

MASARYKOVA UNIVERZITA

LÉKAŘSKÁ FAKULTA

**KONCEPTY LÉKAŘSKÉ FARMAKOLOGIE V ÉŘE
PERSONALIZOVANÉ MEDICÍNY A JEJICH IMPLIKACE PŘI
VÝUCE FARMAKOLOGIE V 21. STOLETÍ**

HABILITAČNÍ PRÁCE

komentovaný soubor prací

navazující na habilitační práci s názvem „Koncepty klinické farmakologie v éře
personalizované medicíny“ (LF UK Bratislava, 2015)

Brno 2017

doc. MUDr. Regina Demlová, Ph.D.

Poděkování

Děkuji všem svým kolegům a spolupracovníkům za vynikající týmovou spolupráci a podporu při výzkumné činnosti. Za cenné rady, spolupráci a podporu bych chtěla konkrétně poděkovat doc. MUDr. Daliboru Valíkovi, Ph.D., prof. MUDr. Jaroslavu Štěřbovi, Ph.D. a doc. RNDr. Lence Zdražilové Dubské, Ph.D. Za dlouhodobou podporu a oporu děkuji i své rodině. Za vytvoření příznivých pracovních podmínek děkuji rovněž prof. MUDr. Jiřímu Mayerovi, CSc. a vedení Lékařské fakulty MU v Brně a vedení Masarykova onkologického ústavu v čele s prof. MUDr. Janem Žaloudíkem, CSc.

OBSAH

ABSTRAKT (ČESKY)	1
ABSTRACT (ENGLISH)	2
2. PŘEDMLUVA	3
3. ZÁKLADNÍ FARMAKOLOGIE JAKO TEORETICKÁ NAUKA A KLINICKÁ FARMAKOLOGIE JAKO INTEGRATIVNÍ DISCIPLÍNA S PŘESAHEM DO VŠECH KLINICKÝCH OBORŮ	55
3.1 PŘEHLEDOVÁ ČÁST K PERSONALIZOVANÝM CÍLŮM VE FARMAKOTERAPII NÁDORŮ	9
3.1.1 PERSONALIZOVANÉ CÍLE V ONKOLOGII Z POHLEDU KLINICKÉ FARMAKOLOGIE A PREKLINICKÉM EXPERIMENTU	1010
3.1.1.1. VLASTNÍ PŘÍSPĚVEK K PROBLEMATICE KLINICKÉ ČÁSTI	1111
3.1.1.2. VLASTNÍ PŘÍSPĚVEK K PROBLEMATICE V PREKLINICKÉM EXPERIMENTU	1414
3.1.2 IMUNOLOGICKÉ ASPEKTY NÁDORŮ VE VZTAHU K PROTINÁDOROVÉ FARMAKOTERAPII	1515
3.1.2.1. VLASTNÍ PŘÍSPĚVEK K PROBLEMATICE V KLINICKÉ ČÁSTI	1616
3.1.2.2 VLASTNÍ PŘÍSPĚVEK K PROBLEMATICE V PREKLINICKÉM EXPERIMENTU	1818
3.1.3 PERSONALIZOVANÁ MEDICÍNA V KONTEXTU HODNOCENÍ ODPOVĚDI DLE „BIOMARKERŮ“ – ÚVOD K VÝZNAMU miRNA	211
3.1.3.1 VLASTNÍ PŘÍSPĚVEK K PROBLEMATICE miRNA V PREKLINICKÉM EXPERIMENTU	22
3.1.3.2. VLASTNÍ PŘÍSPĚVEK K PROBLEMATICE Z POHLEDU KLINICKÉ FARMAKOLOGIE	244
3.2 PŘEHLEDOVÁ ČÁST – ÚVOD K METABOLICKÉMU SYNDROMU A ENDOKRINOLOGICKÉMU STATUTU	2525
3.2.1 METABOLICKÝ SYNDROM, ZÁNĚT A NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ Z POHLEDU KLINICKÉ FARMAKOLOGIE	2626
3.2.2 METABOLICKÉ ZMĚNY A ROLE ADIPOKINŮ V PREKLINICKÉM EXPERIMENTU NA ZVÍŘETI	2626
3.2.2.1 VLASTNÍ PŘÍSPĚVEK K PROBLEMATICE V PREKLINICKÉM EXPERIMENTU	2828
4. IMPLIKACE PREKLINICKÝCH A KLINICKÝCH AKTIVIT PŘI VÝUCE LÉKAŘSKÉ FARMAKOLOGIE	30
4.1 PREGRADUÁLNÍ VÝUKA LÉKAŘSKÉ FARMAKOLOGIE	30

4.2	POSTRGRADUÁLNÍ VÝUKA LÉKAŘSKÉ FARMAKOLOGIE	34
5.	ZÁVĚR.....	3636
6.	REFERENCE.....	37
7.	SEZNAM KOMENTOVANÝCH PUBLIKACÍ.....	42
8.	PŘÍLOHY.....	44

ABSTRAKT (česky)

Habilitační práce doc. MUDr. Reginy Demlové, Ph.D. na téma „Koncepty lékařské farmakologie v éře personalizované medicíny a jejich implikace při výuce farmakologie ve 21. století“ je zpracována formou komentovaného souboru publikovaných vědeckých prací autorky z let 2015-2017 a habilitační práce v oboru Klinická farmakologie obhájené dne 18. 10. 2015 před VR LF UK v Bratislavě, která komentovala klinicko-výzkumné práce před rokem 2015 (práce je přílohou I).

Na počátku každé kapitoly je vždy uveden stručný přehled úvodu do problematiky a poté vlastní příspěvek autorky k dané problematice, ať již z hlediska klinické zkušenosti nebo preklinického výzkumu. Úvod habilitační práce nastoluje základní pohled na komplexnost oboru základní a aplikované klinické farmakologie a principy personalizované farmakoterapie v dnešní době. Hlavní část práce přináší informace o principech individualizované medicíny a uplatňování individualizovaného přístupu k pacientovi, definuje farmakologické cíle a vybrané biomarkery protinádorové farmakoterapie, věnuje se jejich genezi od objevu přes validaci až ke klinickým aplikacím. Dále komentuje přístup personalizované farmakoterapie ve vztahu k hostiteli, zejména imunologickým aspektům a roli zánětlivých procesů, které mohou doprovázet metabolický syndrom. Závěr práce se věnuje možné implementaci preklinického i klinického farmakologického výzkumu autorky do pregraduální i postgraduální výuky lékařské farmakologie.

ABSTRACT (English)

The habilitation (associate professorship) thesis of Regina Demlova on the topic "Pharmacological aspects of personalized medicine and their implications in pharmacology teaching" is comprised of a compendium of author's selected scientific papers published in the years 2015 – 2017 amended with interpretive comments and the habilitation thesis in the field of Clinical Pharmacology defended on October 18th 2015 at Faculty of Medicine of the Comenius university in Bratislava, which commented on clinical research and scientific papers published before 2015 (attached as an appendix I).

There is always a brief overview of the introduction to the issue at the beginning of each chapter and then the author's own contribution to the issue, whether in terms of clinical experience or preclinical research. The overall perspective of the complexity of the basic and applied clinical pharmacology and principles of personalized pharmacotherapy in everyday practice are outlined in the introductory part of the thesis. Major part of the thesis provides information on the principles of individualized medicine and use of the individualized approach to the patient, defines the pharmacological targets and selected biomarkers of anticancer pharmacotherapy, and pays attention to their genesis from discovery to validation and clinical applications. Host-approach of personalized pharmacotherapy, particularly immunological aspects and the role of inflammatory processes that may accompany metabolic syndrome, are discussed in the subsequent text. Last part of the thesis deals with the possible implementation of the preclinical and clinical pharmacological research of the author in the pregraduate and postgraduate teaching of medical pharmacology.

2. PŘEDMLUVA

Předkládanou habilitační práci v oboru „**Lékařská farmakologie**“ jsem vypracovala jako komentovaný soubor 13 prací se závěry a výstupy, které jsem pojala jako implementaci vlastních výzkumných preklinických poznatků a klinických zkušeností do pregraduální výuky oboru Lékařská farmakologie. Jedná se o práce, které byly publikovány v období od ukončení mého předchozího habilitačního řízení a komentovaný soubor je tvořen 9 full-texty, 3 Meeting Abstracts a 1 akademicky iniciovanou klinickou studií, přičemž 10 z předkládaných prací bylo publikováno v impaktovaných časopisech.

Předkládaná habilitační práce navazuje a rozšiřuje již obhájenou habilitační práci z roku 2015 na LF UK v Bratislavě. Ta se soustředila cíleně na komplexní rozpracování konceptu personalizované farmakoterapie v onkologii pohledem klinického farmakologa, a to ve třech základních oblastech zahrnujících personalizovaný výzkum léčiv a jeho zejména farmakogenetické aspekty, s tím související problematiku optimálního designu klinických hodnocení a farmakoekonomiku včetně dopadu na úhradové mechanismy léčiv. Práce byla předložena k obhajobě a obhájena v říjnu 2015 na LF UK v Bratislavě v rámci akreditovaného oboru „**Klinická farmakologie**“, tedy oboru, který **nebyl a není v současné chvíli akreditován pro habilitační a profesorská řízení** na žádné z lékařských fakult v České republice.

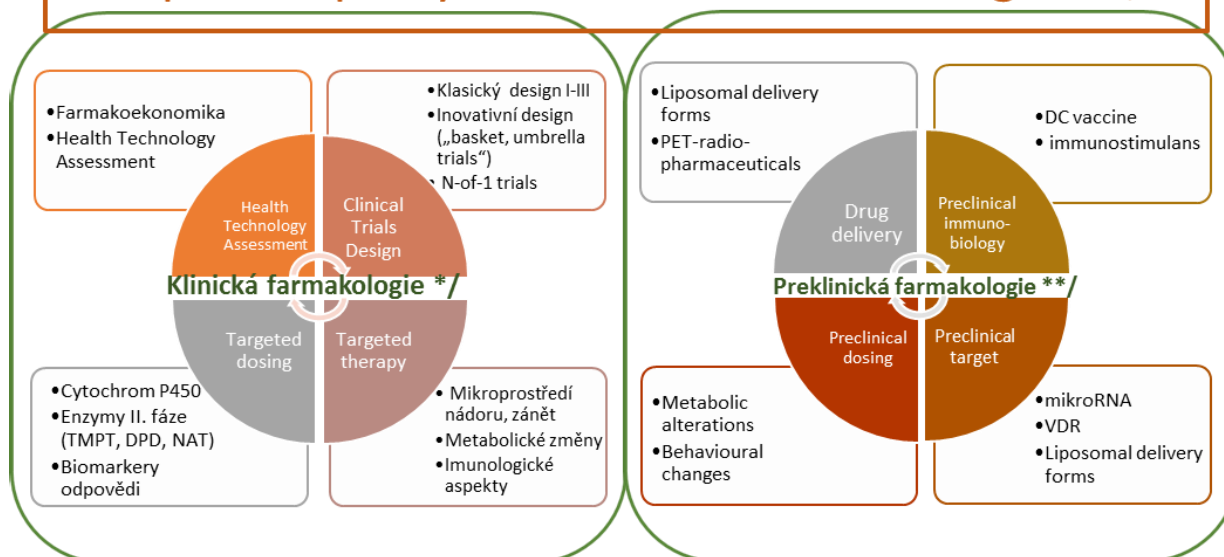
Spis, předkládaný k habilitačnímu řízení na LF MU v Brně, se již věnuje specifickým a rozšiřujícím výzkumným tématům z oblasti preklinické farmakologie v onkologii a psychofarmakologii a dále pak personalizaci protinádorové farmakoterapie ve vztahu k hostitelskému organizmu. Tento spis je potřeba vnímat jako celek, syntézu habilitační práce z roku 2015 (příloha I) a komentovaného souboru navazujících prací s cílovou snahou zasadit vlastní výzkumné aktivity v oblasti farmakologie do kontextu **výuky předmětu Lékařské farmakologie** na LF MU a představit tak inovativní komplexní pohled klinického farmakologa se zkušeností s preklinickým výzkumem i s dlouhodobou klinickou zkušeností na výuku farmakologie v době personalizované farmakoterapie, na kterou je nutno připravovat studenty již během studia medicíny.

Předmět Lékařská farmakologie je v současné době na LF MU vyučován v rámci pregraduálního studia všeobecného i zubního lékařství v 6. a 7. semestru studia. V souladu se stávající akreditací je věnován zejména pochopení základních principů farmakokinetiky a farmakodynamiky v rámci obecné farmakologie a dále pak mechanismům účinků jednotlivých lékových skupin v rámci studia speciální farmakologie.

Byť jsou tyto znalosti zásadní a nepodkročitelné zejména v preklinické části studia, tak si během svého působení ve vedení Farmakologického ústavu od roku 2011 stále významněji uvědomuji, že nám chybí systematictější výuka věnovaná aplikované klinické farmakologii a problémově orientované výuce farmakologie na příkladech personalizované farmakoterapie vybraných onemocnění. S farmakoterapií reálných pacientů se naši studenti setkávají samozřejmě v klinické části studia medicíny, kdy se jim v tomto směru dlouhodobě věnují kolegové, kliničtí lékaři, v jednotlivých oborech medicíny. Tato část patří a vždy bude patřit do curricula klinických oborů, nicméně i tak zůstává stále prostor pro modernější pojetí výuky oboru klinické farmakologie. S mírnou nadsázkou lze v obecné rovině říci, že **nám ve výuce chybí „simulace farmakoterapie“**. Tento model výuky, uplatňovaný v posledních letech zejména v anglosaských a skandinávských zemích a v zemích Beneluxu, jednoznačně přispívá k vyšší úrovni znalostí farmakologie a jejich aplikaci do reálné klinické farmakoterapie již v době studia medicíny.

Závěrečný výstup v předkládané habilitační práci ve smyslu implikací těchto poznatků při výuce Lékařské farmakologie zohledňuje práce publikované v obou spisech tak, aby byly obsaženy prvky jak preklinických, tak klinických výstupů ve výuce pregraduální, ale i postgraduální Lékařské farmakologie.

Implikace při výuce Lékařské farmakologie **/



*/Habilitační práce „Koncepty klinické farmakologie v éře personalizované medicíny“, LF UK Bratislava 2015

**/ Habilitační práce „Koncepty Lékařské farmakologie v éře personalizované medicíny a její implikace do výuky farmakologie v 21. století, Brno 2017

3. ZÁKLADNÍ FARMAKOLOGIE JAKO TEORETICKÁ NAUKA A KLINICKÁ FARMAKOLOGIE JAKO INTEGRATIVNÍ DISCIPLÍNA S PŘESAHEM DO VŠECH KLINICKÝCH OBORŮ

Historie farmakologie jako vědního oboru

Počátky **farmakologie** jako **exaktní samostatné vědy**, zabývající se pochopením účinků látek na lidský organismus, byly položeny přibližně v polovině 19. století. Za zakladatele experimentální farmakologie je považován profesor Rudolf Buchheim (1820 - 1879), který se stal zakladatelem a prvním profesorem Ústavu farmakologie na univerzitě v Dorpatu v Estonsku. Jeho žák, profesor Oswald Schmiedeberg (1838 - 1921), je pak považován za zakladatele moderní farmakologie. V roce 1872 se stal profesorem farmakologie na univerzitě ve Strassburgu, kde ve svých výzkumech mimo jiné prokázal, že „muskarinové účinky“ jsou srovnatelné s elektrickou stimulací *n. vagus* a svůj objev publikoval v *Outline of Pharmacology* v roce 1878. Mimo Evropu byla první katedra farmakologie založena ve Spojených státech na Michiganské univerzitě v roce 1890 pod vedením Johna Jacoba Abeleho, rovněž žáka prof. Schmiedeberga. Od těch dob se farmakologie stala živým, otevřeným oborem, který zaznamenal obrovský

rozmach, a to zejména ve 20. století s ohledem na rozvoj dalších vědních oborů, zejména organické chemie a biologie (1).

Jedním z příkladů té doby, který dokumentuje spolupráci na úrovni chemie, biochemie a farmakologie, je objev aspirinu, léku, který je stále jedním ze základních léčiv používaných v široké terapeutické praxi. Izolací salicinu byla připravena kyselina salicylová a z ní roku 1853 salicylan sodný. Ten však nebyl dobře snášen, působil zejména gastrointestinální obtíže a z tohoto důvodu jej nebylo možno pacientům dlouhodoběji podávat. V roce 1897 německý chemik Felix Hoffmann připravil esterifikovaný derivát kyseliny salicylové, následně jej podal několika pacientům s bolestmi kloubů a zaznamenal výborné terapeutické účinky, současně bez závažnějších nežádoucích účinků (2). Kyselina acetylsalicylová byla roku 1899 patentována pod obchodním jménem Aspirin.

