis elbukik a klinikai III-as fázisban ([95],[96]).

Az *in vitro* modellek helyes megválasztásával és a vizsgált sejtvonalak számának emelésével az *in vitro* szűrések hatásfoka javítható. Bár a valódi tumorokban talált mutációk széles spektruma a sejtvonalakban is megtalálható, a daganatokban tapasztalt kromoszómális változások, metilációs és mRNS expressziós mintázatuk is hasonló, a sejtvonalak a tenyésztés során genetikailag [97] és mRNS expressziós profiljukat ([98];

[99]) tekintve is megváltoznak, nem jellemzi őket az eredeti tumor heterogenitása és nincs jelen mellettük a mikroörményzetük.

Kérdés, hogy a sejtvonalak valóban alkalmazhatóak-e klinikai tumorok modellezésére és hogy az így levonható következtetések relevánsak lesznek-e a beteg kezelését tekintve. Különböző szövetekből származó klinikai daganatokat sejtvonalakhoz hasonlítva kiderült, hogy adherenciájukban és osztódási potenciáljukban a valós tumorok és az *in vitro* tenyésztett sejtek jelentősen különböztek és, hogy ez eltérést okozott a különböző drogokra mutatott érzékenységükben ([100];[101]). Mivel ez az általánosan is ismert jelenség, logikus módon, következhet a tumorokban jelenlévő, azonban sejtkultúrákból hiányzó mikroörményzet elvesztéséből, így megoldást jelenthet az ún. allo- és xenograft tumor modellek használata.

### 2.3.2 A daganat-modellek fejlődése, xenograft tumorok

Történelmileg a preklinikai egér modellek együtt fejlődtek a tumor ellenes terápiákkal. A legelső állatmodellek rágszáló tumorok egészséges immunrendszerrel rendelkező befogadó egerekbe történő beültetésére épültek ([102];[103]). Az 1960-as és 1970-es években ezek a korai „egérből egérbe” izograft modellek szolgálták sokáig a gyógyszerjelölt vegyületek kiválasztásának alappilléreként. Használatukkal sikerült azonosítani több, igen hatékony molekulát, mint például a vinkrisztin vagy a prokarbazine [102].

Az 1980-as években már felismerték a metasztázis mechanizmusát különböző egér és humán sejtvonalak használata közben. Fidler és kollégái rájöttek, hogy a metasztázis nem véletlenszerű, sokkal inkább szövet-specifikus [104], sőt függ a sejtek beadásának helyétől, hogy később milyen szóródási mintázatot mutatnak a kísérleti állatokban. Végül ez az észrevétel alapozta meg az ortotopikus (származási szövetből egy másik állat azonos szövetébe ültetés) modellek létrehozását [103].

Azóta is, a daganat terápiák fejlesztése inkább a könnyen kezelhető sejtvonal derivált xenograft tumor rendszerekre épül, ahol a daganat immunhiányos egerekben, sejtek szubkután beoltását követően fejlődik ki. Ezek a sejtvonalak hosszantartó tenyésztés alatt lettek arra szelektálva, hogy minél gyorsabb növekedési rátát mutassanak 2D örményzetben, műanyag felülethez alkalmazkodva, vérsavót tartalmazó tápfolyadékban.

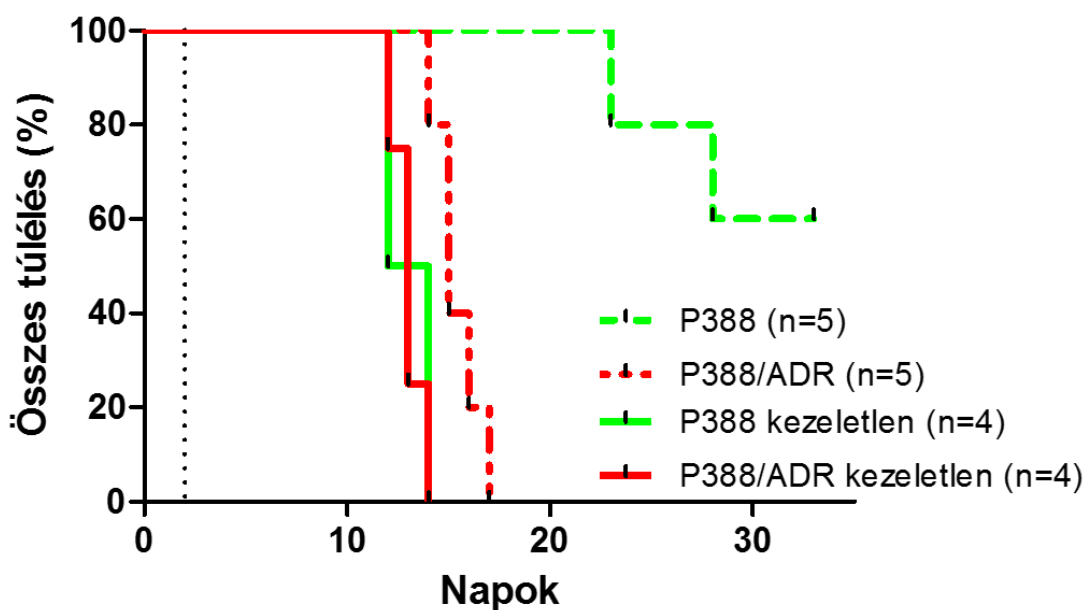
Ezeket a sejtvonalakat felhasználva könnyen lehet tumor modelleket előállítani szinte bármilyen laboratóriumi felszereltség mellett és használatuk olyan kemoterápiás vegyületek azonosításához vezetett, amik a mai napig dominálnak a klinikai onkológiai ellátásban [105].

### *2.3.3 Tumormodellek a drog rezisztencia kutatásában*

#### 2.3.3.1 A P388 – P388/ADR egér limfoblasztikus leukémia allograft modell

A P388 limfoblasztikus leukémia sejtvonalat kémiai karcinogenezissel hozták létre 1955-ben, DBA/2 egerek bőrének 3-metilkolantrénnel történő ecsetelését követően [106]. A leukémiás állatok keringéséből nyert leukémia sejtek *in vitro* tenyészthetők, majd kísérleti egerek hasüregébe fecskendezve aszcitesz (hasvízkór) tumorok nyerhetőek és a sejtvonal a továbbiakban *in vivo* propagálható és vizsgálható.

A P388 MDR klónját (P388/ADR) növekvő koncentrációjú *in vitro* doxorubicin kezeléssel alapították [107]. Az *in vitro* körülmények között tapasztaltaknak megfelelően a transzporter kifejeződése jelentős hatással van a P388/ADR sejtek doxorubicin érzékenységére ebben az aszcitesz modellben is. Direkt hasúri doxorubicin kezelés használatával a P388 sejtekkel oltott egerek túlélése szignifikánsan növelhető, míg a rezisztens tumort hordozókra ugyanez a kezelés nincs jelentős hatással (6. ábra).



6. ábra A drog-naív P388 (szaggatott zöld vonal) és a Pgp-expresszáló P388/ADR (szaggatott piros vonal) sejtvonal párból létrehozott allograft tumorok doxorubicin- (3 mg/kg ip.) érzékenysége BDF1 egerekben. A piros és zöld egyenes vonalak a kezeletlen kontroll állatokat, míg a pontozott vonal a kezelés pontos idejét mutatja. (Füredi et al, Magyar Onkológia, 2015)

A 6. ábrán látható, hogy a doxorubicin kezelés ellenére a Pgp-t expresszáló P388/ADR tumorokat hordozó csoport medián túlélése 15 nap volt, míg a gyógyszer érzékeny P388 csoportban a szignifikánsan magasabb, 33 napos megfigyelés alatt összesen két egeret kellett eutanáziában részesíteni. A csoportok, amelyek nem voltak kezelve mindkét sejtvonal esetében 13 napos medián túlélést mutattak.

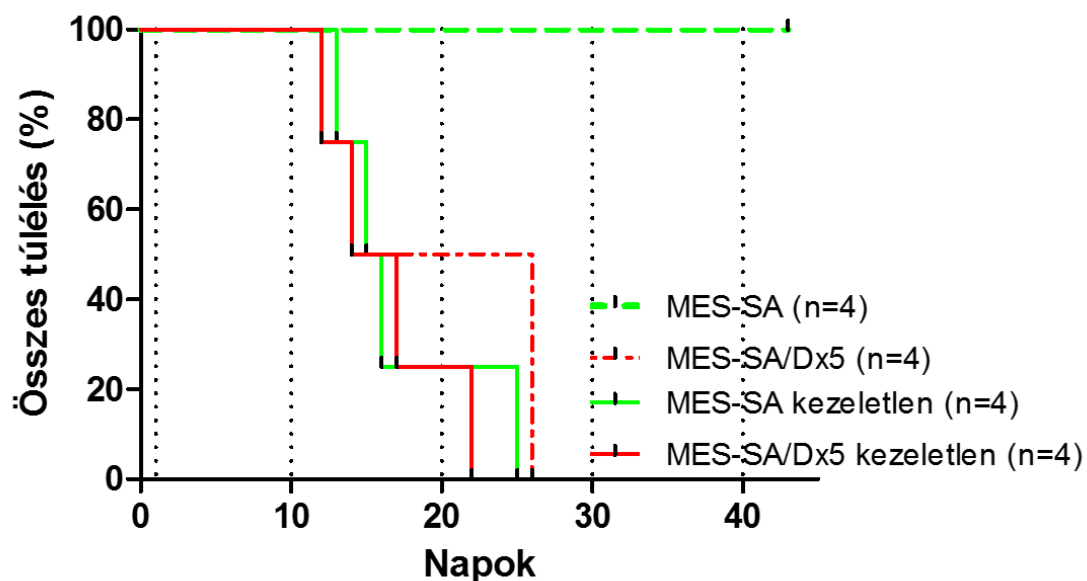
Ezek a túlélési adatok jó egyezést mutatnak a klinikai tapasztalatokkal: kimutatható volt, hogy az AML-blasztsejteken a diagnóziskor mért Pgp szintje korrelál a kemoterápiára adott válasszal. További klinikai tanulmányok igazolták, hogy a Pgp-pozitív ANLL blasztsejtekkel diagnosztizált betegek rosszabbul reagálnak a kezelésre, és túlélési esélyeik is kedvezőtlenebbek [74]. A P388 – P388/ADR rendszerhez hasonló aszcitez-képző tumorokat főként a magas osztódási rátával rendelkező sejtekből álló hematológiai daganatok érzékenységének modellezésére használják [103]. A vérképző szervek és a nyirokrendszer rosszindulatú daganatainál fellépő multidrog rezisztencia vizsgálatára a P388/ADR modell gyors, olcsó és viszonylag nagy átteresztőképességű

módszert biztosít, ugyanakkor az ascitesz modell korlátai miatt a szolid tumorokra vonatkozó klinikai relevanciája megkérdőjelezhető.

### 2.3.3.2 MES-SA és MES-SA/Dx5 uterin szarkóma xenograft modell

Az *in vitro* fenntartott és alkalmazott emberi tumor sejtvonalakból xenograft daganatok indíthatóak. A MES-SA és MES-SA/Dx5 sejteket immunhiányos egerekbe oltva szolid tumorok hozhatóak létre, amik lehetőséget adnak a Pgp hatásának, a humán patológiát jobban követő, modellrendszerben történő vizsgálatára. Az ebből a sejtvonal párból létrehozott tumorokat intravénás doxorubicin terápiával (2 mg/kg iv., 10 naponta) kezelve ellenőrizhető a Pgp emberi daganatokban betöltött szerepe (7. ábra).

A MES-SA xenograft daganatok reagáltak a kezelésre, a teljes csoport életben maradt a kísérlet végéig, azonban a Pgp-pozitív MES-SA/Dx5 tumoros állatok rezisztensnek bizonyultak, a medián túlélés ebben a csoportban 20 nap volt ( $p < 0,01$ , 7. ábra).



7. ábra MES-SA (zöld szaggatott vonal) és MES-SA/Dx5 (piros szaggatott vonal) sejtvonalakból létrehozott xenograft tumorok doxorubicin (2 mg/kg iv.) kezelésre adott válasza. A piros és zöld egyenes vonalak a kezeletlen kontroll állatokat, míg a pontozott vonalak a kezeléseket mutatják. A fekete, pontozott, függőleges vonalak a kezeléseket jelzik. (Füredi et al, Magyar Onkológia, 2015)

A nem kezelt, MES-SA és MES-SA/Dx5 tumorokat hordozó állatok átlagos túlélése 15,5 nap volt.



#### 2.3.4 A xenograft tumormodellek korlátai

A rezisztens xenograft tumorok terápiára mutatott érzékenysége jelentősen javítható a Pgp gátlószeres egyidejű alkalmazásával [108], azonban az inhibitorok klinikai kudarca arra figyelmeztet, hogy a xenograft alapú állatkísérletek eredményeit fenntartásokkal kell kezelnünk. A fentebb már többször említett tény igazoló adat, hogy az összes, preklinikai tesztben sikeresnek ítélt rákellenes vezérmolekula csupán 8%-át sikerül a klinikumba átvezetni [109].

Ezt az alacsony transzlációs rátát többnyire az alkalmazott állatmodellek korlátai magyarázzák. A több éve vagy gyakran több évtizede *in vitro* műanyag felületen, kontrollált és változatlan körülmények között tenyésztett sejtvonalak immunhiányos állatokba oltásával nyert tumorok rendszerint nem alkalmasak a betegekben növekvő daganatok komplexitásának modellezésére. A sejt kultúra létrehozása és fenntartása, egy *in vitro* szelekciós eljárásnak tekinthető, ahol a gyorsan osztódó és plasztik-adherens sejtklonok túlsúlyba kerülnek, majd ennek eredményeként a sejtvonal elveszíti kezdeti heterogenitását.

Az *in vitro* tenyésztés következményeként a sejtvonalak hozzászoknak a valódi tumorok növekedését, metabolizmusát, terjeszkedését és túlélését szabályozó mikrokörnyezet (pl. a strómasejtek vagy infiltráló limfociták) hiányához és a laboratóriumi körülményekhez (hypoxia helyett norm- vagy hyperoxia, véges tápanyag mennyiség helyett közel kifogyhatatlan tartalékok, 3-dimenziós struktúra helyett 2-dimenziós „monolayer” stb.).

Az emberi tumorokból izolált sejtvonalak xenograft daganatként sem nyerik vissza eredeti jellemzőiket. A xenograftok anatómiai-morfológiai jegyei, a tumorokban jelenlévő strukturális elemek, az erezettség és az erek felépítése és a nem-rosszindulatú mikrokörnyezet mind szignifikánsan különböznek a valódi daganatok felépítésétől [101]. Ezen kívül a xenograft rendszerek ellen szól az is, hogy létrehozásukhoz immunhiányos állatokra van szükség.

A gyógyszer rezisztencia kutatása szempontjából külön kiemelendő, hogy a drog szelekció segítségével alapított rezisztens vonalak jellemzően rendkívül magas Pgp-expressziót mutatnak a klinikumban mért értékekhez képest [110]. Ahogy a 6. és 7. ábrán látható volt, a P388 – P388/ADR és a MES-SA – MES-SA/Dx5 sejtekből létrehozott

daganat modellek alkalmazhatóak a Pgp-mediált MDR bemutatására, de a rezisztencia extrém magas szintű jelenléte miatt, a xenograft modellekben a gátlókerek konvencionális kemoterápiás vegyületekkel kombinációban való alkalmazásának hatékonysága klinikailag nem tekinthető relevánsnak.

Ezekben a xenograft rendszerekben az alkalmazott sejtvonalak már a beültetés pillanatában rendelkeznek a túlélésüket biztosító rezisztencia mechanizmusokkal, míg a valódi tumorok rezisztenciája a legtöbb esetben a kezelés hatására, mint egy evolúciós folyamat eredményeként alakul ki. A sejtvonalakra jellemző rapid osztódás a xenograftokkal végzett kísérletek időtartamát is jelentősen behatárolja, szemben a valódi tumorokkal, ahol a növekedés és a kemorezisztencia kialakulása olykor évekig is eltarthat.

A preklinikai fázisokban nagyszerűen teljesítő gyógyszer-jelölt molekulák későbbi (90%-os arányt mutató!) várakozásokat alulmúló teljesítménye vagy akár teljes kudarca a helytelen sejtes és xenograft modellek alkalmazásával is magyarázható ([111],[112]).

Sajnos, a xenograftok nem képesek megjósolni a klinikai hatékonyságot az olyan célzott terápia esetében sem, melyek különböző rák specifikus útvonalak fehérjéinek gátlásán alapult [113], amit bizonyít az FDA (Food and Drug Administration) által véglegesen elfogadásra kerülő terapeutikumok alacsony, összesen 5-7%-os aránya is [114].

A fázis II és III stádiumokban bekövetkező vegyületek bukása arra utal, hogy a jelenleg rutinszerűen használt preklinikai modell-rendszerek nem megfelelően képviselik a sikeres terápia elérése közben tapasztalt komplex kihívásokat, mint a gazda szervezet immunválasza, a tumor heterogenitás és a drog rezisztencia [105]. Ennek következményeként a rendszer nem alkalmas a kombinációs kezelések, a dozírozási stratégiák és a gyógyszer célba juttatási módok összetett változóinak optimalizálására [115]. A xenograft modellek korlátai miatt szükségessé vált egy jobb, a klinikai drogrezisztenciát pontosabban követő modell kialakítása.

### 2.3.5 Genetikailag módosított tumormodellek

A klinikumban tapasztalt drog rezisztencia megjelenése egy evolúciós lépéssorozat végtermékének tekinthető. A terápia első fázisaiban a tumor, ugyan változó mértékben, de többnyire reagál a kezelésekre, azonban ez később megváltozik, először csökken a terápiára adott válasz, majd végül kialakul a teljes rezisztencia és a kezelés hatástalanná válik. A daganatok mikroevolúciójának követését és mélyebb megértését a genetikailag módosított egérmodellek (Genetically Engineered Mouse Models, GEMM) létrehozása és fejlődése tette lehetővé.

A tapasztalat, hogy bizonyos kezelésekkel a xenograft modellek közül több is sikerrel gyógyítható, míg a hasonló humán daganatokban ezek a vegyületek teljesen hatástalanok sokakat (köztük nagyszámú rákkutatót is) arra ösztönöztek, hogy megkérdőjelezzék az egér modellek jelentőségét a terápiák fejlesztésében [116]. Habár ez a csalódottság teljes mértékben érthető, fontos megjegyezni, hogy ezeket a „gyógyulásokat” csak humán sejtvonal-alapú xenograft modelleken sikerült elérni, és így az összes egér tumor modell feltétlen elvetése az új gyógyszerek azonosításának folyamatában szükségtelen.

Az összes rágszáló daganat modell közül a GEMM biztosítja a tumor fejlődés legösszetettebb reprezentációját, ahol a rák kialakulása progresszió eredménye, ahol a rosszindulatú sejtek együtt fejlődnek a strómájukat alkotó összetevőkkel, valamint, ahol az érintetlen immunrendszer is szerepet játszik a betegség alakulásában [105]. Több tanulmány bizonyítja, hogy egy jól megtervezett GEMM-kísérlet hozzájárulhat a klinikai vizsgálatok sikereihez, nem csak úgy, hogy igazolja adott kezelések hatékonyságát, hanem azzal is, hogy megjósolja a terápia előnyös és hátrányos hatását a vizsgált daganat bizonyos molekuláris szubtypusaira, vagy úgy, hogy több kezelőszer együttes alkalmazásának hatásosságát támasztja hitelt érdemlően alá ([117],[118],[119],[120],[121]).

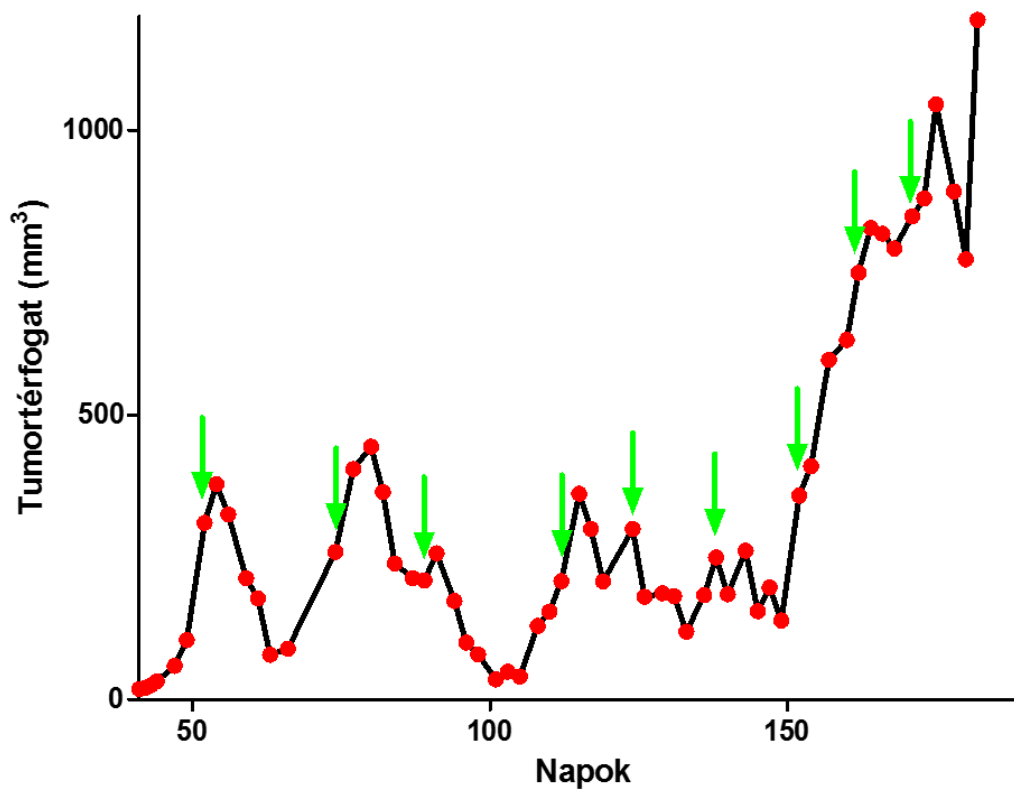
### 2.3.6 A drog rezisztencia evolúciójának vizsgálata transzgenikus *brca1<sup>-/-</sup>;p53<sup>-/-</sup>* spontán kialakuló egér emlő tumor modellben

A munkám során beállítottam és jellemeztem egy *brca1<sup>-/-</sup>, p53<sup>-/-</sup>* kettős mutáns egerekből származó, szeriális ortotopikus átültetéssel propagálható spontán tumor modellt.

Ebben a GEMM-ben a humán tumorok klinikai viselkedéséhez hasonlóan a rezisztencia a kezelés hatására alakul ki és a megjelenő emlő daganatok jól reprodukálják a humán megbetegedésekből ismert, invazív duktális karcinómákra jellemző molekuláris, hisztopatológiai és morfológiai tulajdonságokat [122].

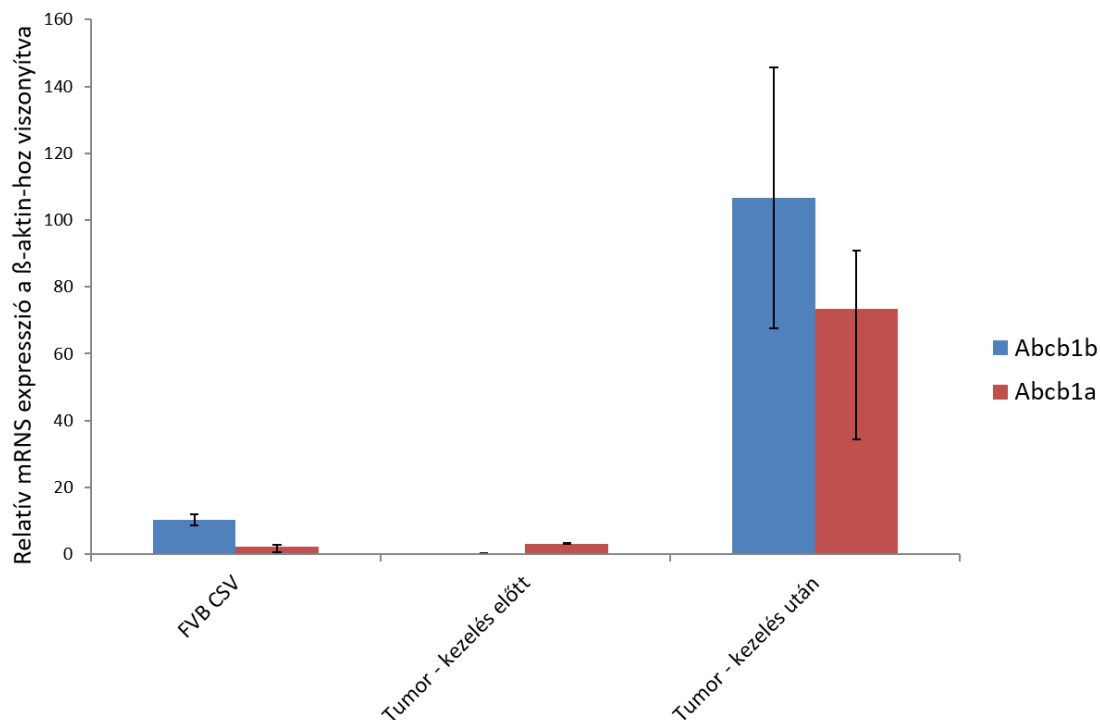
A kialakult tumorok egészséges, kettős deléciót nem hordozó, egerekben is propagálhatók a tumor darabok tejlécbe történő átültetésével. Az eljárás előnye, hogy a kísérleteket megelőző időintervallum jelentősen rövidíthető, hiszen nem kell megvárni a genetikailag módosított egérben kifejlődő tumor megjelenését, ami átlagosan nagyjából 280 napot vesz igénybe. A fagyasztva tárolt tumor darabok tejlécbe ültetésével a tumor kezdeti tulajdonságai, mint a heterogenitás vagy a folyamatos evolúció megőrizhető és reprodukálható módon modellezhető [123].

A modell használatával könnyen bemutatatható a daganatot hordozó egerekben doxorubicin kezelésével kiváltott adaptációs folyamat. Kezdetben a kezelések hatására a tumorok térfogata jelentősen csökken, azok ismétlésével a daganat növekedése gátolható, azonban a tumorok rendre rezisztenssé válnak és néhány kezelést követően már nem reagálnak az alkalmazott terápiára (8. ábra).



**8. ábra** Genetikailag módosított egerekben spontán kialakuló emlődaganatok kezelése doxorubicinnal. A kezelések (5 mg/kg iv. doxorubicin) időpontját zöld nyilak jelölik. A reprezentatív görbe a tumor térfogat változását mutatja az idő függvényében. (Füredi et al, Magyar Onkológia, 2015)

Irodalmi adatok szerint a  $brca1^{-/-}, p53^{-/-}$  tumorokban kialakuló doxorubicin rezisztencia az egér P-glikoprotein fehérje fokozott kifejeződésével magyarázható [123]. Míg kezdetben a tejlécben oltott tumor darab Pgp-expressziója a kimutathatósági határ alatt volt, addig a rezisztensé vált daganat *Abcb1a* és *Abcb1b* (egérben a P-glikoprotein fehérjét két gén kódolja) mRNA expressziója jelentősen megemelkedett (9. ábra).



**9. ábra** Az *Abcb1a* és *Abcb1b* gének mRNS-szintjének változása a *Brc1<sup>-/-</sup>;p53<sup>-/-</sup>* tumorok doxorubicin kezelése előtt és után. Kontrollként feltüntettük az FVB egerek csontvelőjéből izolált sejtek (FVB CSV) *Abcb1a* és *b* mRNS szintjeit is. (Füredi et al, Magyar Onkológia, 2015)

A sejtvonalakban tapasztaltakkal szemben ezekben a spontán tumorokban alacsony szintű, az egészséges szövetekben tapasztalható Pgp-expresszió volt kimutatható. A spontán modellben a transzporter fehérje farmakológiai gátlása a terápia megújult hatékonyságához vezet, de a kísérletes bizonyítékok szerint a daganatok, ennek ellenére, később újra rezisztenssé válnak [124].

#### 2.4 Az MDR-szelektív vegyületek lehetséges támadáspontjai

Ugyan a Pgp inhibitorok nem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket, a Pgp fehérje kifejeződés még mindig egyike a legelterjedtebb és legjobban megismert rezisztencia mechanizmusoknak. A kezeléseknél ellenálló daganatok gyógyításához újfajta megközelítésekre van szükség. A Pgp gátlása más stratégiákkal, például peptidekkel vagy antitestekkel, illetve az MDR1 gén célzott csendesítése ígéretes megoldások lehetnek [83], de gondot okozhat a fiziológiai Pgp működésének gátlása. A rezisztenciával együtt járó kollaterális vagy járulékos szenzitivitás jelentősége ott mutatkozhat meg, hogy lehetőséget ad a rezisztens sejtek célzott, szelektív elpusztítására.

Ezek a vegyületek képesek a rezisztens sejteket szelektív módon megölni, valamint hosszú távú kezeléssel megszüntetni a Pgp expressziójukat, amivel a sejtek újra érzékennyé válnak a klasszikus kemoterápiás szerekkel szemben [125].