Dalším zajímavým objevem, založeným na poznacích základního farmakologického výzkumu, byl objev β -sympatolytik. Teoretickým východiskem k objevu beta-blokátorů byl článek „A study of the adrenotropic receptors“ Američana Raymonda P. Ahlquista, který byl publikován v roce 1948 v časopise American Journal of Physiology. Ahlquist v něm popsal existenci dvou druhů adrenergických receptorů – α a β . Práce byla řadu let ignorována, než byla existence dvou druhů adrenergických receptorů potvrzena experimentálními studiemi C. E. Powela a I. H. Slatery ve výzkumných laboratořích farmaceutické firmy Eli Lilly při pokusech s bronchodilatancii, konkrétně s isoproterenolem. Definitivní potvrzení však přinesl až vývoj prvního beta-blokátoru v polovině 60. let minulého století. První beta-blokátor propranolol (Inderal) vyvinul v roce 1964 geniální britský klinický farmakolog James W. Black, který se snažil anulovat škodlivé účinky adrenalinu a noradrenalinu na srdce (3). Spolu s chemikem J. S. Stephansonem testovali v laboratořích dnes již neexistující farmaceutické firmy ICI řadu látek, než se jim podařilo vyvinout propranolol. Brzy poté bylo doloženo, že tato látka významně snižuje mortalitu a morbiditu nemocných s anginou pectoris. Nemocní léčení propranololem měli po třech letech čtyřikrát nižší mortalitu na infarkt myokardu než nemocní bez léčby (3). Později byly také prokázány prospěšné účinky v léčbě arytmií a hypertrofické kardiomyopatie. Tyto úspěchy stimulovaly další farmakologický výzkum β -adrenergických receptorů, vedly k objevu β_2 -receptorů v bronších a posléze k objevu selektivních β_2 -mimetik, která se stala důležitými bronchodilatancii.

Podstatné je také zmínit se o tom, že ani tehdejší Československo nezaostávalo ve výzkumu nových léčiv, přičemž nejvýznamnější a nejvyspělejší institucí v oblasti objevů a testování nových farmak byl u nás v letech 1951–1990 Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii (VÚFB) v Praze, kde byla vyvinuta celá řada léčiv, některých dodnes využívaných v klinické praxi (příkladem Kinedryl, Mesocain, Prothiaden, Valetol nebo jedním z tehdy nejvýznamnějších pak Trimepranol). V sedmdesátých letech byl také zahájen výzkumný program protinádorových léčiv v brněnské firmě LACHEMA. V lékopisné kvalitě byla zvládnuta purifikace platinového komplexu s následnou výrobou lyofilizovaných injekcí PLATIDIAM obsahujících cisplatinu. V roce 1981 byla úspěšně dokončena syntéza methotrexátu, obdobně tomu bylo i v případě antidota leukovorinu, které pak umožnilo zavedení vysokodávkové chemoterapie methotrexátem. Výzkumný tým v krátké době zvládl i syntézu dacarbazinu a tamoxifenu, jejichž léčivé formy úspěšně zavedl do výroby a registroval pro použití v klinické praxi (4).

Dá se asi obecně říci, že ke konci 20. století, v návaznosti na obrovský pokrok v oblasti genetiky a rozvoji molekulárně-diagnostických metod, se výzkum a vývoj nových léčiv přesouvá směrem k **biotechnologicky vyvíjeným léčivům**, které mají mnohem komplexnější strukturu, vyšší molekulovou hmotnost, odlišnou farmakokinetiku i farmakodynamické cíle. Současný trend vývoje nových léčiv je charakterizován zejména posunem od „jednodušších, chemicky definovaných molekul“ až k dnešní cílené léčbě a léčivým přípravkům pro moderní terapie, jako jsou somatobuněčná a genová terapie nebo produkty tkáňového inženýrství. Tento trend ve vývoji nových cílených léčiv sebou dnes ovšem přináší další výzvy, zejména vymezení jejich mnohem personalizovanějších indikací včetně specifických dávkování a dalších farmakologických principů. V tomto ohledu již farmakologie není pouze teoretickou exaktní vědou jako na svém začátku, ale **aplikovanou lékařskou disciplínou**, která vede k úspěšné farmakoterapii našich pacientů.

Klinická farmakologie a farmakoterapie v reálné klinické praxi

Farmakoterapie a preskripce léčivých přípravků je zásadní dovedností, s níž se ve své klinické praxi setkávají v podstatě všichni kliničtí lékaři. Farmakoterapie a léky jsou zdaleka nejčastější formou léčebné intervence, ale také nejčastější příčinou iatrogenního poškození pacientů. Obecně lze říci, že léčivých přípravků preskribovaných lékaři v každodenní reálné klinické praxi přibývá a orientovat se v portfoliu léčiv pro dané onemocnění, znát principy mechanismů účinků, jejich nežádoucí účinky a potenciál klinických interakcí je stále náročnější. Nesmírně se navýšil počet registrovaných léčiv, dnes jich máme už přes jedenáct tisíc, a ani farmakolog nemůže zvládnout znát všechny detailně. Navíc se rychle mění názvy léků, na trh se uvádí velký počet „generických“ léčiv a roli hraje i ekonomický tlak plátců péče. V tomto smyslu se v případě farmakologie již nejedná o vědu v užším slova smyslu, ale o translaci farmakologických poznatků do reálné klinické praxe. Je potřeba oprášit termín „účelné farmakoterapie“, což vnímám jako jedno z nejdůležitějších témat současné medicíny ve vztahu k farmakoterapii. Účelná farmakoterapie nikoliv tedy jako restriktivní a regulační prvek, nýbrž jako snaha o dosažení optimálního farmakoterapeutického zásahu přizpůsobeného konkrétnímu pacientovi nejen na základě diagnózy, ale i z hlediska jeho dalších chorob, souběžné medikace, věku nebo farmakogenetických variabilit.

Zde vidím také opětovně se objevivší prostor pro renesanci oboru **klinické farmakologie**, aplikované to lékařské disciplíny, která musí dbát na to, aby se v době personalizované medicíny a stále cílenějšího zásahu farmak nevytratily z farmakoterapie prvky komplexnosti a kontextu reálného pacienta v každodenní lékařské praxi. Každý klinický lékař se s farmakoterapií setkává, a musíme počítat s tím, že do budoucna budou kladeny stále větší nároky na znalosti lékařů a větší důraz jejich potřebu se dále vzdělávat i v postgraduálním studiu. Tomu všemu musí předcházet výuka na pregraduálním stupni vzdělávání na lékařských fakultách. Tento aspekt si také dovoluji sumarizovat ve 4. kapitole této habilitační práce s implikací vlastních preklinických i klinických farmakologických poznatků, které jsou detailněji diskutovány v kapitolách 3.1. a 3.2, do zejména pregraduální, ale i postgraduální výuky Lékařské farmakologie.

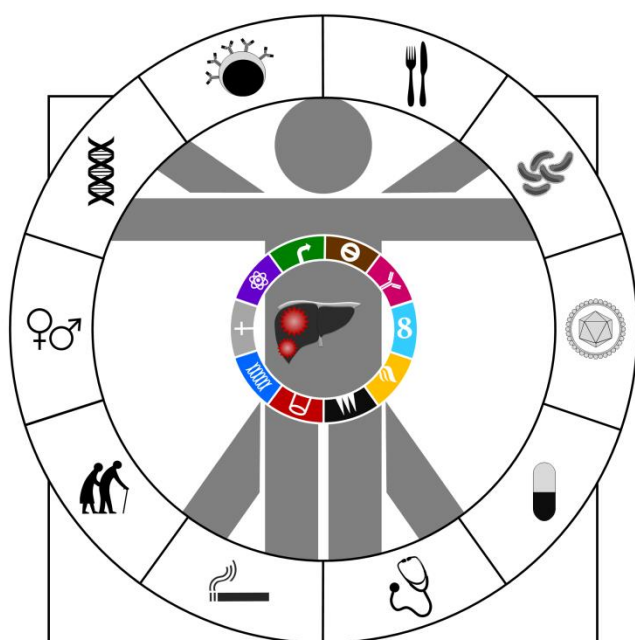
3.1 PŘEHLEDOVÁ ČÁST K PERSONALIZOVANÝM CÍLŮM VE FARMAKOTERAPII NÁDORŮ

V této části si dovolím navázat na část A 2.2. (Personalizovaná medicína jako „targeted therapy“) v habilitačním spisu z roku 2015, který se věnoval výhradně **klinicko-farmakologickému** pohledu na personalizaci farmakoterapie (samotný spis je přílohou č. I této habilitační práce). Zmínila jsem zde, že je možno definovat několik atributů ve vztahu k cílovým strukturám a charakteristickým znakům vlastního nádoru, které se spolupodílí na výsledném terapeutickém efektu. Jako zásadní však stále vnímám nutnost holistického pohledu na farmakoterapii, neb stále platí základní farmakologický postulát, že „personalizovaně“ musíme vnímat samozřejmě strukturu, na kterou lék působí – „target“, současně však nesmíme opomenout klíčový faktor hostitele – tedy jedince, kterému je léčivo podáváno se všemi jeho možnými specifiky včetně farmakogenetických a imunologických aspektů. V předloženém textu se budu dále věnovat farmakologickému pohledu na možné terapeutické cíle, ať již na úrovni receptoru nebo signální dráhy/drah, s komentářem vybraných publikací, které vznikly na základě vlastních preklinických experimentů nebo klinického výzkumu.

V souladu s široce citovanou prací Weinberga a Hanahana (5,6) lze identifikovat deset základních charakteristik nádorové buňky („hallmarks of cancer“), na něž lze v dnešní době farmakologicky cílit, jsou tedy farmakologicky ovlivnitelné. Jsou jimi autokrinní produkce růstových faktorů, necitlivost k regulaci růstu, únik imunitnímu dohledu organismu, neomezený replikační potenciál, zánětlivá reakce, prolongovaná angiogeneze, invazivita do tkání, metastazování, potlačená apoptóza a deregulace buněčného metabolismu. Na tomto místě si dovolím zopakovat, že personalizace farmakoterapie se nemůže omezit pouze na cílení „hallmarks of cancer“, kromě identifikace terapeutického cíle na úrovni receptoru nebo signální dráhy sehrávají ve farmakoterapii nádorových onemocnění současně roli i proměnné ve vztahu k nádorovému mikroprostředí a zejména k nositeli onemocnění, tedy pacientovi. Nelčíme nádor, nýbrž pacienta s nádorem, je tedy nutno vnímat i komplexnost systémových faktorů ze strany pacienta, jimiž jsou jeho věk, pohlaví, komorbidity a komedikace, lékové interakce, nutriční stav, mikrobiom a životní styl, „farmakogenom“, tj. individuální biotransformační kapacita a konečně imunitní výbava pacienta. Koncept personalizované medicíny je tedy potřeba vidět souvztažně „all in one“ – definování konceptu

personalizované medicíny buď jako „cílené terapie“ nebo „cíleného dávkování“ je bohužel obvyklou, ale nemedicínskou simplifikací problému (obr. 1, viz také habilitační spis 2015, 12-32).

Obr. 1: Koncept personalizované terapie v kontextu konkrétního pacienta (systémové faktory pacienta a základní znaky maligní buňky, upraveno a adaptováno dle Hanahan and Weinberg, 2011)



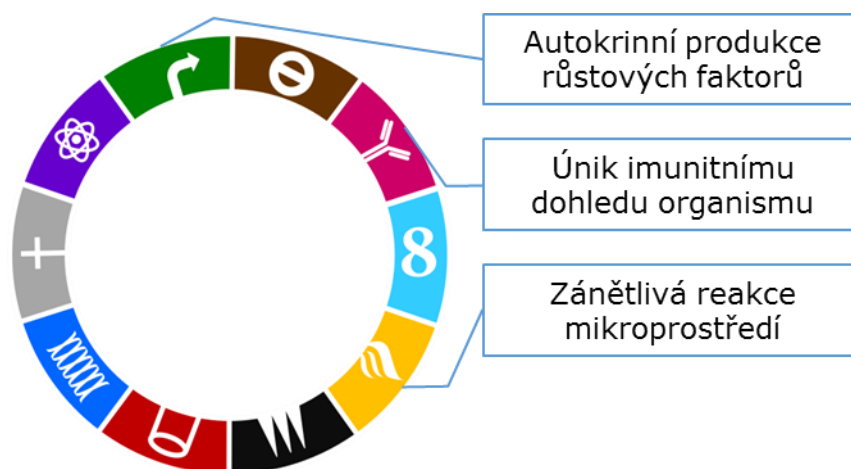
Základní znaky maligní buňky: autokrinní produkce růstových faktorů, necitlivost k regulaci růstu, únik imunitnímu dohledu organismu, neomezený replikační potenciál, zánětlivá reakce, prolongovaná angiogeneze, invazivita do tkání, metastazování, potlačená apoptóza a deregulace buněčného metabolismu

Systémové aspekty hostitele: věk, pohlaví, genom, komorbidity, komedikace, životní styl, nutriční stav, mikrobiom, infekce, imunitní výbava

3.1.1 PERSONALIZOVANÉ CÍLE V ONKOLOGII Z POHLEDU KLINICKÉ FARMAKOLOGIE A PREKLINICKÉM EXPERIMENTU

V rámci pokračujících výzkumných aktivit, a to jak klinických v rámci svého působení v Masarykově onkologickém ústavu, tak nověji i preklinických v rámci výzkumné skupiny Farmakologického ústavu LF MU, se snažíme postihnout některé vybrané aspekty personalizované farmakoterapie, zejména směrem k možnostem farmakologického ovlivnění receptorů/signálních drah pro epidermální růstový faktor (EGFR, Her-2 neu), výzkumné aktivity v oblasti imunobiologie nádorů a problematiku miRNA jako možného prediktivního biomarkeru personalizované farmakoterapie (obr. 2).

Obr. 2: možnosti farmakologického ovlivnění vybraných znaků maligní buňky (upraveno a adaptováno dle Hanahan and Weinberg, 2011)



3.1.1.1 VLASTNÍ PŘÍSPĚVEK K PROBLEMATICE KLINICKÉ ČÁSTI

Turjap M, Juřica J, Demlová R. Potential clinical benefit of therapeutic drug monitoring of imatinib in oncology (published in Klin Onkol. 2015; 28(2):105-111)

Duchnowska R, Sperinde J, Czartoryska-Arlukowicz B, Mysliwiec P, Winslow J, Radecka B, Petropoulos C, Demlova R. et al. Predictive value of quantitative HER2 and HER3 levels combined with downstream signaling markers in HER2-positive advanced breast cancer patients treated with lapatinib (Meeting Abstract SABSC San Antonio, US. Published in Cancer Research. 2017;77(Suppl.4): 2-05-21. IF 9,122)

Farmakologická léčiva s potenciálem ovlivňovat HER-2 receptor, ať již extracelulárně antagonisticky vazebného receptorového místa nebo intracelulárně inhibicí jeho tyrozinkinázové domény, jsou dnes stěžejní v léčbě Her-2 pozitivního karcinomu prsu. Jednou z látek, která prokázala v reálné klinické praxi zásadní klinický benefit ve smyslu prodloužení přežití, je **trastuzumab** (7). Trastuzumab antagonizuje receptor pro lidský epidermální faktor 2, který je součástí rodiny čtyř epidermálních receptorů ErbB. Po navázání ligandu na HER2 dochází k dimerizaci

a následné aktivaci kináz a spuštění rozdílných signálních cest, které mají za následek proliferaci, motilitu i indukci angiogeneze v nádorové tkáni. Aktivace HER2 vede cestou Ras-MAPK k buněčné proliferaci a inhibici apoptózy cestou PI3K-AKT-mTOR (savčí rapamycinový receptor)(8). Další látkou, která ovlivňuje signální dráhu spojenou s epidermálním receptorem, je **lapatinib**. Lapatinib je potentní a selektivní reverzibilní duální inhibitor receptorů ErbB-1 (EGFR, receptor pro epidermální růstový faktor) a ErbB-2 (HER2). Jedná se o perorálně účinné léčivo s malou molekulovou hmotností, které zasahuje na úrovni intracelulárně umístěné tyrozinkinázové domény obou receptorů, a to kompetitivní vazbou na vazebné místo pro makroergní fosfát ATP. Zabraňuje tak autofosforylaci tyrozinových zbytků intracelulární části receptoru a následné aktivaci signálních drah, jež hrají zásadní roli v buněčném růstu (9). Trastuzumab, společně s imatinibem níže, si dovolím zařadit mezi klinicky nejúspěšnější cílená léčiva. Máme možnost je v klinické praxi používat již více než 15 let, postupem času se stala zlatým standardem v léčbě indikovaných pacientů. Současně si dovolím přiřadit mezi tyto látky i selektivní modulátor estrogenového receptoru **tamoxifen**, byť mezi cílenými léčivy nebývá zmiňován. Z farmakologického hlediska se ovšem rovněž jedná o cílené léčivo s primárně antiestrogenní aktivitou, modulující cílové místo receptoru, exprimovaného pouze u hormonálně pozitivních nádorů prsu.

Další klinicky zásadně úspěšnou látkou je **imatinib**. Imatinib je perorální selektivní inhibitor tyrosinkinázy BCR-ABL, PDGFR-a i PDGFR-b a KIT. Jeho mechanismus účinku spočívá v kompetitivní inhibici aktivity výše zmíněných tyrosinkináz vazbou na místo určené pro adenosintrifosfát. S patologickou aktivitou kinázy ABL (spojenou s tvorbou fúzního genu BCR/ABL) je spojena chronická myeloidní leukemie (CML) a Ph+ akutní lymfoblastická leukemie (Ph+ ALL), v jejichž indikacích je úspěšně klinicky využíván (10). Imatinib je biotransformován cestou cytochromu P450, přičemž je známo množství významných lékových interakcí. Onkologičtí pacienti navíc často užívají současně množství dalších léčiv, zvyšujících pravděpodobnost takové interakce a svou roli může sehrávat i adherence k léčbě při dlouhodobém podávání. Režimy vycházející z fixního dávkování imatinibu nerespektují interindividuální rozdíly ve farmakokinetice léčiva a je možné, že někteří nemocní tak nedosahují dostatečných plazmatických koncentrací. Na základě evidence z klinických studií lze usuzovat, že existuje vztah mezi plazmatickými koncentracemi imatinibu a klinickou odpovědí (11). Imatinib se

proto jeví být vhodným kandidátem pro terapeutické monitorování jeho plazmatických koncentrací. Přehledový článek, který jsme publikovali v Klinické onkologii v roce 2015 (12), předkládá přehled o farmakokinetice, klinicky relevantních lékových interakcích, sumarizuje aktuální stav problematiky stanovení plazmatických koncentrací pro účely optimalizace terapie a dále popisuje možnosti, limity a návrhy pro terapeutické monitorování imatinibu, které chceme zavést v rámci činností klinicko-farmakologické jednotky Farmakologického ústavu LF MU.

Další klinicko-výzkumné studie v oblasti personalizované farmakoterapie se věnují problematice klinicky závažných korelací mezi expresí příslušných receptorů/aktivace signálních drah a celkového přežití při léčbě lapatinibem. Předchozí publikované studie studovaly úlohu genů regulovaných estrogením receptorem (ER) a receptory EGFR (13). Ve spolupráci s klinickými farmakology a onkology v rámci CEEOG (Central Eastern Europe Oncology Group) jsme publikovali výsledky studie zkoumající expresi receptorů ve vztahu k účinnosti lapatinibu (14). Hladiny exprese HER2 a HER3 byly kvantitativně měřeny za použití fluorescenčních metod, pro kvantifikaci hladin exprese HER2 proteinu byl použit test HERmark® (Monogram Biosciences, South San Francisco), exprese HER3 proteinu byla kvantifikována použitím technologie VeraTag® (Monogram Biosciences). Exprese „downstream“ signalizačních proteinů (ER, PTEN, Cyklin E, HIF-2alfa, p-p70S6K, p-AMPK a p-MAPK) byla stanovována imunohistochemicky. Všechny hodnocené biomarkery byly korelovány s celkovým přežitím (OS) pacientů léčených lapatinibem a kapecitabinem po progresi na trastuzumabu (n=191). Analýzy celkového přežití byly následně korelovány s expresí HER2 a HER3 za dodržení stratifikačních parametrů (klinické stadium, přítomnosti mozkových metastáz). Parametr celkového přežití byl signifikantně kratší u pacientů pod mezní hodnotou positivity testem HERmark® (HR=1,8, p=0,029), a u pacientů s vyššími mediánovými hladinami HER2 (HR=1,7, p=0,009). Zvýšený HER3 vykazoval trend ke korelaci s delším celkovým přežitím (HR=0,66/log; p=0,16), významněji u hormonálně negativních pacientek. Lze vyvozovat, že u těchto pacientek může sehrávat inhibice HER2 a aktivace HER3 významnější roli. Na základě výsledků lze usuzovat, že pacienti s mírně zvýšenou hladinou HER2 mohou mít lepší výsledky a klinicky lépe profitují z podávání lapatinibu po progresi trastuzumabu než ti, kteří mají vysokou expresi HER2. Tento názor podporuje také

nedávné publikované výsledky o menším přínosu lapatinibu u pacientů s vysokou expresí HER2 (15). Zdá se, že hladiny HER3 prognózu pacientů významně neovlivňují. Výsledky byly publikovány formou konferenčního abstraktu v prosinci 2016 v rámci San Antonio Breast Cancer Symposium a publikovány v Cancer Research 2017.

3.1.1.2 VLASTNÍ PŘÍSPĚVEK K PROBLEMATICE V PREKLINICKÉM EXPERIMENTU

Duchnowska R, Wysocki PJ, Korski K, Czartoryska-Arłukowicz B, Niwińska A, Orlikowska M, Radecka B, Studziński M, Demlova R at al. (CEEEOG). Immunohistochemical prediction of lapatinib efficacy in advanced HER2-positive breast cancer patients (published in Oncotarget. 2016; 7(1):550-564. IF 5,168)

Jak již bylo zmíněno výše, lapatinib inhibuje tyrozinkinázové domény receptorů ErbB-1 (EGFR, receptor pro epidermální růstový faktor) a ErbB-2 (HER2) na intracelulární úrovni (9). V rámci spolupráce s výzkumnou skupinou CEEEOG (Central Eastern Europe Oncology Group) na preklinickém výzkumu možných mechanismů vzniku rezistence při podávání lapatinibu, včetně možných interakcí signalizačních drah, jsme zkoumali expresi vybraných proteinů zapojených do signalizačních cest rodiny ErbB. Byla analyzována imunohistochemická exprese fosforylovaného proteinu aktivovaného adenosinmonofosfátem (p-AMPK), proteinkinázy aktivované mitogenem (p-MAPK), fosfo (p) -p70S6K, cyklin E, fosfatázy a tensinového homologu na 270 nádorových vzorcích. Následně byla získaná data korelována s klinickými údaji vývoje onemocnění (16). Exprese p-p70S6K byla nezávisle spojena s delším (HR 0,45, 95% CI:0,25-0,81, p=0,009) a cyklinem E s kratším přežitím bez známek onemocnění (HR 1,83, 95% CI:1,06-3,14, p=0,029). Exprese p-MAPK (HR 1,61, 95% CI:1,13-2,29, p=0,009) a cyklin E (HR 2,99, 95% CI:1,29-6,94, p=0,011) koreluje s kratším a exprese receptoru estrogenu HR 0,65, 95% CI:0,43-0,98, p=0,041) s delším celkovým přežitím. Exprese p-AMPK negativně ovlivnila odpověď na léčbu (HR 3,31; 95% CI:1,48-7,44; p=0,004) a kontrolu onemocnění (HR 3,07; 95% CI: 1,25-7,58; p=0,015). Z výsledků lze usuzovat na skutečnost, že účinnost lapatinibu souvisí rovněž s aktivitou dalších signálních drah - AMPK/mTOR a Ras/Raf /MAPK.

Pokračování v dalších výzkumných aktivitách zaměřených tímto směrem by mohl přispět k posouzení klinické užitečnosti kombinace lapatinibu s inhibitory MAPK, spolupráce v rámci CEEOG skupiny s naší účastí i nadále pokračuje.

3.1.2 IMUNOLOGICKÉ ASPEKTY NÁDORŮ VE VZTAHU K PROTINÁDOROVÉ FARMAKOTERAPII

Primárním úkolem imunitního systému je ochrana před cizorodými mikroorganismy a látkami z prostředí. Nádorové buňky vznikají z těla vlastních buněk, obecně jsou tak pouze slabě imunogenní a je zřejmé, že imunitní dozor organismu není schopen nádorovému bujení vždy zabránit. Je dokonce známo, že v prvních fázích vzniku nádoru nebo při jeho metastazování může vlastní produkce růstových faktorů nádorovým buňkám napomáhat v jejich růstu. Stimulace imunitního systému může být výraznější v případě nádorů spojených s infekcí onkogenními viry, případně tehdy, pokud nádor začne na svém povrchu produkovat změněné nebo nezvyklé molekuly, které imunitní buňky rozpoznávají jako cizí. Obecně pak hovoříme o imunogenních nádorech, mezi něž patří například maligní melanom, vznikající na kůži nebo sliznicích ze zhoubně přeměněných melanocytů buněk, které jsou v kůži nebo ve sliznici v jistém smyslu „cizorodé“. Nádorové antigeny jsou často buňkou prezentovány v komplexu s MHC I, což umožňuje rozeznání nádorové buňky cytotoxickým T-lymfocytům. Procesem fagocytózy je odumřelá nádorová buňka odstraněna, nádorové antigeny jsou vystaveny MHC II a může dojít ke stimulaci pomocných T-lymfocytů a protilátkové odpovědi. V rámci diskuse o existenci imunitního boje proti nádorovým buňkám je třeba zmínit teorii protinádorového dohledu, která rozlišuje tři odlišné úrovně v procesu boje imunitního systému proti nádorovým buňkám -eliminaci transformované buňky, ustanovení rovnováhy mezi transformovanou buňkou a organismem a únik transformované buňky před kontrolou imunitního systému. Ve většině případů je nádorová buňka v časných stádiích transformace rozpoznána a imunitním systémem zničena. Celý proces zde může skončit nebo přejít do dalších fází. Ve fázi ustanovení rovnováhy je hostitelský imunitní systém a přežívající nádorové buňky ve stadiu dynamické rovnováhy. Tato fáze rovnováhy je z oněch tří popsaných procesů nejdelší a klinicky se nejvíce shoduje s pre-neoplastickým stadiem, které rovněž zůstává nejčastěji nedignostikované. Poslední fáze je fáze úniku transformované buňky před kontrolou imunitním systémem, vzniká

imunoprotektivní nádorové mikroprostředí, dochází tak k růstu nádoru a jeho klinické manifestaci. Je nutno poznamenat, že svou roli sehrává i stav imunity nositele nádoru – pacienta, kdy celková imunosuprese pacienta přispívá ke vzniku imunosupresivního mikroprostředí protektivního pro nádorové buňky. Poznání, že nádory mohou aktivovat regulační mechanismy, které potlačují imunitní odpověď, vedla k novým nadějným imunoterapeutickým přístupům. Principem této strategie může být blokáda inhibičních signálů pro lymfocyty. Monoklonální protilátka proti CTLA-4 a protilátka proti receptoru/ligandu programované buněčné smrti (PD-(L)1) jsou již schváleny pro léčbu melanomu, v klinických studiích je celá řada dalších protilátek s obdobným farmakologickým mechanismem účinku (17). Do této kategorie nakonec můžeme zařadit i rituximab, jehož farmakologickým mechanismem účinku je indukce ADCC a CDC vedoucí k léčebné odpovědi. Dalšími ze způsobů, jak stimulovat protinádorovou imunitu, je například tzv. „adoptivní buněčná imunoterapie“ pomocí autologních dendritických buněk vystavených nádorovému antigenu a následné použití těchto dendritických buněk jako nádorově pulsní vakcíny (18). I tento přístup je v současnosti předmětem klinických studií včetně vlastní klinické studie LF MU fáze I/II (viz 3.1.2), data z interim-analýzy potvrzují bezpečnost protinádorové vakcíny, data o účinnosti jejich terapeutický přínos budou publikována až po závěrečné analýze klinické studie.

3.1.2.1 VLASTNÍ PŘÍSPĚVEK K PROBLEMATICE V KLINICKÉ ČÁSTI

Demlova R., Valik D., Obermannova R., Zdrzilova-Dubská L.
The safety of therapeutic monoclonal antibodies: implications for
cancer therapy including immuno-checkpoint inhibitors.
(published in Physiol Res. 2016; 65(Suppl.4):455-462. IF 1,461)

Bilek O, Bohovicova L, Demlova R, Poprach A, Lakomy R,
Zdrzilova-Dubská L. Non-Small Cell Lung Cancer-from
Immunobiology to Immunotherapy.
(published in Klin Onkol. 2016; 29(Suppl.4):78-87)

Léčba založená na monoklonálních protilátkách proti kontrolním bodům imunitní reakce je dnes považována za průlomovou metodu v onkologii. Výsledky s anti-

CTLA-4 (cytotoxický T-lymfocytární antigen-4) protilátkou ipilimumabem u pokročilého maligního melanomu znamenaly doslova revoluci v protinádorové imunoterapii a byly impulzem pro vývoj nových protilátek zaměřených na další kontrolní molekuly (tzv. „checkpoints“) (19,20). Z nich je nutné zmínit protilátky proti receptoru programované buněčné smrti (PD-1) – nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab a proti jeho ligandu (PD-L1) – BMS-936559 a MPDL3280A (atezolizumab) (21-25). Výhodou těchto léčiv je kromě jejich účinnosti také jejich potenciální „imunoterapeutická“ univerzálnost, což je zásadní pro široké využití u řady malignit. Vývoj a použití imunoterapie dosáhly zatím největších pokroků u pokročilého melanomu a nemalobuněčného karcinomu plic (26), v současnosti pak probíhá řada dalších klinických studií například u nádorů hlavy a krku, nádorů ledvin, uřetelálních karcinomů a řady dalších malignit.

Princip účinku „checkpoint“ inhibitorů (anti-CTLA-4, anti-PD-1 a anti-PD-L1 protilátek) spočívá v blokádě inhibičních receptorů na buňkách imunitního systému nebo nádoru, a tím prolomení tolerance imunitního systému vůči nádoru. Ipilimumab působí spíše na „centrální úrovni“ v orgánech lymfatického systému. Zde, po prezentaci antigenů dendritickými buňkami, blokádou inhibičního CTLA-4 receptoru, udržuje aktivaci T lymfocytů, ty pak putují do nádorové tkáně, kde plní svoji funkci. Protilátky bránící inhibiční interakci mezi PD-1 a PD-L1/L2 naopak sekundárně potencují efektorovou složku imunity „periferně“ přímo v nádorové tkáni. Prolomení tolerance vůči nádoru však může být doprovázeno i nežádoucím prolomením tolerance vůči „normálním tkáním“, což vede k vedlejším účinkům, které se svým charakterem blíží autoimunitním onemocněním – tzv. imunitně podmíněné vedlejší účinky (immune related adverse events, ir-AEs). Přehled nejčastějších ir-AEs, k nimž patří kožní toxicita (exantém, pruritus), GIT toxicita (průjem, kolitida), endokrinní toxicita (hypopituitarismus, hypofyzitida, hypotyreóza, insuficience nadledvin), jaterní toxicita (elevace transamináz, hepatitida), u anti-PD-1 protilátek pneumonitida, včetně managementu toxicit, jsme publikovali v přehledovém článku ve *Physiological Research* (27). Incidence ir-AEs je vyšší u ipilimumabu (v závislosti na dávce), ve srovnání s anti-PD-1/ PD-L1 protilátkami. Ještě vyšší je u kombinace ipilimumabu a nivolumabu. Vzhledem k vysoké četnosti ir-AEs s rizikem rozvoje život ohrožujících komplikací je nezbytná dostatečná edukace pacienta i odborných lékařů. Byla vypracována řada doporučení, jak při podezření na ir-AEs postupovat. Časně zahájení

imunosupresivní léčby kortikosteroidy je zásadním krokem ke zvládnutí příhody, snížení morbidity a případně i mortality. Pokud nejsou kortikoidy dostatečně účinné, přidávají se další imunosupresiva jako infliximab nebo mykofenolát mofetil. Úspěch ipilimumabu u pokročilého melanomu ukázal nové možnosti v léčbě nádorových onemocnění. Imunitně podmíněné vedlejší účinky a jejich vážné komplikace zpočátku vedly k velkým obavám a k rezervovanému postoji u řady onkologů. S postupným získáváním zkušeností však lze toxicitu řešit a při dodržování doporučených postupů je dnes léčba těmito léčiva bezpečná, respektive provázena nežádoucími účinky, které jsou terapeuticky zvládnutelné.