A fentebb tárgyaltak alapján az MDR-szelektív terápia három támadásponttal rendelkezik. Ha ezeket a molekulákat a hagyományos kemoterápiás szerekkel együtt alkalmazzuk, úgy lehetséges lenne a kifejlődő Pgp-expresszáló sejtek azonnali elpusztítása és így a rezisztencia kialakulását megelőzhetnénk vagy időben kitolhatnánk. A megelőző kezeléssel biztosíthatnánk, hogy ne a már kialakult rezisztenciával kelljen felvinnünk a harcot. A rezisztencia megjelenését követően a tumor Pgp-expressziója csökkenthető lenne. Ezzel a módszerrel a rezisztens tumor, a fehérje kifejeződésének csökkentésével, újra kezelhetővé válna a kezdetben is alkalmazott kemoterápiával. Az olyan tumorok, amelyekben már kialakult a rezisztencia vagy a kezelés elején is rezisztensek voltak (intrinszik rezisztencia) és nagyszámú Pgp-pozitív sejtet tartalmaztak, az MDR-szelektív molekulákkal történő kezelés hatására a Pgp-t expresszáló tumorsejteket elpusztíthatnánk, és ezzel együtt csökkenthetnénk a daganatok méretét. A konvencionális és MDR-szelektív kezelések ciklikus alkalmazásával a rezisztenciával párhuzamosan kialakuló kollaterális érzékenység folyamatosan kiaknázható.

## 2.5 A pegilált liposzómális doxorubicin (Doxil®/Caelyx®/PLD)

Az új tumor ellenes terápiák és célpontok keresése mellett lehetőség van egy alternatív megközelítés alkalmazására is, mely nem az új kezelőszerek kutatásán alapul, hanem a jelenlegi, bevált gyógyszerek hatékonyságát és pontosabb célba juttatását kívánja növelni [126]. Mivel a doxorubicin az egyik leghatékonyabb kemoterápiás vegyületnek számít és mivel több daganattípusnál (tüdő, emlő, petefészek, méhnyak, limfóma és leukémia) bizonyult eredményesnek, mint bármely más kemoterapeutikum ([127],[128],[129]), ezért létrehozták a pegilált liposzómális doxorubicint (PLD/Doxil®/Caelyx®), hogy felülkerelkedjen a doxorubicin olyan súlyos, dózis limitáló mellékhatásain, mint a kardiotoxicitás és a myeloszuppresszió [130]. A PLD olyan kettősrétegű liposzómába csomagolt doxorubicin, melynek a felületét metoxipolietilén-glikol (MPEG) oldalláncokkal vonják be. A PLD a doxorubicintól teljesen eltérő farmakológiai tulajdonságokat mutat, és képes elkerülni a retikuloendoteliális rendszert is („álcázás”, [131]). A liposzómális formuláció kifejezetten a tumorban dúsul,

így mint egy indirekt célba juttatást valósítva meg, ami a tumorokban található abnormális, pórusos mikroér szerkezetnek tulajdonítható ([132],[133]).

A PLD hatékonyságát több allo- and xenograft tumor modellben is összehasonlították a doxorubicinéval, mint például vastagbél [134], emlő [135], petefészek [136], tüdő (Colbern et al, J Liposome Res, 1999), leukémia [137], limfóma [138], hólyag [139] és prosztata [140]. Ezekben a tesztekben összességében megegyező vagy jobb eredményt mutatott, mint a konvencionális doxorubicin (összefoglaló: [141]). Összhangban ezekkel a megfigyelésekkel a klinikai tanulmányok kimutatták, hogy a metasztatikus emlő daganatok esetében a doxorubicin és a PLD megegyező hatékonyságú [142]. Napjainkban a PLD-nek három fő indikációja van: 1. Petefészek daganatok, amik nem reagáltak megfelelően a platina-alapú terápiákra, 2. AIDS-kapcsolt Kaposi szarkóma, amire már nem hat a kezdeti kezelés és 3. Myeloma multiplex, bortezomibbal kombinálva, miután a beteg már átesett egy előző kezelésen.

Meglepő módon, a PLD hatását csak kevés tanulmány vizsgálta, mint első vonalbeli kezelés és szinte sosem nézték a gyógyszer rezisztenciával összefüggésben.



### 3. Célkitűzések

Mivel a kemoterápia sikerét a rákos sejtek ellenállása jelentős mértékben korlátozza, általános célunk a multidrog rezisztens tumorok ellen hatékony stratégiák kidolgozása volt. A doktori munka során az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

1. Új MDR-szelektív vegyületek azonosítása és jellemzése in vitro rendszerekben.
2. MDR-szelektív molekulák Pgp expresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata sejtvonalakon, primer tumorból izolált sejteken, valamint a vér-agy gát sejtmodelljén.
3. A PLD hatásának vizsgálata szenzitív és rezisztens in vitro és allograft modelleken
4. A PLD terápiás hatásának vizsgálata egy klinikailag releváns egér emlő tumor modellen.

## 4. Anyagok és módszerek

*4.1 Vegyület adatbázis és az MDR-szelektív molekulák azonosítása.* Az MDR-szelektív vegyületeket a csoport által korábban közölt módszer szerint azonosítottuk ([92],[91]). A módszer lényege, hogy az NCI60 sejtvonalon mért ABCB1 mRNS expresszió mintázatát korreláltuk a sejt panelen lemért mintegy 50.000 vegyület toxicitási mintázatával (National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program) (2010. decemberi kiadás). Olyan vegyületeket kerestünk, amelyek a magas ABCB1 expressziót mutató sejtekben alacsony IC<sub>50</sub> (a sejtek felét elpusztító koncentráció) értéket mutattak. A Pgp expresszió és a toxicitás korrelációja arra utal, hogy ezeknek a vegyületeknek a toxicitását a Pgp paradox módon fokozza.

*4.2 Vegyületek.* Az NSC vegyületeket az amerikai National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program-jától (NCI DTP) kaptuk, míg az ABCB1 gátló tariquidart Dr. S. Bates (NCI, NIH) bocsájtotta rendelkezésünkre. A ciszplatint (CDDP) az Accord Healthcare-től, a doxorubicint (DOX) a TEVA-tól, a pegilált liposzomális doxorubicint (Doxil®/Caelyx®/PLD) pedig a Janssentől szereztük be. A BRCA1+/- kísérletekben használt vegyületeket a Selleckchem-től (olaparib), a TEVA-tól (etoposide), a Sigma-Aldrich-től (SN-38, paclitaxel) és az Accord Healthcare-től (5-fluorouracil) vásároltuk, illetve Dr. Mező Gábortól (daunorubicin, ELTE) kaptuk.

*4.3 Drog érzékeny és drog rezisztens sejtvonal párok.* A MES-SA uterin szarkóma és az abból folyamatos doxorubicin kezeléssel létrehozott MES-SA/Dx5, az MDCKII kutya vese epitél és az A431 epidermoid karcinóma sejtvonalakat az American Type Culture Collection-től (ATCC) vásároltuk, míg a KB-3-1 méhnyak karcinóma és annak vinblasztin rezisztens utód sejtvonalát, a KB-V1-et, Dr. Michael M. Gottesmann (NIH) biztosította számunkra. Az MDCKII-ABCB1, A431-ABCB1 és az A431-ABCG2 sejtvonalakat lentivirális transzdukcióval hoztuk létre [143]. A P388 egér leukémia sejtvonalat és az abból létrehozott doxorubicin rezisztens P388/ADR sejteket a NCI DTP sejtgűjteményéből kaptuk. A KB-V1 sejteket 300 nmol/L vinblasztin, a MES-SA/Dx5 sejtvonalat 500 nmol/L, míg a P388/ADR egér leukémia vonalat 800 nmol/L doxorubicin mellett tenyésztettük, hogy fenntartsuk a magas P-glikoprotein expressziót. A sejtvonalakat DMEM tápoldatban (Life Technologies) tenyésztettünk, amit 10% főtális

borjú szérummal (FBS), 5mmol/L glutaminnal és 50 egység/mL penicillin/sztreptomicin (Lonza) kombinált antibiotikummal egészítettünk ki. A sejtvonalakat 37°C hőmérsékleten és 5% CO<sub>2</sub>-ot tartalmazó környezetben tartottuk.

*4.4 Emlő tumor sejtvonal panel.* A humán emlő daganat sejtvonal panelt (MCF7, T47D, MDA-MB-231, MDA-MB-468, Hs578T, BT-549) az NCI DTP sejtvonal kollekciónaként szereztük be. A sejteket RPMI tápoldatban (Life Technologies) tenyésztettük, amit 10% FBS-sel, 5mmol/L glutaminnal és 50 egység/mL penicillin/sztreptomicin (Lonza) kombinált antibiotikummal egészítettünk ki. A sejteket 37°C hőmérsékleten és 5% CO<sub>2</sub>-ot tartalmazó környezetben tartottuk.

*4.5 Vér-agy gát endotél sejtvonal.* A hCMEC/D3 immortalizált vér-agy gát endotél sejtvonalat Professzor Pierre-Olivier Couraud (INSERM, Párizs, Franciaország) és Dr. Cervenák László (SOTE, Budapest) biztosították számunkra. A sejteket EndoGRO™-MV médiumban tenyésztettük 1 ng/ml FGF-2 növekedési faktor jelenlétében 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> koncentráció mellett. A kultúrák megfelelő növekedéséhez a tenyésztőedények felületét, mind a normál tenyésztés, mind a kísérletek során, 20-szorosan higított I. típusú kollagénnel vontuk be a sejtek szélesztése előtt.

*4.6 BRCA1-WT és -KO DT40 csirke limfóma sejtvonal.* A DT40 csirke B-sejtes limfóma sejtvonalat Dr. Szüts Dávidtól (MTA TTK, Budapest) kaptuk. Kísérleteinkben a vad típusú (WT) DT40 sejtvonal 18-as klónját [144] és annak BRCA1-kiütött változatát használtuk [145]. A sejteket RPMI-1640 médiumban tartottuk, amit 7% FBS-sel, 3% csirke szérummal, 50 µM 2-merkaptotetanollal és penicillin/sztreptomicin oldattal egészítettünk ki. A sejteket 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> mellett tenyésztettük.

*4.7 Citotoxicitási vizsgálatok.* A szelektivitást célzottan, Pgp-negatív és -pozitív sejtvonal párokon vizsgáltuk, és a vegyületek két sejtvonalon mért citotoxicitási értékeinek hányadosával adtuk meg. A szelektivitási hányados (SR) megmutatja, hogy az adott molekula mérgezőbb-e a Pgp-t expresszáló sejtekre a parentális sejtvonalhoz képest. A sejtek viabilitását PrestoBlue® reagenssel (Life Technologies) mértük a gyártó által megadott protokoll szerint. Röviden, a sejteket 96-lyukú mikrolemezekben tenyésztettük, majd a letapadást követő 24 órán belül a sejteket a megadott vegyületekkel kezeltük. 72 ill. 120 órás inkubációt követően a sejteket 5%-os PrestoBlue®/PBS oldatban tartottuk,

majd a viabilitást spektrofotometriás módszerrel mértük EnSpire mikrolemez olvasóval (Perkin Elmer). Az adatokat korrigáltuk a háttérre, úgy, hogy a jelöletlen sejteken mért szignált kivontuk a jelölt sejteken kapott eredményekből, majd a kapott adatokat normalizáltuk a kezeletlen sejteken mért értékre. A viabilitási görbék számításait Prism szoftverrel végeztük a szigmoidális dózis-válasz modellt alkalmazva. Az IC<sub>50</sub> értékeket görbe illesztés statisztikai elemzéssel nyertük. A kísérletekhez használt sejtszámokat minden esetben TC-10-es automata sejtszámoló készülékkel (Bio-Rad) határoztuk meg.

*4.8 Immuncitokémia.* 5000 MES-SA ill. MES-SA/Dx5 sejtet tettünk ki üvegaljú 8-lyukú tenyésztőkamrára (Thermo Scientific). 24 óra elteltével a sejteket 4% paraformaldehiddel fixáltuk 15 percig szobahőmérsékleten. Ezt követően három, PBS (foszfát-pufferelt fiziológiás sóoldat) oldattal történt mosás után a fixált sejteket 2 mg/mL BSA (borjú szérum albumin), 1% hal zselatin, 5% kecske szérum és 0.1% Triton-X 100 tartalmú komplett blokkolóban permeabilizáltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. A mintákat 1 óráig jelöltük P-glikoprotein ellenes elsődleges antitesttel (1:500, MRK16, Kamiya Biomedical), majd háromszori PBS-es mosás után Alexa Fluor® 488-konjugált kecske anti-egér IgG másodlagos antitesttel (Life Technologies) festettük a kultúrákat 250-szeres hígításban. Mind az elsődleges, mind a másodlagos antitesteket komplett blokkolóban oldva használtuk. A sejtmagokat minden esetben DAPI (Dojindo Molecular Technologies) festéssel vizualizáltuk. A jelölt mintákat Zeiss LSM 710-es konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

*4.9 RNS izolálás és RT-PCR.* A hirtelen fagyasztott tumor mintákat folyékony nitrogén alatt porítottuk, majd TRIzol™ reagensben (Life Technologies) homogenizáltuk. Az így gyűjtött mintákból a Direct-zol® MiniPrep kittel (Zymo Research) izoláltunk RNS-t a gyártó által megadott módon. Az izolálás során a szeparáló oszlopon Dnáz I kezelést alkalmaztunk a DNS szennyezések elkerülése végett. 300 ng RNS-t írtunk át cDNS-sé a Promega Reverz Transcription System-et használva. A Real-Time PCR vizsgálatokhoz előre gyártott egér Béta-Aktin (Aktβ) próbát (Life Technologies) használtunk endogén kontrollként, míg az egér Abcb1a és Abcb1b gének expresszióját a megfelelő TaqMan® primerekkel kvantifikáltuk. Az RT-PCR analízist StepOne™ Real-Time PCR készüléken végeztük (Life Technologies), az mRNS expresszió változását pedig a  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

módszerrel számítottuk. A relatív mRNS szint változásokat 3 független kísérlet átlagaként ábrázoltuk  $\pm$  S.E.M. (standard error of mean).

*4.10 Áramlási citometria.* A P-glikoprotein funkciójának méréséhez calcein esszét használtunk [146]. MES-SA és MES-SA/Dx5 sejteket 0,1%-os tripszin oldattal választottuk le a tenyésztőedény felületéről, majd 250.000 darab sejtet a P-glikoprotein inhibitor verapamil (10  $\mu$ M) mellett vagy nélkül jelöltünk meg 0.25  $\mu$ M Calcein AM (Dojindo Molecular Technologies) festékkel 37°C hőmérsékleten. A halott sejteket a TO-PRO3 (Life Technologies) DNS festék pozitivitás alapján zártuk ki. A módszer alapját képező nem fluoreszcens Calcein AM festéket a sejtekbe jutva intracelluláris észteráz enzimek hasítják, aminek eredményeképpen létrejön az erősen fluoreszcens calcein. Mivel a Calcein AM szubsztrátja a P-glikoprotein fehérjének, így a Pgp-pozitív sejtekbe a festék nem jut be, azok alacsony fluoreszcenciát mutatnak, ami a Pgp gátlószer verapamil hozzáadásával jelentősen növelhető. Ezzel a módszerrel a Pgp funkciója érzékenyen követhető. Az áramlási citometriás méréseket FACSCANTO II készülékkel (BD Biosciences) végeztük.

*4.11 Állatkísérletek.* Az állatkísérleteket az Országos Állategészségügyi Intézet és a Magyar Tudományos Akadémia Természettudományi Kutatóközpont Állatkísérleti Bizottságának engedélyével (22.1/2291/3/2010), valamint az Európai Unió állatkísérletes előírásainak betartásával végeztük. A kísérletek az Országos Onkológiai Intézet Kísérletes Farmakológiai Osztályának állatházában történtek.

*4.12 Allograft tumorok.* A P388 és P388/ADR egér leukémia sejtekből aszcitesz tumorokat hoztunk létre BDF1 (Országos Onkológiai Intézet) egerek hasüregében, melynek során  $10^6$  sejtet injektáltunk intraperitoneálisan 6-8 hetes állatokba. 48 órával a beoltást követően egyetlen adag fiziológiás sóoldatot, doxorubicint (3 mg/kg) vagy PLD-t (3 vagy 5 mg/kg) adtunk intraperitoneálisan az egereknek. Az állatok testtömegét hetente 3 alkalommal mértük és naponta ellenőriztük, hogy az egyedek szenvednek-e bármilyen nemű fájdalomtól. Az aszciteszt képző, nem-szolid daganatok esetén az állatok egészségi állapotát (stressz, diszkomfort, fájdalom) a Test Kondíció Pontozás (Body Condition Scoring, BCS) módszerrel követtük. Ez a technika segít meghatározni az eutanázia időpontját és csökkenti az egereknek okozott tartós fájdalmak időtartamát [147].

4.13 *Spontán kialakuló, átültethető Brca1<sup>-/-</sup>;p53<sup>-/-</sup> egér emlő tumorok.* A Brca1<sup>-/-</sup>;p53<sup>-/-</sup> FVB egerekben spontán kialakult emlő daganatokból származó tumor darabokat Dr.Sven Rottenberg (Holland Rákkutató Intézet) bocsájtotta rendelkezésünkre. A darabokat vad típusú FVB egerek (Harlan) tejlécébe ültetve az eredeti daganattal megegyező heterogenitású és fenotípusú tumorok nyerhetőek, melyek a kiindulási daganat gyógyszer érzékenységében is osztoznak, így vizsgálhatóak bennük a kezelésekre kialakuló rezisztencia mechanizmusok. A tumor darabokat altatás alatt (20 mg/kg zolazepam, 12.5 mg/kg xylazine, 3 mg/kg butorphanol, 20 mg/kg tiletamine) ortotopikusan ültettük be. A daganatok méretét hetente háromszor ellenőriztük, majd amint elérték a mérhető térfogatot tolómérővel mértük a kialakult tumorok szélességét és hosszúságát, amiből a következő formula szerint számoltunk térfogatot:  $V = \text{hosszúság} \times (\text{szélesség}^2/2)$ . A kezeléseket akkor kezdtük, amikor a tumorok elérték a  $\sim 200\text{mm}^3$ -t. Ekkor a DOX és a PLD maximálisan tolerálható dóziséval (MTD, DOX: 5 mg/kg, PLD: 8mg/kg) kezeltük intravénásan az állatokat a farki vénán keresztül. A kezeléseket 10 naponta ismételtük, amennyiben a tumor térfogata nem csökkent 50%-al a kezdeti állapothoz képest, viszont ha kezelésre adott válasz több volt, mint 50%, akkor a következő dózist csak akkor kapták az egerek, ha a tumor újra elérte az eredeti méretét. Az állatokat nyaki diszlokációval eutanáziában részesítettük, ha a tumor elérte a  $\sim 2000\text{ mm}^3$ -es térfogatot.

4.14 *Primer tumor sejtek izolálása spontán kialakuló egér emlő daganatokból.* A tumor hordozó állatokat eutanáziában részesítettük, majd eltávolítottuk a daganatokat. Az így nyert tumor szövetet 70%-os etanollal, majd jéghideg PBS-sel alaposan átmostuk, a peritumorális szöveteket eltávolítottuk és a daganatot közel  $1\text{ mm}^3$ -es darabokra vágtuk. A darabokat 50 ml-es centrifugacsőbe helyeztük, majd 20 ml disszociációs médiumot (200 egység/ml IV-es típusú kollagenáz és 0,6 egység/ml diszpáz komplettált DMEM-ben oldva) pipettáztunk rájuk. Két órán keresztül emésztettük a darabokat 37°C hőmérsékleten, miközben az elegyet minden 15 percben 1 percig vortexeltük. A sejt szuszpenziót végül 70 mikronos nylon szűrőn (BD Biosciences) engedték át, 300×g sebességgel centrifugáltuk 5 percig, a felülúszót eltávolítottuk és a sejt csapadékot DMEM/F-12 médiumban vettük vissza, amit főtális borjú savóval, L-glutaminnal és penicillin/sztreptomycin oldatokkal egészítettünk ki.

*4.15 DOX és PLD koncentráció kimutatása vérből.* Az egereket intravénásan kezeltük egyetlen dózis doxorubicinnal (5 mg/kg) vagy PLD-vel (8 mg/kg). Vérmintákat gyűjtöttünk a kezelés előtt, majd a kezelést követő 5, 15, 30, 60, 180, 360, 1440 és 2880 percben szív punkcióval, miután az állatokat elaltattuk. A vérsavót centrifugálással szeparáltuk 4000 rpm-en, 15 percig 4°C-on. A felülúszót steril csőbe vittük át, majd -20°C-on tároltuk a tömeg spektrometriai mérésig. A kontrollként használt DOX és PLD oldatokat metanol és víz 1:1 arányú keverékében oldottuk 1 mg/ml-es koncentrációban. A kalibráláshoz szükséges standard sorban 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 50000 ng/ml koncentrációjú oldatokat használtunk, amit a DOX törzsoldat vízzel történő tovább hígításával állítottunk elő. Vizes oldatokat azért használhattunk, mert nem tapasztaltunk szignifikáns eltéréseket a mátrixból, illetve a vizes oldatból történő visszaméréseknél. 100 µl levett mintához 300 µl extrakciós oldószert (metanol) adtunk, az oldatot vortexeltük, majd 10 percig centrifugáltuk 13300 rpm fokozaton. A deproteinizált felülúszót (100 µl) 200 µl-es csövekbe töltöttük mérés előtt. Az LC-MS/MS analízishez egy electrospray módban működő Turbo V ionforrással (AB Sciex) és egy Perkin Elmer Series 200 mikro LC rendszerrel felszerelt QTRAP 6500 tripla négyszeres – lineáris ionscaphadás tömeg spektrométert használtunk. Az adatgyűjtést és feldolgozást az Analyst 1.6.2 szoftverrel végeztük (AB Sciex). A kromatográfiás elválasztás egy Agilent Zorbax SB C18 oszlopon (75 mm × 4,6 mm, 3,5µm) történt. A mintát A oldószer (0,1% hangyasav vízben) és B oldószer (0,1% hangyasav acetonitrilben) gradiensével eluáltuk. Az áramlás sebességét 0,8 ml/percre állítottuk. A szeparáció először 1 percig 10% B oldószerrel történt, amit lineáris gradiens követett 90% B oldószerrel 4 percig. Az 5.-től a 8. percig maradt a 90% B oldószer, majd a 8 és 8,5 perc között a kezdeti kondíciókat állítottuk vissza, ami a 13,5. percig maradt. Az oszlopot szobahőmérsékleten tartottuk, az injekciós térfogat pedig 10 µl volt. A tömegspektrometriai méréseket Dr. Imre Tímea és Dr. Szabó Pál végezték (MTA TTK MS Metabolomika kutatócsoport).

*4.16 Adatelemzés.* A citotoxicitási esszéket, a Kaplan-Meier túlélési és a tumor növekedési görbéket GraphPad Prism 6 szoftverrel ábrázoltuk és értékeltük ki.

## 5. Eredmények

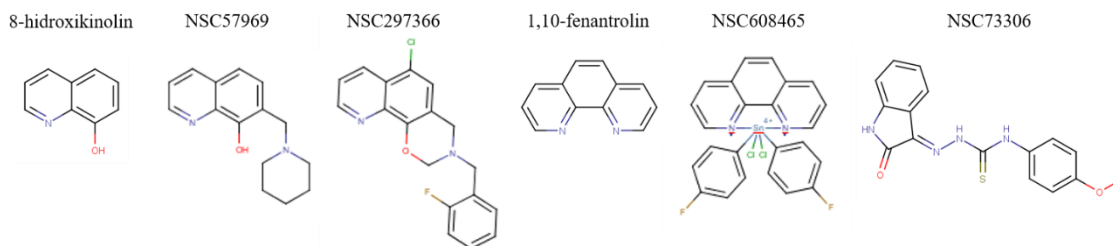
### 5.1 Új MDR-szelektív vegyületek azonosítása és jellemzése *in vitro* rendszerekben

Az MDR-szelektív vegyületek felfedezése ugyan bizonyította, hogy a járulékos érzékenység egy farmakológiailag kihasználható célpont lehet a rezisztens tumor sejtekkel szemben, azonban az 1. generációs molekulák toxicitása túl alacsony volt az esetleges klinikai fejlesztések elindításához. A vegyületek hatékonyságának növelése érdekében újabb MDR-szelektív hatóanyagok azonosítására volt szükség, amelyek magasabb szelektivitással és alacsonyabb IC<sub>50</sub> értékekkel rendelkeznek, valamint képesek a Pgp expresszió hatékonyabb csökkentésére.

#### 5.1.1 Új MDR-szelektív molekulák *in silico* azonosítása a DTP adatbázisában

Korábban mi (ahogy mások) is, kimutattuk, hogy a Pgp mRNS szintjeit és a publikus DTP toxicitási profilokat korrelálva lehetőség nyílik Pgp szubsztrátok és olyan MDR-szelektív vegyületek (pl. NSC73306) azonosítására, amelyek toxicitása funkcionális Pgp jelenlétében növekszik ([92],[91]). A sejtek hiperérzékenyek mutatkoznak az NSC73306-tal szemben és ez az érzékenység arányos a sejtek Pgp expressziójával, de elvész, amint a Pgp funkcióját gátlószerrel vagy géncsendesítéssel megszüntetjük [125]. Ahhoz, hogy korábbi, kisebb adathalmazból származó vegyületek csoportját több hasonló molekulával bővíthessük, meghatároztuk a korrelációt 49169 vegyület citotoxicitási mintázata és az NCI60 sejt vonal panel sejtjein mért Pgp expressziós szintek között. Analízisünk 82 lehetséges MDR-szelektív anyagot eredményezett, amelyek közül 61 már egy korábbi elemzésünkben ismert volt ([92],[93]). A 21 új MDR-szelektív vegyület közül az a három került kiemelésre (NSC57969, NSC297366, NSC608465), amiket a korábban talált NSC73306-hoz (pozitív kontroll), 8-hidroxikinolin alapvázhoz (8OHQ, negatív kontroll) és az 1,10-fenantrolinhoz (1,10-fen) lett hasonlítva *in vitro* körülmények között, sejtes rendszerekben. Ez utóbbi molekula egy másik, szerkezetileg eltérő, de szintén MDR-szelektív hatást mutató vegyület csoport alapvázaként szolgál és magában is aktív, ezért ez, mint pozitív kontroll lett használva a kísérletek során. A részletesen ismertetett molekulák szerkezetét a 10. ábra mutatja.





10. ábra A vizsgált vegyületek szerkezetei.

### 5.1.2 Az új MDR-szelektív vegyületek tesztelése *in vitro* citotoxicitási esszében

A vegyületek MDR-szelektív citotoxicitását három parentális és multidrog rezisztens, P-glikoproteint expresszáló sejtvonalon páron teszteltük. Ahhoz, hogy egyértelműen bizonyítást nyerjen a vegyületek Pgp-függő hatása, két, doxorubicin szelekcióval létrehozott rezisztens vonal (MES-SA és MES-SA/Dx5, valamint KB-3-1 és KBV-1) mellett, egy transzdukcióval Pgp expresszálóvá tett sejtvonalat (MDCKII és MDCKII-B1) is vizsgáltunk. A 7. ábrán bemutatott 6 molekula közül 5 bizonyult toxikusabbnak az MDR sejteken (1,10-fen, NSC73306, NSC57969, NSC297366, NSC608465), ugyanakkor a 8OHQ alapváz csak egy Pgp-pozitív sejtre volt mérgezőbb (1. táblázat). A korábban ismertetett kritériumok szerint tehát 5 MDR-szelektív vegyületnek tekinthető, míg a 8OHQ toxicitása sejtspecifikus.

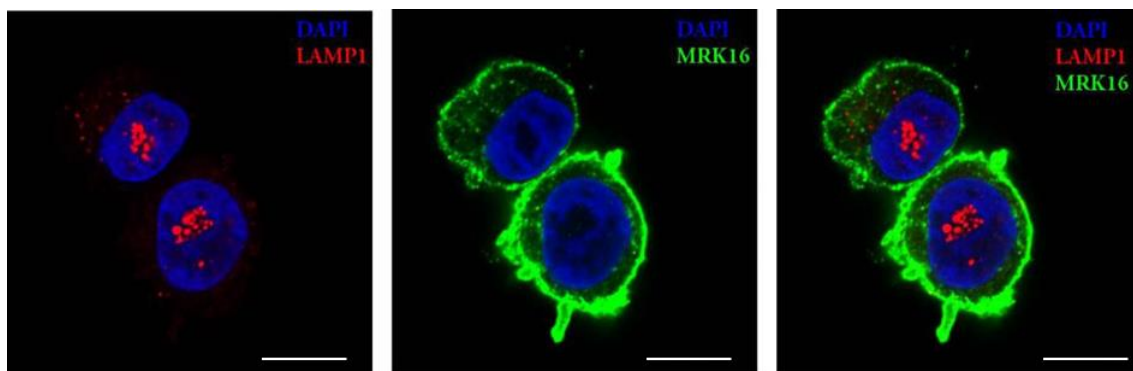
NSC kód	KB-3-1	KBV-1	KB-3-1/ KBV-1	MDCK II	MDCK II-B1	MDCK II/ MDCK II-B1	MES-SA	Dx5	MES- SA/ Dx5	MES-SA (TQ)	Dx5 (TQ)	MES- SA/ Dx5 (TQ)
NSC297366	2,1	0,1	17,6**	2,9	0,3	10,5**	2,1	0,1	19,0*	1,7	1,6	1,1
NSC57969	8,6	0,6	14,6*	4,5	0,8	5,7**	4,9	0,6	8,2**	4,8	3,6	1,4
8OHQ	20,1	10,0	2,2	3,3	2,8	1,2	4,8	2,8	1,7**	4,1	2,1	1,9**
1,10-phen	32,9	11,0	3,4*	5,1	2,6	2,0**	4,7	1,7	3,1**	4,6	3,7	1,3
NSC608465	2,6	1,1	2,6*	2,6	1,4	2,3*	3,6	1,2	3,0*	4,9	3,8	1,6
NSC73306	7,5	3,7	2,2**	6,8	2,8	2,4*	6,4	3,1	2,0**	5,3	4,0	1,3*

\*P<0.05; \*\*P<0.01

1. táblázat Az újonnan azonosított és korábban talált MDR-szelektív vegyületek IC<sub>50</sub> értékeinek összehasonlítása különböző Pgp-negatív és Pgp-pozitív sejtvonalon párokon. A megadott értékek a molekulák IC<sub>50</sub> értékeit mutatják (μM) a parentális és a rezisztens sejtvonalon. A szelektivitási hányados a (Pgp-negatív/Pgp-pozitív sejtek IC<sub>50</sub> értékeinek hányadosa) nagyobb, mint 1, ha az adott vegyület hatékonyabban pusztítja el a Pgp-expresszáló sejteket, mint a drog szenzitív párjukat. Ez a tulajdonság MDR-szelektív hatásra utal. (Füredi et al, Molecular Cancer Therapeutics, 2016 alapján)

Az NSC73306-hoz és az 1,10-fenantrolinhoz képest a két 8OHQ alapszerkezetű molekula (NSC57969 és NSC297366) szignifikánsan hatékonyabb és átlagosan 6-7-szer szelektívebb a Pgp expresszáló sejtekre. Az MDR-szelektív toxicitás kritériuma, hogy a transzporter fehérje funkciójának gátlására a szelektivitásnak meg kell szűnnie. A hat vegyületet a MES-SA és MES-SA/Dx5 sejteken a Pgp gátlószer tariquidar (TQ) mellett is leteszteltük annak bizonyítására, hogy a Pgp funkciójának kiesése megszünteti az MDR sejtek hiperérzékenységét. A vártak megfelelően a molekulák, melyek célzottan pusztították el Pgp expresszáló sejteket, csökkent hatást mutattak a gátlószer jelenlétében, azonban hatékonyságuk nem változott jelentősen a Pgp-negatív parentális sejtvonalakon (1. táblázat). Ezzel szemben a 8OHQ toxicitása nem függött a P-glikoprotein funkciójától. Ahogy az korábban kiderült, az MDR-szelektív tulajdonságokkal rendelkező szerkezetek, mint a tioszemikarbazidok (NSC73306), a 8-hidrokinolinok (NSC57969, NSC297366) és az 1,10-fenantrolinok (1,10-fen, NSC608465) mind rendelkeznek fém kelációs képességekkel, ami egy eddig ismeretlen mechanizmussal pusztíthatja el szelektíven az Pgp-pozitív sejteket.

A fémkelátorok Pgp-szelektív hatását magyarázhatja a Dp44mT vegyület példája, ami a tanulmányok szerint különleges módon képes szelektív toxicitást kifejteni a Pgp expresszáló rezisztens sejtekre. Kimutatták, hogy a Dp44mT, mint a Pgp szubsztrátja, felgyülemlik a lizoszómákban, köszönhetően a lizoszóma membránjába beépülő Pgp pumpáknak. A „fordított” orientáció következtében az intracelluláris Pgp akkumulálja a molekula redox-aktív réz komplexét a lizoszómában, ami így permeabilizálódik és ez apoptózishoz vezet ([148], [149]). Ez a hipotézis azon az alapfeltevésen alapszik, hogy a Pgp kifejeződik a lizoszómák membránjában. Mivel, egyetértésben más tanulmányokkal, mi is csak a sejtmembránban találtunk Pgp-t, nem tudtuk igazolni, ennek az elméletnek a helyességét (11. ábra).



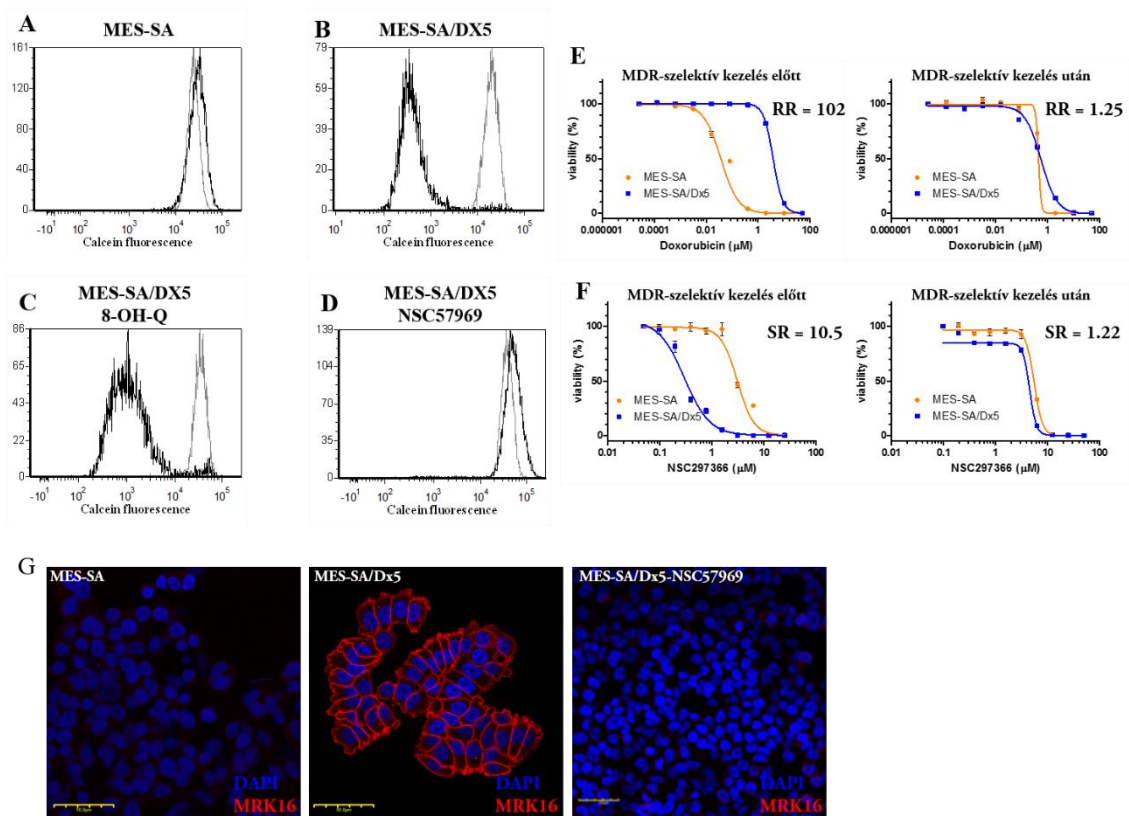
**11. ábra** A Pgp-pozitív KB-V1 sejtek a sejtmembránjukban expresszálnak Pgp-t, a lizoszómájukban nem. A Pgp specifikus antitestet zölddel (MRK16-AF488), a lizoszóma specifikus antitestet pirossal (LAMP1-AF546) jelölve. A magok DAPI-val vizualizálva. (Füredi et al, Molecular Cancer Therapeutics, 2016)

## 5.2 MDR-szelektív molekulák Pgp expresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata sejtvonalakon, primer tumorból izolált sejteken, valamint a vér-agy gát sejtjes modelljén

### 5.2.1 Az új MDR-szelektív vegyületek képesek egyetlen, nagy dózisu kezeléssel megszüntetni az MDR-sejtek Pgp expresszióját és újra érzékenyíteni azokat a kemoterápiás szerekkel szemben

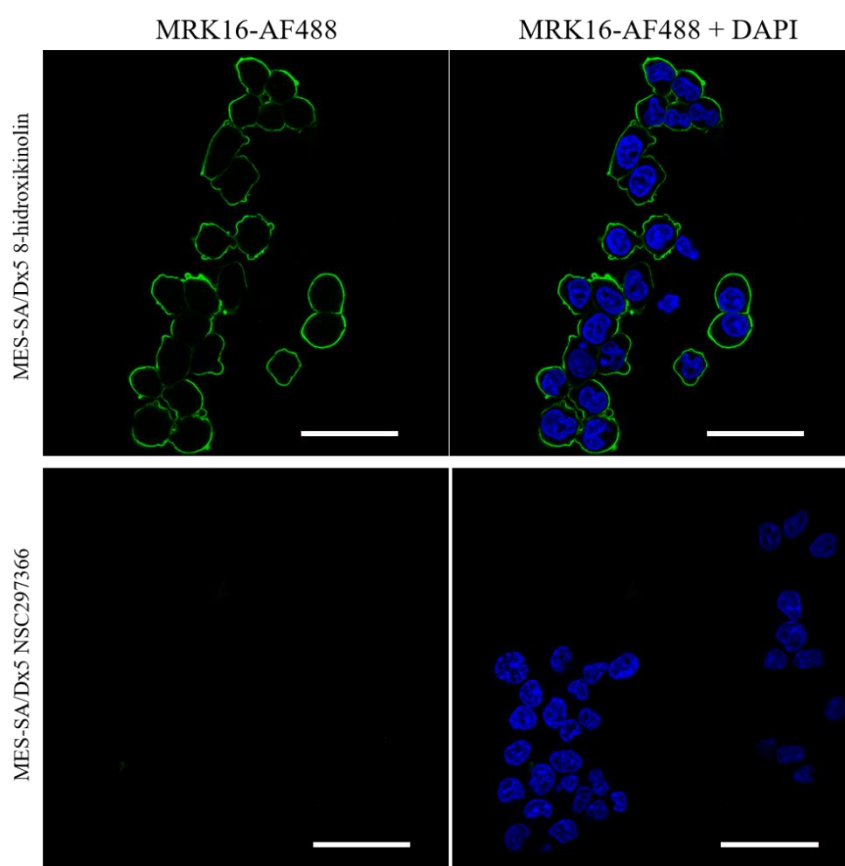
Már az MDR-szelektív vegyületek felfedezését követően nem sokkal kiderült, hogy az MDR sejtek folyamatos MDR-szelektív vegyülettel történő kezelésnek kitéve elveszítik Pgp transzportereiket és újra érzékennyé válnak a konvencionális kemoterápiás szerekkel szemben, melyekre korábban nagyfokú rezisztenciát mutattak [125]. Ez az eredmény tovább erősítette az elméletet, miszerint az MDR-szelektív molekulák hatása szorosan összefügg a sejtek membránjában működő Pgp fehérjékkel. Hogy az újonnan talált vegyületek Pgp-csökkentő hatását is fel tudjuk mérni, egy újfajta megközelítést alkalmaztunk. Míg a korábban azonosított szerkezeteket alacsony koncentrációban (~IC<sub>80</sub>, az a koncentráció, ami a sejtek 20%-át pusztítja el) alkalmazva kezelték a sejteket, úgy, hogy a kultúrák médiumában folyamatosan, több passzálon keresztül jelen volt a kezelőszer, addig az új kezelési protokollban magas dózist (IC<sub>20</sub>, koncentráció, ami a sejtek 80%-át pusztítja el) használtunk, amit 5 napig hagytunk a sejteken, majd médiumcserét követően engedték a kultúrát repopulálódni. Ezt az eljárást a MES-SA/Dx5 sejtvonalon alkalmaztuk, mivel ebben a sejtvonalba a magas Pgp expresszió

doxorubicinban történő szelekció eredménye, ami lehetővé tette az endogén Pgp promóteren történő esetleges változások vizsgálatát. A kezelés hatására bekövetkező Pgp funkció változást áramlási citometrián alapuló calcein esszével vizsgáltuk (lásd Anyagok és módszerek). Meglepő módon az NSC57969 egyetlen, 5 napig tartó, IC<sub>20</sub>-al történő kezelés után a Pgp-negatív sejtek szintjére csökkentette a fehérje funkcióját, míg a negatív kontrollként használt 8OHQ kezelést követően a Pgp funkció nem változott (12. ábra A, B, C és D).



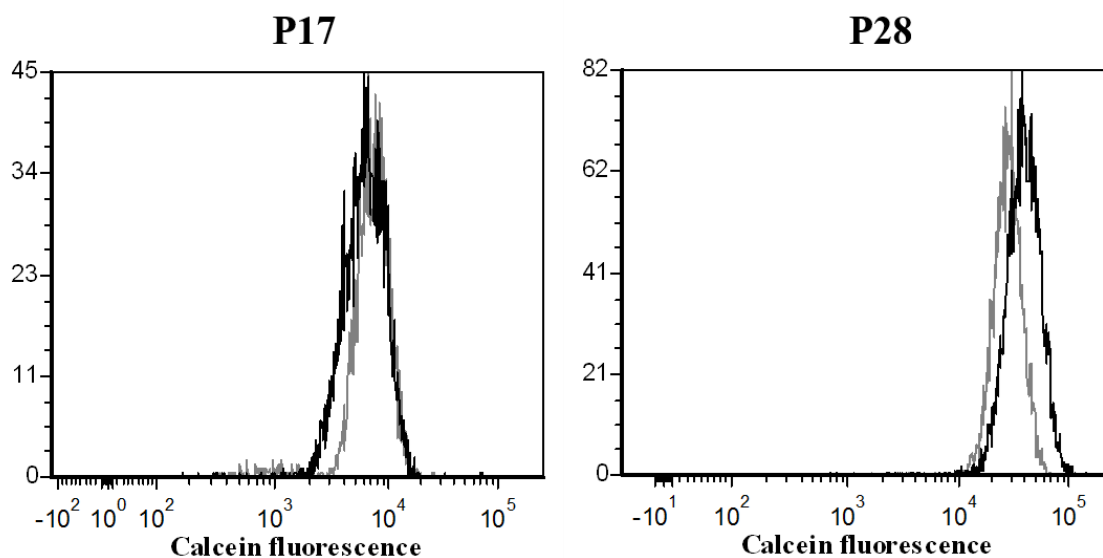
**12. ábra** Az MDR-szelektív vegyületek hatása a drog rezisztens tumor sejtek P-glikoprotein expressziójára. A MES-SA (A) és MES-SA/Dx5 (B) sejtek Pgp funkciójának vizsgálata calcein esszével, valamint a MES-SA/Dx5 sejtek Pgp expressziójának változása 14 nap 8OHQ (C) és 15 nap NSC57969 (D) kezelést követően. A szürke hisztogramok a Pgp gátlószer verapamil jelenlétében mért calcein akkumulációt mutatják. (E) Az NSC57969-rezisztens MES-SA/Dx5 sejtek újra érzékenyvé válnak a doxorubicinra és (F) rezisztenssé más MDR-szelektív vegyületekre (NSC297366). A viabilitási görbék mellett fel lett tüntetve a rezisztencia (RR) és a szelektivitási (SR) hányadosok változása is. (G) A MES-SA, MES-SA/Dx5 és MES-SA/Dx5-NSC57969 sejtek Pgp expressziója (piros) MRK16 antitesttel jelölve. A magokat DAPI festéssel jelöltük, a nagyítás 40-szeres. (Füredi et al, Molecular Cancer Therapeutics, 2016)

A kezelés hatására Pgp-negatívvá vált MES-SA/Dx5-NSC57969 sejtek újra érzékennyé váltak a doxorubicinra (12. ábra E) és rezisztenssé egy másik MDR-szelektív molekulával, az NSC297366-al, szemben (12. ábra F). Ez újabb bizonyíték arra, hogy a funkcionális Pgp jelenléte szükséges és elégséges feltétele az MDR-szelektív vegyületek által mutatott specifikus toxicitásnak. A funkcióvesztés következhetett volna permanens vagy hosszú távú kémiai gátlásból is, de ezt a feltételezést cáfolta az immunfestésekben látott teljes, fehérje szintű Pgp veszteség (12. ábra G). Hasonló immuncitokémiai vizsgálatok igazolták, hogy míg az NSC57969-hez hasonlóan az NSC297366 is Pgp expresszió megszűnéshez vezet, addig a 8OHQ kezelés nem okoz fehérje szint csökkenést (13. ábra).



**13. ábra** A rezisztens tumor sejtek az NSC57969-hez hasonlóan az NSC297366 hatására is elveszítik P-glikoprotein expressziójukat. A MES-SA/Dx5 sejtek Pgp expressziója (zöld) nem detektálható az NSC297366 kezelést követően, de a 8OHQ nem változtat a fehérje expresszióján. (Füredi et al, Molecular Cancer Therapeutics, 2016)

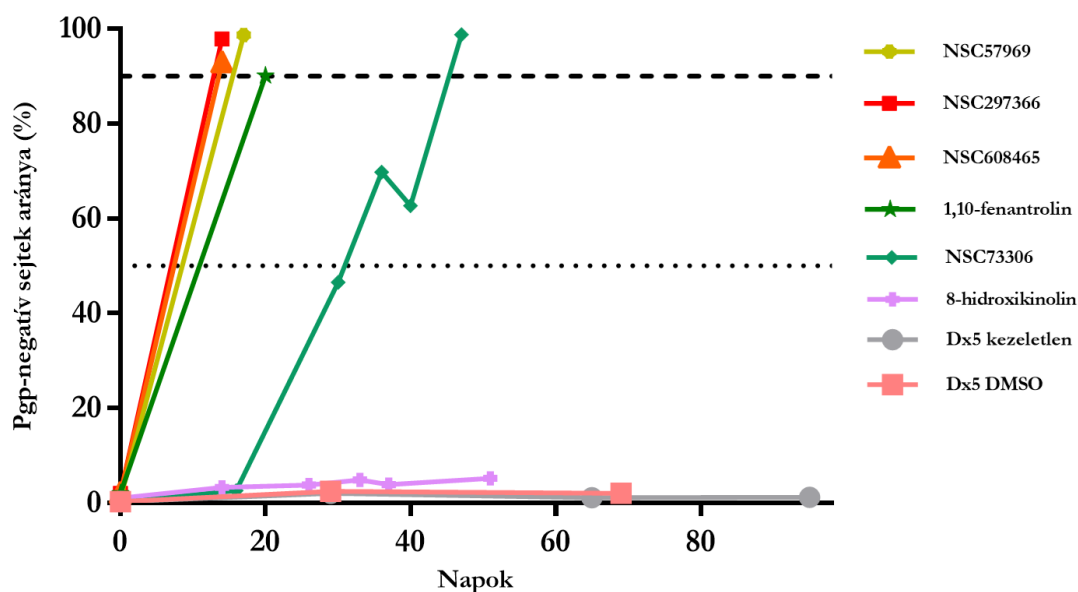
A kezelés hatására a MES-SA/Dx5 sejtek fenotípusa stabilan megváltozott, amit Pgp-negativitás és újra megszerzett doxorubicin érzékenység jellemez. Ez az újra előállt Pgp-negatív, kemoterápia-szenzitív fenotípus 30 passzázson (kb. 4 hónap) keresztül nem változott, ami azt sugallja, hogy az MDR-szelektív vegyületek elvonása nem vezet a Pgp expresszió újra megjelenéséhez (14. ábra).



**14. ábra** Az MDR-szelektív kezelés leállítására nem vezet Pgp újra-expresszáshoz. NSC57969 kezelt MES-SA/Dx5 sejtek Pgp funkciójának követése 11 passzázson keresztül calcein esszével. A sejtek calcein felvételét verapamil nélkül (fekete) és jelenlétében (szürke) vizsgáltuk.

### 5.2.2 Az MDR-szelektív molekulák Pgp veszteséget okozó hatása összehasonlítható és kategorizálható

A meglepő felfedezés, miszerint a korábbi tapasztalatokkal szemben vannak olyan MDR-szelektív vegyületek, melyek akár egyetlen kezelés hatására teljes Pgp veszteséget eredményeznek, arra vezetett, hogy az MDR-szelektív vegyületek ebből a szempontból is jellemezve legyenek. Meghatároztuk a hat vegyület IC<sub>20</sub> értékeit, majd a fentebb leírt protokoll szerint kezeltük a MES-SA/Dx5 sejteket és követtük az általuk okozott Pgp-vesztés dinamikáját (15. ábra).

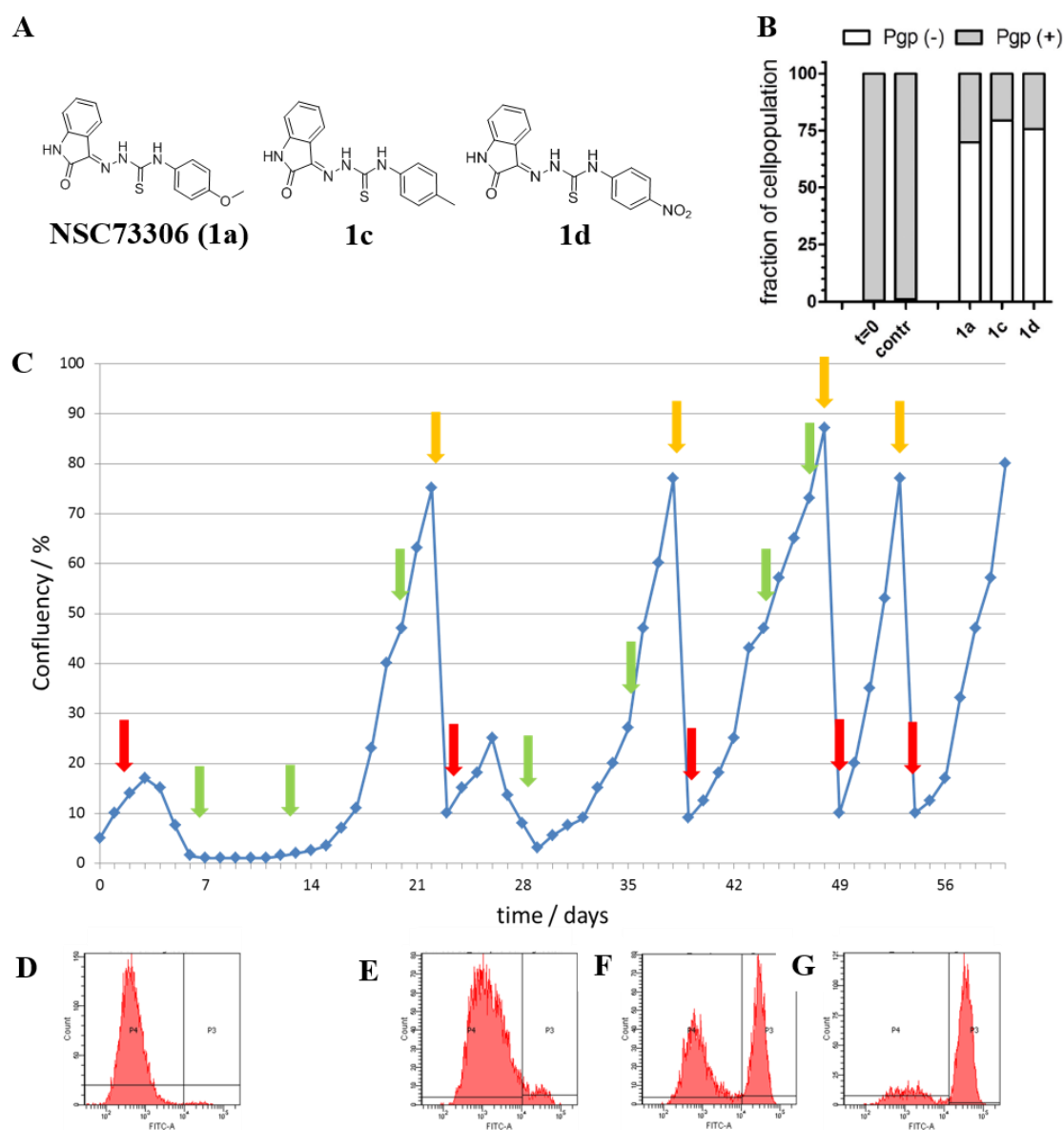


**15. ábra** A Pgp-pozitív sejtek arányának időbeli csökkenése a megadott MDR-szelektív vegyületekkel történő kezelést követően. Az adatpontok a sejt kultúrák calcein esszével meghatározott Pgp-negatív frakciójának százalékos változását mutatják. (Füredi et al, Molecular Cancer Therapeutics, 2016 alapján)

A párhuzamosan indított sejt kultúrákat 5 napig IC20-nak megfelelő koncentrációjú vegyület jelenlétében tenyésztettük, majd a tápoldatok cseréjét követően megvártuk, amíg a sejtek elérték a 80%-os konfluenciát. Ekkor calcein esszével vizsgáltuk a Pgp-negatív frakció arányát a kultúrákban. A kezeléseket addig folytattuk míg a sejtek 90%-a el nem veszítette a Pgp expresszióját, vagy amíg a kultúra 5 egymást követő kezelésen át nem esett. Az eredmények alapján elmondható, hogy a MES-SA/Dx5 sejtek normál tenyésztési körülmények között (lsd. módszerek) 95 napig biztosan megtartják kiindulási P-glikoprotein expressziójukat, amin a kontrollként használt DMSO kezelés sem változtatott. Ezzel szemben az NSC57969, NSC297366, NSC608465 és az 1,10-fenantrolin vegyületekkel történő egyetlen kezelés elegendőnek bizonyult ahhoz, hogy a kezelést követően felnövő sejt populációban a Pgp-pozitív sejtek aránya 10% alá csökkenjen, míg 5 egymást követő 8OHQ kezelés 51 nap alatt sem módosította jelentősen a kiindulási populáció összetételét. A korábban azonosított NSC73306 ugyan képes volt a MES-SA/Dx5 sejtek Pgp-negatív frakcióját 90%-nál magasabbra emelni, de ez csak 5 kezelés és 47 napot követően következett be. Az eredmények tükrében úgy tűnik, hogy a fentebb vázolt kísérleti elrendezésben a vegyületekre jellemző adat, hogy milyen hatékonysággal és gyorsasággal képesek a Pgp-pozitív sejtek eliminációjára.

A módszer alkalmazásával más tioszemikarbazon alapvázú vegyületek Pgp expresszió csökkentő hatása is vizsgálhatóvá vált [150]. Ezek a molekulák az itt is ismertetett NSC73306 közeli szerkezeti analógjai, melyek citotoxicitási kísérletekben szintén MDR-szelektív hatást mutattak. A tesztelésükhöz a korábban részletesen bemutatott szelektív esszét használtuk, ahol az 5 napig tartó IC20 koncentrációjú kezeléssel felnevelő kultúrákban található Pgp expresszáló sejtek arányát határoztuk meg és a kezelést csak a 90%-os Pgp-negatív frakció vagy az 5. kezelés elérését követően fejeztük be. A mérések visszaigazolták az NSC73306 esetében látottakat: a vegyületek hatására a Pgp-pozitív sejtek aránya jelentősen csökkent, de csak fokozatosan, több kezelést követően (14. ábra, [150]). Három egymást követő kezelést követően mind az NSC73306, mind a két, közeli analógja (**1c** és **1d**) nagyjából 70-80%-ra növelte a Pgp-negatív frakció arányát, de a 90%-os határt még így is csak 1 vagy 2 további kezeléssel tudták átlépni (16. ábra B). A kísérlet során az is kiderült, hogy a molekulák hozzáadását követő repopulációhoz szükséges idő egyre csökken: minél alacsonyabb a Pgp expresszió a kultúrában, annál gyorsabban képes a sejtpopuláció felnöni a kezelést követően (16. ábra C és D), azonban hogy ez milyen ok-okozati kapcsolatban van a vegyületekre adott válasszal még nem világos.