3.1.2.2 VLASTNÍ PŘÍSPĚVEK K PROBLEMATICE V PREKLINICKÉM EXPERIMENTU

Klinické hodnocení fáze I/II „Kombinovaná protinádorová terapie s ex vivo manipulovanými dendritickými buňkami produkujícími IL-12 u dětských, adolescentních a mladých dospělých pacientů s progredujícími, relabujícími nebo primárně metastatickými malignitami vysokého rizika“

EudraCT Number:2014-003388-39, zadavatel: LF MU, Farmakologický ústav, odpovědný řešitel LF MU doc. Demlová, Klinika dětské onkologie FN Brno, řešitel prof. Šterba

*Zdrzilova-Dubska L, Fedorova L, Pilatova K, Mudry P, Hlavackova E, Matoulkova E, Flajsarova L, **Demlova R**, Valik D, Sterba J. TKI pazopanib impaires immunostimulatory properties of monocytes: Implication for monocyte-derived DC-based anti-cancer vaccine preparation (Meeting Abstract, ESMO Immunology 2016. Published in Ann Oncol. 2016;27(Suppl.8):18P. IF 11,855)*

V rámci výzkumné činnosti ACIU (Advanced Cell Immunotherapy Unit) Farmakologického ústavu LF MU se se věnujeme výzkumu a vývoji vakcíny z dendritických buněk (DC vakcína). Takto vyvíjené léčivo somatobuněčné terapie patří mezi tzv. léčivé přípravky pro moderní terapie (ATMP – Advanced Therapy Medicinal Product), kategorie léčiv s významnou regulací na úrovni Evropské

lékové agentury (EMA – European Medicines Agency), a to včetně požadavků na provádění klinických studií a výrobu hodnoceného léčivého přípravku. Výroba DC vakcín se řídí správnou výrobní praxí dle GMP (The Rules Governing Medicinal Products in the European Union, Volume 4, Good Manufacturing Practice) a dozor nad výrobní činností provádí SÚKL (Státní ústav pro kontrolu léčiv). Lékařská fakulta Masarykovy univerzity v Brně je držitelem oprávnění k výrobě protinádorových vakcín z autologních dendritických buněk, což je v akademických podmínkách nejen v ČR výjimečný počin. V tomto bodě si dovoluji poděkovat vedení Lékařské fakulty MU v Brně za významnou podporu naší práce na poli somatobuněčných terapií.

Při vývoji a výrobě DC vakcíny se monocyty periferní krve pacientů vybraných pro imunoterapii získávají v průběhu leukaferézy. Z monocytů se pak připraví velké množství nezralých dendritických buněk v přítomnosti cytokinů GM-CSF a IL-4. Po pěti dnech dojde k diferenciaci monocytů v nezralé dendritické buňky. Další postup závisí na typu nádorového antigenu, který je pro imunoterapii zvažován. Kritickou podmínkou k zařazení do naší klinické studie (viz dále) je odběr vitální nádorové tkáně pacienta (při plánované operaci či reoperaci), která je zpracovávána spolu s autologně leukafereticky získanými leukocyty v čistých prostorách ACIU. Po pohlčení lyzátu nádorových buněk jsou následně dendritické buňky aktivovány a zralé dendritické buňky jsou poté jako protinádorová vakcína podány zpět pacientovi. Výše uvedené imunoterapeutické postupy jistě předpokládají adekvátní pre-existující imunitu a/nebo adekvátní funkci imunitního systému, kdy manipulace imunitního systému spočívá pouze v prezentaci nádorových antigenů v kontextu nespecifické stimulace imunitního systému. Léčivý přípravek je dále specifický tím, že obsahuje živé buňky, nemůže na svém konci projít procesem sterilizace a musí být vyráběn v tzv. čistých prostorách (ČP v kategorii nejvyšší čistoty A/B). Výstupní kontrola kvality DC vakcíny je zaměřena na imunobiologické vlastnosti léčivého přípravku (diferenciace do DC, maturace, schopnost produkovat aktivační cytokiny, schopnost stimulovat imunitní systém v MLR) a na ověření neinfekčnosti (sterilita, nepřítomnost *Mycoplasma* spp.).

Díky tomu, že se v rámci ACIU Farmakologického ústavu LF MU podařilo provést nutné preklinické experimenty a dokončení procesu validace, bylo možno přistoupit k zahájení akademicky iniciované klinické studie. Protokol klinického hodnocení byl schválen Státním ústavem pro kontrolu léčiv, studie je

spolufinancována ze zdrojů velké výzkumné infrastruktury CZECRIN (LM2015090), hodnoceným léčivým přípravkem (IMP) je pak vlastní autologní vakcína jako léčivý přípravek moderní somatobuněčné terapie. Studie s názvem „Kombinovaná protinádorová terapie s *ex vivo* manipulovanými dendritickými buňkami produkujícími interleukin-12 u dětských, adolescentních a mladých dospělých pacientů s progredujícími, relabujícími nebo primárně metastatickými malignitami vysokého rizika“ (EudraCT 2014-003388-39, KDO_DC1311) probíhá ve spolupráci s Fakultní nemocnicí Brno, konkrétně na pracovišti Kliniky dětské onkologie pod vedením prof. J. Štěrbý a hlavního řešitele prim. P. Múdrého, kde jsou i pacienti v rámci klinického hodnocení léčeni. Primárním cílem studie je prokázání bezpečnosti, sekundárním cílem pak získání pilotních dat o předběžné účinnosti.

Součástí sledování pacientů v klinickém hodnocení KDO_DC1311 je i podrobný imunomonitoring cirkulujících elementů periferní krve. Imunomonitoring, který byl navržen doc. L. Zdražilovou-Dubskou (viz také její habilitační práce *Imunobiologické aspekty nádorových onemocnění*, Brno 2016), z našeho výzkumného týmu, zahrnuje kvantitativní stanovení MDSC (myeloid-derived stem cells); T-reg; subpopulaci monocytů; maturační a aktivační subsety T-lymfocytů a subsety T-lymfocytů dle exprese ICOS, PD-1, Tim-3; NK-buňky a NKT-like buňky včetně aktivačních znaků; $\gamma\delta$ T-lymfocyty včetně subsetů a exprese NKG2D. V rámci interim-analýz (první proběhla po léčbě 5. a druhá po léčbě 10. pacienta léčených dle protokolu klinické studie) vyvstává postupně řada dalších výzkumných otázek ve vztahu DC vakcíny, stavu pacienta ve smyslu jeho preexistující imunity, souběžné onkologické terapie včetně analýzy konkrétních léčiv, které mohou s imunoterapií interferovat. Jedním z těchto léčiv je u dětí „off-label“ podávaný pazopanib. Jedná se o malou molekulu, tyrozinkinázový inhibitor receptorů EGF, PDGF a c-kit, což umožňuje jeho protinádorovou aktivitu zásahem signální trasy pro neoangiogenezi. V klinických studiích u dospělých pacientů prokázal účinnost u metastazujícího světlobuněčného karcinomu ledviny a je registrován k léčbě 1. linie u nepředléčených pacientů a ve 2. linii po selhání cytokinů. Jak jsem zmínila výše, je podáván cíleně v režimu „off-label“ i u dětských onkologických pacientů. K posouzení vlivu pazopanibu na biologické funkce monocytů jsme analyzovali periferní krev dětských pacientů léčených pazopanibem a současně zařazených do klinické studie s DC vakcínou. Byla

kvantifikována exprese povrchových a intracelulárních molekul, přičemž dvě z osmi vakcín na bázi DC nesplnily imunobiologická „quality-control“ kritéria, jako je exprese kostimulační molekuly a produkce IL-12 a nevykazovaly žádnou stimulační schopnost vůči autologním T-lymfocytům. Monocyty vystavené pazopanibu měly zvýšenou expresi CD64 a inhibiční molekulové ILT3, vykazovaly zhoršené imunobiologické vlastnosti relevantní pro DC stimulační funkce. Tyto výsledky jsme zveřejnili formou konferenčního abstraktu v rámci ESMO Immuno-Oncology Symposia v Lausanne s publikací v *Annals of Oncology* 2016 (28).

3.1.3 PERSONALIZOVANÁ MEDICÍNA V KONTEXTU HODNOCENÍ ODPOVĚDI DLE „BIOMARKERŮ“ – ÚVOD K VÝZNAMU miRNA

Studium farmakogenetiky a designování farmakogenetických studií přináší problémy při zkoumání takových jevů, jako jsou normální či abnormální reakce osoby na daný podnět. Důležitým přístupem, jak možno řešit obdobné problémy, je stanovování cílových parametrů biochemické a/nebo genetické povahy, které mohou být měřeny v krátkých časových intervalech. Při návrhu vhodného biomarkeru je potřeba, aby byl dostatečně selektivní vůči sledovanému jevu, měřitelný v dobře dostupném biologickém materiálu a měla by u něj existovat minimální pravděpodobnost spontánní změny. Používaný biomarker by tak mohl být využit jako minimálně invazivní a nenákladný diagnostický test k určení fenotypu jedince a určení, zda je daný fenotypový znak determinován geneticky nebo vyvolán působením exogenních anebo endogenních vlivů. V onkologii jsme schopni využít biomarkerů k uplatnění možností individualizované medicíny ve všech oblastech zdravotní péče: v prevenci (identifikace osob a populací se zvýšeným rizikem vzniku nádorových onemocnění), v diagnostice (diagnostika a staging nádorů, diagnostika toxicity léčby) i v léčbě (individualizace protinádorové léčby na základě rozsahu a fenotypu nádorového onemocnění a prognózy pacienta). V tomto kontextu vhodných diagnostických, prediktivních a prognostických biomarkerů je v posledním desetiletí živě diskutována role miRNA. MikroRNA (miRNA) tvoří velkou skupinu krátkých nekódujících RNA posttranskripčně regulujících genovou expresi. Schopnost miRNA inhibovat translaci onkogenů a nádorových supresorů dává předpoklad jejich zapojení do procesů kancerogeneze, související se samotným vznikem nádorové buňky. Intenzivní výzkum v oblasti biogeneze a biologických funkcí miRNA přináší také poznatky,

že miRNA sehrává svou úlohu nejen v oblasti nádorové biologie, ale také v oblasti diagnostické a prediktivní onkologie. Analýza expresních profilů miRNA je proto stále častěji využívána pro účely molekulární diagnostiky nádorových onemocnění, analogicky, jako je tomu u studií založených na DNA čipech a profilování kódujících transkriptů. V kontextu publikovaných studií lze také usuzovat na schopnost vybraných miRNA sloužit jako tkáňové prognostické a prediktivní markery a potenciální terapeutické cíle, zejména u kolorektálního karcinomu, renálního karcinomu a glioblastomu.

3.1.3.1 VLASTNÍ PŘÍSPĚVEK K PROBLEMATICE miRNA V PREKLINICKÉM EXPERIMENTU

Merhautová J, Vychytilová-Faltejsková P, Demlová R, Slabý O. Systemic administration of miRNA mimics by liposomal delivery system in animal model of colorectal carcinoma (published in Physiol Res. 2016; 65(Suppl.4):481-488. IF 1,461)

Merhautova J, Demlova R, Slaby O. MicroRNA-Based Therapy in Animal Models of Selected Gastrointestinal Cancers (published in Front Pharmacol. 2016;7(329):1-21. IF 4,4)

V rámci preklinické výzkumné skupiny Farmakologického ústavu LF MU a ve spolupráci s výzkumnou skupinou Molekulární onkologie II – solidní nádory CEITEC vedenou doc. RNDr. O. Slabým, Ph.D., jsme se věnovali translaci *in vitro* testů studujících vybrané miRNA v *in vivo* podmínkách experimentu na zvířeti. MiR-215 je rozpoznáným nádorovým supresorem u kolorektálního karcinomu (CRC). Její biologické účinky a molekulární cíle byly studovány v široké škále *in vitro* testů na buněčných liniích odvozených od CRC a v rámci těchto experimentů byly skupinou doc. Slabého potvrzeny její tumorově supresorové účinky (29). Vzhledem k hypotetickému terapeutickému potenciálu bylo překročeno k pokračování výzkumu *in vivo*. Cílem našich experimentů s pomocí animálních modelů solidních nádorů bylo zejména ověření hypotézy, zda má podávání inhibitorů/prekurzorů terapeutický potenciál včetně jejich farmakologických charakteristik. Pracovní hypotéza pracovala s úvahou navýšení hladin miR-215 v nádorových buňkách a hodnocení tohoto vlivu na změnu jejich fenotypu především ve smyslu snížení

proliferace *in vivo*. V testu tumorigenicity se prokázalo, že stabilně transfekovaná linie HCT-116^{+/+} s navýšenou expresí miR-215 proliferuje výrazně pomaleji, což se odrazilo na rozdílu objemu tumorů ve srovnání s kontrolní linií. Díky pozitivním výsledkům této studie jsme přistoupili k uspořádání navazujícího experimentu s modelací eventuálního terapeutického podání u člověka. Pro systémové podání miRNA *mimics* byl zvolen intravenózní přístup a léková forma liposomů, která byla již několikrát pro dopravení miRNA *mimics* do tumoru použita (30,31). Z hlediska orgánové distribuce jsme zaznamenali signifikantně zvýšenou expresi v plicích zvířat. Výsledky této studie tak podporují hypotézu plicní akumulace liposomů vytvořených z emulze neutrálních lipidů. Ačkoli se část dávky do tumoru dostala, nebyla dostatečná k tomu, aby se projevil významný tumorově supresorový účinek. Vzhledem k tomu nedošlo ani ke změnám v růstu tumorů, což je velmi pravděpodobně způsobeno zvolenou lékovou formou, kdy liposomy v dostatečném množství neprostupují do nádorové tkáně, ale akumulují se jinde v organismu. Všechny inovativní nosiče léčiv se musí vypořádat s interakcemi s plazmatickými proteiny, s vychytáváním RES a dalšími procesy, které vedou k jejich eliminaci. S přihlédnutím k našim výsledkům lze tedy usuzovat, že NLE liposomy se kumulují v plicní tkáni a byly by tak vhodným nosičem léčiv pro plicní onemocnění. Výsledky byly publikovány v roce 2016 ve *Physiological Research* (32). Využití NLE liposomů pro dopravu miRNA *mimics* do nádorů střeva tak bude nutné buď podstatným způsobem optimalizovat (dávka, způsob podání, typ animálního modelu), nebo opustit jako slepou uličku a pokusit se vybrat vhodnější nosič, kdy je v plánu *in vitro* a *in vivo* testování nanočástice oxidu železnato-železitého (SPIONs) potažené chitosanem. O této problematice jsme rovněž publikovali přehledový článek, zaměřený na mapování dostupných informací o farmakokinetice a toxicitě terapie založené na miRNA, včetně informací o použitém zvířecím modelu, farmakologických aspektech (chemie oligonukleotidů, systém dodávání, dávkování, cesta podání) a toxikologickém hodnocení (33).

3.1.3.2 VLASTNÍ PŘÍSPĚVEK K PROBLEMATICE Z POHLEDU KLINICKÉ FARMAKOLOGIE

*Merhautova J, Hezova R, Poprach A, Kovarikova A, Radova A, Svoboda M, Vyzula R, **Demlova R**, Slaby O. miR-155 and miR-484 Are Associated with Time to Progression in Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated with Sunitinib (published in Biomed Res Int. 2015; ID941980. IF 2,476)*

*Merhautova J, Hezova R, Poprach A, Svoboda M, **Demlova R**, Slaby O. MiRNA associated with time to progression in metastatic renal cell carcinoma patients treated with sunitinib (Meeting Abstract, European Cancer Congress 2015. Published in Eur J Cancer. Sep 2015;51(Suppl.3): S505. IF 6,029)*

Klinicky orientovaná studie si stanovila jako primární cíl korelaci miRNA-biomarkerů predikujících odpověď na léčbu sunitinibem u renálního karcinomu. Studie byla navržena jako retrospektivní biomarkerová klinická studie a její protokol včetně Informovaného souhlasu schválila Etická komise Masarykova onkologického ústavu (MOÚ). Jednalo se o pacienty Masarykova onkologického ústavu, kde v rámci působení výzkumné skupiny Farmakologického ústavu LF MU na Oddělení klinických hodnocení analyzujeme klinická data pacientů. Sunitinib patří mezi tzv. „small drugs“, látky s malou molekulovou hmotností, jehož farmakologickým mechanismem účinku je inhibice tyrozinkináz receptorů pro růstový faktor z destiček (PDGFR-a a PDGFR-b), receptorů pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGFR-1, VEGFR-2 a VEGFR-3) a receptorů faktoru kmenových buněk (cKit). Primární indikací je metastazující karcinom ledviny, přičemž klinickým problémem je vývoj rezistence na léčivo s následným selháním léčby a progresí onemocnění. Vývoj rezistence je jistě multifaktoriální, roli mohou sehrávat jak farmakokinetické (hladina léčiva v krvi, aktivní metabolit SU012662), tak farmakodynamické faktory související s cílovým místem v nádorové buňce. Jedním z uvažovaných faktorů může být také role miRNA, kterou jsme v naší studii hodnotili ve vztahu k léčebné odpovědi na sunitinib. Retrospektivně jsme analyzovali nádorovou tkáň pacientů léčených sunitinibem a provedli korelaci ve vztahu k vybraným miRNA (miR-155, miR-374-5p, miR324-3p, miR-484, miR-

302c a miR-888) ve vzorcích nádorových tkání. Kaplanova-Meierova analýza prokázala, že dvě z vybraného souboru miRNA signifikantně korelují s časem do progresu onemocnění, a to miR-155 (medián TTP 5,8 vs. 12,8 měsíců, $p < 0,01$) a miR-484 (5,8 vs. 8,9 měsíců, $p < 0,05$). U ostatních miRNA nebylo dosaženo statisticky významného rozdílu. Stratifikace pacientů na základě analýzy miRNA by umožnila personalizovanější přístup při léčbě metastatického karcinomu ledvinových buněk. Výsledky byly publikovány v roce 2015 v Biomedical Research a v rámci konferenčního abstraktu v European Journal of Cancer (34,35).

3.2 PŘEHLEDOVÁ ČÁST – ÚVOD K METABOLICKÉMU SYNDROMU A ENDOKRINOLOGICKÉMU STATUTU

Metabolický syndrom je dnes široce diskutován jako jeden z velkých medicínských i ekonomických problémů současné doby svázaný s životním stylem ve vyspělých zemích. Je považován za jeden z nejvýznamnějších rizikových faktorů vzniku kardiovaskulárních onemocnění a diabetu mellitu 2. typu, stále častěji je také zmiňována jeho možná role ve vztahu k nádorovým onemocněním. Kombinace dyslipidemie, obezity, arteriální hypertenze, inzulinové rezistence a dalších složek jednoznačně zvyšuje riziko následných zdravotních komplikací.

Předpokládá se, že etiopatogenetický mechanismus řady složek metabolického syndromu je společný a souvisí s tukovou tkání. Je známo, že tuková tkáň není složena pouze z diferencovaných adipocytů, na její stavbě se podílí mnoho dalších druhů buněk, jako jsou endotelie, fibroblasty, myocyty, nediferencované adipocyty (preadipocyty) a imunokompetentní buňky, zejména monocyty a lymfocyty (36). Je aktivním sekrečním orgánem produkujícím řadu látek s autokrinním, parakrinním nebo endokrinním účinkem. Za patofyziologický podklad metabolického syndromu je obecně považována inzulinová rezistence, důležitou roli sehrává také dysfunkce tukové tkáně a dysregulace imunitního systému vedoucí k akumulaci makrofágů stimulujících chronický zánět tukové tkáně. Adipocyty, makrofágy a další součásti tukové tkáně produkují ve zvýšené míře prozánětlivé působky (např. TNF-alfa, IL-6) a některé hormony tukové tkáně, nazývané souhrnně adipokiny (37,38). Mezi nejznámější popsané adipokiny patří leptin, adiponektin nebo visfatin. V periferních tkáních pak dochází ke změnám na subcelulární úrovni, poruchám signalizační kaskády inzulinového receptoru, což může přispívat k rozvoji inzulinové rezistence.

3.2.1 METABOLICKÝ SYNDROM, ZÁNĚT A NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ Z POHLEDU KLINICKÉ FARMAKOLOGIE

V souvislosti s inzulínovou rezistencí, obezitou nebo aterosklerózou se nyní mluví o chronickém zánětlivém stavu nebo metabolicky indukovaném zánětu (39). Chronický zánět je, jak bylo diskutováno již v rámci habilitační práce 2015 (příloha č. 1), jedním z faktorů, které se mohou spolupodílet na vzniku a rozvoji nádorových onemocnění. Působení TNF-alfa je spojeno s chronickým zánětem a podporuje nádorovou angiogenezi a metastazování (40). K metabolizaci a proliferaci maligní buňky přispívá také dostupnost lipidů a dalších makromolekul a inzulínová signalizace. Inzulin, IGF-1, IGF-2 jsou ligandy povrchových receptorů (INSR, IGF1R, IGF2R), jejich aktivace vede k posílení signální transdukce, buněčné proliferaci a inhibici apoptózy (41). Kromě dysfunkce tukové tkáně a dysregulace imunitního systému ve vztahu k zánětu hraje u nádorových onemocnění roli celkový endokrinologický statut pacienta (42). Všechny tyto aspekty je nutno vidět opět souvztažně, s čímž se pojí i systémový pohled na možné ovlivnění metabolického syndromu a jeho komponent včetně možné prevence a ovlivnění průběhu nádorových onemocnění.

3.2.2 METABOLICKÉ ZMĚNY A ROLE ADIPOKINŮ V PREKLINICKÉM EXPERIMENTU NA ZVÍŘETI

Kromě všech výše uvedených možných aspektů uvedených v kapitole 3.2.1 je v současné době diskutována i možná souvislost metabolického syndromu s některými psychiatrickými poruchami, zejména u schizofrenie a deprese. Intenzivně se studuje hypotéza, že samotná patofyziologie schizofrenie je spojena s rozvojem metabolického syndromu, preklinický výzkum naznačuje společný základ subchronického zánětu a dysbalanci sekrece adipokinů. Tyto patofyziologické predispozice pro rozvoj složek metabolického syndromu mohou být dále zhoršovány souběžným podáváním farmakoterapie schizofrenickým pacientům. I samotná psychofarmaka, jako například modernější antipsychotika 2. a 3. generace, přináší vedle vyšší účinnosti a lepší snášenlivosti i významné nežádoucí metabolické účinky.

Antipsychotika 2. generace můžeme rozdělit do 3 skupin podle mechanismu jejich účinku: 1) selektivní antagonisté dopaminových (D2/D3) receptorů: amisulprid, 2) SDA-serotoninoví, dopaminoví a alfa-1 antagonisté: risperidon, ziprasidon, sertindol, 3) MARTA - multireceptoroví antagonisté: klozapin, olanzapin, quetiapin, zotepin. Selektivní antagonisté dopaminových D2/D3 receptorů neovlivňují jiné neurotransmitterové systémy. Nežádoucí účinky jsou v této skupině antipsychotik vázány výhradně na dopaminový systém, není přítomna nadměrná sedace, somnolence, zvyšování hmotnosti nebo anticholinergní příznaky. SDA (Serotonin and Dopamine Antagonists) antipsychotika blokují významně více serotoninové S2 receptory než dopaminová D2 zakončení a v závislosti na léčivu různě intenzivně i adrenalinová alfa-1 zakončení. Ze skupiny SDA je prvou volbou risperidon, druhou volbou ziprasidon, zejména vzhledem k určitému riziku prodloužení QT intervalu, byť není jednoznačná klinická relevance. Ziprasidon by proto neměl být podáván kardiakům, je naopak vhodný pro obézní nemocné, protože nezvyšuje hmotnost, obdobně jako antipsychotikum třetí generace, aripiprazol. MARTA (Multi-Acting Receptor Targeted Agents) antipsychotika ovlivňují jak dopaminový, tak serotoninový, adrenalinový, histaminový a muskarinový systém. Jejich vazba na D2 zakončení je extrastriálně selektivní s výjimkou zotepinu, s nízkou (klozapin, quetiapin) až středně vysokou (olanzapin, zotepin) obsazeností D2 receptorů. Blokáda serotoninových S2 receptorů je vysoká a podstatně vyšší než D2 zakončení se všemi příznivými důsledky, popsány u SDA antipsychotik. MARTA antipsychotika jsou smíšenými antagonisty/agonisty muskarinových receptorů s důsledkem zvýšeného uvolňování acetylcholinu, který příznivě ovlivňuje paměťovou složku kognitivní dysfunkce. Nevýhodou těchto léčiv je zvyšování hmotnosti pacienta, určitá sedace a nutnost monitorovat glukozový a lipidový metabolismus s možným (být nízkým) rizikem provokace či zhoršení diabetu typu 2. Mezi antipsychotika 3. generace patří látky, které nejsou plnými dopaminergními agonisty, nýbrž dualisty, popř. parciálními antagonisty. Zatím jediným v klinické praxi zavedeným reprezentantem této „třetí“ generace antipsychotik je aripiprazol, který vykazuje charakteristiky atypických antipsychotik a má mimořádně dobrou snášenlivost. Klinická praxe zatím u aripiprazolu těží z jeho minimálního působení útlumu a zanedbatelného rizika obezity a diabetu II. typu coby nežádoucího účinku antipsychotické léčby (43).

3.2.2.1 VLASTNÍ PŘÍSPĚVEK K PROBLEMATICE V PREKLINICKÉM EXPERIMENTU

*Horska K, Ruda-Kucerova J, Babinska Z, Karpisek M, **Demlova R**, Opatrilova R, Suchy P, Kotolova H. Olanzapine-depot administration induces time-dependent changes in adipose tissue endocrine function in rats (published in Psychoneuroendocrinology. 2016; 73:177-185. IF 4,788)*

*Horska K, Ruda-Kucerova J, Drazanova E, Karpisek M, **Demlova R**, Kasperek T, Kotolova H. Aripiprazole-induced adverse metabolic alteration in polyI:C neurodevelopmental model of schizophrenia in rats (published in Neuropharmacology. 2017; 123:148-158. IF 5,012)*

V rámci výzkumné skupiny Farmakologického ústavu LF MU, jsme se zaměřili na metabolické nežádoucí účinky vybraných atypických antipsychotik, které významně přispívají ke zvýšení rizika kardiovaskulární morbidity a mortality u pacientů trpících schizofrenií. Přestože se touto otázkou zabývá i řada jiných experimentálních výzkumných skupin, mechanismy vzniku těchto nežádoucích účinků stále nejsou plně pochopeny. V poslední době je věnována pozornost právě také úloze metabolismu tukové tkáně a neurohormonální regulaci a stejnou otázkou jsme se zabývali i v naší práci.

Účelem preklinické studie bylo zhodnotit časově závislé účinky podávání olanzapinu v klinicky relevantním dávkování při regulaci energetické homeostázy, metabolismu glukózy a lipidů, hormonů pocházejících z gastrointestinálního traktu a tukového tkáně, které se podílely na regulaci energetické bilance v experimentu na krysích samicích Sprague-Dawley. Léčba olanzapinem nevedla ke změnám sérových hladin ghrelinů, FGF-21 a prozánětlivých markerů IL-1a, IL-6 a TNF- α v jakémkoli časovém bodě studie. Výsledky rovněž naznačují, že došlo k časně změně endokrinní funkce tukové tkáně jako faktoru, který se podílí na mechanismech, jež mohou být základem metabolických nežádoucích účinků antipsychotik (44).

Další experimentální práce cílila na podávání atypického antipsychotika aripiprazolu, který jak již bylo zmíněno dříve, představuje antipsychotikum s nízkým rizikem vývoje metabolického syndromu. Cílem této studie bylo vyhodnotit metabolický fenotyp modelu neurodevelopmentu polyI:C a posoudit metabolické účinky chronického podávání aripiprazolu s ohledem na komplexní neuroendokrinní homeostázy. Aripiprazol neovlivnil tělesnou hmotnost, ale způsobil neurohumorální změny. Sérové hladiny leptinu a GLP-1 byly výrazně sníženy, zatímco hladina ghrelinu byla zvýšena. Dále aripiprazol snížil sérové hladiny prozánětlivých cytokinů. Naše údaje naznačují dysregulaci adipokinů a gastrointestinálních hormonů přítomných při chronickém podávání aripiprazolu, které je považována za metabolicky neutrální v polyI:C modelu schizofrenie (45).

4. IMPLIKACE PREKLINICKÝCH A KLINICKÝCH AKTIVIT PŘI VÝUCE LÉKAŘSKÉ FARMAKOLOGIE

4.1 PREGRADUÁLNÍ VÝUKA LÉKAŘSKÉ FARMAKOLOGIE

Závěrečnou kapitolu předložené habilitační práce, a to v návaznosti na již obhájenou práci z roku 2015 (Příloha č. I), pojmám jako snahu zasadit vlastní výzkumné práce v oblasti farmakologie do kontextu výuky předmětu Lékařské farmakologie na LF MU a dovolím si tak představit komplexní pohled klinického farmakologa se zkušeností s preklinickými výzkumy i dlouhodobou klinickou zkušeností na výuku farmakologie v době personalizované farmakoterapie, na kterou je nutno připravovat naše studenty již během preklinické a klinické části studia medicíny.

Předmět **Lékařská farmakologie** je vyučován na LF MU v rámci pregraduálního studia všeobecného i zubního lékařství v 6. a 7. semestru studia. V souladu se stávající akreditací je věnován zejména pochopení základních principů farmakokinetiky a farmakodynamiky v rámci obecné farmakologie a dále pak mechanismům účinků jednotlivých lékových skupin v rámci studia speciální farmakologie.

Z didaktického hlediska farmakologie tvoří jednotu dvou celků: obecné a speciální farmakologie. Obecná farmakologie na základě experimentálních poznatků z oblasti farmakodynamiky a farmakokinetiky léčiv definuje obecně platné zákonitosti biofyzikální a biochemické povahy, projevující se vzájemnou interakcí organismu a farmaka. Stává se tím zároveň metodologickým návodem pro farmakologii speciální, jež se věnuje konkrétnímu rozřídění farmak z hlediska farmakodynamiky, studuje vlastnosti léčiv v jejich zvláštní specifické podobě, stanovuje jejich farmakokinetiku. Během svého působení ve vedení Farmakologického ústavu od roku 2011 si stále významněji uvědomuji, že byt jsou všechny výše uvedené znalosti zcela zásadní a nepodkročitelné, zejména v preklinické části studia, chybí nám systematictější výuka věnovaná aplikované klinické farmakologii a problémově orientované výuce farmakologie na příkladech personalizované farmakoterapie vybraných onemocnění.

Klinická farmakologie je interdisciplinární obor, který integruje experimentální farmakologii s klinickými a paraklinickými obory s cílem studovat a objektivními

metodami hodnotit účinek léku u zdravého i nemocného člověka. Zahrnuje rovněž doporučení a zdůvodnění terapeutického užití určitých skupin léčiv u určitých onemocnění a do její náplně patří i terapeutické monitorování léčiv. V rámci klinické farmakologie se vyčleňují ještě další podobory, např. farmakogenetika jako obor, který se zabývá vlivem jednotlivých farmakogenetických polymorfismů na individuální odpověď na podané léčivo u konkrétního jedince, případně farmakogenomika, obor, který studuje tyto vlivy na úrovni celého genomu.

Současný stav výuky klinické farmakologie

Klinická farmakologie je v současném akreditovaném programu všeobecného lékařství zavedena jako volitelný předmět „Vybrané kapitoly z klinické farmakologie“ pro studenty 5. ročníku, kteří úspěšně absolvovali předmět farmakologie ve 4. ročníku. Syllabus je tvořen 9 přednáškami, předmět je zakončen testem. Témata přednášek se týkají farmakologických principů nejčastěji se vyskytujících nozologických jednotek jako jsou hypertenze, farmakoterapie ischemické choroby srdeční a akutního koronárního syndromu, srdečního selhávání, tromboembolických příhod, diabetu mellitu, CHOPN a astmatu, farmakoterapii nádorových onemocnění, antibiotika a klinicky relevantní lékové interakce. Stávající pojetí výuky klinické farmakologie však neodpovídá plně potřebám vyplývajícím z předpokládaných a vytyčených výstupů z učení, které jsme pro tento předmět optimalizovali v rámci projektu OPTIMED a kde došlo k významnému posunu vzhledem k potřebám posunu úrovně znalostí našich studentů směrem k propojení a kombinaci znalostí základní a aplikované farmakologie. Tato optimalizace výuky je v souladu s vyjádřením pracovní skupiny pro klinickou farmakologii v Evropě při Světové zdravotnické organizaci (46) a jejím primárním cílem je zlepšení péče o pacienta ať už přímo nebo nepřímo - vyvíjením lepších, účinnějších a bezpečnějších léčiv a podporou racionálního užívání léčiv (47).

Navrhovaná úprava výuky klinické farmakologie

Smyslem pregraduální výuky klinické farmakologie musí být efektivní předání znalostí, dovedností a postojů, které budou studenti potřebovat jako lékaři v nadcházejících letech své praxe. Obecným konceptem výuky klinické farmakologie a racionální farmakoterapie v klinické medicíně je příprava studentů k jejich

klinické praxi po ukončení studia. Budoucí lékaři musí být obeznámeni s rozhodovacím procesem – jaký lék bude zvolen pro konkrétního pacienta, faktory, které rozhodnutí lékaře ovlivňují a zhodnocení jejich významnosti. Důležitou součástí curricula klinické farmakologie musí být výuka problematiky klinického vývoje nových léků, jež vyžaduje pokročilé porozumění preklinickému výzkumu, stejně jako studium etických, právních a regulačních požadavků na specializované klinické výzkumy v oblasti léčiv. Nedílnou součástí dobře navrženého programu výuky klinické farmakologie je předání znalosti správného a racionálního předepisování, nejen ambulantním, ale i hospitalizovaným pacientům. Výchova kvalifikovaných klinických lékařů je zcela stěžejní a rozhodující pro racionální farmakoterapii a podávání účinných a bezpečných léků v jejich budoucí klinické praxi.