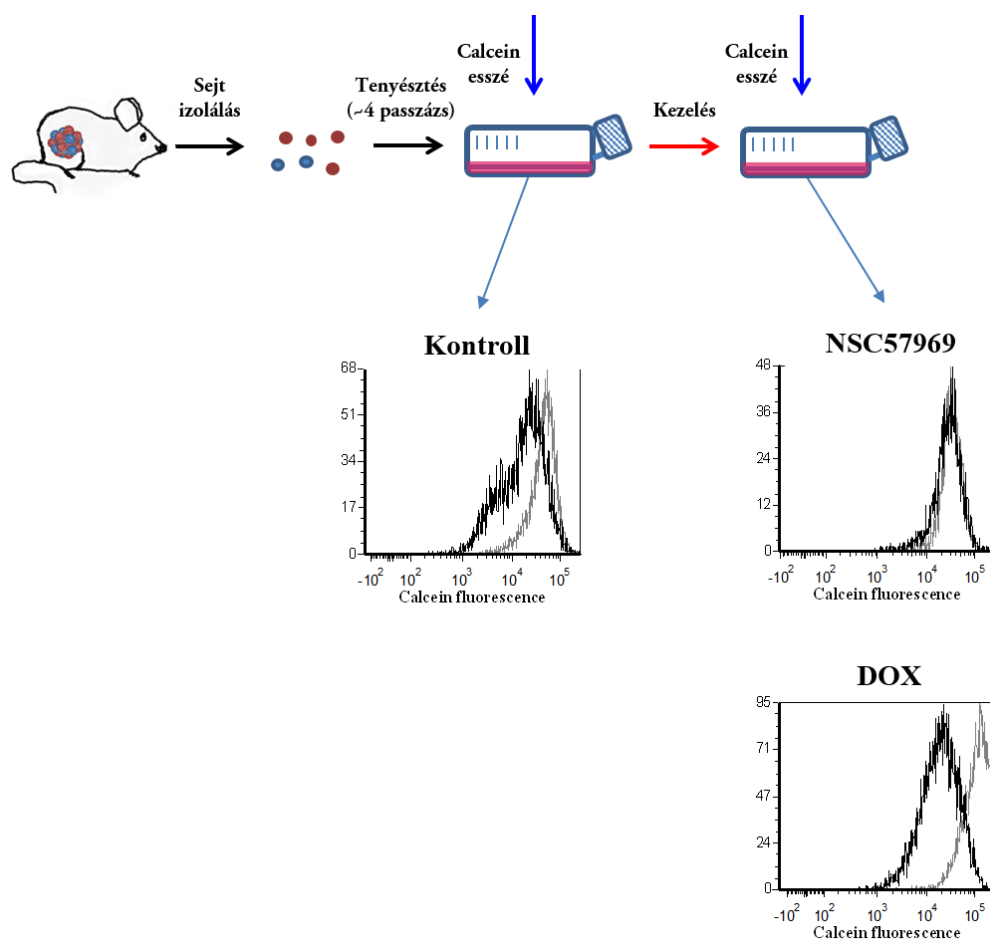




**16. ábra** A szelektós esszé alkalmazása az MDR-szelektív NSC73306 vegyület analógjainak Pgp expresszió csökkentő hatásának vizsgálatában. (A) Az NSC73306 analógjainak szerkezeti képletei. (B) MES-SA/Dx5 sejtek Pgp-pozitív frakciójának változása a kiindulási sejtekhez (t=0) képest kezelés nélkül (contr) és 3 egymást követő kezelés után az adott (**1a**, **1c** és **1d**) vegyülettel. (C) A sejt növekedés (konfluenciában kifejezve) változása az egyes **1d** kezeléseket követően, ahol a piros nyilak a kezeléseket, a zöldek a médiumcseréket és a sárgák a passzálásokat jelölik. (D-G) A passzáláskor áramlási citométerrel mért calcein dúsulási kísérletek eredményei. Az **1d** kezelések reprezentatív görbéi (a többi kezelésnél is hasonló eredmények születtek). A (B) panel az összes vegyület esetén a 3. kezelést követő eredményt mutatja. (Pape et al, European Journal of Medicinal Chemistry, 2016)

### 5.2.3 Az NSC57969 hatékonyan képes csökkenteni a Pgp expressziót egy doxorubicin rezisztens *brca1*<sup>-/-</sup>;*p53*<sup>-/-</sup> spontán egér emlő tumor modellből származó primer sejt kultúrában

Ahhoz, hogy felmérjük, vajon az azonosított vegyületek MDR-szelektív toxicitása használható stratégia olyan tumor sejtek ellen is, amelyek a klinikai drog rezisztenciához hasonló szinten fejezik ki a Pgp-t, felhasználtuk a multidrog rezisztencia egyik genetikailag módosított egér emlő tumor modelljét [110]. Mivel farmakológiailag aktív formuláció még nem áll rendelkezésünkre, az NSC57969 MDR-szelektív molekula hatását *in vitro* teszteltük egy doxorubicin rezisztens tumorból alapított primer sejt kultúrában (17. ábra).



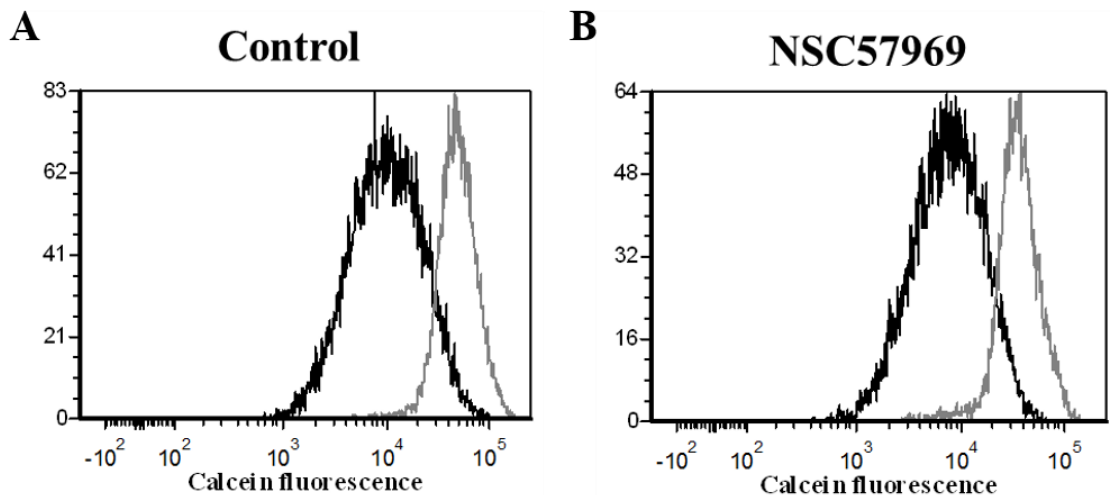
17. ábra A *brca1*<sup>-/-</sup>;*p53*<sup>-/-</sup> spontán egér emlő karcinómából izolált primer sejt kultúrák rendelkeznek egy P-glikoproteint expresszáló rész-populációval, ami *in vitro* elpusztítható az NSC57969 alkalmazásával. *Brca1*<sup>-/-</sup>;*p53*<sup>-/-</sup> egér emlő daganatokból származó tumor darabokat ültettünk ortotopikusan vad típusú FVB egerek tejlécébe, majd a doxorubicin rezisztens tumorokból primer sejt kultúrákat alapítottunk. A funkcionális Pgp expressziót calcein esszével határoztuk meg a kezelés előtt és 5  $\mu$ M

NSC57969 vagy 0.5  $\mu$ M doxorubicin kezelést követően. A kiindulási kultúrák tartalmaztak egy jelentős Pgp-pozitív rész-populációt (31%), ami egyetlen NSC57969 kezeléssel eliminálható (1.9%), míg doxorubicinnal növelhető (47.6%) volt. A szürke hisztogramok a Pgp gátlószer verapamil jelenlétében mért calcein akkumulációt mutatják. (Füredi et al, Molecular Cancer Therapeutics, 2016)

A funkcionális Pgp expressziót calcein esszével jellemeztük, ami kimutatta, hogy a rezisztens tumorból izolált primer sejtek egy adott frakciója rendelkezik egy alacsony szintű, de jelentős efflux kapacitással [124]. Ezt bizonyítja az is, hogy a primer kultúrák doxorubicin kezelése a Pgp-pozitív populáció feldúsulásához vezetett. Ezzel ellentétben, az ebben a modellben doxorubicin rezisztenciát okozó Pgp expresszáló karcinóma sejtek szelektíven eliminálhatóak voltak egyetlen NSC57969 kezeléssel, ami arra utal, hogy az MDR-szelektív terápia hatékonyan képes lehet az MDR fenotípus visszafordítására még klinikailag releváns Pgp szintek mellett is (17. ábra).

#### *5.2.4 Az MDR-szelektív vegyületek egészséges vér-agy gát endotél sejteken nem okoznak Pgp expresszió csökkenést*

A Pgp gátlók bukása fontos tanulságok levonásához vezetett a fiziológias határokon (vér-agy gát, vér-here gát, placenta stb.) kifejeződő MDR transzporterekkel kapcsolatban. Tekintve, hogy az ezekben a szövetekben expresszált Pgp fehérjék gátlása vagy kiesése súlyos mellékhatásokhoz vezetett a klinikai próbák során, ami a mérgező anyagok (pl. kemoterápiás szerek) védett szövetekben történt felhalmozódásával magyarázható, felmerül, hogy az MDR-szelektív kezelések is hasonló problémákhoz vezethetnek. A kérdés vizsgálatához a vér-agy gát, egy rutinszerűen alkalmazott in vitro modelljét használtuk fel. A humán agyi mikroerekből izolált primer endotél sejtek immortalizációjával alapított hCMEC/D3 sejtvonal morfológiájában, vér-agy gát specifikus marker mintázatában, permeabilitásában és multidrog rezisztencia transzporter expressziójában megegyezik a vér-agy gátból izolált primer sejtekével. ([151],[152]). A 18. ábrán bemutatott eredmények szerint a hCMEC/D3 sejtek jelentős mértékben expresszálnak funkcionális Pgp-t, hasonlóan az emberek agyi mikroereinek endotéliumában található sejtekhez.



**18. ábra** Az NSC57969 MDR-szelektív vegyület nem csökkenti a Pgp expressziót a vér-agy gát endotéliumát modellező hCMEC/D3 sejtvonalban. A kezdetben jelentős Pgp expressziót mutató hCMEC/D3 sejtek (A) az NSC57969 kezelés hatására sem veszítenek a calcein efflux kapacitásukból (B). A szürke hisztogramok a Pgp gátlószer verapamil jelenlétében mért calcein akkumulációt mutatják. (Füredi et al, Molecular Cancer Therapeutics, 2016)

A tumor sejteken kapott eredményekkel szemben a hCMEC/D3 sejtek magas Pgp expressziója nem csökkent az NSC57969 kezelést követően. Ez az eredmény arra utal, hogy a normál szövetekben található Pgp szintek nem érzékenyítik szelektíven az egészséges sejteket az MDR-szelektív vegyületekkel szemben, ehhez a malignus transzformáció során elért Pgp mennyiségre és rapid osztódási képességre van szükség.

### 5.3 A PLD hatásának vizsgálata szenzitív és rezisztens in vitro és allograft modelleken

Ugyan az MDR-szelektív vegyületek ígéretes lehetőséget jelentenek a rezisztens tumorok kezelésére, klinikai alkalmazásuk még távoli cél. Ezzel szemben ismert, széleskörben használt hatóanyagok módosított formulációi segíthetnek a multidrog rezisztens daganatok leküzdésében, úgy, hogy célzottan növelik a molekula intracelluláris koncentrációját, keringési idejét vagy meggátolják az efflux transzporterek általi felismerésüket.

### 5.3.1 A doxorubicin nagyobb toxicitást mutat, mint a PLD egy humán emlő tumor sejtvonal panelen

Tekintve, hogy a doxorubicint (DOX) és a ciszplatint (CDDP) széles körben alkalmazzák az emlő daganatok különböző stádiumaiban, a PLD toxicitását ezekhez a vegyületekhez hasonlítva vizsgáltuk az NCI60 sejtvonal panel emlő tumor sejtjein. A hat elérhető sejtvonalon (BT-549, Hs578T, MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF-7, T47D) tesztelve, a DOX kezelés magas toxicitást mutatott, míg a PLD dózis-hatás görbéiből számolt IC50 értékei átlagosan 45-ször bizonyultak magasabbnak (2. táblázat), ami azt jelenti, hogy a PLD jóval magasabb hatóanyag koncentrációban éri el ugyanazt a hatást, amit a DOX.

	IC50 (µM)*				
	DOX	DOX + TQ	PLD	PLD + TQ	Ciszplatin
<b>BT-549</b>	0.02	-	1.68	-	7.62
<b>Hs578T</b>	0.08	-	5.65	-	16.93
<b>MDA-MB-231</b>	0.01	-	0.59	-	6.42
<b>MCF-7</b>	0.13	-	3.63	-	48.75
<b>T47D</b>	0.03	-	1.21	-	10.79
<b>MDA-MB-468</b>	0.02	-	0.49	-	0.71
<b>A431</b>	0.39	-	12.4	-	19.5
<b>A431-B1</b>	8.52	0.32	>250	7.14	23.1
<b>MES-SA</b>	0.072	-	4	-	7.58
<b>MES-SA/Dx5</b>	2.88	0.02	>250	0.1	12.52
<b>P388</b>	0.00015	-	0.00075	-	0.61
<b>P388/ADR</b>	2.038	0.00069	10.19	0.0023	1.18

\*Legalább három ismételt kísérletből számolva.

#### 2. Táblázat: A DOX, PLD és CDDP toxicitásának vizsgálata egy válogatott sejtvonal panelen.

A feltételezés az, hogy a speciális formulációja miatt, a PLD-nek több időre van szüksége, hogy a szabad DOX-hoz hasonló toxikus koncentrációt elérje a sejt kultúrákon, de a 72, illetve 120 órás kezeléseket után mért viabilitási eredmények nem mutattak PLD specifikus toxicitás növekedést, a DOX és a CDDP IC50 értékei is csökkentek a kezelési idő növelésével (*nem közölt eredmények*). Annak ellenére, hogy ebben a panelben nincs valós Brcal1-negatív vagy -mutáns sejtvonal [153], az MDA-MB-468 sejtek viszonylagosan magasabb érzékenységet mutattak mind a ciszplatinra, mind a PLD-re, ami magyarázható azzal, hogy ez a sejtvonal a PTEN gén kiesése miatt csökkent DNS javítási képességekkel és magas fokú, DNS kettős törésekkel szembeni szenzitivitással rendelkezik [154].

### 5.3.2 A P-glikoprotein expresszáló sejtvonalak teljes rezisztenciát mutatnak a PLD-re

A hatékony DOX kezelés leggyakoribb korlátja a drog rezisztencia kialakulása, ami a vegyület Pgp általi aktív kipumpálása miatt történik. Ez a jelenség könnyen modellezhető olyan sejtvonal párok használatával, melyek egyik párja folyamatos drog szelekció vagy külső génbevitel következményeként magasan túlexpresszálja ezt a fehérjét. Ilyen sejt-párok használatával vizsgáltam, hogy a tumor sejtek képesek-e leküzdeni a PLD kezelést. Meglepő módon a Pgp expresszáló sejtek elpusztíthatatlannak mutatkoztak a PLD-vel szemben és még 250  $\mu\text{M}$ -os koncentrációnál is életképesek maradtak (2. táblázat). Ez a feltűnő rezisztencia független volt a stabil Pgp expresszió előidézésének módjától, mivel mind a transzfekcióval (A431-B1), mind a DOX szelekcióval (MES-SA/Dx5, P388/ADR) létrehozott sejtek hasonló mértékű rezisztenciát mutattak a PLD-re. Tekintve, hogy az emberi (A431-B1, MES-SA/Dx5) és az egér (P388/ADR) Pgp is megvédi a sejteket a PLD-től, a fehérje eredete szintén nem számít a PLD rezisztenciában. A jelenséget tovább vizsgálva a sejteket úgy kezeltük, hogy a DOX és PLD kezelésekk mellé tariquidart (TQ), egy ismert és széles körben alkalmazott Pgp gátlószert [108], adtunk. Amíg a PLD magában hatástalan volt a már MDR sejteken, addig TQ-val kombinációban alkalmazva a Pgp-pozitív és -negatív sejtek közötti PLD érzékenységbeli különbség eltűnt, ami arra utal, hogy a Pgp funkciója önmagában elég arra, hogy teljes rezisztenciát alakítson ki a PLD-vel szemben. A vad típusú ABCG2, egy másik részletesen karakterizált MDR fehérje, azonban semmilyen hatással nem volt a PLD hatékonyságára (3. táblázat).

	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )		
	DOX	DOX + TQ	PLD
A431	0,33	-	12,30
A431-G2	0,25	-	10,98

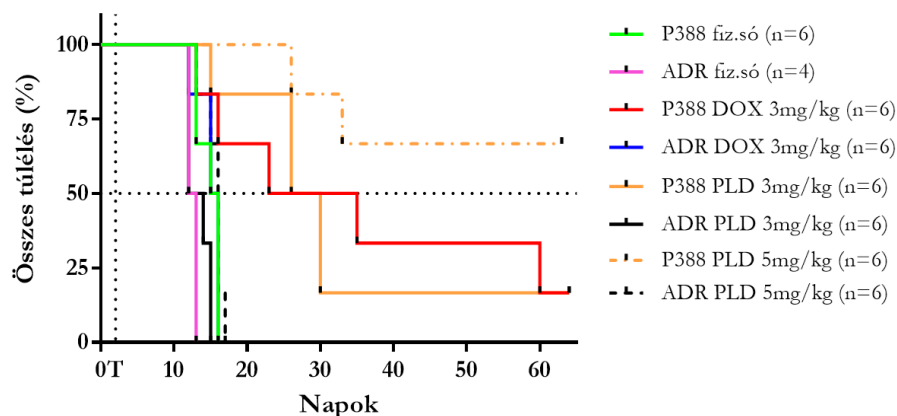
**3. táblázat Az ABCG2 transzporter fehérje hatása a DOX és PLD toxicitására.** Az IC<sub>50</sub> értékeket legalább három ismételt kísérletből számítottuk ki.

Mivel a CDDP sem a Pgp-nek, sem az ABCG2-nek nem szubsztrátja, így ez a vegyület hatékonynak bizonyult a panel összes sejtjén.

### 5.3.3 A PLD hatástalan egy Pgp túlexpresszázó egér B-sejtes leukémia allograft modellben

Ugyan az *in vitro* eredmények bizonyították a Pgp szerepét a PLD szembeni rezisztenciában, azonban a sejtvonal modellek nem képesek a klinikai körülmények között jelentkező MDR pontos leképezésére. Ez többek között annak is köszönhető, hogy a sejt kultúrákból hiányzik a tumor sejtek és a mikro környezet közötti együttműködés, ami egy *in vitro* körülmények között modellezhetetlenül bonyolult rendszert épít fel [101]. Ahhoz, hogy felfedjük, vajon a Pgp egy *in vivo* tumor modellben is védelmet nyújt-e a PLD kezelés ellen, ascitesz képző allograft daganatokat hoztunk létre P388 és P388/ADR sejtekből BDF1 egerekben. A sejtek hasüregbe oltását követő második napon kezdtük el a doxorubicin (3 mg/kg ip), a PLD (3 mg/kg ip) és a fiziológiás sóoldat (placebo kontroll) kezeléseket, de amíg ez a koncentráció a DOX esetében a maximálisan tolerálható dózissal (MTD) bizonyult, addig a PLD kedvező farmakológiai tulajdonságai miatt tesztelni tudtuk az 5 mg/kg-os dózist is, ezzel vizsgálva a kezelés hatékonyságának dózis-függését (19. ábra).

A fiziológiás sóoldat, doxorubicin (3 mg/kg) és PLD (3 and 5 mg/kg) kezelt csoportok túlélése



**19. ábra** A DOX és PLD kezelések hatástalanok egy Pgp túlexpresszázó egér ascitesz leukémia modellben. A drog-naiv P388 és drog rezisztens P388/ADR sejteket hordozó állatokat fiziológiás sóoldattal (fiz.só, zöld és rózsaszín), 3mg/kg doxorubicinnel (piros és kék) vagy PLD-vel (narancs és fekete), illetve 5 mg/kg PLD-vel (szaggatott narancs és fekete) kezeltem. A fekete pöttyözött vonal a második napon (T) jelzi az egyetlen kezelési idejét.

A P388 tumorok megfelelően reagáltak a DOX és PLD kezelésekre és 29 (DOX), 28 (3 mg/kg PLD), illetve >63 (5 mg/kg PLD) napos medián túlélést mutattak a fiziológiás

sóoldattal kezelt csoport 15.5 napos túlélésével szemben. Ezzel ellentétben a drog rezisztens P388/ADR tumorokkal oltott állatok esetében semmilyen túlélési előnyt nem jelentett egyik kezelés sem, míg a kontroll csoport medián túlélése 15.5 nap volt, addig a DOX kezelt csoport medián túlélése 12.5, a PLD (3 mg/kg) 13, a PLD (5 mg/kg) pedig 16 nap volt. Ez a 63 napos megfigyelési periódus bizonyította, hogy a Pgp-pozitív tumorok DOX és PLD kezelése nem hatásos, de a kezelést még nem kapott P388 daganatok esetében jelentős túlélés növekedés érhető el, sőt a PLD kezelés erős dózisfüggést mutatott.

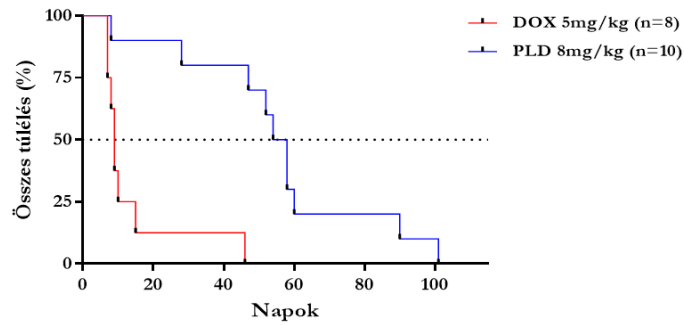
## 5.4 A PLD terápiás hatásának vizsgálata egy klinikailag releváns egér emlő tumor modellen

### 5.4.1 A PLD kezelés meglepően hatékony egy *Brcal<sup>-/-</sup>;p53<sup>-/-</sup>* genetikailag módosított egér emlő tumor modellben

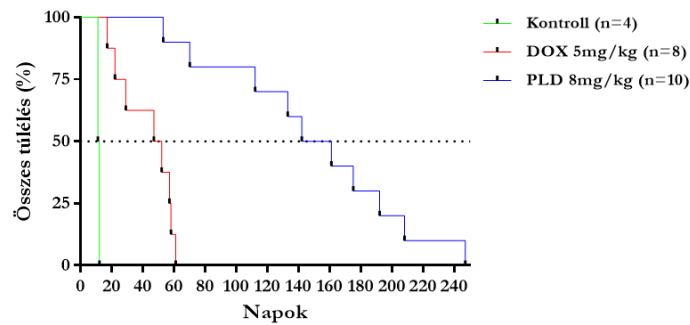
A multidrog rezisztencia evolúciója egy többlépcsős folyamat, ami több különböző jelátviteli útvonalat és fehérjét érint. A tumorok komplex természetét modellezendő a PLD kezelést kipróbáltuk egy klinikailag releváns, örökletes egér emlő daganat modellben is [122]. Ebben a modellben invazív duktális karcinóma (IDK) fejlődik a *Brcal<sup>-/-</sup>;p53<sup>-/-</sup>* deléciókat hordozó állatok nagy részében és ezek a tumorok jelentős mértékben mutatják az emberi IDK molekuláris, patológiai és immunhisztokémiai karakterisztikáját. Ezeket a tumorokat MTD (maximális tolerálható dózis) doxorubicinnal kezelve gyorsan, a legtöbb esetben Pgp-mediált, rezisztencia alakítható ki [123]. A PLD MTD-t egészséges FVB egerek kezelés hatására bekövetkező testtömeg csökkenéséből határoztuk meg és ezt az MTD-t használtuk az összes későbbi kísérletben. A tény, miszerint a PLD sokkal kedvezőbb farmakológiai profillal és kevésbé súlyos mellékhatásokkal rendelkezik, mint a DOX széles körben elismert az irodalomban és az orvosi gyakorlatban ([155]; [156]), így magasabb MTD-t találni hozzá nem volt váratlan (5 mg/kg DOX és 8 mg/kg PLD). Annak ellenére, hogy a két kezelőszer hatóanyag megegyezik, meglepő módon a tumorok által a kezelésre adott válaszok nagyon eltérőek voltak, a relapszus-mentes túlélés szignifikánsan hosszabb volt a PLD kezelt csoportban, mint a DOX kezelés esetén (9 vs 56 nap, 20. ábra A), és a teljes, medián túlélés is jelentősen hosszabbnak bizonyult a PLD kezelést kapott csoportban (20. ábra B).



A doxorubicin (5 mg/kg) és PLD (8 mg/kg) kezelt csoportok relapszus-mentes túlélése



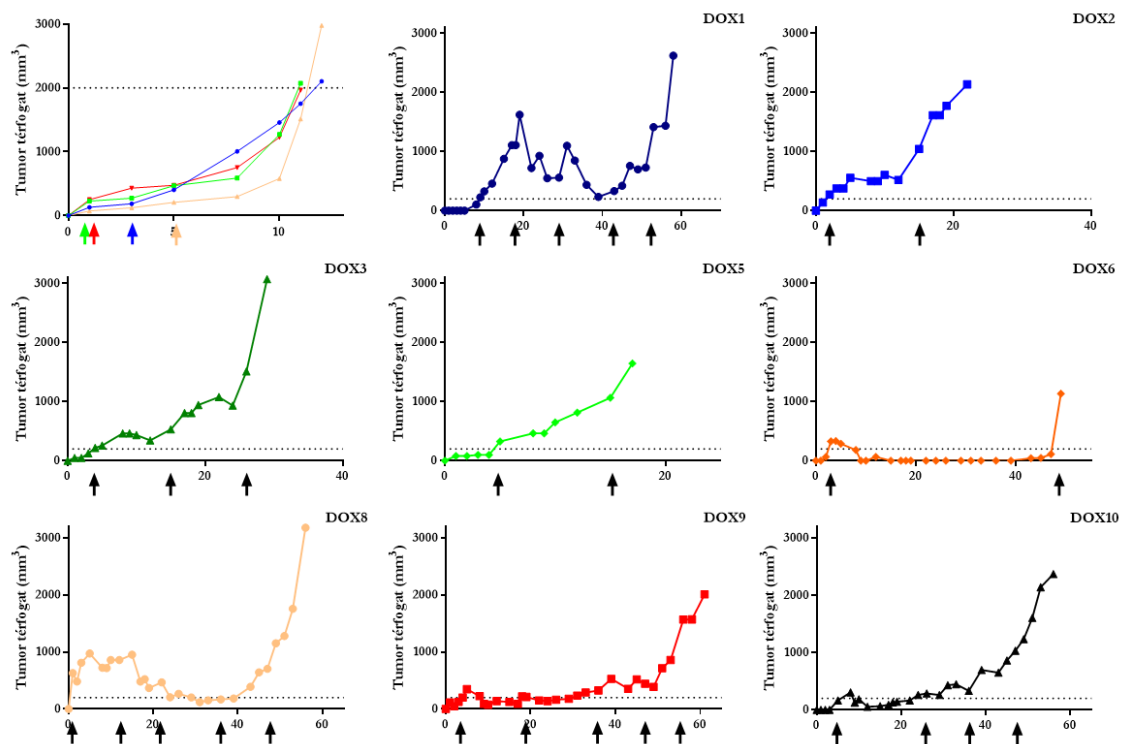
A fiz.só, doxorubicin (5 mg/kg) és PLD (8 mg/kg) kezelt csoportok túlélése



**20. ábra** A PLD növeli a relapszus mentes és a teljes túlélést egy klinikailag is releváns egér emlő tumor modellben. **A.** A DOX (5 mg/kg iv) és PLD (8 mg/kg iv) kezelt csoportok relapszus-mentes túlélése. **B.** A fiziológiás sóoldat, a DOX és a PLD kezelt csoportok teljes túlélése.

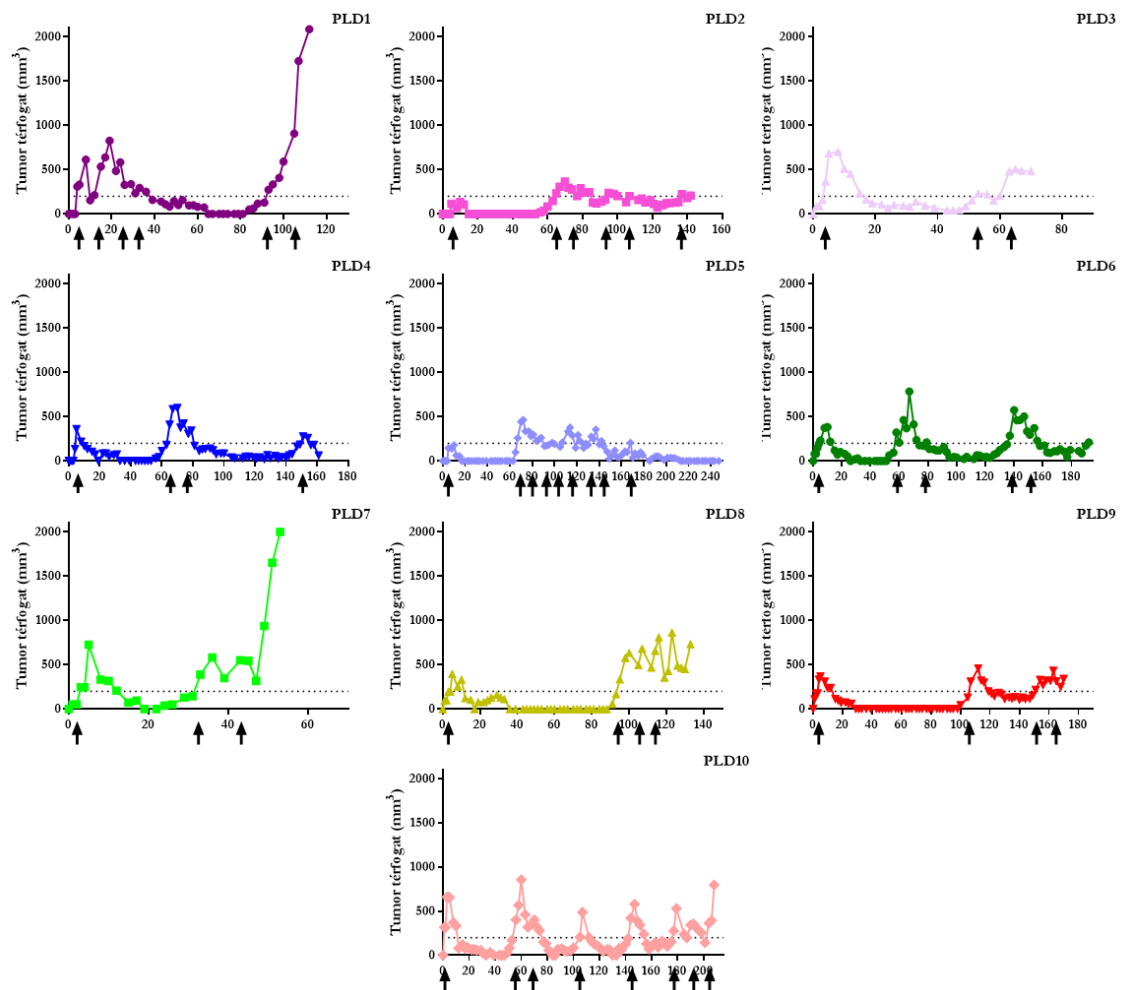
A DOX hatékonyan megnövelte a túlélést a fiziológiás sóoldat-csoportéhoz képest (medián túlélés 11.5 vs 49.5 nap), de a PLD kezelt csoport medián túlélését 151.5 napban állapítottuk meg, míg a csoportban a leghosszabb individuális túlélés 247 nap volt.