Součástí procesu výuky klinické farmakologie musí být i zaměření na problematiku lékových interakcí, ovlivnění funkce parenchymových orgánů, v nichž biotransformace probíhají, vlivů na intervenční terapeutické a diagnostické metody používané v současné medicíně (typicky vztah sérové glukózy a vyšetření PET, obecně vztahy klinické farmakologie a klinické biochemie/hematologie/imunologie, apod.).

Navrhovaný integrovaný program seminářů a přednášek sleduje doporučení IUPHAR, Mezinárodní unie základní a klinické farmakologie (48) a harmonizaci mezinárodního curricula výuky klinické farmakologie na lékařských fakultách v Evropě (DELPHI study). V souladu se zavedenými vzdělávacími cíli je koncept výuky klinické farmakologie orientovaný na pacienty, farmakoterapii a dané onemocnění. Klíčovými prvky, které je potřeba zavést povinně do výuky jsou zejména:

Základní modul:

- 1) Obecná praktická klinická farmakologie (zaměřená na individualizaci farmakoterapie), personalizovaná medicína, cílená léčba, inter/intra individuální variabilita
- 2) Aplikovaná klinická farmakologie - příklady kazuistik specifických pro farmakoterapii nejčastějších onemocnění a zdravotních stavů v rutinní lékařské praxi

- 3) Interaktivní „problem-oriented“ výuka zaměřená na specifickou část - praktická farmakokinetika, TDM, toxokinetika, specifické populace pacientů (dialyzovaní, imunosuprimovaní atd.)
- 4) Léčivé přípravky pro moderní technologie, biologická léčba, genová, vektorová léčba, VILP, orphan drugs
- 5) Racionální principy předepisování (obecné zásady výběru léků, recepturní/žádankový předpis, preskripcce pro hospitalizovaného pacienta), generická substituce, úloha pojišťovny, revizního lékaře/SÚKL při použití léčiv v režimu „off-label“, lékové chyby, lékové interakce, polypragmatie (včetně simulace reálných situací)

Rozšířený modul:

- 6) Výzkum a vývoj léčiv (preklinické a klinické hodnocení, translace výstupů z prekliniky do klinického hodnocení, PASS, PAESS) – farmakologie využitá v rámci klinických hodnocení
- 7) Regulace léčiv (ve vývoji, během registračního procesu, po uvedení na trh, stažení přípravku,...), srovnání s potravinovým doplňkem – rizika jejich použití
- 8) Farmakovigilance (ve vývoji, během registračního procesu, po uvedení na trh), rozpoznání a hlášení NÚ, kritéria CTCAE a etické aspekty používání léčiv („off-label“ use, léky na mimořádný dovoz, repurposing drugs, compassionate use...), monitoring nových léčiv v klinické praxi se zaměřením na farmakovigilanci a HTA, etické problémy neschválených léčebných postupů
- 9) Problematika zdravotnických prostředků
- 10) Evidence - based medicine – kritické zhodnocení literatury, interpretace výsledků klinických studií a case reportů, lékařské úvahy a situace, které se nejčastěji vyskytují v rutinní lékařské praxi

Ve výuce budou uplatněny různé formy učení: didaktické a interaktivní přednášky, jednodenní výukové semináře založené na řešení problémů, diskuze v malých skupinách, učení formou rolí (lékař/pacient), samostudium a společné řešení seminárních prací, kvízy a výuka prostřednictvím IT – TDM, vyhledávání informací. Cílem výuky je rovněž podpořit kritické myšlení založené na znalostech tak, aby absolvent dokázal samostatně vyhodnocovat nově přicházející informace vždy ku

prospěchu pacientů. Podstatné je rovněž kontinuální zařazování nejnovějších poznatků a trendů do výuky tak, aby absolvent předmětu vždy odcházel se soudobými informacemi. K tomu bude využito moderních technologií a jejich možností, včetně využití simulačních nástrojů umožňující reálné modelování situací a jejich analýzu. Aktivní studenti dostanou příležitost podílet se na realizaci pokročilých výzkumných projektů klinických hodnocení a budou mít možnost spoluautorství v souvisejících publikacích.

4.2 POSTGRADUÁLNÍ VÝUKA LÉKAŘSKÉ FARMAKOLOGIE

Studium klinické farmakologie zůstává **procesem celoživotního učení**, jelikož je **integrální, esenciální a celoživotní kompetencí každého klinického lékaře**. Současně je celoživotní výzvou pro klinické farmakology a další lékařské pedagogy vyučující tento obor. V rámci Farmakologického ústavu LF MU je tento koncept podporován spoluprací lékařů, klinických farmakologů a klinických farmaceutů, v současné době je také diskutováno založení konzultačního centra pro farmakologickou interpretaci hladin léků (TDM) a lékových interakcí ve spolupráci s klinickými laboratořemi a lékárnami fakultních nemocnic. Dalšími oblastmi, které patří do náplně oboru klinické farmakologie a ve kterých se díky vlastním zkušenostem podílíme i na postgraduálním vzdělávání, jsou také:

Translační a klinický výzkum: v rámci Farmakologického ústavu LF MU jsme v roce 2011 založili Centrum pro akademické klinické studie, podílíme se na provádění vlastních klinických hodnocení s významným inovativním potenciálem (KDO_DC1311), včetně samotného designu počátečních fází klinických hodnocení léčiv (fáze I, I/II). To vše se daří realizovat i díky výzkumné infrastruktuře CZECRIN (Czech Clinical Research Infrastructure Network), jejíž jsem hlavní řešitelkou. Farmakologický ústav LF MU je rovněž národním koordinátorem s napojením na ECRIN-ERIC, což přispělo k úspěšné participaci na projektech klinického výzkumu financovaných z H2020.

Farmakoekonomika: k zajištění bezpečné a účinné farmakoterapie (jeden z cílů klinické farmakologie) je nezbytně nutné hodnocení zdravotnických technologií (HTA), včetně léčiv. Na Farmakologickém ústavu LF MU funguje pracovní skupina podílející se na farmakoekonomice a HTA, 2 postgraduální

studenti obhájili práci v této oblasti, ústavem jsou pořádány každoroční konference k těmto tématům.

Postgraduální výuku v oblastech uvedených výše realizujeme i díky úspěšné edukační platformě PharmAround, která byla v letech 2011 – 2014 realizována z Operačního programu Vzdělávání pro konkurenceschopnost (OP VK). Výsledkem této fáze je ucelený systém odborných kurzů pro studenty, lékaře, pedagogy a výzkumné pracovníky, kterým dosud chyběla možnost komplexního vzdělávání v oblasti vývoje léčiv. Od roku 2014 pokračuje PharmAround ve své úspěšné činnosti za podpory nadačního fondu a nadále se zaměřuje prioritně na oblast vzdělávání a vzájemné spolupráce se zaměřením na celý životní cyklus léčiva a jeho dopadu na pacienty. Vzdělávací aktivity projektu PharmAround pokrývají všechny vývojové fáze léčiva a jejich absolventi získají pro svou praxi užitečný soubor znalostí.

5. ZÁVĚR

Farmakologie je vědeckým i klinickým oborem, ve kterém se možná více než jinde potvrzuje, že uplatnění principů individualizované medicíny v kontextu pokroků dosažených v biologii, diagnostice a farmakoterapii onemocnění, zvyšuje šance na dlouhodobé přežití a lepší kvalitu života našich pacientů. Personalizovaný přístup hraje a bude v tomto směru hrát stále významnější roli. Farmakologie je velmi živým oborem s řadou výzkumných otázek i klinických aplikací. V takto dynamickém prostředí – kde jsme průběžně svědky zavádění nových farmakologických poznatků a inovativních léčiv – musí i výuka na lékařské fakultě toto reflektovat. Přes všechna nová technologická řešení databázových či jiných informačních systémů dnešní doby i nadále zůstává stále lékař tím, kdo farmakoterapii indikuje a řídí. Schopnost reagovat správně na nové poznatky a efektivně je uplatňovat v péči o pacienty je dána ve velké míře i znalostmi, jež lékař získává při svém vzdělávání. Na druhou stranu je potřeba akceptovat, že dnešní doba s obrovským množstvím informací nás posouvá více od znalostí (memorování – jež ovšem má své nepodkročitelné znalostní základy) do polohy schopnosti najít a správně vyhodnotit/pochopit. V oblasti farmakologie je tedy zásadním cílem naučit lékaře správně identifikovat, vyhodnocovat a používat informace ve vztahu k léčbě pacienta.

6. REFERENCE

1. Rubin RP. A Brief History of Great Discoveries in Pharmacology: In Celebration of the Centennial Anniversary of the Founding of the American Society of Pharmacology and Experimental Therapeutics. *Pharmacological Reviews*. December 2007; 59(4):289-359
2. Sneader W. The discovery of aspirin: a reappraisal. *British Medical Journal*. 2000; 321(7276):1591–1594.
3. Black JW, Stephenson JJ. Pharmacology of a new adrenergic beta-receptor-blocking compound (nethalide). *Lancet*. 1962; 2:311-314.
4. Franc A. Historie vývoje a výroby léčiv brněnské firmy Lachema. *Čes. Slov. Farm.* 2014; 63, 90-98
5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000; 100:57-70.
6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144(5):646-674.
7. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001; 344:783-792
8. Slamon DJ, Eiermann W, Robert N, et al. Phase III randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel (ACT) with doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel and trastuzumab (ACTH) with docetaxel, carboplatin and trastuzumab (TCH) in HER2 positive early breast cancer patients: BCIRG 006 study. *Breast Cancer Res Treat*. 2005; 94:S5a.
9. Tevaarwerk AJ et al. Lapatinib: A small-molecule inhibitor of epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor—2 tyrosine kinases used in the treatment of breast cancer. *Clinical Therapeutics*. 2009; (31):2332–2348
10. Buchdunger E, O'Reilly T, Wood J. Pharmacology of imatinib (STI571). *Eur J of Cancer*. 2002; 38(5):28-36
11. Teng JF, Mabasa VH, Ensom MH. The role of therapeutic drug monitoring of imatinib in patients with chronic myeloid leukemia and metastatic or unresectable gastrointestinal stromal tumors. *Ther Drug Monit*. 2012 Feb; 34(1):85-97

12. Turjap M, Juřica J, Demlová R. Potential clinical benefit of therapeutic drug monitoring of imatinib in oncology. *Klin Onkol.* 2015; 28(2):105-11.
13. Duchnowska R, Dziadziuszko R, Trojanowski T, et al. Conversion of epidermal growth factor receptor 2 and hormone receptor expression in breast cancer metastases to the brain. *Breast Cancer Res* 2012; 14(4):R119.
14. Duchnowska R, Sperinde J, Czartoryska-Arlukowicz B, Mysliwiec P, Winslow J, Radecka B, Petropoulos C, Demlova R. et al. et al. Predictive value of quantitative HER2 and HER3 levels combined with downstream signaling markers in HER2-positive advanced breast cancer patients treated with lapatinib. *Cancer Research.* 2017; Volume 77, Supp. 4. Meeting Abstract: P2-05-21
15. Nuciforo P, Thyparambil S, Galvan P et al. Quantitative HER family proteins assessment as prognostic and predictive biomarkers in the EGF30008 clinical trial. *Cancer Research.* 2016; Volume 76, Supp 4. Meeting Abstract: P3-07-08
16. Duchnowska R, Wysocki PJ, Korski K, Czartoryska-Arlukowicz B, Niwińska A, Orlikowska M, Radecka B, Studziński M, Demlova R et al (CEEEOG). Immunohistochemical prediction of lapatinib efficacy in advanced HER2-positive breast cancer patients. *Oncotarget.* 2016 Jan 5; 7(1):550-64.
17. Couzin-Frankel J. Cancer Immunotherapy. *Science.* 2013 Dec; 342(6156):1432-1433
18. Anguille S. et al. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *Lancet Oncology.* 2014; 15(7):e257 - e267
19. Datamonitor Pipeline Insight, "Biologic Targeted Cancer Therapies, Next Generation Jostles for Market Position," DMHC2573. (2009)
20. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975; 256(5517):495-497
21. Scott AM, Allison JP, Wolchok JD. Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Cancer Immun.* 2012; 12:p.14
22. Catapano AL et al. The safety of therapeutic monoclonal antibodies: Implications for cardiovascular disease and targeting the PCSK9 pathway. *Atherosclerosis.* 2013; 228(1):18-28

23. Naisbitt DJ, Gordon SF, Pirmohamed M, Park BK. Immunological principles of adverse drug reactions: the initiation and propagation of immune responses elicited by drug treatment. *Drug Saf.* 2000; 23:483–507.
24. Hoigne R, Schlumberger HP, Vervloet D, Zoppi M. Epidemiology of allergic drug reactions. *Monogr Allergy.* 1993; 31:147–170.
25. Edwards IR, Aronson JK. Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management. *Lancet.* 2000 Oct 7; 356(9237):1255-9.
26. Bilek O, Bohovicova L, Demlova R, Poprach A, Lakomy R, Zdrzilova-Dubská L. Non-Small Cell Lung Cancer - from Immunobiology to Immunotherapy. *Klin Onkol.* 2016; 29(Supp.4):78-87.
27. Demlova R, Valik D, Obermannova R, Zdrzilova-Dubská L. The safety of therapeutic monoclonal antibodies: implications for cancer therapy including immuno-checkpoint inhibitors. *Physiol Res.* 2016 Dec 21; 65(Supp. 4):455-462
28. Zdrzilova-Dubská L, Fedorova L, Pilatova K, Mudry P, Hlavackova E, Matoulkova E, Flajsarova L, Demlova R, Valik D, Sterba J. TKI pazopanib impairs immunostimulatory properties of monocytes: Implication for monocyte-derived DC-based anti-cancer vaccine preparation. *Annals of Oncology.* 2016; 27(Supp.8):18P
29. Faltejskova P, Svoboda M, Srutova K, Mlcochova J, Besse A, Nekvindova J, et al. Identification and functional screening of microRNAs highly deregulated in colorectal cancer. *J Cell Mol Med.* 2012; 16(11):2655–2666.
30. Mallick S, Choi JS. Liposomes: versatile and biocompatible nanovesicles for efficient biomolecules delivery. *J Nanosci Nanotechnol.* 2014 Jan; 14(1):755–65.
31. Matsumura Y, Maeda H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumor-tropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res.* 1986 Dec 1; 46(12 Part 1):6387–92.
32. Merhautová J, Vychytilová-Faltejsková P, Demlová R, Slabý O. Systemic administration of miRNA mimics by liposomal delivery system in animal model of colorectal carcinoma. *Physiol Res.* 2016 Dec 21; 65(Supplementum 4):481-488.

33. Merhautova J, Demlova R, Slaby O. MicroRNA-Based Therapy in Animal Models of Selected Gastrointestinal Cancers. *Fron Pharmacol*. 2016 Sep; 7(329):1-21
34. Merhautova J; Hezov, R; Poprach A; Kovarikova A; Radova A, Svoboda M, Vyzula R, Demlova R; Slaby O. miR-155 and miR-484 Are Associated with Time to Progression in Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated with Sunitinib. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:941980.
35. Merhautova J., Hezova R., Poprach A., Svoboda M., Demlova R., Slaby O. MiRNA associated with time to progression in metastatic renal cell carcinoma patients treated with sunitinib. *Eur J Cancer*. Sep 2015. 51(Supp.3):505-505
36. Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE. Adipose tissue: The new endocrine organ? *Dig. Dis. Sci*. 2009; 54:1847–1856.
37. Maury E, Brichard SM. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 2010; 314:1–16
38. Dostalova I, Kavalkova P, Haluzikova D. et al. The use of microdialysis to characterize the endocrine production of human subcutaneous adipose tissue in vivo. *Regul Pept*. 2009; 155:156–162.
39. Anděl M, Polák J, Kraml P. et al. Chronický mírný zánět spojuje obezitu, metabolický syndrom, aterosklerózu a diabetes. *Vnitř Lék*. 2009; 55:659–665.
40. Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. *Nature*. 1987 Oct; 329(6140):630-632.
41. Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer*. 2009 Aug; 9(8):550-562
42. Petrakova K., Krasenska M., Valik D, Holanek M, Palacova M, Demlova R. Circulating levels of estradiol in Breast Cancer Patients treated with Aromatase Inhibitors and their Clinical Implications. *Klin Onkol*. 2016; 29(Supp.3):50-57.
43. C. Höschl. Od mechanismu účinku antipsychotik ke klinické praxi aneb malé psychofarmakologické repetitorium (S využitím výukových textů Academia Medica Pragensis, autor prof. MUDr. Jaromír Švestka, DrSc.). http://www.hoschl.cz/files/3848_cz_antipsychotika_hoschl.pdf

44. Horska K, Ruda-Kucerova J, Drazanova E, Karpisek M, Demlova R, Kasperek T, Kotolova H. Aripiprazole-induced adverse metabolic alteration in polyI:C neurodevelopmental model of schizophrenia in rats. *Neuropharmacology*. 2017 Jun 13; 123:148-158
45. Horska K, Ruda-Kucerova J, Babinska Z, Karpisek M, Demlova R, Opatrilova R, Suchy P, Kotolova H. Olanzapine-depot administration induces time-dependent changes in adipose tissue endocrine function in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2016; 73:177-185
46. Clinical Pharmacology. Scope, Organisation, Training. Report of a WHO Study group. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1970; 446:5–21
47. (http://www.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0004/156217/euro_series_39.pdf).
48. Orme, M. *Clinical Pharmacology in Research, Teaching and Health Care*. 2010. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 107, 531–559.

7. SEZNAM KOMENTOVANÝCH PUBLIKACÍ

Komentované práce autorky v rámci publikací v letech 2015-2017

(předchozí komentované práce jsou součástí habilitačního spisu Demlová R., 2015, UK Bratislava, Příloha č.I)

1. Turjap M, Juřica J, **Demlová R**. Potential clinical benefit of therapeutic drug monitoring of imatinib in oncology. *Klin Onkol*. 2015;28(2):105-11.
2. Duchnowska R, Sperinde J, Czartoryska-Arlukowicz B, Mysliwiec P, Winslow J, Radecka B, Petropoulos C, **Demlova R**. et al. et al. Predictive value of quantitative HER2 and HER3 levels combined with downstream signaling markers in HER2-positive advanced breast cancer patients treated with lapatinib. *Cancer Research*. 2017;77(Suppl.4):Meeting Abstract P2-05-21
3. Duchnowska R, Wysocki PJ, Korski K, Czartoryska-Arlukowicz B, Niwińska A, Orlikowska M, Radecka B, Studziński M, **Demlova R** et al (CEEEOG). Immunohistochemical prediction of lapatinib efficacy in advanced HER2-positive breast cancer patients. *Oncotarget*. 2016 Jan 5;7(1):550-64.
4. **Demlova R**, Valik D, Obermannova R, Zdrzilova-Dubska L. The safety of therapeutic monoclonal antibodies: implications for cancer therapy including immuno-checkpoint inhibitors. *Physiol Res*. 2016 Dec 21;65(Suppl. 4):455-S462
5. Bilek O, Bohovicova L, **Demlova R**, Poprach A, Lakomy R, Zdrzilova-Dubska L. Non-Small Cell Lung Cancer-from Immunobiology to Immunotherapy. *Klin Onkol*. 2016;29(Suppl. 4):78-87.
6. Klinické hodnocení fáze I/II „Kombinovaná protinádorová terapie s ex vivo manipulovanými dendritickými buňkami produkujícími IL-12 u dětských, adolescentních a mladých dospělých pacientů s progredujícími, relabujícími nebo primárně metastatickými malignitami vysokého rizika“ EudraCT Number:2014-003388-39. Zadavatel LF MU Brno. <https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/trial/2014-003388-39/CZ>
7. Zdrzilova-Dubska L, Fedorova L, Pilatova K, Mudry P, Hlavackova E, Matoulkova E, Flajsarova L, **Demlova R**, Valik D, Sterba J. TKI pazopanib impaires immunostimulatory properties of monocytes: Implication for monocyte-derived DC-based anti-cancer vaccine preparation. *Annals of Oncology*. 2016;27(Suppl.8): Meeting Abstract 18P

8. Merhautová J, Vychytilová-Faltejsková P, **Demlová R**, Slabý O. Systemic administration of miRNA mimics by liposomal delivery system in animal model of colorectal carcinoma. *Physiol Res.* 2016 Dec 21;65(Suppl.4):481-488.
9. Merhautova J, **Demlova R**, Slaby O. MicroRNA-Based Therapy in Animal Models of Selected Gastrointestinal Cancers. *Fron Pharmacol.* 2016 Sep; 7(329):1-21
10. Merhautova J, Hezova R, Poprach A, Kovarikova A, Radova L, Svoboda M, Vyzula R, **Demlova R**, Slaby O. miR-155 and miR-484 Are Associated with Time to Progression in Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated with Sunitinib. *Biomed Res Int.* 2015; ID941980
11. Merhautova J, Hezova R, Poprach A, Svoboda M, **Demlova R**, Slaby O. MiRNA associated with time to progression in metastatic renal cell carcinoma patients treated with sunitinib. *Eur J Cancer.* Sep 2015; 51(Suppl.3): Meeting Abstract S505
12. Horska K, Ruda-Kucerova J, Drazanova E, Karpisek M, **Demlova R**, Kasperek T, Kotolova H. Horska K, Ruda-Kucerova J, Babinska Z, Karpisek M, **Demlova R**, Opatrilova R, Suchy P, Kotolova H. *Neuropharmacology.* 2017 Jun 13; 123:148-158
13. Horska K, Ruda-Kucerova J, Babinska Z, Karpisek M, **Demlova R**, Opatrilova R, Suchy P, Kotolova H. Olanzapine-depot administration induces time-dependent changes in adipose tissue endocrine function in rats. *Psychoneuroendocrinology.* 2016; (73):177-185

8. PŘÍLOHY

- Příloha č. I:** Habilitační spis Koncepty klinické farmakologie v éře personalizované medicíny, UK Bratislava, obhájeno 18. 10. 2015 *(není součástí svazku, tvoří samostatnou přílohu)*
- Příloha č. II:** Komentovaná práce 1. Potential clinical benefit of therapeutic drug monitoring of imatinib in oncology. Turjap M, Juřica J, Demlová R.
- Příloha č. III:** Komentovaná práce 3. Immunohistochemical prediction of lapatinib efficacy in advanced HER2-positive breast cancer patients. Duchnowska R, Wysocki PJ, Korski K, Czartoryska-Arłukowicz B, Niwińska A, Orlikowska M, Radecka B, Studziński M, Demlova R et al (CEEEOG)
- Příloha č. IV:** Komentovaná práce 4. The safety of therapeutic monoclonal antibodies: implications for cancer therapy including immun-checkpoint inhibitors. Demlova R, Valik D, Obermannova R, Zdrzilova-Dubska L.
- Příloha č. V:** Komentovaná práce 5. Non-Small Cell Lung Cancer-from Immunobiology to Immunotherapy. Bilek O, Bohovicova L, Demlova R, Poprach A, Lakomy R, Zdrzilova-Dubska L.
- Příloha č. VI:** Komentovaná práce 8. Systemic administration of miRNA mimics by liposomal delivery system in animal model of colorectal carcinoma. Merhautová J, Vychytilová-Faltejsková P, Demlová R, Slabý O.
- Příloha č. VII:** Komentovaná práce 9. MicroRNA-Based Therapy in Animal Models of Selected Gastrointestinal Cancers. Merhautova J, Demlova R, Slaby O.
- Příloha č. VIII:** Komentovaná práce 10. miR-155 and miR-484 Are Associated with Time to Progression in Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated with Sunitinib. Merhautova J, Hezova R, Poprach A,

Kovarikova A, Radova L, Svoboda M, Vyzula R, Demlova R, Slaby O.

Příloha č. IX: Komentovaná práce 12. Aripiprazole-induced adverse metabolic alteration in polyI:C neurodevelopmental model of schizophrenia in rats. Horska K, Ruda-Kucerova J, Drazanova E, Karpisek M, Demlova R, Kasperek T, Kotolova H.

Příloha č. X: Komentovaná práce 13. Olanzapine-depot administration induces time-dependent changes in adipose tissue endocrine function in rats. Horska K, Ruda-Kucerova J, Babinska Z, Karpisek M, Demlova R, Opatrilova R, Suchy P, Kotolova H.

Možný klinický přínos terapeutického monitorování hladin imatinibu v onkologii

Potential Clinical Benefit of Therapeutic Drug Monitoring of Imatinib in Oncology

Turjap M.¹⁻³, Juřica J.^{2,3}, Demlová R.^{2,4}

¹ Oddělení klinické farmacie, FN Ostrava

² Farmakologický ústav, LF MU, Brno

³ Skupina experimentální a aplikované neuropsychofarmakologie, CEITEC – Středoevropský technologický institut, MU, Brno

⁴ Oddělení klinických hodnocení, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Imatinib mesylát je kompetitivním inhibítorem tyrozinkinázy BCR/ABL a současně také inhibítorem několika receptorových tyrozinkináz. Za dobu od svého uvedení na trh se ukázal jako velmi cenný v terapii Philadelphia chromozom (BCR/ABL) – pozitivní (Ph+) chronické myeloidní leukemie a Kit (CD117) pozitivních gastrointestinálních stromálních tumorů. Léčivo je biotransformováno cestou cytochromu P450 a je popsáno množství významných lékových interakcí. Onkologičtí pacienti často užívají současně množství dalších léčiv zvyšujících pravděpodobnost takové interakce a svou roli může sehrávat i adherence k léčbě při dlouhodobém podávání. Režimy vycházející z fixního dávkování imatinibu nerespektují interindividuální rozdíly ve farmakokinetice léčiva a je možné, že někteří nemocní tak nedosahují dostatečných plazmatických koncentrací. Na základě evidence z klinických studií lze usuzovat, že existuje vztah mezi plazmatickými koncentracemi imatinibu a klinickou odpovědí. Imatinib se proto jeví být vhodným kandidátem pro terapeutické monitorování jeho plazmatických koncentrací. Tento článek předkládá přehled o farmakokinetice, lékových interakcích imatinibu, sumarizuje aktuální stav problematiky stanovení plazmatických koncentrací pro účely optimalizace terapie a dále popisuje možnosti, limity a návrhy pro terapeutické monitorování imatinibu.

Klíčová slova

imatinib – farmakokinetika – lékové interakce – terapeutické monitorování léčiv – chronická myeloidní leukemie – gastrointestinální stromální tumory

Summary

Imatinib mesylate is a competitive inhibitor of BCR/ABL tyrosine kinase and inhibits also several receptor tyrosin kinases. Since its launch to the market, imatinib has proven to be very valuable in the treatment of Philadelphia chromosome (BCR/ABL) – positive (Ph+) chronic myeloid leukemia and Kit (CD117) positive gastrointestinal stromal tumors. The drug is metabolized by cytochrome P450, and there are many clinically important pharmacokinetic drug-drug interactions described in the literature. Frequent polypharmacy in oncological patients increases probability of such interactions, and also adherence may play its role during long-term treatment. Fixed dosing therapeutic regimens fail to respect known interindividual variability in pharmacokinetics of the drug and thus, some patients may not achieve sufficient plasma concentrations. Based on current evidence, there seems to be a relationship between plasma concentration and clinical response to imatinib. Therefore, imatinib appears to be suitable candidate for therapeutic drug monitoring. Here, we present an overview of pharmacokinetics, drug-drug interactions and current knowledge and suggestions on therapeutic drug monitoring of imatinib, its potential benefits and limitations.

Key words

imatinib – pharmacokinetics – drug interactions – therapeutic drug monitoring – chronic myeloid leukemia – gastrointestinal stromal tumors

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



PharmDr. Miroslav Turjap

Oddělení klinické farmacie
FN Ostrava

17. listopadu 1790

708 52 Ostrava-Poruba

e-mail: miroslav.turjap@fno.cz

Obdrženo/Submitted: 8. 12. 2014

Přijato/Accepted: 4. 2. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko2015105>

Úvod

Imatinib mesylát (Glivec®) je z hlediska svého mechanismu účinku selektivním kompetitivním inhibitorem tyrozinkinázy BCR/ABL (breakpoint cluster region/Abelson), tedy konstitutivně aktivované tyrozinkinázy vzniklé jako produkt transkripce Philadelphia chromozomu (reciproká translokace mezi dlouhými raménky 9. a 22. chromozomu). Imatinib interaguje s proteinem BCR/ABL na nukleotidovém vazebném místě tak, že zabraňuje vazbě adenosin trifosfátu (ATP) a tím stabilizuje tento protein v jeho inaktivní konformaci. Výsledným efektem je zabránění účinku genu *BCR/ABL* na proteinové úrovni, vedoucí následně k apoptóze a zástavě proliferace buněčného klonu. Imatinib současně inhibuje i některé receptorové tyrozinkinázy – PDGFR- α a PDGFR- β (Platelet-derived growth factor receptor, - α , - β ; glykoproteinový růstový faktor), c-KIT (transmembránový tyrozinkinázový receptor), CSF-1R (receptor pro kolonie stimulační faktor 1) [1]. V ČR je Glivec® dostupný již od roku 2001, přičemž zásadně přispěl k inovaci tehdy dostupných léčebných postupů a zlepšení prognózy léčených pacientů. Imatinib je dle guidelines NCCN (National Comprehensive Center Network) pro chronickou myeloidní leukemii (chronic myeloid leukemia – CML) [2] indikován k 1. linii léčby chronické fáze Philadelphia chromozom (BCR-ABL) – pozitivní chronické myeloidní leukemie (Ph+ CML) s doporučenou kontrolou cytogenetické odpovědi a monitorace hladiny transkriptu v pravidelných intervalech. V případě suboptimální odpovědi lze volit zvýšení dávky imatinibu, v případě selhání léčby imatinibem je pak indikována změna léčby alternativním tyrozinkinázovým inhibitorem (nilotinib nebo dasatinib). Dle NCCN doporučení je imatinib dále indikován u pacientů s akcelerovanou nebo blastickou fází CML se současným zvážením možnosti provedení transplantace kostní dřeně [2].

V rámci léčby solidních nádorů jsou další indikací imatinibu pacienti s Kit (CD117) pozitivními inoperabilními nebo metastazujícími gastrointestinálními stromálními nádory (GIST) nebo pacienti po resekci GIST s vysokým rizikem recidivy [3].

Obvyklé dávkování imatinibu u hematologických malignit je 400–800 mg denně. Dávka 400 mg se používá standardně jako dávka iniciální, dávky 600–800 mg denně jsou podávány u pokročilejších fází CML nebo u pacientů s akcelerovanou fází onemocnění nebo v blastické krizi. U dospělých pacientů s inoperabilním a/nebo metastatickým maligním GIST je doporučena dávka 400 mg denně, s možným zvýšením dávky na 600 mg nebo 800 mg u pacientů s primární nebo sekundárně vzniklou rezistencí na imatinib. Všeobecně se při terapeutickém selhání iniciální dávky nebo při suboptimální léčebné odpovědi doporučuje dávku eskalovat na 800 mg/den v případě, že pacient denní dávku 400 mg dobře snášel.

V současné době je diskutována možnost přerušení léčby imatinibem u nemocných s CML v molekulární remisi. Výsledky dosavadních studií naznačují, že přerušení léčby by mohlo být perspektivně možné u vybraných pacientů se stabilní kompletní molekulární odpovědí trvajícím alespoň dva roky, za současného pečlivého monitorování molekulární odpovědi a časného řešení případného relapsu [2]. Pro standardizaci kritérií bezpečného přerušení podávání imatinibu jsou nicméně potřebné výsledky dalších, prospektivních studií s větším počtem pacientů a delším sledováním. Proto aktuální guidelines NCCN [2] i European LeukemiaNet [4] doporučují dlouhodobé pokračování léčby imatinibem u všech pacientů, kteří na léčbu odpovídají; případné ukončení léčby imatinibem u těchto pacientů může být zvažováno pouze v rámci některého z protokolů klinických studií. Doporučená dávka imatinibu v adjuvantní léčbě vysoce rizikových pacientů po resekci GIST je 400 mg.

Obecně je imatinib dobře snášen a výskyt závažných nežádoucích účinků grade 3 nebo 4, s výjimkou hematotoxicity, je nízký. Klinicky nejdůležitější jsou nežádoucí účinky hematologické, zejm. neutropenie a trombocytopenie, a proto je nutné zejm. v prvních týdnech léčby pečlivě monitorování krevního obrazu. Kromě hematologických komplikací patří mezi možné nežádoucí účinky vý-

skyt gastrointestinálních komplikací (nevolnost, dyspepsie, průjem), poruchy vnitřního prostředí (otoky víček, obličej, dolních končetin, méně často pleurální výpotek nebo ascites), případně bolesti svalů, kloubů, kostí nebo únava. Tyto nežádoucí účinky jsou většinou mírné a odeznívají během několika dnů či týdnů po vysazení léčby. Potenciálně nebezpečná může být hepatotoxicita, vzácně vedoucí k selhání jater; doporučuje se sledovat jaterní testy a omezit podávání paracetamolu. Důvodem jsou obavy z aditivního hepatotoxického efektu obou látek a uvažuje se o možné inhibici O-glukuronidace paracetamolu imatinibem [5].