A két csoport egyes tumorjainak növekedési kinetikájának vizsgálata alapvető különbségekre világított rá a DOX és PLD kezelésekre adott válaszok között (21. ábra C és D).



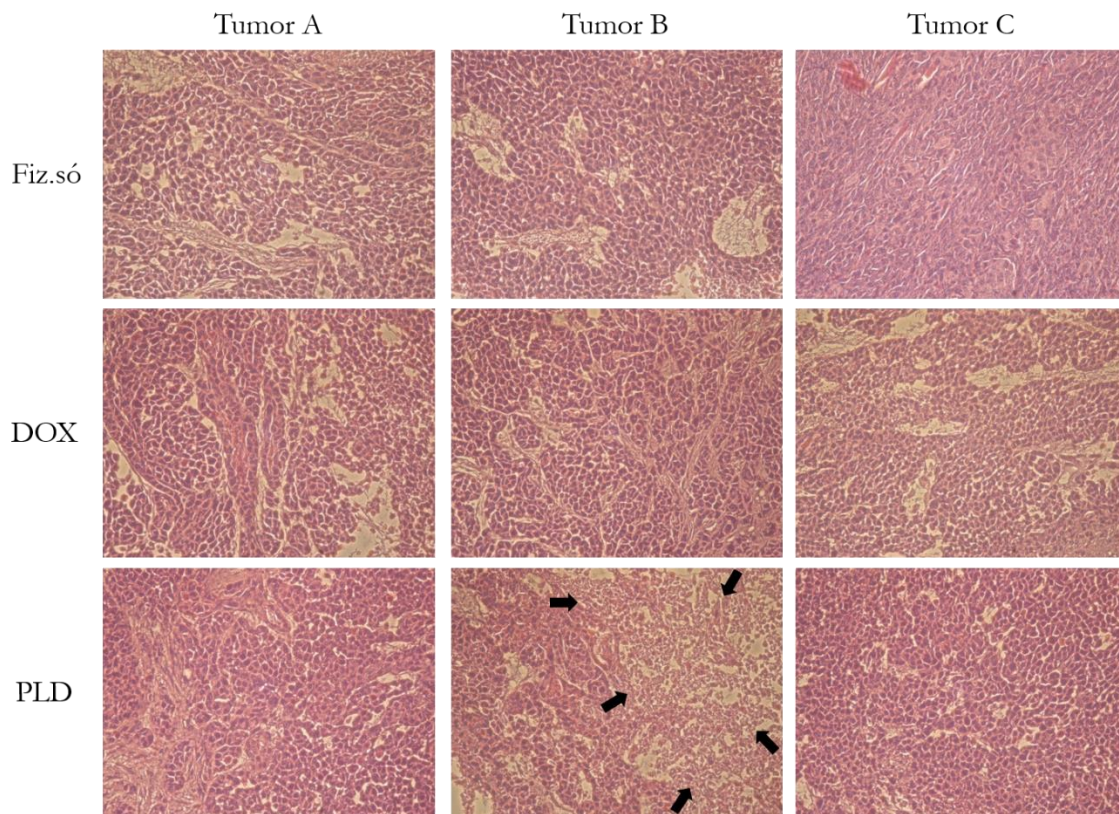
**21. ábra** A DOX kezelés képes a tumor térfogat kezdeti kontrollálására, de a rezisztencia kialakulását követően hatástalanná válik. A fiziológias sóoldat (bal felső panel), a DOX (DOX1-10) kezelt individuális tumorok növekedési kinetikája. A nyilak a fiziológias sóoldat (színes nyilak, bal felső panel) vagy a doxorubicin (fekete nyilak) kezeléseket jelölik.

A fiziológias sóoldattal történő kezelés nem volt képes befolyásolni a tumorok növekedését és a csoport állatait végül eutanáziában kellett részesíteni, mivel a tumorok térfogata 12 nap alatt elérte a  $\sim 2000 \text{ mm}^3$ -es határt (21. ábra, bal felső panel). Ezzel ellentétben a DOX kezelés sikeresen kontrollálta a tumorok méretét a legtöbb esetben, de végül a kialakuló drog rezisztencia a terápia hatékonyságának csökkenéséhez vagy megszűnéséhez vezetett a csoport összes tagjában 60 nap alatt (21. ábra). Összességében a doxorubicin kezelés a rezisztencia gyors kialakulását okozta minden tumorban, ami szignifikánsan megrövidítette a csoport relapszus-mentes és teljes túlélését is. Érdekes módon azonban a PLD kezelés csak két tumorban vezetett teljes (PLD1 és 7), illetve háromban részleges (PLD3, 8 és 10) rezisztenciához, a többi daganatot (PLD2, 4, 5, 6 és 9) ez a terápia hatékonyan visszaszorította (22. ábra).



**22. ábra** A PLD kezelés hatékony és kevés esetben vezet a rezisztencia kialakulásához. A PLD (PLD1-10) kezelt individuális tumorok növekedési kinetikája. A nyilak a kezeléseket jelölik.

A három csoport tumorjaiból készített metszetek immunhisztokémiai analízise (23. ábra) nem tárt fel jelentős morfológiai vagy strukturális különbséget és a daganatot infiltráló immun sejtek mennyiségében sem mutatkozott eltérés, ami azt sugallja, hogy a különböző kezelések nem vezetnek megváltozott immun válaszhoz, ami esetleg befolyásolhatná a terápia kimenetelét.

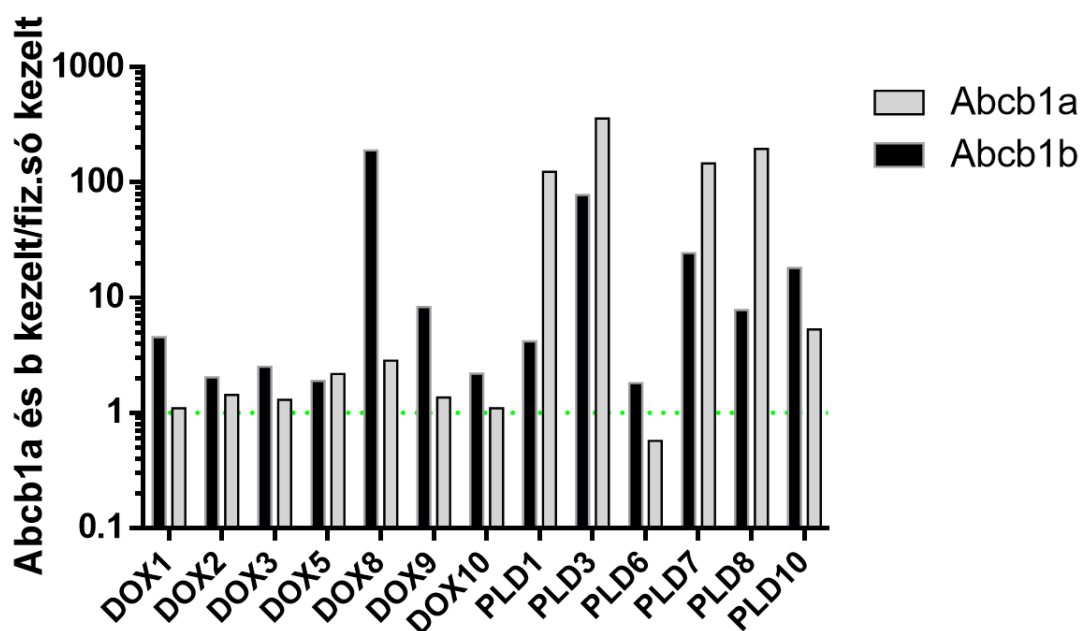


**23. ábra** A PLD kezelés nem okoz szignifikáns morfológiai és strukturális eltéréseket a többi fizioológias sóoldat és a DOX kezelésekhöz képest. A kezelési csoportokból véletlenszerűen kiválasztott, három különböző tumor, reprezentatív hematoxilin és eozin festett metszetének morfológiai összehasonlítása. A fekete nyilak az egyik PLD kezelt tumorban talált nekrotikus területet mutatják.

Ellenben a PLD kezelt tumorokban gyakran fordultak elő nagy kiterjedésű nekrotikus területek, mint ahogy az látható a B tumor esetében. A szignifikánsan nagyobb terápiás válasz, a hosszabb relapszus-mentes és teljes túlélés ellenére a PLD csoport állatait nem lehetett teljesen meggyógyítani vagy a tumorukat teljesen elpusztítani és végül a kezelt egereket is fel kellett áldozni a mellékhatások miatt. A PLD egyik legsúlyosabb mellékhatása a klinikai gyakorlatban tapasztalt ún. kéz-láb szindróma (palmar-plantar erythrodysesthesia, [157]), egy dermatológiai toxikus reakció a pegilált liposzómákra, amely a legsúlyosabb esetekben kiütések és fekélyek kialakulásához vezet a betegek testén. A kísérletekben is a fekélyek megjelenése, nem pedig a tumorméret volt az indikáció az állatok feláldozására.

#### 5.4.2 A drog rezisztens tumorok fokozottan expresszálják az egerekben P-glikoprotein fehérjét kódoló *Abcb1a* és *b* géneket

Ahogy korábban az már bemutatásra került (2. táblázat), a Pgp túlexpresszálása rezisztenssé tette a rosszindulatú sejteket a PLD-vel szemben. Ismert, hogy a Brca1-függő emlő tumor modell DOX kezelése a legtöbb esetben megemeli az *Abcb1a* és *b* gének expresszióját [123]. Ezzel megegyezően én is az alap expressziónál magasabb mRNS szinteket mértünk a DOX kezelt állatokból származó tumorokon (24. ábra). A fiziológiás sóoldattal kezelt csoporthoz képest, a DOX-rezisztens tumorok legalább kétszer magasabb *Abcb1a* és *b* szinteket mutattak, azonban azok a tumorok, amelyek teljesen (PLD1 és 7) vagy részlegesen (PLD3, 8 és 10) rezisztenssé váltak a PLD kezeléssel szemben különösen nagy mennyiségben (néha 100-szor nagyobb mértékben, mint a DOX-rezisztens tumorok) expresszálták az *Abcb1a* és *b* géneket.



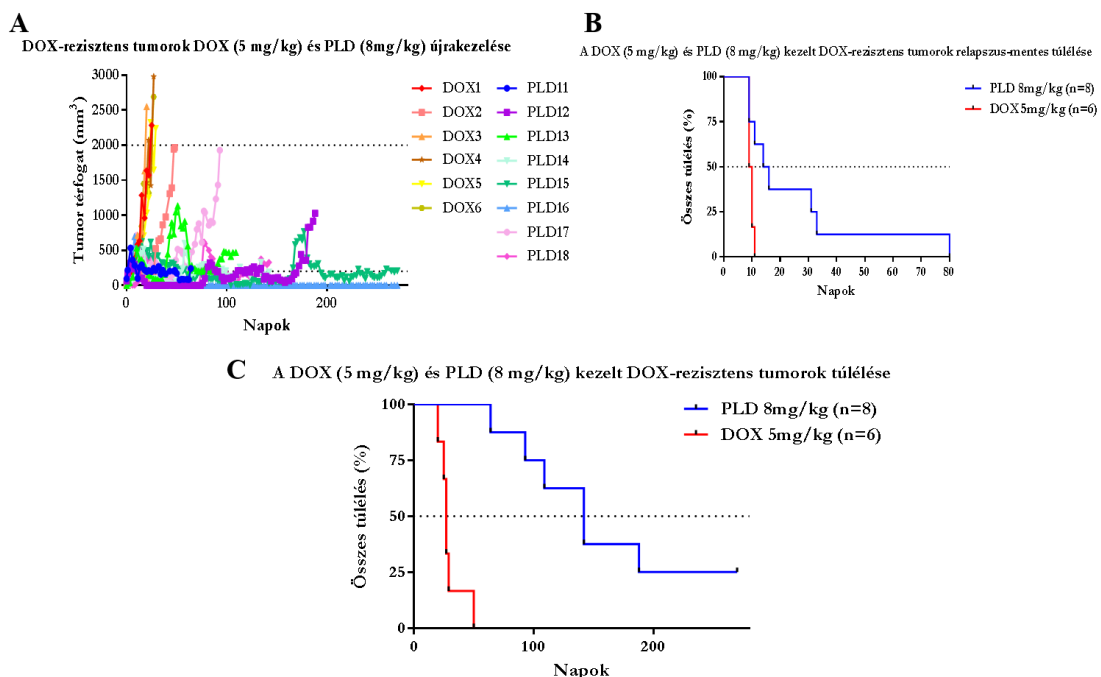
24. ábra A PLD kezelésre már nem érzékeny tumorok *Abcb1a* és *b* expressziója jelentősen meghaladja a DOX-rezisztens daganatokban talált mRNS szinteket. Az *Abcb1a* és *b* gének mRNS expressziójának változása a fiziológiás sóoldattal kezelt csoport átlagos expressziójához viszonyítva. A szaggatott zöld vonal a fiziológiás sóoldatot kapott tumorok átlagos expresszióját mutatja.

A doxorubicin terápián átesett csoportból egyedül a DOX8 *Abcb1b* expressziója volt összevethető a PLD kezelt tumorokban talált szintekkel. Ugyancsak érdekes, hogy összehasonlítva a DOX1, 3, 8, 9 és 10, valamint a PLD1, 3, 7, 8 és 10 daganatokat egy

különleges mintázat rajzolódik ki az *Abcb1* gén expressziókból: míg a DOX-rezisztens tumorok főleg az *Abcb1b* gént fejezik ki, addig a PLD-rezisztensek mind az *Abcb1a*, mind az *Abcb1b* mRNS szintekben túlexpressziót mutatnak. A PLD2, 4, 5 és 9 tumorokból nem tudtunk mintát venni, mert a daganatok túl kicsik voltak az állatok halálakor.

#### 5.4.3 A DOX kezelés során drog rezisztenssé vált tumorok érzékenyek a PLD-re

A DOX és PLD kezelt csoportok Pgp mRNS szintjeiben látott különbségek arra engedtek következtetni, hogy a DOX kezelés során, a terápia hatékonyságának nagyfokú csökkenéséhez vezető Pgp expresszió megjelenése valószínűleg nem elég a PLD rezisztencia kialakításához. Ahhoz, hogy ezt az elméletet bizonyítani lehessen, korábban már rezisztenssé vált DOX kezelt tumorokból származó darabokat ültettünk át vad típusú FVB egerekbe és PLD-vel kezeltük őket. A korábban meghatározott 8 mg/kg dózist alkalmazva az eredetileg DOX-rezisztens tumorok 100%-a jól reagált a PLD kezelésre, míg az újraindított 5 mg/kg-os DOX terápia nem változtatott jelentősen a betegség lefolyásán és a daganatok mérete gyorsan elérte a ~2000 mm<sup>3</sup> limitet (25. ábra A). A legfontosabb különbség a drog-naiv és DOX-rezisztens tumorok esetén alkalmazott PLD terápiákra adott válaszokban az első kezelést követő relapszus-mentes szakasz hosszában mutatkozott meg (25. ábra B).

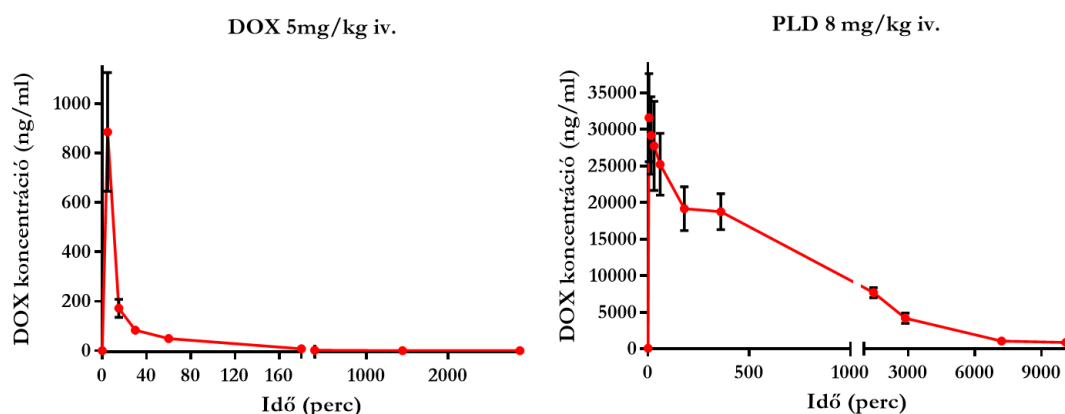


**25. ábra** A DOX-rezisztens tumorok PLD kezelése meglepően hatékony stratégia, amely felülkerekedik a korábban kialakult rezisztencián. **A.** 6 darab DOX (5 mg/kg iv.) kezelt és 8 darab PLD (8 mg/kg iv.) kezelt DOX-rezisztens tumor növekedési kinetikája. Tekintve, hogy minden egyes daganatot individuálisan, saját protokoll szerint kezeltünk, az egyes kezelések nincsenek feltüntetve az ábrán. **B.** A DOX és PLD kezelt DOX-rezisztens tumorokat hordozó egér csoportok relapszus-mentes túlélése. **C.** A teljes túlélés a DOX és PLD kezelt DOX-rezisztens tumorok esetében.

Ahogy azt korábban bemutatásra került (20. ábra A), az előzőleg nem kezelt tumorok PLD kezelése 56 napos medián relapszus-mentes túlélés eléréséhez vezetett, miközben a már kialakult DOX-rezisztenciával rendelkező daganatok relapszus-mentes periódusa csupán 15 nap volt. A DOX-rezisztens tumorok DOX kezelése jelentősen rövidebb túlélést eredményezett a csoportban, mint a drog-naiv daganatok esetén (27 vs 49.6 nap, 20. B és 25. C ábrák), azonban a PLD terápia sikeresnek bizonyult mind a DOX-érzékeny, mind a DOX-rezisztens tumorokban. A kísérlet végén 142 napos medián túlélést találtunk a PLD kezelt DOX-rezisztens daganatot hordozó állatok csoportjában, ami összevethető volt a kezelést korábban nem kapott tumorok PLD terápiája során kapott eredményekkel (142 vs 151.5 nap, 20. B és 25. C ábrák).

#### 5.4.4 A PLD kiemelkedő hatékonysága a DOX-hoz képest megmagyarázható a két vegyület eltérő farmakokinetikai tulajdonságaival

Mivel a PLD csupán a DOX egy speciálisan formulált változata, magyarázatra szorulnak a hatékonyságban és a drog rezisztencia szempontjából tapasztalt jelentős különbségek, amihez az MTA TTK MS Metabolomika Kutatócsoport segítségével megmértük a szabad doxorubicin koncentrációját a DOX és PLD kezelt egerek vérében (26. ábra).



**26. ábra** A DOX és PLD farmakokinetikája jelentős eltérést mutat. A kezeléseket követő szabad doxorubicin koncentráció változásának követése tömegspektrometriával egerek véréből különböző időpontokban.

Az összességében 60%-kal magasabb doxorubicin dózis (5 vs 8 mg/kg) a PLD kezelt állatokban 35-ször magasabb maximális csúcs koncentrációt ( $885.67 \pm 240$  vs  $31600 \pm 6023$  ng/ $\mu$ l) eredményezett 5 perccel a beadást követően, és míg a DOX vérben mért szintje gyorsan csökkenni kezdett, addig a PLD kezelt egerek vérében még 7 napot követően is olyan magas koncentrációt lehetett mérni, amely összevethető volt a DOX maximális csúcs koncentrációjával a beadást követően. A PLD AUC értéke („Area Under the Curve”, a szervezetet érő teljes hatóanyag mennyiség egy kezelés alatt) közel 2600-szor (!) magasabb volt, mint a DOX beadást követően ( $4.47 \times 10^7$  vs  $1.7 \times 10^4$  ng\timesh/ml). A nagyon magas koncentráció és hosszú keringési idő ellenére az állatok nem mutatták jelét fájdalomnak, súlyos mellékhatásnak vagy súlyvesztésnek.



5.4.5 A BRCA1-kiütött sejtek kismértékben, de szignifikánsan érzékenyebbek a DOX, a PLD és egyéb topoizomeráz II gátló kezelésekre, mint a vad típusú sejtvonalak

Ahhoz, hogy tovább vizsgáljuk a PLD váratlan hatékonyságának hátterében megbúvó mechanizmusokat, megnéztük, hogy vajon a BRCA1 funkciójának kiesése hozzájárul-e a PLD-vel szembeni érzékenységhez, illetve más kezelőszerekkel szemben mutatott citotoxicitási reakciókhoz (4. táblázat).

Hatásmechanizmus	Vegyület	WT	BRCA1-/-	Szelektivitás
PARP-gátló	Olaparib	3080	30	104.1**
topoizomeráz II gátló	PLD	229.4	82.9	2.8**
	Doxorubicin	8.45	2.57	3.3**
	Daunorubicin	4.68	2.51	1.9*
	Etoposide	51.0	29.3	1.7*
topoizomeráz I gátló	SN-38	4.60	0.49	9.4**
antimetabolit	5-FU	2.86	2.98	0.96
mikrotubulus-stabilizáló	Paclitaxel	384.5	448.2	0.86

4. táblázat A BRCA1 funkciójának kiesése fokozott DOX és PLD érzékenységhez vezet. A doxorubicin, a PLD és az olaparib IC<sub>50</sub> értékei vad típusú és BRCA1-kiütött DT40 sejteken mérve. Az eredmények három ismételt kísérletből nyert adatok átlagát és szórását mutatják. (A méréseket és az ábrát Tóth Szilárd készítette.)

Nyolc különböző kemoterápiás vegyületet teszteltünk, amelyek hatásuk szerint 5 csoportba sorolhatóak: PARP-gátlók (olaparib), Topoizomeráz I (SN-38) és II (DOX, PLD, daunorubicin, etoposide) gátlószerek, antimetabolitok (5-fluorouracil) és mikrotubulus-stabilizáló ágensek (paclitaxel). A BRCA1-kiütött DT40 sejtek 3.3 és 2.1 szelektivitási hányadost (IC<sub>50</sub><sub>WT</sub>/IC<sub>50</sub><sub>KO</sub>) mutattak a DOX és PLD kezelésekre, míg a célzottan BRCA1-negatív sejteket elpusztító olaparib 87-szer volt toxikusabb a BRCA1-hiányos sejtekre. Az olaparib mellett a topoizomeráz I gátlószerek is szelektíven toxikusak a BRCA1-negatív sejtekre (9-szeres szelektivitás), azonban, meglepő módon, a topoizomeráz II inhibitorok is szelektívnek mutatkoztak ezeken a sejteken. Ugyan nem rendelkeztek olyan magas szelektivitással, mint a PARP-, illetve Topo I gátlószerek, de

ez az eredmény azt sugallja, hogy a DOX és a PLD kezelésekre érzékenyebbek lehetnek azok a sejtek, amelyekben a BRCA1 fehérje kiesése miatt sérült a DNS-javító képesség.

## 6. Megbeszélés

Annak ellenére, hogy még mindig heves vita övezi a multidrog transzporterek klinikai rezisztencia kialakulásában betöltött szerepét, széles körben elfogadott, hogy az ABC transzporterek túlexpresszálnak az emberi tumorok 50%-ban a kezelés valamely stádiumában [158]. A drog rezisztencia problémáját tovább súlyosbítja, hogy míg jelentőségét a daganatok kezelésében és a rákos megbetegedések okozta halálozási statisztikákban pontosan ismerjük, terápiás megoldás még nem született a multidrog rezisztens daganatok leküzdésére [159].

A rosszindulatú daganatos betegek halálát legtöbb esetben a távoli áttétek terápia rezisztenciája okozza. Ebben az esetben, a kezdetben igen hatékony kezeléssel már nem érhetőek el sikerek a primer daganattól távol kialakult metasztázisoknál. Gyakran előfordul, hogy a tumor sejtek rezisztenciát fejlesztenek ki, nem csak a kezdetben alkalmazott kezeléssel szemben, de más strukturálisan és hatásmechanizmusban eltérő vegyületekkel szemben is [160]. Az új célzott vagy biológiai terápiás molekulák és antitestek megjelenésével (pl. EGFR-gátlószer) a betegek túlélése ugyan jelentősen meghosszabbodott [161], de a rezisztencia problémáját ezekkel sem sikerült leküzdeni, a daganatok rendre rezisztenssé válnak ([162],[163]).

A fentebb bemutatott sejtes és *in vivo* modell-rendszerekkel bizonyítható, hogy a doxorubicinra adott terápiás válasz a P-glikoprotein kifejeződésének függvénye. *In vitro*, a Pgp-t expresszáló MES-SA/Dx5 sejtvonal több, mint 70-szer ellenállóbbnak bizonyult az eredeti, Pgp-t nem kifejező MES-SA sejtvonal párjánál, ami nem csak sejtkultúrákban mutatható ki, de elegendő ahhoz, hogy a xenograft modellekben alkalmazott doxorubicin kezelés is hatástalannak mutakozzon.

A xenograft tumor modellek ismert korlátja, hogy a klinikai daganatokhoz képest a kísérleti vegyületekre erőteljesebb választ adnak ([164],[165]). A mesterségesen létrehozott drog rezisztens (transzfektált vagy szelektált) sejtvonalak használatával kapcsolatban felmerülő probléma még az extrém magas P-glikoprotein expresszió és a rapid sejtosztódás. A transzgenikus, spontán kialakuló egér tumorok jobb modellként kínálnak a daganatos megbetegedések tanulmányozására ([166-170]). A Brca1- és p53-deletált, klinikailag releváns egér emlő karcinóma-modell nagy hasonlóságot mutat a nők örökletes Brca1-hiányos, tripla-negatív daganataihoz a kifejezett markerek, a

differenciáltság és a növekedési mintázat tekintetében [122]. Amint az a 4. és 5. ábrán is látható, a spontán tumorokat doxorubicinnal kezelve a daganat visszaszorítható és kontrollálható, de a kezdeti javulást rezisztencia váltja fel, amelyet a P-glikoprotein fokozott expressziója eredményez [123].

A kísérletek, melyek a P-glikoprotein kémiai gátlásán keresztül kívántak felülkerekedni a klinikai multidrog rezisztencián, elbuktak a nem várt toxicitás és a nem meggyőző erejű klinikai eredmények miatt ([84],[171],[85]). Az MDR sejtek kollaterális érzékenysége azt mutatja, hogy a gyógyszerekkel szembeni rezisztencia felfogható gyengeségként, ami új drogokkal akár célba is vehető. Ez a stratégia különbözik a transzporterek gátlásán alapuló megközelítésektől, amihez nélkülözhetetlen két vegyület, egy citosztatikum és egy gátlószer együttes adagolása ahhoz, hogy a rezisztens sejteket is elpusztíthassuk. Ezzel szemben az MDR-szelektív vegyületek hatékonysága növekszik, és nem csökken az MDR sejteken mérve. Az elképzelés, miszerint a funkcionális Pgp okozhat kollaterális érzékenységet, olyan korai tanulmányokból származik, amikben fokozott szenzitivitást mutattak ki MDR sejtvonalakon. Egy közelmúltban publikált összefoglaló közleményben összegezték azokat a véletlenszerűen azonosított vegyületeket, amelyek MDR-szelektív aktivitást mutattak [90]. A kalcium csatorna blokkoló verapamil szelektív toxicitása ([172],[173]), például megmagyarázható azzal, hogy a nagy affinitású Pgp szubsztrát a transzporter folyamatos működtetésével megnöveli az ATP felhasználást, ami végül végzetes energia hiányhoz vezet [174]. A verapamilhoz hasonlóan a dipeptid reversin121 is feltehetőleg hasonló módon képes a rezisztens sejtek célzott elpusztítására [175]. Az MDR sejtek ATP raktárainak célzott kimerítése azonban történhet úgy, hogy az adott vegyület nem lép direkt kapcsolatba a Pgp-vel, mint például a D-glükóz analóg 2-deoxy-D-glükóz (2-DG, [176]), a mitokondriális elektron transzportláncot gátló rotenone [174] és a felületaktív polimer Pluronic [177] esetében. Különösen a pluronic P85 nevű változatáról mutatták ki, hogy hatása függ a funkcionális Pgp jelenlététől több sejtvonalban is ([178],[179]). Ugyan a pontos mechanizmusra nem derült fény, de a szerzők hipotézise szerint a rotenone és a P85 szelektív toxicitása a mitokondriális enzimek célzott gátlásával magyarázható, ami ATP hiányhoz és oxidatív stresszhez vezet az MDR sejtekben [177]. Ezek a véletlenül talált, MDR-szelektívnek titulált vegyületek azonban vélhetően a legtöbb esetben inkább mutatkoznak sejtvonal-, mint MDR-specifikusnak. Az általunk felállított szűrőrendszeren

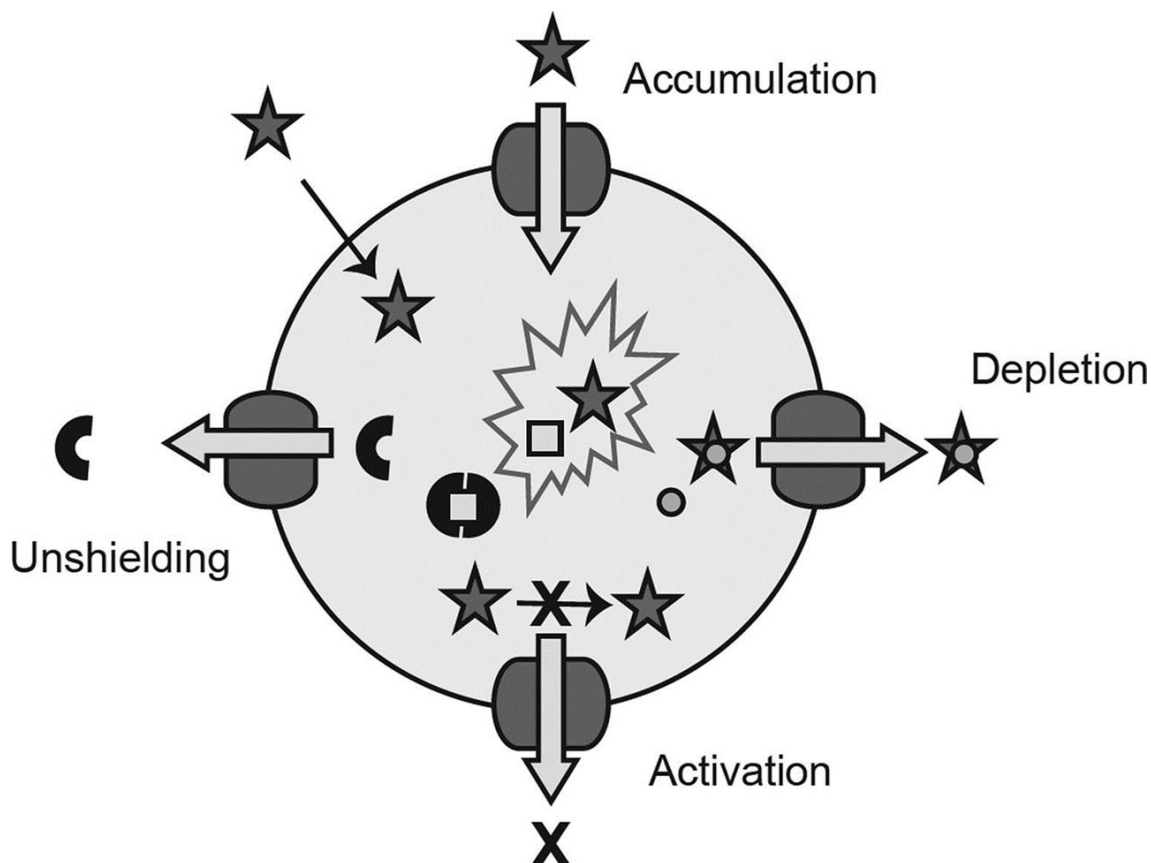
lefuttatva egyik molekula sem mutatott általános (minden Pgp<sup>+</sup> és Pgp<sup>-</sup> sejtvonal páron) szelektivitást a rezisztens sejtekkel szemben, ami arra utal, hogy ezek az anyagok inkább a felfedezésükhöz használt rezisztens sejtvonalban bekövetkezett individuális változást képesek kihasználni és nem egy általános tulajdonságra érzékenyek [93].

Míg a korai MDR-szelektív tulajdonságokkal rendelkező vegyületeket véletlenül találták, addig a dolgozatban vizsgált molekulák már egy célzott szűrőrendszer végeredményeként kerültek azonosításra. Az MDR-szelektív anyagoknak konzisztens módon toxikusnak kell lenniük a Pgp expresszáló sejtekre, függetlenül attól, hogy a fehérje fokozott kifejeződését kemoterápiás vegyületekkel történő kezeléssel vagy genetikai módosítással hozták létre. A korábban talált izatin- $\beta$ -tioszemikarbazon (TSC) és 1,10-fenantrolin (1,10-fen) alapvázak [92] mellett, a 8-hidroxikinolin (8OHQ) származékok is MDR-szelektív hatásúnak bizonyultak. A bemutatott vegyületek közül kiemelkedően hatékonyak mutatkoztak két 8OHQ vegyület is, az NSC57969 és az NSC297366 (1. táblázat). Ezek szelektivitási hányadosa 10-19 volt, ami azt jelenti, hogy a vegyületek 10-19-szer toxikusabbak voltak a rezisztens sejtekre, mint a Pgp-negatív parentális vonalakra. Ezek az eredmények bizonyították, hogy a 8OHQ alapváz ígéretes kiindulási szerkezet lehet az MDR-szelektív vegyületek tudatos tervezésének, így a derivátumok előállítása, tesztelése, valamint szerkezet-hatás összefüggésük vizsgálata jelenleg is zajlik.

Az MDR-szelektív vegyületek azonosítását követően tovább nőtt az érdeklődés ezen molekulák felé, mikor felfedezték, hogy a fehérje mennyisége egyenesen arányos a mutatott toxicitással és, hogy a rezisztens sejtek Pgp expressziója lecsökken, ha azokat hosszú ideig NSC73306 kezelésnek vetik alá [125]. Ez utóbbi kísérlet bemutatta, hogy az MDR-szelektív vegyületek szelekciós nyomása olyan erős, hogy képes az MDR fenotípus visszafordítására és a sejtek kemoterápiával szembeni újraérzékenyítésére, úgy, hogy kiirtja a Pgp expresszáló sejteket a kultúrából. Ehhez a sejteket hetekig, a sejtek viabilitását minimálisan csökkentő, alacsony koncentrációjú NSC73306 vegyület mellett tenyésztették. A P-glikoprotein expresszióval járó kollaterális érzékenység egyik lehetséges kihasználása az lenne, ha a multidrog rezisztenciát „visszafordíthatnánk” MDR-szelektív vegyületekkel történő kezelésekkel. Hogy elkerüljük a hosszas drog kezeléssel járó komplex változásokat, MES-SA/Dx5 sejteket egyetlen magas koncentrációjú MDR-szelektív molekulával kezeltük. Meglepő módon az új vegyületek

közül három (NSC57969, NSC297366, NSC608465), míg a korábban leírtak közül egy (1,10-fenantrolin) teljesen lecsökkentette a Pgp expressziót egyetlen nagy dózisú kezelést követően (12., 13. és 15. ábrák). Az MDR-szelektív vegyületek ilyen gyors és hatékony Pgp expresszió csökkentő hatásának felfedezése vezetett az „MDR-reversing 8-hydroxy-quinoline derivatives” című szabadalmi bejelentés benyújtásához is, aminek elbírálása jelenleg folyamatban van.

A funkcionális Pgp miatti fokozott érzékenység mechanizmusa még nem ismert. Tekintve, hogy az összes ígéretes MDR-szelektív vegyület fém kelátor, úgy tűnik, hogy a fém ionokkal történő interakciók nélkülözhetetlenek ennek a paradox hatásnak a kialakításában. Csoportunk egy nem rég megjelent összefoglaló közleményében felvázolt lehetséges magyarázatokat, amelyek választ adhatnak a lehetséges hatásmechanizmusok mibenlétére ([90]; 27. ábra). Lehetséges, hogy az MDR-szelektív vegyületek valamely módon feldúsulnak a rezisztens sejtekben („accumulation”), ami végül sejthalálhoz vezet. Ez logikus magyarázat lenne a tapasztalt hatásra, de a molekulák specifikus akkumulációjára az MDR sejtekben mindeddig még nem találtunk bizonyítékot. Egy másik mechanizmus lehetne, hogy a Pgp képes lehet az MDR-szelektív vegyületek egyébként rejtett („shielded”) molekuláris célpontjainak feltárására („unshielding”). Egy hasonló lehetőség szerint az MDR-szelektív vegyületek kizárólag az MDR sejtekben aktiválódnának („activation”), a Pgp funkciójával összefüggő metabolikus változásokkal összefüggésben. Elképzelhető az is, hogy az MDR-szelektív vegyületek képesek megkötni bizonyos anyagokat (pl. fém ionok, kismolekulák stb.), amelyekkel együtt komplexet alkotva már szubsztrátjai lehetnek a Pgp-nek és a folyamatos kiáramlás miatt a sejtekben hiány lép fel ezekből a célpontokból, ami végül apoptózishoz vezet („depletion”).



**27. ábra** Az MDR-szelektív vegyületek lehetséges hatásmechanizmusai. A Pgp működése elősegítheti az MDR-szelektív vegyületek feldúsulását („accumulation”), védtelenné teheti az MDR-szelektív vegyületek célpontjait („unshielding”), vagy éppen aktiválhatja azokat („activation”), végül depletálhatja a sejtek valamely kritikus endogén komponensét („depletion”). Átvéve Szakács et al, Chemical Reviews, 2014.

Mivel a fémkomplexek tumor ellenes hatása gyakran a redukciós-oxidációs (redox) körfolyamatokon alapszik, logikus magyarázatnak tűnik az is, hogy a multidrog rezisztens sejtek MDR-szelektív vegyületekkel szembeni járulékos érzékenysége mögött a daganat sejtek Pgp-hez köthető, fokozott reaktív oxigén gyökökkel (reactive oxygen species, ROS) szembeni érzékenysége áll ([174],[177]). Ennek a magyarázatnak egy komoly hiányossága, hogy a fém keláció ugyan szükséges, azonban nem elégséges feltétele az MDR-szelektív toxicitásnak, ahogy azt a 8OHQ alapvázsal történő kezelés is mutatja. A szerkezet rendelkezik kelátor tulajdonságokkal, azonban még sem mutat MDR-szelektív aktivitást.

A korrelációs eljárással azonosított MDR-szelektív vegyületek képesek voltak megfelelően kihasználni az egyértelműen Pgp expresszióval járó paradox

hiperérzékenységet. Az MDR sejtek járulékos érzékenységének felfedezése rámutatott arra, hogy a Pgp expresszáló tumor sejtek talán célzottan elpusztíthatóak. Azonban, ha ez az érzékenység in vitro artefaktumok eredménye, amelyek a sejttenyésztés során fellépő változásokból és az extrém magas Pgp expresszióból származnak, akkor nehezen elképzelhető, hogy az MDR-szelektív vegyületek koncepciója átvihető lenne a klinikai gyakorlatba. A problémát jól mutatja, hogy irodalomban leírt, véletlenszerűen talált MDR-szelektív vegyületek közül a saját szűrő rendszerünkben csak egyetlen egyet találtunk, amely valóban minden általunk megfogalmazott elvárást teljesített, aminek egy valódi MDR-szelektív vegyületnek meg kell felelnie [93]. E szerint az MDR-szelektív vegyületek nem lehetnek sejtvonal specifikusak, a Pgp-szelektív toxicitásuknak több, különböző sejtvonalon is igazolhatónak kell lennie, ráadásul függetlenül a Pgp túlexpresszió előidézésének módjától (szelekció vagy transzfekció). A Pgp-gátlószerek jelenlétében hatásuknak szignifikánsan csökkenie kell, bizonyítva, hogy a Pgp-funkciója szükséges és elégséges feltétele a citotoxicitásuknak. Fontos, hogy szelektivitásukat ne csak extrém P-glikoprotein expresszió esetén lehessen mérni, mert a klinikailag releváns transzporter szintek jelentősen alacsonyabbak a sejtvonalakban tapasztaltaknál. Emellett fontos bizonyítéka lehet az MDR-szelektív hatásnak, ha a Pgp-pozitív sejteket a vegyület jelenlétében tenyésztve, azok elveszítik a rezisztens fenotípusukat. Ez arra utal, hogy a sejtek a molekula szelektív nyomásának hatására annak a fehérjének az expresszióját csökkentik le, amelyen keresztül az adott kezelés megtámadja őket, így biztosítva saját túlélésüket.

Vannak vegyületek, amelyek csak nagyon magas Pgp expresszió esetén bizonyultak toxikusnak. Például a Dp44mT sejt-specifikus hatása magyarázható azzal, hogy a Pgp lizoszómális lokalizációja csak nagyon magas Pgp expressziónál jelentkezik. Ez fontos részlet, tekintve, hogy a klinikai rezisztenciát kialakító Pgp kifejeződés mértéke nagyságrendekkel kisebb, mint amit az MDR sejtvonalakban tapasztaltak ([180],[75]). Korábban a csoportunk is kimutatta, hogy széles spektrumban Pgp-t kifejező KB sejteken mérve az MDR-szelektív NSC73306 molekula toxicitása arányos az expresszió mértékével [125]. Ahhoz, hogy megbizonyosodjunk róla, az MDR-szelektív vegyületek képesek a Pgp-t klinikaihoz hasonló szinten kifejező tumor sejtek elpusztítására is, egy genetikailag módosított egér emlő tumort használtunk. Az irodalmi adatokkal teljes egyezésben azt találtuk, hogy a  $brca1^{-/-};p53^{-/-}$  háttérű, spontán kialakuló emlő daganatok



doxorubicin kezelése mérsékelt Pgp mRNS expresszióhoz vezetett ([124],[181]). Ezekből a tumorokból primer sejteket izolálva vizsgáltuk az MDR-szelektív vegyületek *in vitro* hatását alacsony (<10) passzázs számnál. Ebben a rendszerben vizsgálva, az NSC57969 MDR-szelektív molekula jelentősen csökkentette a primer emlő karcinóma sejtek calcein AM efflux kapacitását, ami azt mutatja, hogy ezek a vegyületek akár a klinikailag releváns Pgp szintekkel rendelkező tumor sejtek elpusztítására is képesek lehetnek.

Mivel az MDR-szelektív vegyületek nem gátolják a transzportereket, így jelentős hatásuk a drog abszorpcióra, metabolizmusra, kiválasztásra és toxicitásra (ADME-Tox) nem valószínű. Ennek ellenére, mivel sok normál testi sejt is jelentős mértékben expresszál P-glikoproteint, bizonyos szervek érintve lehetnek a kollaterális érzékenységet okozó toxicitásban. Ezt a hatást az emberi agyi mikroerek endotéliumából izolált, immortalizált hCMEC/D3 sejt vonal alkalmazásával teszteltük. Mivel ezek a sejtek nagymértékben expresszálják funkcionális Pgp-t ([151], 18. ábra), alkalmasak arra, hogy az MDR-szelektív vegyületek Pgp kifejeződés csökkentő hatását vizsgáljuk rajtuk. A magas Pgp expresszió ellenére a hCMEC/D3 sejt vonalon nem mértünk csökkenést a fehérje funkciójában, ami arra utalhat, hogy a vegyületeink főleg a rosszindulatú sejteken hatékonyak.

Ugyan az MDR-szelektív vegyületek koncepciója nagyon izgalmas és ígéretes, a fentebb leírt problémák miatt, ezeknek a vegyületeknek klinikumban való kipróbálása még várat magára, így a nagyon súlyos kihívást jelentő multidrog rezisztencia elleni küzdelemben más stratégiák kutatására is szükség van.

A pegilált liposzomális doxorubicin (PLD) kifejlesztése mögött álló indok egyértelműen az volt, hogy úgy csökkentsék a doxorubicin olyan komoly mellékhatásait, mint a kardiotoxicitás, hogy ezzel párhuzamosan megőrizzék a kezelés hatékonyságát [130]. Több klinikai tanulmány igazolta emlő daganatos betegek kezelése során, hogy míg a teljes toxicitás csökkent, addig a PLD a doxorubicinhoz hasonló sikereket ért el ([142],[155]). Ugyan hivatalosan a PLD három daganat típusra ajánlott (AIDS-hez köthető Kaposi-szarkóma, platinum terápia rezisztens petefészek tumor és myeloma multiplex), több beszámoló is igazolta, hogy használata kifizetődő előrehaladott metasztatikus és visszatérő emlő daganatoknál is ([182],[183]). Ennek ellenére érdekes, hogy mennyire alacsony azon vizsgálatok száma, amelyek a PLD kezelést neoadjuváns

terápiaként alkalmazzák lokálisan előrehaladott emlő daganatok esetén [156]. Még kevesebb azoknak az irodalmi adatoknak a száma, amelyek a drog rezisztenciával összefüggésben vizsgálják, vagy magára a PLD-re kialakuló rezisztenciával foglalkoznak. Tekintve, hogy a PLD aktív hatóanyaga a doxorubicin, feltételeztük, hogy a két vegyületre azonos mechanizmusokon keresztül alakul ki rezisztencia. Ennek bizonyítására egy Pgp-negatív és -pozitív sejtvonal párokból álló panelt használtunk, ahol összehasonlíthattuk az egyes sejteken kapott érzékenységi adatokat (2. táblázat). A sejteken, melyek túlexpresszálják a Pgp-t, a PLD kezelés nem volt hatékony, a speciális liposzómális bevonat nem tudta megvédeni a doxorubicint az efflux transzporterektől és a Pgp farmakológiai gátlására volt szükség a tariquidar használatával, ahhoz, hogy a PLD érzékenység helyreálljon. Ez az eredmény különösen érdekes, ha számításba vesszük, hogy a liposzómák felvétele megelőzi a szabad DOX intracelluláris eloszlását [184], vagyis az endocitózissal bejutó liposzómális-részecskékből a doxorubicin már csak a citoplazmában szabadul fel [185]. Ez a megfigyelés felveti, hogy a Pgp valahogy képes szabályozni a liposzómákba csomagolt vegyületek felvételét is, hiszen a plazmamembránon endocitózissal átjutó PLD így nem találkozik közvetlenül a transzporter fehérjével. Ahhoz, hogy fel lehessen mérni a pegilálás jelentőségét a PLD hatására további kísérletekre van szükség, amikben például a doxorubicin nem pegilált liposzómális formulációját a Myocet®-et lehetne használni.

A közelmúltban, a genetikailag módosított egér modellek (GEMM) területén elért fejlődésnek köszönhetően új lehetőségek nyíltak a tumorok kialakulásának és a drog rezisztencia evolúciójának mélyebb megértésére [186]. Kutatásaink során a tripla-negatív emlődaganatok egyik legújabb GEM modelljét alkalmaztuk, ahol a tumor kifejlődése a DNS-javító fehérjét kódoló *Brca1* és a tumorszuppresszor *p53* gének szövet specifikus kiütésének eredményeként jön létre [122]. Habár egy viszonylag ritka, *BRCA1*-mediált öröklődő emlődaganat használata nyilvánvalóan limitálja az eredmények relevanciáját, több vizsgálat is azt igazolta, hogy *BRCA1* vesztés a sporadikus tumorokban is előfordul [187]. Például a *BRCA1* gén hipermetilációval történő csendesítése megfigyelhető sporadikus emlő és petefészek daganatokban [188], de a *BRCA1* fehérje funkciójának sérülése tetten érhető nem-öröklött emlő tumorok esetében is [189]. Szintén ennek a fehérjének a gyakori diszfunkcióját figyelték meg sporadikus bazális típusú mell daganatokban is [190], valamint mutatták ki a kódoló génjének kiesését szórványos emlő

tumorokban. Ez többek között magyarázható a HMG1A1 fehérje által irányított negatív regulációval is [191]. Emellett egy, közelmúltban publikált tanulmány felmérte, hogy a DNS-javító gének funkcióvesztéssel járó mutációi milyen frekvenciával fordulnak elő a férfiak metasztatikus prosztata daganataiban. A 692 résztvevő páciens között összesen 82 (11.8%) öröklött mutáció hordozót azonosítottak, akik közül 37 (5.3%) a *BRCA2* és 6 (0.9%) a *BRCA1* gének mutációival rendelkeztek, bizonyítva, hogy a *BRCA1/2*-hiány miatt nem csak nőgyógyászati daganatok, hanem más típusú tumorok is kifejlődhetnek [192].

Kimutatták, hogy a PLD kezelés klinikai körülmények között meglepően hatásos a *BRCA1*-negatív petefészek tumorok ellen is [193]. Egy 155 rekurrens epitelialis petefészek rákkal diagnosztizált beteg (40 nő ismert *BRCA1* vagy 2 mutációt hordozott, míg 115 sporadikus daganattal rendelkezett) adatait összegyűjtő klinikai kísérlet eredményeként kiderült, hogy a sérült *BRCA* funkciójú háttéren kifejlődött tumorok érzékenyebbek a DNS károsító drogokkal (mint például a PLD) szemben, még akkor is, ha bennük a platina alapú terápiákra már kialakult a rezisztencia [194]. Még meggyőzőbb, hogy mikor a PLD kezelés hatékonyságát az olaparibhoz, egy új, ígéretes PARP gátlószeréhez hasonlították olyan betegekben, akik ismert *BRCA1* vagy 2 funkcióvesztéssel járó mutációkat hordoztak és kiújult petefészek daganatban szenvedtek, egy fázis II, nyílt jelölésű, randomizált kísérletben, semmilyen szignifikáns eltérést nem találtak a progresszió-mentes túlélésben, az objektív válaszok számában és a „tumor méret legnagyobb változásában” („best change in tumor size”). A tanulmány végső következtetése szerint a „PLD hatékonysága a vártnál nagyobb volt” [195]. Ugyan ez a publikáció kiköti, hogy az ismert *BRCA1/2* mutációkkal rendelkező betegek között a progresszió-mentes túlélés magasabb volt, mint más, jelentős méretű, randomizált vizsgálat esetén, ahol a *BRCA* státusz ismeretlen volt, ami utalhat arra, hogy a PLD specifikus toxicitást mutat az olyan tumorokkal szemben, amikben sérült a *BRCA1/2*-höz köthető DNS-javítás. Tekintve, hogy az olaparib különösen hatékony a *BRCA1*-hiányos daganatokkal szemben [196], ezek az eredmények támogatják a hipotézisünket, miszerint a PLD szelektív toxicitással rendelkezhet a *BRCA1*-negatív tumorok ellen.

A 2. táblázatban szereplő emlő tumor sejt panelben két sejt vonal mutatott magasabb érzékenységet a PLD kezelésre, az MDA-MB-231 és MDA-MB-468, de egyedül az

MDA-MB-468 mutatkozott egyszerre PLD- és ciszplatin-érzékenynek is (2. táblázat). Habár ez a panel nem tartalmaz olyan sejtvonalakat, amelyekben mutálódott vagy kiesett volna a *BRCA1* gén, ami megmagyarázhatná a ciszplatin-érzékenységet, ismert, hogy az MDA-MB-468 sejtekből hiányzik a *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*) gén. A *BRCA1* funkciójának kieséséhez hasonlóan a *PTEN* hiánya is hibás homolog rekombinációhoz (HR) vezet, és együtt jár az olaparibhoz hasonló PARP gátlószerekkel szembeni érzékenységgel is ([154],[197]). A HR elégtelen működését támasztja alá az is, hogy az MDA-MB-468 sejteket 14 másik emlő daganatsejthez és 2 egészséges emlő epitel vonalhoz hasonlítva, az egyik legalacsonyabb HR aktivitást mutatja miután kettős szálú töréseket idéznek benne elő gamma sugárzással és a legmagasabb érzékenységet produkálja mikor UV besugárzásnak vagy mitomycin C kezelésnek teszik ki, mutatva, hogy ez a sejtvonal különösen érzékeny a DNS-t érő inzultusokra, gyaníthatóan a csökkent DNS-javító képessége miatt [198]. A vad típusú *BRCA1*-et kifejező, illetve *BRCA1*-kiütött DT40 sejteken kapott eredményeink is arra utalnak, hogy mind a DOX, mind a PLD kétszer toxikusabbak az elégtelen DNS-javító képességgel rendelkező sejteken. Ez a lehetséges szelektivitás a *BRCA1*-hiányos tumorokkal szemben, a meglepően magas szérum koncentrációk, a megnövekedett keringési idő és a hibás, pórusos erek miatti indirekt felhalmozódás a daganat szövetben, megmagyarázhatják a PLD jelentős sikerét a konvencionális doxorubicinnal szemben ebben a modellben.

Az egér emlő tumor modellünkben a PLD jelentősen hatékonyabbnak bizonyult a doxorubicin kezelésnél a relapszus-mentes és teljes túlélést tekintve (20. ábra A és B), valamint sikeresen kitolta a drog rezisztencia megjelenésének idejét (21. és 22. ábra), ami alapvető fontossággal bír a túlélési idő meghosszabbításában. Meglepő, de a relapszus-mentes túlélés ideje a PLD kezelt csoportban összevethető volt a DOX terápiában részesített csoport teljes túlélésével (56 vs 49.5 nap), ami megmagyarázható a két szer szignifikánsan eltérő farmakokinetikai profiljával (26. ábra). Ahogy azt mások is kimutatták betegektől nyert mintákon [131], mind a keringési idő, mind a maximális csúcs koncentráció, mind pedig a szabad doxorubicin AUC értéke jelentősen magasabbak voltak a PLD csoportban, mint azok között az állatok között, amik DOX terápiát kaptak és 7 nappal a kezelést követően a PLD még mindig detektálható szinten maradt. Sőt, 7 nap után a PLD kezelt állatok vérében a DOX kezelést követő 5. percben mért mennyiségű szabad doxorubicint találtunk. Ezek az eltérések azt sugallják, hogy míg a

rövid és csúcs-szerű toxikus inzultusok, mint a DOX kezelést követően megfigyeltek, kedvez az Pgp-mediált rezisztencia relatív gyors kialakulásának, addig a magas dózisú és elnyújtott keringési idejű terápia, mint a PLD után látottak, hatékonyan késlelteti a drog rezisztencia kialakulását. Azonban, a magas szérum koncentráció és keringési idő ellenére is, a tumorokban fellépett csökkent drog érzékenység és rezisztencia is a PLD terápia alatt (22. ábra), ami ráadásul a Pgp mRNS szintjeinek extrém megemelkedésével járt együtt (24. ábra).

Talán még izgalmasabb, hogy a PLD a már kialakult DOX-rezisztenciával rendelkező daganatok esetén alkalmazva is minden esetben terápiás választ váltott ki (25. ábra), míg a DOX kezelés már nem bizonyult sikeresnek és nem volt képes kontrollálni a betegséget. Érdekes módon, hasonló eredményekről számoltak be tanulmányok antraciklinnel (pl. doxorubicin) jelentősen előkezelt, sőt antraciklin-rezisztens metasztatikus emlődaganattal (metastatic breast cancer, MBC) diagnosztizált betegek PLD kezelése kapcsán is. Egy 79, korábban antraciklinekkel előkezelt, MBC beteggel indított klinikai fázis II kísérletben úgy találták, hogy a PLD kezelés hatékonynak bizonyult, és a medián progresszió-mentes túlélés, a terápiára adott válasz hossza, valamint a teljes túlélés hossza összehasonlítható volt más, széles körben alkalmazott „mentő terápiákkal” („salvage therapy”, melyet az elsődleges kezelés kudarca esetén vetnek be), mint például a capecitabine. Ráadásul a klinikai haszon ráta (clinical benefit rate) az antraciklin- vagy taxán-előkezelt betegek körében szignifikánsan magasabb volt, mint bármely más, korábban publikált stratégia esetén [199]. Egy 4 különböző klinikai teszt adatait összesítő analízis igazolta, hogy az antraciklin újra-kezelés („re-challenge”) a PLD használatával hatásos megközelítés MBC betegeknél, függetlenül a rezisztenciától, a kumulatív dózistól vagy a konvencionális antraciklin kezelés óta eltelt időtől [200]. Annak ellenére, hogy a PLD terápia szignifikánsan növelte a progresszió-mentes és a teljes túlélést, a betegek, akik korábban több kezelési cikluson estek át rosszabb prognózisra számíthatnak, mint azok, akik kevesebb antraciklin kezeléssel mentek keresztül. Annak ellenére, hogy az ebben a szituációban (MBC, progresszió antraciklin vagy taxán kezelés alatt) elérhető terápia hatékonysága általában alacsonynak tekintendő, a betegek, akik antraciklinokat tartalmazó adjuváns kezelésben részesültek még érzékenységet mutathatnak az antraciklinek liposzómális formulációira [201]. Bár ugyanezek a tanulmányok nem részletezik (véltetően nem is vizsgálták) a kialakult antraciklin- és taxán-rezisztencia

mechanizmusát, az köztudott, hogy mindkét csoport vegyületei igen jó szubsztrátjai a P-glikoproteinnek [83], ami jelentheti azt, hogy a PLD kezelés, a megnövekedett vérkoncentrációnak és keringési időnek köszönhetően, a transzporter jelenlétének ellenére, képes megfelelő mennyiségű hatóanyagot juttatni a tumor sejtekbe. Ezzel összhangban, ahogy mi is kimutattuk, a PLD még aktívnak bizonyul a DOX kezelésre már rezisztens tumorokban is. Ez a megfigyelés megmagyarázhatja, hogy a többszörösen előkezelt betegek miként képesek klinikailag profitálni a PLD re-challenge terápiából.

## 7. Következtetések

1. Az *in silico* korrelációs és *in vitro* szűrési technikák segítségével olyan új MDR-szelektív vegyületek lettek azonosítva, melyek toxikusabbak és szelektívebbek a korábban talált molekuláknál, továbbá bizonyítást nyert, hogy az eddig célzottan nem vizsgált 8-hidrokinolin származékok az MDR-szelektív vegyületek leghatékonyabb csoportját alkotják.
2. Kimutatásra került, hogy Az új molekulák képesek a Pgp-pozitív multidrog rezisztens sejteket egyetlen, nagy dózisu kezeléssel újra Pgp-negatívvá tenni, ezzel újra érzékenyítve őket a konvencionális kemoterápiákkal szemben.
3. Az MDR-szelektív vegyületek Pgp expresszió csökkentő hatására építve megszületett létrehoztam egy új szűrőrendszer, ami képes a molekulákat a Pgp expresszióra kifejtett hatásuk alapján összehasonlítani és karakterizálni.
4. A *brca1*<sup>-/-</sup>; *p53*<sup>-/-</sup> egér emlő tumorokból alapított primer sejt kultúrák alkalmazásával igazolást nyert, hogy az MDR-szelektív vegyületek képesek szelektíven elpusztítani a Pgp-t klinikailag releváns szinten expresszáló drog rezisztens sejteket.
5. Egy fiziológiás vér-agy gát sejtmodell segítségével bizonyítást nyert, hogy a Pgp kifejeződést érintő hatás nem jelent veszélyt a fontos vér-szöveti határokon P-glikoproteint expresszáló testi sejtekre.
6. Összehasonlítottuk a doxorubicint (DOX) és a pegilált liposzómális doxorubicint (PLD) az NCI60 sejt vonal panel összes emlő tumorból származó vonalán, valamint egy Pgp-negatív és -pozitív sejt párokat tartalmazó panelen is és kimutattuk, hogy *in vitro* a DOX kezelés toxikusabb, mint a PLD, de mindkét anyag hatástalan a Pgp-t túlexpresszáló sejteken.
7. A Pgp PLD-rezisztenciára kifejtett hatását tovább vizsgálva igazolódott, hogy a P388 drog érzékeny és P388/ADR drog rezisztens egér leukémia tumorokat kezelve, csak azok a daganatok szoríthatóak vissza a DOX és PLD kezelésekkkel, amelyek nem fejezik ki a P-glikoproteint.
8. Kísérletesen bizonyítottuk, hogy egy genetikailag módosított *brca1*<sup>-/-</sup>; *p53*<sup>-/-</sup> egér emlő tumor modellben a PLD kezelés szignifikánsan megnöveli a relapszusmentes és a teljes túlélést, úgy, hogy kitolja a terápia rezisztencia kialakulásának idejét.

9. Kimutattuk, hogy a PLD kezeléssel szemben kialakult rezisztencia hátterében a P-glikoprotein mRNS expressziójának megnövekedése áll, ami a DOX terápia során fellépő Pgp expresszió változás akár százszorosa is lehet.
10. Bizonyossá vált, hogy a DOX-rezisztenciát okozó Pgp expresszió nem elegendő a PLD kezeléssel szemben, így a DOX-rezisztens daganatok újratezelése PLD-vel, hatékony stratégia.
11. Kísérletet tettünk arra, hogy kimutassuk a PLD szelektív toxicitását a *BRCA1*-hiányos sejtekre, ezzel megmagyarázva a klinikai gyakorlatban tapasztaltakat.



## 8. Összefoglalás

A doktori disszertációban részletezett munka eredményeként olyan kísérleti eljárások születtek, amelyek a későbbiekben hatékonyak lehetnek a P-glikoproteint expresszáló, multidrog rezisztens (MDR) tumorokkal szemben. A disszertáció két eltérő megközelítést tárgyal: míg az MDR-szelektív vegyületek a multidrog rezisztenciát előidéző P-glikoprotein transzporter kihasználásán keresztül képesek a rezisztens tumorokat támadni, addig a pegilált liposzómális doxorubicin a hagyományos antraciklinektől jelentősen különböző farmakokinetikai tulajdonságaival tud felülkerekedni a terápiára már nem reagáló daganatokon. A munka részét képezte az új MDR-szelektív vegyületek *in silico* kiválogatása és *in vitro* tesztelése, valamint olyan állatmodellek beállítása, melyekkel a multidrog rezisztencia jelensége vizsgálható. Az MDR-szelektív vegyületek paradox, P-glikoproteint célzó citotoxikus hatása mellett kiderült, hogy ezek a vegyületek rövid időn belül képesek a P-glikoprotein expressziójának teljes megszüntetésére, ezzel újra érzékenyítve a sejteket a kemoterápiás vegyületekkel szemben. A felfedezés segítségével az MDR-szelektív vegyületek összehasonlíthatóvá és karakterizálhatóvá váltak, lehetőséget biztosítva azoknak a szerkezeti elemeknek azonosítására, amelyek összefügnek a rezisztens sejtek újra érzékenyítésével. Bebizonyosodott, hogy a P-glikoprotein kifejeződést csökkentő megközelítés alkalmazható egy klinikailag releváns, egér emlő tumor modellben található, rezisztenciát biztosító fehérje szintek mellett is. Ennek ellenére az MDR-szelektív kezelés nem tesz kárt a vér-agy gát endotél sejtjeiben és nem csökkenti az ott található P-glikoprotein szinteket. A pegilált liposzómális doxorubicin *in vitro* és *in vivo* körülmények között sem bizonyult hatékonyabbnak a hagyományos doxorubicinnél, sőt, a mesterségesen előidézett P-glikoprotein expresszió teljes rezisztenciát biztosított a vegyülettel szemben. Ezzel szemben egy *brca1*<sup>-/-</sup>; *p53*<sup>-/-</sup> egér emlő daganat modellben, ahol a multidrog rezisztencia az alkalmazott kezelés eredményeként alakul ki, a pegilált liposzómális doxorubicin szignifikánsan emelte a relapszus-mentes és a teljes túlélés hosszát, ami a drog rezisztencia megjelenésének késleltetésével volt magyarázható. A doxorubicinre nem reagáló tumorokban kifejeződő P-glikoprotein szint nem volt képes védelmet nyújtani a pegilált liposzómális formuláció ellen, ezért a pegilált liposzómális doxorubicinnal történő kezelés a doxorubicin rezisztens tumorokkal szemben is eredményesnek bizonyult.

## 9. Summary

We describe new approaches for the treatment of P-glycoprotein expressing multidrug resistant (MDR) cancer. Two methods are proposed: one relies on the use of MDR-selective compounds that target MDR cancer through the exploitation of P-glycoprotein function; the other aims to overcome drug resistance based on the improved pharmacokinetic parameters of pegylated liposomal doxorubicin. We used *in silico*, *in vitro* as well as *in vivo* models to identify and characterize new MDR-selective molecules and to investigate cancer MDR. In addition to their paradoxical toxicity against MDR cells, MDR-selective compounds can re-sensitize cancer cells to chemotherapy by rapidly abolishing the expression of P-glycoprotein. We have established an assay to characterize series of MDR selective compounds in order to identify structure activity relations. We showed that the MDR-reversing potential of the compounds provides a viable strategy even in the case of cells isolated from a mouse mammary tumor model expressing clinically relevant levels of P-glycoprotein, while having no effect on blood-brain barrier endothelial cells that also express P-glycoprotein. We found pegylated liposomal doxorubicin (PLD) to be less effective than doxorubicin in *in vitro* and *in vivo* models. P-glycoprotein expressing drug resistant cell lines were completely resistant against PLD. In contrast, in a *brca1*<sup>-/-</sup>;*p53*<sup>-/-</sup> mouse mammary tumor model, where multidrug resistance evolves as a result of chemotherapy, pegylated liposomal doxorubicin significantly increased relapse-free and overall survival. Increased survival could be explained by the delayed onset of resistance. P-glycoprotein levels associated with doxorubicin resistance did not influence treatment by PLD, explaining why PLD treatment could successfully limit the growth of doxorubicin-resistant *brca1*<sup>-/-</sup>;*p53*<sup>-/-</sup> mouse mammary tumors.

## 10. Irodalomjegyzék

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 61(2): 69-90.
2. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 65(2): 87-108.
3. Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, Cooper D, Gansler T, Lerro C, Fedewa S, Lin C, Leach C, Cannady RS, Cho H, Scoppa S, Hachey M, Kirch R, Jemal A, Ward E. (2012) Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 62(4): 220-41.
4. Barbosa FHdS, Pereira PVLGdC, Bergqvist LP, Rothschild BM. (2016) Multiple neoplasms in a single sauropod dinosaur from the Upper Cretaceous of Brazil. *Cretaceous Research*, 62: 13-17.
5. Rothschild BM, Tanke DH, Helbling M, 2nd, Martin LD. (2003) Epidemiologic study of tumors in dinosaurs. *Naturwissenschaften*, 90(11): 495-500.
6. Edward JO, Patrick SR-Q, Maryna S, Zach T, Jacqueline SS, Bernhard Z, Tanya A, Frikkie De B, Jakobus WH, Ryan DF, Lee RB, Earliest hominin cancer: 1.7-million-year-old osteosarcoma from Swartkrans Cave, South Africa. 2016.
7. Monge J, Kricun M, Radovic J, Radovic D, Mann A, Frayer DW. (2013) Fibrous dysplasia in a 120,000+ year old Neandertal from Krapina, Croatia. *PLoS One*, 8(6): e64539.
8. Sudhakar A. (2009) History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *J Cancer Sci Ther*, 1(2): 1-4.
9. Hanahan D, Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5): 646-74.
10. Goodman LS, Wintrobe MM, Dameshek W, Goodman MJ, Gilman A, McLennan MT. (1946) Nitrogen mustard therapy; use of methyl-bis (beta-chloroethyl) amine hydrochloride and tris (beta-chloroethyl) amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. *J Am Med Assoc*, 132: 126-32.
11. Pinkel D. (1959) Actinomycin D in childhood cancer; a preliminary report. *Pediatrics*, 23(2): 342-7.

12. Farber S. (1949) Some observations on the effect of folic acid antagonists on acute leukemia and other forms of incurable cancer. *Blood*, 4(2): 160-7.
13. Law LW, Dunn DB, Boyle PJ, Miller JH. (1949) Observations on the effect of a folic-acid antagonist on transplantable lymphoid leukemias in mice. *J Natl Cancer Inst*, 10(1): 179-92.
14. Farber S, Diamond LK. (1948) Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. *N Engl J Med*, 238(23): 787-93.
15. Li MC, Hertz R, Bergenstal DM. (1958) Therapy of choriocarcinoma and related trophoblastic tumors with folic acid and purine antagonists. *N Engl J Med*, 259(2): 66-74.
16. Hertz R, Ross GT, Lipsett MB. (1963) Primary chemotherapy of nonmetastatic trophoblastic disease in women. *Am J Obstet Gynecol*, 86: 808-14.
17. Tsukamoto S, Akashi-Tanaka S, Shien T, Terada K, Kinoshita T. (2007) Brain metastases after achieving local pathological complete responses with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer*, 14(4): 420-4.
18. Cross M, Dexter TM. (1991) Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. *Cell*, 64(2): 271-80.
19. Lemmon MA, Schlessinger J. (2010) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141(7): 1117-34.
20. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. (2004) Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, 432(7015): 332-7.
21. Burkhart DL, Sage J. (2008) Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer*, 8(9): 671-82.
22. Deshpande A, Sicinski P, Hinds PW. (2005) Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene*, 24(17): 2909-15.
23. Oren M. (2003) Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ*, 10(4): 431-42.
24. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. (2010) TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(1): a001008.

25. Adams JM, Cory S. (2007) The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26(9): 1324-37.
26. Lowe SW, Cepero E, Evan G. (2004) Intrinsic tumour suppression. *Nature*, 432(7015): 307-15.
27. Evan G, Littlewood T. (1998) A matter of life and cell death. *Science*, 281(5381): 1317-22.
28. Blasco MA. (2005) Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*, 6(8): 611-22.
29. Borst P. (2012) Cancer drug pan-resistance: pumps, cancer stem cells, quiescence, epithelial to mesenchymal transition, blocked cell death pathways, persists or what? *Open Biol*, 2(5): 120066.
30. Folkman J. (2007) Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov*, 6(4): 273-86.
31. Ebos JM, Lee CR, Kerbel RS. (2009) Tumor and host-mediated pathways of resistance and disease progression in response to antiangiogenic therapy. *Clin Cancer Res*, 15(16): 5020-5.
32. Carpenter G, Cohen S. (1990) Epidermal growth factor. *J Biol Chem*, 265(14): 7709-12.
33. Blume-Jensen P, Hunter T. (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 411(6835): 355-65.
34. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. (1999) The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 341(3): 164-72.
35. Shawver LK, Slamon D, Ullrich A. (2002) Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Cell*, 1(2): 117-23.
36. Kantarjian HM, Talpaz M, O'Brien S, Smith TL, Giles FJ, Faderl S, Thomas DA, Garcia-Manero G, Issa JP, Andreeff M, Kornblau SM, Koller C, Beran M, Keating M, Rios MB, Shan J, Resta D, Capdeville R, Hayes K, Albitar M, Freireich EJ, Cortes JE. (2002) Imatinib mesylate for Philadelphia chromosome-positive, chronic-phase myeloid leukemia after failure of interferon-alpha: follow-up results. *Clin Cancer Res*, 8(7): 2177-87.

37. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, Sawyers CL. (2001) Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*, 293(5531): 876-80.
38. Yarden Y, Sliwkowski MX. (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(2): 127-37.
39. Herbst RS, Shin DM. (2002) Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy. *Cancer*, 94(5): 1593-611.
40. Mendelsohn J. (1997) Epidermal growth factor receptor inhibition by a monoclonal antibody as anticancer therapy. *Clin Cancer Res*, 3(12 Pt 2): 2703-7.
41. Huang L, Fu L. (2015) Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Acta Pharm Sin B*, 5(5): 390-401.
42. McCarthy EF. (2006) The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J*, 26: 154-8.
43. Lamm DL, Thor DE, Harris SC, Reyna JA, Stogdill VD, Radwin HM. (1980) Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy of superficial bladder cancer. *J Urol*, 124(1): 38-40.
44. Tsiatas M, Grivas P. (2016) Immunobiology and immunotherapy in genitourinary malignancies. *Ann Transl Med*, 4(14): 270.
45. Ferrantini M, Capone I, Belardelli F. (2007) Interferon-alpha and cancer: mechanisms of action and new perspectives of clinical use. *Biochimie*, 89(6-7): 884-93.
46. Antony GK, Dudek AZ. (2010) Interleukin 2 in cancer therapy. *Curr Med Chem*, 17(29): 3297-302.
47. Melero I, Hervas-Stubbs S, Glennie M, Pardoll DM, Chen L. (2007) Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 7(2): 95-106.
48. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebba C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol

- GM, Hoos A, Urba WJ. (2010) Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 363(8): 711-23.
49. Khalil DN, Smith EL, Brentjens RJ, Wolchok JD. (2016) The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 13(6): 394.
50. Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Restifo NP, Royal RE, Kammula U, White DE, Mavroukakis SA, Rogers LJ, Gracia GJ, Jones SA, Mangiameli DP, Pelletier MM, Gea-Banacloche J, Robinson MR, Berman DM, Filie AC, Abati A, Rosenberg SA. (2005) Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol*, 23(10): 2346-57.
51. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, Redfern CH, Ferrari AC, Dreicer R, Sims RB, Xu Y, Frohlich MW, Schellhammer PF, Investigators IS. (2010) Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med*, 363(5): 411-22.
52. Mittendorf EA, Clifton GT, Holmes JP, Schneble E, van Echo D, Ponniah S, Peoples GE. (2014) Final report of the phase I/II clinical trial of the E75 (nelipepimut-S) vaccine with booster inoculations to prevent disease recurrence in high-risk breast cancer patients. *Ann Oncol*, 25(9): 1735-42.
53. Crawford S. (2013) Is it time for a new paradigm for systemic cancer treatment? Lessons from a century of cancer chemotherapy. *Front Pharmacol*, 4: 68.
54. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. (2013) Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*, 63(1): 11-30.
55. Gottesman MM. (2002) Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med*, 53: 615-27.
56. Filipits M. (2004) Mechanisms of cancer: multidrug resistance. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 1(2): 229-234.
57. Dano K. (1973) Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta*, 323(3): 466-83.

58. See YP, Carlsen SA, Till JE, Ling V. (1974) Increased drug permeability in Chinese hamster ovary cells in the presence of cyanide. *Biochim Biophys Acta*, 373(2): 242-52.
59. Juliano R. (1976) Drug-resistant mutants of Chinese hamster ovary cells possess an altered cell surface carbohydrate component. *J Supramol Struct*, 4(4): 521-6.
60. Juliano RL, Ling V. (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta*, 455(1): 152-62.
61. Bech-Hansen NT, Till JE, Ling V. (1976) Pleiotropic phenotype of colchicine-resistant CHO cells: cross-resistance and collateral sensitivity. *J Cell Physiol*, 88(1): 23-31.
62. Debenham PG, Kartner N, Siminovitch L, Riordan JR, Ling V. (1982) DNA-mediated transfer of multiple drug resistance and plasma membrane glycoprotein expression. *Mol Cell Biol*, 2(8): 881-9.
63. Roninson IB, Abelson HT, Housman DE, Howell N, Varshavsky A. (1984) Amplification of specific DNA sequences correlates with multi-drug resistance in Chinese hamster cells. *Nature*, 309(5969): 626-8.
64. Roninson IB, Chin JE, Choi KG, Gros P, Housman DE, Fojo A, Shen DW, Gottesman MM, Pastan I. (1986) Isolation of human *mdr* DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(12): 4538-42.
65. Shen DW, Fojo A, Chin JE, Roninson IB, Richert N, Pastan I, Gottesman MM. (1986) Human multidrug-resistant cell lines: increased *mdr1* expression can precede gene amplification. *Science*, 232(4750): 643-5.
66. Shapiro AB, Ling V. (1997) Extraction of Hoechst 33342 from the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane by P-glycoprotein. *Eur J Biochem*, 250(1): 122-9.
67. Aller SG, Yu J, Ward A, Weng Y, Chittaboina S, Zhuo R, Harrell PM, Trinh YT, Zhang Q, Urbatsch IL, Chang G. (2009) Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science*, 323(5922): 1718-22.
68. Lin JH, Yamazaki M. (2003) Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications. *Clin Pharmacokinet*, 42(1): 59-98.



69. Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L, Smit JJ, van der Valk MA, Voordouw AC, Spits H, van Tellingen O, Zijlmans JM, Fibbe WE, Borst P. (1997) Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking *mdr1*-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(8): 4028-33.
70. Sarkadi B, Homolya L, Szakacs G, Varadi A. (2006) Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system. *Physiol Rev*, 86(4): 1179-236.
71. Roulet A, Puel O, Gesta S, Lepage JF, Drag M, Soll M, Alvinerie M, Pineau T. (2003) MDR1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. *Eur J Pharmacol*, 460(2-3): 85-91.
72. Pirker R, Wallner J, Gotzl M, Gsur A, Geissler K, Havelec L, Knapp W, Haas O, Linkesch W, Lechner K. (1992) MDR1 RNA expression is an independent prognostic factor in acute myeloid leukemia. *Blood*, 80(2): 557-9.
73. Doxani C, Voulgarelis M, Zintzaras E. (2013) MDR1 mRNA expression and MDR1 gene variants as predictors of response to chemotherapy in patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis. *Biomarkers*, 18(5): 425-35.
74. Campos L, Guyotat D, Archimbaud E, Calmard-Oriol P, Tsuruo T, Troncy J, Treille D, Fiere D. (1992) Clinical significance of multidrug resistance P-glycoprotein expression on acute nonlymphoblastic leukemia cells at diagnosis. *Blood*, 79(2): 473-6.
75. Karaszi E, Jakab K, Homolya L, Szakacs G, Hollo Z, Telek B, Kiss A, Rejto L, Nahajevszky S, Sarkadi B, Kappelmayer J. (2001) Calcein assay for multidrug resistance reliably predicts therapy response and survival rate in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, 112(2): 308-14.
76. He YZ, Liang Z, Wu MR, Wen Q, Deng L, Song CY, Wu BY, Tu SF, Huang R, Li YH. (2015) Overexpression of *EPS8* is associated with poor prognosis in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*, 39(6): 575-81.
77. Gillet JP, Wang J, Calcagno AM, Green LJ, Varma S, Bunkholt Elstrand M, Trope CG, Ambudkar SV, Davidson B, Gottesman MM. (2011) Clinical relevance of multidrug resistance gene expression in ovarian serous carcinoma effusions. *Mol Pharm*, 8(6): 2080-8.

78. Coyle B, Kessler M, Sabnis DH, Kerr ID. (2015) ABCB1 in children's brain tumours. *Biochem Soc Trans*, 43(5): 1018-22.
79. Othman RT, Kimishi I, Bradshaw TD, Storer LC, Korshunov A, Pfister SM, Grundy RG, Kerr ID, Coyle B. (2014) Overcoming multiple drug resistance mechanisms in medulloblastoma. *Acta Neuropathol Commun*, 2: 57.
80. Flahaut M, Meier R, Coulon A, Nardou KA, Niggli FK, Martinet D, Beckmann JS, Joseph JM, Muhlethaler-Mottet A, Gross N. (2009) The Wnt receptor FZD1 mediates chemoresistance in neuroblastoma through activation of the Wnt/beta-catenin pathway. *Oncogene*, 28(23): 2245-56.
81. Luo Y, Ellis LZ, Dallaglio K, Takeda M, Robinson WA, Robinson SE, Liu W, Lewis KD, McCarter MD, Gonzalez R, Norris DA, Roop DR, Spritz RA, Ahn NG, Fujita M. (2012) Side population cells from human melanoma tumors reveal diverse mechanisms for chemoresistance. *J Invest Dermatol*, 132(10): 2440-50.
82. Effendi K, Mori T, Komuta M, Masugi Y, Du W, Sakamoto M. (2010) Bmi-1 gene is upregulated in early-stage hepatocellular carcinoma and correlates with ATP-binding cassette transporter B1 expression. *Cancer Sci*, 101(3): 666-72.
83. Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. (2006) Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 5(3): 219-34.
84. Cripe LD, Uno H, Paietta EM, Litzow MR, Ketterling RP, Bennett JM, Rowe JM, Lazarus HM, Luger S, Tallman MS. (2010) Zosuquidar, a novel modulator of P-glycoprotein, does not improve the outcome of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia: a randomized, placebo-controlled trial of the Eastern Cooperative Oncology Group 3999. *Blood*, 116(20): 4077-85.
85. Tamaki A, Ierano C, Szakacs G, Robey RW, Bates SE. (2011) The controversial role of ABC transporters in clinical oncology. *Essays Biochem*, 50(1): 209-32.
86. Harker WG, MacKintosh FR, Sikic BI. (1983) Development and characterization of a human sarcoma cell line, MES-SA, sensitive to multiple drugs. *Cancer Res*, 43(10): 4943-50.
87. Harker WG, Sikic BI. (1985) Multidrug (pleiotropic) resistance in doxorubicin-selected variants of the human sarcoma cell line MES-SA. *Cancer Res*, 45(9): 4091-6.

88. Willingham AT, Deveraux QL, Hampton GM, Aza-Blanc P. (2004) RNAi and HTS: exploring cancer by systematic loss-of-function. *Oncogene*, 23(51): 8392-400.
89. Szybalski W, Bryson V. (1952) Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. I. Cross resistance of *Escherichia coli* to fifteen antibiotics. *J Bacteriol*, 64(4): 489-99.
90. Szakacs G, Hall MD, Gottesman MM, Boumendjel A, Kachadourian R, Day BJ, Baubichon-Cortay H, Di Pietro A. (2014) Targeting the Achilles heel of multidrug-resistant cancer by exploiting the fitness cost of resistance. *Chem Rev*, 114(11): 5753-74.
91. Szakacs G, Annereau JP, Lababidi S, Shankavaram U, Arciello A, Bussey KJ, Reinhold W, Guo Y, Kruh GD, Reimers M, Weinstein JN, Gottesman MM. (2004) Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells. *Cancer Cell*, 6(2): 129-37.
92. Turk D, Hall MD, Chu BF, Ludwig JA, Fales HM, Gottesman MM, Szakacs G. (2009) Identification of compounds selectively killing multidrug-resistant cancer cells. *Cancer Res*, 69(21): 8293-301.
93. Furedi A, Toth S, Szebenyi K, Pape VF, Turk D, Kucsma N, Cervenak L, Tovari J, Szakacs G. (2017) Identification and Validation of Compounds Selectively Killing Resistant Cancer: Delineating Cell Line-Specific Effects from P-Glycoprotein-Induced Toxicity. *Mol Cancer Ther*, 16(1): 45-56.
94. Dean M, Fojo T, Bates S. (2005) Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*, 5(4): 275-84.
95. Wilding JL, Bodmer WF. (2014) Cancer cell lines for drug discovery and development. *Cancer Res*, 74(9): 2377-84.
96. van der Worp HB, Howells DW, Sena ES, Porritt MJ, Rewell S, O'Collins V, Macleod MR. (2010) Can animal models of disease reliably inform human studies? *PLoS Med*, 7(3): e1000245.
97. Roschke AV, Tonon G, Gehlhaus KS, McTyre N, Bussey KJ, Lababidi S, Scudiero DA, Weinstein JN, Kirsch IR. (2003) Karyotypic complexity of the NCI-60 drug-screening panel. *Cancer Res*, 63(24): 8634-47.

98. Daniel VC, Marchionni L, Hierman JS, Rhodes JT, Devereux WL, Rudin CM, Yung R, Parmigiani G, Dorsch M, Peacock CD, Watkins DN. (2009) A primary xenograft model of small-cell lung cancer reveals irreversible changes in gene expression imposed by culture in vitro. *Cancer Res*, 69(8): 3364-73.
99. Tveit KM, Pihl A. (1981) Do cell lines in vitro reflect the properties of the tumours of origin? A study of lines derived from human melanoma xenografts. *Br J Cancer*, 44(6): 775-86.
100. Stein WD, Litman T, Fojo T, Bates SE. (2004) A Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) database analysis of chemosensitivity: comparing solid tumors with cell lines and comparing solid tumors from different tissue origins. *Cancer Res*, 64(8): 2805-16.
101. Szakacs G, Gottesman MM. (2004) Comparing solid tumors with cell lines: implications for identifying drug resistance genes in cancer. *Mol Interv*, 4(6): 323-5.
102. DeVita VT, Jr., Chu E. (2008) A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res*, 68(21): 8643-53.
103. Talmadge JE, Singh RK, Fidler IJ, Raz A. (2007) Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. *Am J Pathol*, 170(3): 793-804.
104. Fidler IJ, Hart IR. (1982) Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science*, 217(4564): 998-1003.
105. Day CP, Merlino G, Van Dyke T. (2015) Preclinical mouse cancer models: a maze of opportunities and challenges. *Cell*, 163(1): 39-53.
106. Dawe CP, M.;. (1957) Morphologic and biologic progression of a lymphoid neoplasm of the mouse in vivo and in vitro. *The American Journal of Pathology*, 33(603).
107. Schabel FM, Jr., Skipper HE, Trader MW, Laster WR, Jr., Griswold DP, Jr., Corbett TH. (1983) Establishment of cross-resistance profiles for new agents. *Cancer Treat Rep*, 67(10): 905-22.
108. Mistry P, Stewart AJ, Dangerfield W, Okiji S, Liddle C, Bootle D, Plumb JA, Templeton D, Charlton P. (2001) In vitro and in vivo reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a novel potent modulator, XR9576. *Cancer Res*, 61(2): 749-58.

109. Mak IW, Evaniew N, Ghert M. (2014) Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am J Transl Res*, 6(2): 114-8.
110. Rottenberg S, Borst P. (2012) Drug resistance in the mouse cancer clinic. *Drug Resist Updat*, 15(1-2): 81-9.
111. Aggarwal BB, Danda D, Gupta S, Gehlot P. (2009) Models for prevention and treatment of cancer: problems vs promises. *Biochem Pharmacol*, 78(9): 1083-94.
112. Hait WN. (2010) Anticancer drug development: the grand challenges. *Nat Rev Drug Discov*, 9(4): 253-4.
113. Johnson JI, Decker S, Zaharevitz D, Rubinstein LV, Venditti JM, Schepartz S, Kalyandrug S, Christian M, Arbuck S, Hollingshead M, Sausville EA. (2001) Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. *Br J Cancer*, 84(10): 1424-31.
114. Sharpless NE, Depinho RA. (2006) The mighty mouse: genetically engineered mouse models in cancer drug development. *Nat Rev Drug Discov*, 5(9): 741-54.
115. Al-Lazikani B, Banerji U, Workman P. (2012) Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. *Nat Biotechnol*, 30(7): 679-92.
116. Leaf C. (2004) Why we're losing the war on cancer (and how to win it). *Fortune*, 149(6): 76-82, 84-6, 88 passim.
117. Ablain J, de The H. (2014) Retinoic acid signaling in cancer: The parable of acute promyelocytic leukemia. *Int J Cancer*, 135(10): 2262-72.
118. Raymond E, Dahan L, Raoul JL, Bang YJ, Borbath I, Lombard-Bohas C, Valle J, Metrakos P, Smith D, Vinik A, Chen JS, Horsch D, Hammel P, Wiedenmann B, Van Cutsem E, Patyna S, Lu DR, Blanckmeister C, Chao R, Ruzsniewski P. (2011) Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med*, 364(6): 501-13.
119. Goldstein D, El-Maraghi RH, Hammel P, Heinemann V, Kunzmann V, Sastre J, Scheithauer W, Siena S, Tabernero J, Teixeira L, Tortora G, Van Laethem JL, Young R, Penenberg DN, Lu B, Romano A, Von Hoff DD. (2015) nab-Paclitaxel plus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer: long-term survival from a phase III trial. *J Natl Cancer Inst*, 107(2).
120. Lunardi A, Pandolfi PP. (2015) A co-clinical platform to accelerate cancer treatment optimization. *Trends Mol Med*, 21(1): 1-5.

121. Szabova L, Bupp S, Kamal M, Householder DB, Hernandez L, Schlomer JJ, Baran ML, Yi M, Stephens RM, Annunziata CM, Martin PL, Van Dyke TA, Weaver Ohler Z, Difilippantonio S. (2014) Pathway-specific engineered mouse allograft models functionally recapitulate human serous epithelial ovarian cancer. *PLoS One*, 9(4): e95649.
122. Liu X, Holstege H, van der Gulden H, Treur-Mulder M, Zevenhoven J, Velds A, Kerkhoven RM, van Vliet MH, Wessels LF, Peterse JL, Berns A, Jonkers J. (2007) Somatic loss of BRCA1 and p53 in mice induces mammary tumors with features of human BRCA1-mutated basal-like breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(29): 12111-6.
123. Rottenberg S, Nygren AO, Pajic M, van Leeuwen FW, van der Heijden I, van de Wetering K, Liu X, de Visser KE, Gilhuijs KG, van Tellingen O, Schouten JP, Jonkers J, Borst P. (2007) Selective induction of chemotherapy resistance of mammary tumors in a conditional mouse model for hereditary breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(29): 12117-22.
124. Pajic M, Iyer JK, Kersbergen A, van der Burg E, Nygren AO, Jonkers J, Borst P, Rottenberg S. (2009) Moderate increase in Mdr1a/1b expression causes in vivo resistance to doxorubicin in a mouse model for hereditary breast cancer. *Cancer Res*, 69(16): 6396-404.
125. Ludwig JA, Szakacs G, Martin SE, Chu BF, Cardarelli C, Sauna ZE, Caplen NJ, Fales HM, Ambudkar SV, Weinstein JN, Gottesman MM. (2006) Selective toxicity of NSC73306 in MDR1-positive cells as a new strategy to circumvent multidrug resistance in cancer. *Cancer Res*, 66(9): 4808-15.
126. Tiwari G, Tiwari R, Sriwastawa B, Bhati L, Pandey S, Pandey P, Bannerjee SK. (2012) Drug delivery systems: An updated review. *Int J Pharm Investig*, 2(1): 2-11.
127. Weiss RB. (1992) The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Semin Oncol*, 19(6): 670-86.
128. Skeel RT, Khleif SN, *Handbook of cancer chemotherapy*. Eighth Edition. ed. A Lippincott Williams & Wilkins Handbook. 2011, Philadelphia: Wolter Kluwer. xiv, 875 pages.

129. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. (2004) Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*, 56(2): 185-229.
130. Barenholz Y. (2012) Doxil(R)--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J Control Release*, 160(2): 117-34.
131. Gabizon A, Catane R, Uziely B, Kaufman B, Safra T, Cohen R, Martin F, Huang A, Barenholz Y. (1994) Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. *Cancer Res*, 54(4): 987-92.
132. Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, Jain RK, McDonald DM. (2000) Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol*, 156(4): 1363-80.
133. Bassermann R. (1986) Changes of vascular pattern of tumors and surrounding tissue during different phases of metastatic growth. *Recent Results Cancer Res*, 100: 256-67.
134. Huang SK, Lee KD, Hong K, Friend DS, Papahadjopoulos D. (1992) Microscopic localization of sterically stabilized liposomes in colon carcinoma-bearing mice. *Cancer Res*, 52(19): 5135-43.
135. Vaage J, Mayhew E, Lasic D, Martin F. (1992) Therapy of primary and metastatic mouse mammary carcinomas with doxorubicin encapsulated in long circulating liposomes. *Int J Cancer*, 51(6): 942-8.
136. Vaage J, Donovan D, Mayhew E, Abra R, Huang A. (1993) Therapy of human ovarian carcinoma xenografts using doxorubicin encapsulated in sterically stabilized liposomes. *Cancer*, 72(12): 3671-5.
137. Working PK, Dayan AD. (1996) Pharmacological-toxicological expert report. CAELYX. (Stealth liposomal doxorubicin HCl). *Hum Exp Toxicol*, 15(9): 751-85.
138. Cabanes A, Tzemach D, Goren D, Horowitz AT, Gabizon A. (1998) Comparative study of the antitumor activity of free doxorubicin and polyethylene glycol-coated liposomal doxorubicin in a mouse lymphoma model. *Clin Cancer Res*, 4(2): 499-505.

139. Mazurchuk R, Glaves D, Raghavan D. (1997) Magnetic resonance imaging of response to chemotherapy in orthotopic xenografts of human bladder cancer. *Clin Cancer Res*, 3(9): 1635-41.
140. Vaage J, Barbera-Guillem E, Abra R, Huang A, Working P. (1994) Tissue distribution and therapeutic effect of intravenous free or encapsulated liposomal doxorubicin on human prostate carcinoma xenografts. *Cancer*, 73(5): 1478-84.
141. Vail DM, Amantea MA, Colbern GT, Martin FJ, Hilger RA, Working PK. (2004) Pegylated liposomal doxorubicin: proof of principle using preclinical animal models and pharmacokinetic studies. *Semin Oncol*, 31(6 Suppl 13): 16-35.
142. O'Shaughnessy JA. (2003) Pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer. *Clin Breast Cancer*, 4(5): 318-28.
143. Pape VF, Turk D, Szabo P, Wiese M, Enyedy EA, Szakacs G. (2015) Synthesis and characterization of the anticancer and metal binding properties of novel pyrimidinylhydrazone derivatives. *J Inorg Biochem*, 144: 18-30.
144. Buerstedde JM, Reynaud CA, Humphries EH, Olson W, Ewert DL, Weill JC. (1990) Light chain gene conversion continues at high rate in an ALV-induced cell line. *EMBO J*, 9(3): 921-7.
145. Vandenberg CJ, Gergely F, Ong CY, Pace P, Mallery DL, Hiom K, Patel KJ. (2003) BRCA1-independent ubiquitination of FANCD2. *Mol Cell*, 12(1): 247-54.
146. Homolya L, Hollo M, Muller M, Mechetner EB, Sarkadi B. (1996) A new method for a quantitative assessment of P-glycoprotein-related multidrug resistance in tumour cells. *Br J Cancer*, 73(7): 849-55.
147. Ullman-Cullere MH, Foltz CJ. (1999) Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice. *Lab Anim Sci*, 49(3): 319-23.
148. Yamagishi T, Sahni S, Sharp DM, Arvind A, Jansson PJ, Richardson DR. (2013) P-glycoprotein mediates drug resistance via a novel mechanism involving lysosomal sequestration. *J Biol Chem*, 288(44): 31761-71.
149. Jansson PJ, Yamagishi T, Arvind A, Seebacher N, Gutierrez E, Stacy A, Maleki S, Sharp D, Sahni S, Richardson DR. (2015) Di-2-pyridylketone 4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone (Dp44mT) overcomes multidrug resistance by a novel mechanism involving the hijacking of lysosomal P-glycoprotein (Pgp). *J Biol Chem*, 290(15): 9588-603.



150. Pape VF, Toth S, Furedi A, Szebenyi K, Lovrics A, Szabo P, Wiese M, Szakacs G. (2016) Design, synthesis and biological evaluation of thiosemicarbazones, hydrazinobenzothiazoles and arylhydrazones as anticancer agents with a potential to overcome multidrug resistance. *Eur J Med Chem*, 117: 335-54.
151. Weksler B, Romero IA, Couraud PO. (2013) The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids Barriers CNS*, 10(1): 16.
152. Weksler BB, Subileau EA, Perriere N, Charneau P, Holloway K, Leveque M, Tricoire-Leignel H, Nicotra A, Bourdoulous S, Turowski P, Male DK, Roux F, Greenwood J, Romero IA, Couraud PO. (2005) Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J*, 19(13): 1872-4.
153. Elstrodt F, Hollestelle A, Nagel JH, Gorin M, Wasielewski M, van den Ouweland A, Merajver SD, Ethier SP, Schutte M. (2006) BRCA1 mutation analysis of 41 human breast cancer cell lines reveals three new deleterious mutants. *Cancer Res*, 66(1): 41-5.
154. Saal LH, Gruvberger-Saal SK, Persson C, Lovgren K, Jumppanen M, Staaf J, Jonsson G, Pires MM, Maurer M, Holm K, Koujak S, Subramaniam S, Vallon-Christersson J, Olsson H, Su T, Memeo L, Ludwig T, Ethier SP, Krogh M, Szabolcs M, Murty VV, Isola J, Hibshoosh H, Parsons R, Borg A. (2008) Recurrent gross mutations of the PTEN tumor suppressor gene in breast cancers with deficient DSB repair. *Nat Genet*, 40(1): 102-7.
155. O'Brien ME, Wigler N, Inbar M, Rosso R, Grischke E, Santoro A, Catane R, Kieback DG, Tomczak P, Ackland SP, Orlandi F, Mellars L, Alland L, Tandler C, Group CBCS. (2004) Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Ann Oncol*, 15(3): 440-9.
156. Lao J, Madani J, Puertolas T, Alvarez M, Hernandez A, Pazo-Cid R, Artal A, Anton Torres A. (2013) Liposomal Doxorubicin in the treatment of breast cancer patients: a review. *J Drug Deliv*, 2013: 456409.
157. Lorusso D, Di Stefano A, Carone V, Fagotti A, Pisconti S, Scambia G. (2007) Pegylated liposomal doxorubicin-related palmar-plantar erythrodysesthesia ('hand-foot' syndrome). *Ann Oncol*, 18(7): 1159-64.

158. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. (1999) Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 39: 361-98.
159. Garraway LA, Janne PA. (2012) Circumventing cancer drug resistance in the era of personalized medicine. *Cancer Discov*, 2(3): 214-26.
160. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res*, 11(7): 1156-66.
161. Kris MG, Natale RB, Herbst RS, Lynch TJ, Jr., Prager D, Belani CP, Schiller JH, Kelly K, Spiridonidis H, Sandler A, Albain KS, Cella D, Wolf MK, Averbuch SD, Ochs JJ, Kay AC. (2003) Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *JAMA*, 290(16): 2149-58.
162. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, Sunpaweravong P, Han B, Margono B, Ichinose Y, Nishiwaki Y, Ohe Y, Yang JJ, Chewaskulyong B, Jiang H, Duffield EL, Watkins CL, Armour AA, Fukuoka M. (2009) Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med*, 361(10): 947-57.
163. Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, Majem M, Lopez-Vivanco G, Isla D, Provencio M, Insa A, Massuti B, Gonzalez-Larriba JL, Paz-Ares L, Bover I, Garcia-Campelo R, Moreno MA, Catot S, Rolfo C, Reguart N, Palmero R, Sanchez JM, Bastus R, Mayo C, Bertran-Alamillo J, Molina MA, Sanchez JJ, Taron M, Spanish Lung Cancer G. (2009) Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med*, 361(10): 958-67.
164. Kelland LR. (2004) Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. *Eur J Cancer*, 40(6): 827-36.
165. Kerbel RS. (2003) Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved. *Cancer Biol Ther*, 2(4 Suppl 1): S134-9.
166. Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, Madhu B, Goldgraben MA, Caldwell ME, Allard D, Frese KK, Denicola G, Feig C, Combs C, Winter SP, Ireland-Zecchini H, Reichelt S, Howat WJ, Chang A, Dhara M, Wang L, Ruckert F, Grutzmann R, Pilarsky C, Izeradjene K, Hingorani

- SR, Huang P, Davies SE, Plunkett W, Egorin M, Hruban RH, Whitebread N, McGovern K, Adams J, Iacobuzio-Donahue C, Griffiths J, Tuveson DA. (2009) Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science*, 324(5933): 1457-61.
167. Singh M, Lima A, Molina R, Hamilton P, Clermont AC, Devasthali V, Thompson JD, Cheng JH, Bou Reslan H, Ho CC, Cao TC, Lee CV, Nannini MA, Fuh G, Carano RA, Koeppen H, Yu RX, Forrest WF, Plowman GD, Johnson L. (2010) Assessing therapeutic responses in Kras mutant cancers using genetically engineered mouse models. *Nat Biotechnol*, 28(6): 585-93.
168. Watters JW, Cheng C, Majumder PK, Wang R, Yalavarthi S, Meeske C, Kong L, Sun W, Lin J, Heyer J, Ware C, Winter C, Reilly JF, Demuth T, Clark S, Chiu MI, Robinson MO, Kohl N, Kannan K. (2009) De novo discovery of a gamma-secretase inhibitor response signature using a novel in vivo breast tumor model. *Cancer Res*, 69(23): 8949-57.
169. Zhou Y, Rideout WM, 3rd, Zi T, Bressel A, Reddypalli S, Rancourt R, Woo JK, Horner JW, Chin L, Chiu MI, Bosenberg M, Jacks T, Clark SC, Depinho RA, Robinson MO, Heyer J. (2010) Chimeric mouse tumor models reveal differences in pathway activation between ERBB family- and KRAS-dependent lung adenocarcinomas. *Nat Biotechnol*, 28(1): 71-8.
170. Zuber J, Radtke I, Pardee TS, Zhao Z, Rappaport AR, Luo W, McCurrach ME, Yang MM, Dolan ME, Kogan SC, Downing JR, Lowe SW. (2009) Mouse models of human AML accurately predict chemotherapy response. *Genes Dev*, 23(7): 877-89.
171. Libby E, Hromas R. (2010) Dismounting the MDR horse. *Blood*, 116(20): 4037-8.
172. Warr JR, Brewer F, Anderson M, Fergusson J. (1986) Verapamil hypersensitivity of vincristine resistant Chinese hamster ovary cell lines. *Cell Biol Int Rep*, 10(5): 389-99.
173. Karwatsky J, Lincoln MC, Georges E. (2003) A mechanism for P-glycoprotein-mediated apoptosis as revealed by verapamil hypersensitivity. *Biochemistry*, 42(42): 12163-73.

174. Laberge RM, Ambadipudi R, Georges E. (2009) P-glycoprotein (ABCB1) modulates collateral sensitivity of a multidrug resistant cell line to verapamil. *Arch Biochem Biophys*, 491(1-2): 53-60.
175. Hall MD, Salam NK, Hellowell JL, Fales HM, Kensler CB, Ludwig JA, Szakacs G, Hibbs DE, Gottesman MM. (2009) Synthesis, activity, and pharmacophore development for isatin-beta-thiosemicarbazones with selective activity toward multidrug-resistant cells. *J Med Chem*, 52(10): 3191-204.
176. Bell SE, Quinn DM, Kellett GL, Warr JR. (1998) 2-Deoxy-D-glucose preferentially kills multidrug-resistant human KB carcinoma cell lines by apoptosis. *Br J Cancer*, 78(11): 1464-70.
177. Alakhova DY, Rapoport NY, Batrakova EV, Timoshin AA, Li S, Nicholls D, Alakhov VY, Kabanov AV. (2010) Differential metabolic responses to pluronic in MDR and non-MDR cells: a novel pathway for chemosensitization of drug resistant cancers. *J Control Release*, 142(1): 89-100.
178. Kabanov AV, Batrakova EV, Alakhov VY. (2003) An essential relationship between ATP depletion and chemosensitizing activity of Pluronic block copolymers. *J Control Release*, 91(1-2): 75-83.
179. Batrakova EV, Li S, Elmquist WF, Miller DW, Alakhov VY, Kabanov AV. (2001) Mechanism of sensitization of MDR cancer cells by Pluronic block copolymers: Selective energy depletion. *Br J Cancer*, 85(12): 1987-97.
180. Hirsch P, Tang R, Marzac C, Perrot JY, Fava F, Bernard C, Jeziorowska D, Marie JP, Legrand O. (2012) Prognostic impact of high ABC transporter activity in 111 adult acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics when compared to FLT3, NPM1, CEBPA and BAALC. *Haematologica*, 97(2): 241-5.
181. Borst P, Jonkers J, Rottenberg S. (2007) What makes tumors multidrug resistant? *Cell Cycle*, 6(22): 2782-7.
182. Sparano JA, Makhson AN, Semiglazov VF, Tjulandin SA, Balashova OI, Bondarenko IN, Bogdanova NV, Manikhas GM, Oliynychenko GP, Chatikhine VA, Zhuang SH, Xiu L, Yuan Z, Rackoff WR. (2009) Pegylated liposomal doxorubicin plus docetaxel significantly improves time to progression without additive cardiotoxicity compared with docetaxel monotherapy in patients with advanced breast cancer previously treated with neoadjuvant-adjuvant

- anthracycline therapy: results from a randomized phase III study. *J Clin Oncol*, 27(27): 4522-9.
183. Perez AT, Domenech GH, Frankel C, Vogel CL. (2002) Pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) for metastatic breast cancer: the Cancer Research Network, Inc., experience. *Cancer Invest*, 20 Suppl 2: 22-9.
  184. Seynhaeve AL, Dicheva BM, Hoving S, Koning GA, ten Hagen TL. (2013) Intact Doxil is taken up intracellularly and released doxorubicin sequesters in the lysosome: evaluated by in vitro/in vivo live cell imaging. *J Control Release*, 172(1): 330-40.
  185. Gabizon AA, Patil Y, La-Beck NM. (2016) New insights and evolving role of pegylated liposomal doxorubicin in cancer therapy. *Drug Resist Updat*, 29: 90-106.
  186. Politi K, Pao W. (2011) How genetically engineered mouse tumor models provide insights into human cancers. *J Clin Oncol*, 29(16): 2273-81.
  187. Turner N, Tutt A, Ashworth A. (2004) Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer*, 4(10): 814-9.
  188. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, Bussaglia E, Prat J, Harkes IC, Repasky EA, Gabrielson E, Schutte M, Baylin SB, Herman JG. (2000) Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst*, 92(7): 564-9.
  189. Thompson ME, Jensen RA, Obermiller PS, Page DL, Holt JT. (1995) Decreased expression of BRCA1 accelerates growth and is often present during sporadic breast cancer progression. *Nat Genet*, 9(4): 444-50.
  190. Turner NC, Reis-Filho JS, Russell AM, Springall RJ, Ryder K, Steele D, Savage K, Gillett CE, Schmitt FC, Ashworth A, Tutt AN. (2007) BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene*, 26(14): 2126-32.
  191. Baldassarre G, Battista S, Belletti B, Thakur S, Pentimalli F, Trapasso F, Fedele M, Pierantoni G, Croce CM, Fusco A. (2003) Negative regulation of BRCA1 gene expression by HMGA1 proteins accounts for the reduced BRCA1 protein levels in sporadic breast carcinoma. *Mol Cell Biol*, 23(7): 2225-38.
  192. Pritchard CC, Mateo J, Walsh MF, De Sarkar N, Abida W, Beltran H, Garofalo A, Gulati R, Carreira S, Eeles R, Elemento O, Rubin MA, Robinson D, Lonigro

- R, Hussain M, Chinnaiyan A, Vinson J, Filipenko J, Garraway L, Taplin ME, AlDubayan S, Han GC, Beightol M, Morrissey C, Nghiem B, Cheng HH, Montgomery B, Walsh T, Casadei S, Berger M, Zhang L, Zehir A, Vijai J, Scher HI, Sawyers C, Schultz N, Kantoff PW, Solit D, Robson M, Van Allen EM, Offit K, de Bono J, Nelson PS. (2016) Inherited DNA-Repair Gene Mutations in Men with Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med*, 375(5): 443-53.
193. Imyanitov EN, Byrski T. (2013) Systemic treatment for hereditary cancers: a 2012 update. *Hered Cancer Clin Pract*, 11(1): 2.
194. Safra T, Borgato L, Nicoletto MO, Rolnitzky L, Pelles-Avraham S, Geva R, Donach ME, Curtin J, Novetsky A, Grenader T, Lai WC, Gabizon A, Boyd L, Muggia F. (2011) BRCA mutation status and determinant of outcome in women with recurrent epithelial ovarian cancer treated with pegylated liposomal doxorubicin. *Mol Cancer Ther*, 10(10): 2000-7.
195. Kaye SB, Lubinski J, Matulonis U, Ang JE, Gourley C, Karlan BY, Amnon A, Bell-McGuinn KM, Chen LM, Friedlander M, Safra T, Vergote I, Wickens M, Lowe ES, Carmichael J, Kaufman B. (2012) Phase II, open-label, randomized, multicenter study comparing the efficacy and safety of olaparib, a poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor, and pegylated liposomal doxorubicin in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer. *J Clin Oncol*, 30(4): 372-9.
196. Rottenberg S, Jaspers JE, Kersbergen A, van der Burg E, Nygren AO, Zander SA, Derksen PW, de Bruin M, Zevenhoven J, Lau A, Boulter R, Cranston A, O'Connor MJ, Martin NM, Borst P, Jonkers J. (2008) High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(44): 17079-84.
197. Mendes-Pereira AM, Martin SA, Brough R, McCarthy A, Taylor JR, Kim JS, Waldman T, Lord CJ, Ashworth A. (2009) Synthetic lethal targeting of PTEN mutant cells with PARP inhibitors. *EMBO Mol Med*, 1(6-7): 315-22.
198. Hill SJ, Clark AP, Silver DP, Livingston DM. (2014) BRCA1 pathway function in basal-like breast cancer cells. *Mol Cell Biol*, 34(20): 3828-42.
199. Al-Batran SE, Bischoff J, von Minckwitz G, Atmaca A, Kleeberg U, Meuthen I, Morack G, Lerbs W, Hecker D, Sehouli J, Knuth A, Jager E. (2006) The clinical

- benefit of pegylated liposomal doxorubicin in patients with metastatic breast cancer previously treated with conventional anthracyclines: a multicentre phase II trial. *Br J Cancer*, 94(11): 1615-20.
200. Al-Batran SE, Guntner M, Pauligk C, Scholz M, Chen R, Beiss B, Stopatschinskaja S, Lerbs W, Harbeck N, Jager E. (2010) Anthracycline rechallenge using pegylated liposomal doxorubicin in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis using individual data from four prospective trials. *Br J Cancer*, 103(10): 1518-23.
201. Palmieri C, Krell J, James CR, Harper-Wynne C, Misra V, Cleator S, Miles D. (2010) Rechallenging with anthracyclines and taxanes in metastatic breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 7(10): 561-74.

## 11. Saját publikációk jegyzéke

### 10.1 Dolgozat részét képező publikációk

*Veronika F.S. Pape, Szilárd Tóth, András Füredi, Kornélia Szabó, Anna Lovrics, Pál Szabó, Michael Wiese, Gergely Szakács: Design, synthesis and biological evaluation of thiosemicarbazones, hydrazinobenzothiazoles and arylhydrazones as anticancer agents with a potential to overcome multidrug resistance, European Journal of Medicinal Chemistry, 2016, 117:335-354*

*András Füredi, Szilárd Tóth, Kornélia Szabó, Veronika F.S. Pape, Dóra Türk, Nóra Kucsma, László Cervenák, József Tóvári and Gergely Szakács: Identification and validation of compounds selectively killing resistant cancer: delineating cell line specific effects from P-glycoprotein-induced toxicity, Molecular Cancer Therapeutics, 2017 Jan;16(1):45-56*

*András Füredi, Kornélia Szabó, Szilárd Tóth, Mihály Cserepes, Lilla Hámori, Veronika Nagy, Edina Karai, Tímea Imre, Pál Szabó, Dávid Szüts, József Tóvári, Gergely Szakács: Pegylated liposomal formulation of doxorubicin overcomes drug resistance in a genetically engineered mouse model of breast cancer, Journal of Controlled Release, 2017 Sep 10;261:287-296*

„**MDR-reversing 8-hydroxy-quinoline derivatives**” című és P1600234 alapszámú szabadalmi bejelentés (2016)

### 10.2 Dolgozatban nem szereplő publikációk

*Lóránd Kiss, Éva Hellinger, Ana-Maria Pilbat, Ágnes Kittel, Zsolt Török, András Füredi, Gergely Szakács, Szilvia Veszélka, Péter Sipos, Béla Ózsvári, László G. Puskás, Mónika Vastag, Piroska Szabó-Révész, Mária A. Deli: Sucrose esters increase drug penetration, but do not inhibit P-glycoprotein in Caco-2 intestinal epithelial cells, Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014, 103:3107-3119*



*Kornélia Szabó, András Füredi, Orsolya Kolacsek, Rózsa Csohány, Ágnes Prókai, Katalin Kis-Petik, Attila Szabó, Zsuzsanna Bősze, Balázs Bender, József Tóvári, Ágnes Enyedi, Tamás I. Orbán, Ágota Apáti, Balázs Sarkadi: Visualization of calcium dynamics in kidney proximal tubules, Journal of the American Society of Nephrology, 2015, 26:2731-2729*

*Kornélia Szabó, András Füredi, Orsolya Kolacsek, Enikő Pergel, Zsuzsanna Bősze, Balázs Bender, Péter Vajdovich, József Tóvári, László Homolya, Gergely Szakács, László Héja, Ágnes Enyedi, Balázs Sarkadi, Ágota Apáti, Tamás I. Orbán: Generation of a homozygous transgenic rat strain stably expressing a calcium sensor protein for direct examination of calcium signaling, Scientific Reports, 2015, 5:12645*

*Füredi András, Tóth Szilárd, Hámori Lilla, Nagy Veronika, Tóvári József, Szakács Gergely: Állatmodellek szerepe a multihormonális tumorokat célzó kemoterápia fejlesztésében, Magyar Onkológia, 2015, Vol. 59, Nr 4, 338-345*

*Zsolt Szabó, László Héja, Gergely Szalay, Orsolya Kékesi, András Füredi, Kornélia Szabó, Árpád Dobolyi, Tamás I. Orbán, Orsolya Kolacsek, Tamás Tompa, Zsombor Miskolczy, László Biczók, Balázs Rózsa, Balázs Sarkadi, Julianna Kardos: Extensive astrocyte synchronization advances neuronal coupling in slow wave activity in vivo, Scientific Reports, 2017 Jul 20;7(1):6018*

## 12. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném megköszönni szüleim, húgom és nagyszüleim segítségét és támogatását, ami végigkísérte eddigi pályámat. A tudomány és a munka iránt érzett szeretetemet egyértelműen tőlük „örököltem” és ezért mérhetetlenül hálás vagyok nekik.

Köszönettel tartozom Dr. Szebényi Kornéliának, „Nellinek”, aki nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre. Az ő hite, bizalma és szerelme volt a legfontosabb támaszom a doktori képzés évei alatt és igazából a vele közösen végzett projektek alatt váltam valódi kutatóvá. Csak remélni tudom, hogy én is annyit segítettem neki, mint amennyit ő nekem.

Köszönet illeti Dr. Szakács Gergelyt, aki témavezetőként irányította a munkámat az utóbbi években. Mellette értettem meg a „tudományos igényesség” kifejezés igazi jelentését és azt, hogy mennyire fontos nem csak mások, de a saját munkánkat is kritikusan szemlélni. Barátságunk sokkal gazdagított, de talán a legszebb emlékem a közös amszterdami villamosozás marad.

Köszönöm kollégámnak és harcostársamnak, Tóth Szilárdnak, azt a rengeteg segítséget, amit az együtt töltött évek alatt nyújtott nekem. Mérnöki precizitása és higgadtsága olyan attribútumok, melyekkel én nyilvánvalóan nem rendelkezem, de az, hogy ezeket néha „kölcsonadta” nekem eredményesebbé tette a munkámat. Köszönöm, hogy elviselte az örült ötleteimet (sőt néha még talán kedvét is lelte bennük!), és remélem, hogy ő is, legalább egy kicsit, élvezte közös munkánkat.

Hálás vagyok Dr. Türk Dórának, hogy bevezetett a laboratóriumi munka rejtelmeibe. Igazából a legtöbb módszert, amit mára naponta, rutinszerűen használok, tőle tanultam.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Tóvári Józsefnek, hogy a kezdetektől támogatta és segítette az állatkísérletes munkámat, és hogy olyan munkakörülményeket biztosított az állatházában, amelyek nélkül a dolgozatban használt GEM modellel folytatott munka komoly akadályokba ütközött volna.

Hatalmas köszönet illeti Bodrogi-Mayer Irént, Hídvégi Anitát és Tóth Annamáriát, az Országos Onkológiai Intézet munkatársait, akik nélkül az állatkísérletes munka nem valósulhatott volna meg. Az ő profizmusuk, segítőkészségük és szakértelmük

nélkülözhetetlen volt a legtöbb projektben, és nem csak azokban, amikre e dolgozat épül! Nem tudom eléggé megköszönni nekik a segítségüket.

Szeretném megköszönni Dr. Apáti Ágotának, Dr. Orbán Tamásnak és Dr. Sarkadi Balásznak, hogy bizalmukkal megtisztelve, bevontak a TransRat pályázat kísérletes munkáiba. Ebben a projektben tanultam meg milyen az igazi csapatmunka és találkoztam először az új felfedezésének semmihez sem hasonlítható, különleges élményével. A velük töltött idő nem csak tudományosan hasznos, de hihetetlenül szórakoztató is volt.

Köszönöm Dr. Uher Ferencnek, hogy lehetőséget biztosított rá, hogy rövid ideig vele dolgozhassak és belelássak a mesenchimális őssejtek izgalmas világába. Ez a munka inspirálta az új projektjeim jelentős részét is. Számomra a Tanár úr az igazi Tudós archetípusa.

Szeretném továbbá megköszönni a teljes Biomembrán-közösségnek az együtt töltött néha nehéz, néha szomorú, de mindig izgalmas és mindig szórakoztató éveket.

Végezetül szeretném kifejezni hálámat a Membrán fehérje Kutatócsoport minden korábbi és jelenlegi tagjának, akik segítettek, elviseltek, támogattak, megbocsátottak, kedveltek, untak, de mindenekelőtt mindig ott voltak, amikor szükségem volt rájuk. Tudásuk, kedvességük és intelligenciájuk az az alap, amire ez a munka valójában épült. Az utóbbi évek eredményeit nekik köszönhetem: Dr. Szabó Kornélia, Dr. Türk Dóra, Kucsma Nóra, Kurkó Ibolya, Hámori Lilla, Nagy Veronika, Veronika Pape, Windt Tímea, Dr. Lovrics Anna, Sessler Judit, Mohos Krisztina, Tóth Szilárd, Cserepes Mihály, Kiss Dániel és Dr. Szakács Gergely.