Farmakokinetické vlastnosti

Imatinib mesylát se po perorálním podání dobře absorbuje, biologická dostupnost je až 98 % a není ovlivněna potravou. Maximálních plazmatických koncentrací dosahuje imatinib po 2–4 hodinách po podání, extenzivně se váže na proteiny plazmy (až 95 %, z většiny na α 1 kyselý glykoprotein). Distribuční objem imatinibu je 252 L [6]. Hlavní biotransformační cesta vede přes N-demetylaci k piperazinovému metabolitu (CGP74577), který je biologicky aktivní. Tuto reakci katalyzuje forma 3A4 cytochromu P450. Farmakokinetika imatinibu je lineární v rozmezí dávek 25–1 000 mg p.o. 1× denně. Eliminační parametry jsou věkem nebo hmotností ovlivněny jen mírně – s nárůstem hmotnosti se zvyšuje clearance (8,5 L/h u pacientů pod 50 kg, 11,3 L/h u pacientů nad 100 kg), s věkem roste distribuční objem. Větší vliv na farmakokinetické parametry mají spíše albumin, buňky bílé krevní řady a bilirubin [7,8]. Eliminační poločas imatinibu je 18 hodin, v případě jeho aktivního metabolitu pak dokonce 40 hodin. Během sedmi dní se tak vyloučí okolo 80 % podané dávky, většina ve formě metabolitů, a to zejm. biliární cestou (poměr exkrece stolice : moč je 5 : 1); jen asi 25 % se vyloučí v nezměněné formě. Mírná až středně závažná hepatální insuficience zpravidla nevyžaduje korekci dávkování [8].

Imatinib je středně silným inhibitorem metabolické aktivity CYP2C9 (neočeká-

vají se klinicky závažné interakce) a poměrně silným inhibítozem metabolické aktivity CYP2D6 (dle inhibiční konstanty K_i ; klinicky se zatím takto neprojevuje) a CYP3A4, přičemž je dokumentována řada lékových interakcí, především se substráty CYP3A4 [9]. Imatinib je také substrátem P-glykoproteinu (Pgp, produkt genu *ABCB1*) a je transportován přenašečem pro organické kationty (hOCT1). Interakce s inhibitory metabolické aktivity CYP3A, jež současně inhibují aktivitu Pgp, je tedy zvláště nebezpečná a může vyústit ve výrazné zvýšení plazmatické koncentrace a toxicity imatinibu [7,8,10].

Lékové interakce imatinibu

Lékové interakce mohou být v zásadě dvojího typu – jednak mohou jiná léčiva ovlivňovat účinek imatinibu a na druhé straně může imatinib ovlivňovat účinky jiných léčiv, především svým inhibičním účinkem na metabolickou aktivitu CYP3A4 a CYP2D6. Pro jednoduchost a s ohledem na zaměření článku se zde věnujeme pouze vlivu jiných látek na plazmatické koncentrace/účinek imatinibu.

Mezi lékovými interakcemi výrazně převažují farmakokinetické nad farmakodynamickými. V naprosté většině se jedná o ovlivnění metabolické aktivity CYP3A4, v menší míře pak CYP2D6 a CYP2C9. Současným podáním inhibitoru nebo induktoru metabolické aktivity těchto forem CYP dochází ke změnám v plazmatických koncentracích a AUC (area under curve – plocha pod křivkou plazmatických koncentrací v čase) imatinibu. Tyto změny mohou být i velmi výrazné a klinicky relevantní (změny v AUC řádově o desítky procent) [11]. Druhý typ farmakokinetické interakce spočívá v inhibici aktivity P-glykoproteinového transportéru a tím ve zvýšení biologické dostupnosti a AUC imatinibu. Léčiva zapříčiňující tyto interakce jsou uvedena v tab. 1 [8–10,12].

Důsledkem současného podání induktorů metabolické aktivity CYP3A4 je zrychlení presystémové eliminace i biotransformace imatinibu a snížení AUC, c_{max} a snížení účinku imatinibu. Příkladem je snížení AUC_{0-24h} o 54 % po souběžném pětidenním podání imatinibu (400 mg, 1× denně) a rifampicinu v denní dávce 600 mg [13].

Tab. 1. Léčiva, která mohou významně ovlivnit plazmatickou koncentraci nebo účinek imatinibu [8–10,12].

	Induktor	Inhibitor
CYP3A4	karbamazepin, dexametazon, dabrafenib, mitotan, nevirapin, bosentan, barbituráty, fenytoin, rifabutin, rifampicin	chloramfenikol, některé makrolidy, (klaritromycin, telitromycin), azolová antimykotika (itakonazol, ketokonazol, posakonazol, vorikonazol), inhibitory virových proteáz (atazanavir, boceprevir, lopinavir, nelfinavir, telaprevir, saquinavir, ritonavir, indinavir, darunavir, fosamprenavir)
Pgp	karbamazepin, dexametazon, doxorubicin, fenobarbital, fenytoin, primidon, rifampicin, třezalka tečkovaná, tenofovir, vinblastin	abirateron, amiodaron, atorvastatin, karvedilol, klaritromycin, crizotinib, cyklosporin, darunavir, dipyridamol, grepfruitová šťáva, itakonazol, ketokonazol, lapatinib, lopinavir, meflochin, nelfinavir, nilotinib, progesteron, ritonavir, saquinavir, simeprevir, sunitinib, takrolimus, tamoxifen, telaprevir, vemurafenib, verapamil
hOCT1	není známo	amiodaron, levofloxacin, ganciklovir, chlorochin, indinavir, saquinavir, lamivudin, ranitidin, midazolam, metformin, progesteron

hOCT1 – human organic cation transporter 1, transportér pro organické kationty 1

Při kombinaci s inhibitory metabolické aktivity CYP3A4 naopak dochází k opačným projevům – zvýšení AUC, nežádoucích účinků a toxicity imatinibu, jako v případě zvýšení AUC o 41 % po jednorázovém podání imatinibu (200 mg) s ketokonazolem (400 mg) [11].

Méně často se objevují informace o vlivu současného podání inhibitoru aktivity transportéru pro organické kationty (hOCT1) na plazmatické koncentrace/účinek imatinibu. Tento transportér je zodpovědný za uptake imatinibu do cílových buněk. Inhibice aktivity hOCT1 se paradoxně projevuje zvýšenou plazmatickou koncentrací imatinibu a současně jeho sníženou intracelulární expozicí [10].

Interakce na úrovni CYP2D6 nebo CYP2C9 mají teoreticky podobné důsledky, projevují se však pravděpodobně s daleko menší intenzitou (biotransformační cesta prostřednictvím CYP3A4 je dominantní), a nejsou tedy klinicky relevantní.

Imatinib je také inhibítozem aktivity transportéru BCRP (breast cancer resistance protein); tato interakce

sice potenciálně může zvrátit rezistenci k léčivům transportovaným tímto přenašečem, na druhou stranu však klinicky může až nebezpečně zvýšit expozici těmito léčivům – např. pazopanibu nebo topotekanu [8,14].

Poněkud problematická je případná kombinace imatinibu s warfarinem u nemocných vyžadujících antikoagulační léčbu. Biotransformace warfarinu vede přes CYP2C9 (účinnější *S* enantiomer) a také přes CYP3A4 (méně účinný *R* enantiomer). O interakcích imatinibu a warfarinu není dostatek spolehlivých dat; některé studie naznačují, že warfarin neovlivňuje plazmatické koncentrace a účinek imatinibu [15]. Opačná interakce je dokumentována – imatinib by mohl zvýšit účinek warfarinu pravděpodobně inhibičním účinkem na metabolickou aktivitu CYP3A4 [16], jehož je imatinib silným inhibítozem, méně významná je (slabší) inhibice metabolické aktivity CYP2C9. S ohledem na terapeutické režimy zahrnující obvykle více současně podávaných léčiv je obtížné identifikovat původce a rozsah těchto interakcí. Klinický dopad zůstává

nejasný a výsledek předvídat prozatím nedokážeme. Dalším komplikujícím faktorem může být zvýšené riziko krvácení spojené se samotným imatinibem. Pokud jsou léčiva užívána současně, je nutná opatrnost, častější monitorování INR a zvýšený klinický dohled. Vhodnou alternativou warfarinu může být použití nízkomolekulárního heparinu.

Interakce farmakodynamického nebo neznámého typu jsou vzácnější – příkladem je očekávatelná interakce s vakcínací nebo imunosupresivou, zvýšení rizika agranulocytózy při současné komedikaci s klozapinem, zvýšení rizika agranulocytózy a pancytopenie při současném užívání metamizolu, snížení účinku imatinibu po kombinaci s imuno-stimulačními látkami (např. i echinacea, beta-glukany), popř. snížení účinku tyreotropních látek.

Možnosti a přínosy terapeutického monitorování léčiv

Terapeutické monitorování léčiv (therapeutic drug monitoring – TDM) se zabývá stanovováním a následnou farmakokinetickou interpretací koncentrací léčiv v biologických vzorcích, vždy v kontextu klinických údajů a příslušných dat. V ČR se TDM již dlouhou řadu let využívá k optimalizaci farmakoterapie léčivy, jako jsou aminoglykosidová antibiotika, vankomycin, digoxin, teofylin, amiodaron, celá řada antiepileptik a nověji také některých imunosupresiv, antipsychotik, azolových antimykotik a dalších látek.

Největší benefit přináší TDM u léčiv, která mají následující charakteristiky [17]:

- absence snadno měřitelného, bezpečného a validního ukazatele efektu léčby;
- toxická či neúčinnost léčiva může přímo ohrozit stav pacienta;
- absence či slabá korelace dávka – klinická odpověď;
- úzké terapeutické rozmezí;
- korelace mezi plazmatickou koncentrací a klinickým efektem a/nebo toxicitou;
- velká interindividuální a optimálně nízká intraindividuální variabilita v koncentracích léčiva po podání stejné dávky;

g) dostupná validovaná, dostatečně citlivá a ekonomicky přijatelná analytická metoda pro stanovení koncentrací.

Přítomnost aktivního metabolitu, významný interakční potenciál, nelineární farmakokinetika léčiva již v rozmezí běžně používaných dávek či častý výskyt non-adherence jsou další faktory, které lze pomocí TDM zachytit či s nimi pracovat.

TDM může být *obecně* užitečné např. pro:

- potvrzení efektivních koncentrací (jako referenční hodnota pro další průběh léčby);
- optimalizaci dávek na podkladě dosažení terapeutického referenčního rozmezí (např. pokud je efekt stávající léčby částečný/neuspokojivý a zároveň naměříme plazmatické koncentrace pod dolní hranici referenčního rozmezí);
- potvrzení suspektní toxicity (jsou přítomny známky toxicity daného léčiva a zároveň naměříme výrazně vysoké plazmatické koncentrace);
- podezření na nonadherenci či selhávání léčby z různých důvodů (plazmatické koncentrace pod limitem detekce či výrazně neodpovídající danému dávkování, neobvyklý poměr plazmatických koncentrací mateřské látky a metabolitu, velmi vysoké/nízké plazmatické koncentrace při běžném dávkování a dobré adherenci);
- korekce dávkování při změnách renálních funkcí (typicky např. u aminoglykosidových antibiotik, vankomycinu, digoxinu);
- posouzení vlivu komedikace (aktuálně nasazena/vysazena/změněna dávka medikace, která může snížit/zvýšit plazmatickou koncentraci sledovaného léčiva a potažmo jeho efekt, vliv zanechání kouření u některých léčiv atd.);
- posouzení vlivu stavů, kdy lze předpokládat významné změny v distribuci léčiva (gravida, ascites, edémy, kritické stavy, některá onemocnění, věkové a hmotnostní extrémy atd.).

Měřená léčiva zpravidla splňují pouze některé z výše uvedených charakteristik „optimálního“ léčiva, a proto i poten-

ciál pro klinické využití a informační hodnota vyšetření konkrétních léčiv může být různorodá. Aby přinášelo vyšetření žádajícímu lékaři validní informaci a bylo nákladově efektivní, je velmi účelné mít zpracováváno metodiku TDM v daném zdravotnickém zařízení, která definuje jednotlivé kroky a předpoklady vyšetření pro každé měřené léčivo (jak, kdy a kolik vzorků odebírat, jak je uchovávat a transportovat, kdy je/není účelné žádat stanovení koncentrací vzhledem k fázi léčby, na jaké otázky může vyšetření dát odpověď, sledované parametry a jejich doporučovaná rozmezí, náležitosti žádanky, potřebná biochemická vyšetření, lhůty dodání výsledků atd.). Zároveň je důležitá dobrá spolupráce žádajícího lékaře s laboratoří, resp. interpretujícím klinickým farmaceutem/farmakologem, neboť bez správné interpretace výsledku a následného doporučení nebo návrhu opatření ztrácí vyšetření mnoho ze svého potenciálu, či může být dokonce kontraproduktivní.

Terapeutické monitorování imatinibu v indikacích CML a GIST

Imatinib má předpoklady k tomu, aby se u něj TDM stalo validním nástrojem k optimalizaci a individualizaci léčby. Dostupná evidence naznačuje, že jednou z příčin primární rezistence k léčbě inhibitory tyrozinkináz (TKi) mohou být nedostatečné plazmatické koncentrace léčiva. Podobně příčinou suboptimální odpovědi na léčbu imatinibem mohou být mezi jinými také problémy s compliance či interindividuální variabilita ve farmakokinetice léčiva [2]. K interindividuální variabilitě mohou dále významně přispívat lékové interakce diskutované výše. Guidelines NCCN pro léčbu CML doporučují v rámci monitorování odpovědi na léčbu TKi pravidelně posuzovat compliance a případný vliv lékových interakcí, pokud není odpověď na léčbu optimální [2]. Stanovení údolní plazmatické koncentrace (c_{trough}) 1–3 měsíce po zahájení léčby může sloužit jako individuální referenční hladina pro další průběh léčby a případně časně upozornit na výrazně odlišné plazmatické koncentrace, než lze očekávat při daném dávkování. V dalším průběhu léčby může (při porovnání s aktuálně naměřenou hod-

notou) pomoci posoudit vliv lékové interakce či adherence k léčbě. TDM může pomoci vyloučit nedostatečné plazmatické koncentrace jako možnou příčinu suboptimální odpovědi či primární rezistence nebo naopak vysoké plazmatické koncentrace jako možnou příčinu výskytu známek toxicity [18–21]. Tento model, tzv. rescue TDM (TDM v případě potřeby, při výskytu potíží s léčbou), je dostupný např. ve Švýcarsku [22].

CML

V posledních přibližně sedmi letech byly v renomovaných onkologických časopisech publikovány klinické studie, které se zabývaly primárně vztahem mezi plazmatickými koncentracemi imatinibu a klinickou odpovědí. Definice cytogenetických a molekulárních odpovědí v níže uvedených studiích odpovídá definicím dle European Leukemia Net [4].

Picard et al popisují studii s 68 pacienty s CML léčenými imatinibem v dávce 400 nebo 600 mg/den po dobu min. 12 měsíců [23]. Pacienti užívající 400 mg, resp. 600 mg/den dosahovali údolních (tj. před podáním další dávky) plazmatických koncentrací (c_{trough}) $1\,058 \pm 557$ ng/mL, resp. $1\,444 \pm 710$ ng/mL (průměr \pm SD), přičemž hodnoty vykazovaly vysokou interindividuální variabilitu (min.–max., 181–2 947 ng/mL). c_{trough} byly retrospektivně korelovány s odpovědí. Statisticky významně vyšší c_{trough} byly pozorovány ve skupině pacientů s *kompletní cytogenetickou odpovědí* (complete cytogenetic response – CCyR, $1\,123 \pm 617$ ng/mL vs. 694 ± 556 ng/mL, průměr \pm SD; $p = 0,03$) a tzv. *velkou molekulární odpovědí* (major molecular response – MMR, $1\,452 \pm 649$ ng/mL vs. 869 ± 427 ng/mL, průměr \pm SD; $p < 0,001$) oproti skupině bez CCyR, resp. MMR, nezávisle na užívané denní dávce léčiva. ROC analýzou byla vypočtena prahová c_{trough} 1 002 ng/mL, která odlišovala respondéry/nonrespondéry dle dosažení MMR se senzitivitou 77 % a specificitou 71 % [23].

Larson et al potvrdili tyto výsledky v rozsáhlejší retrospektivní studii zahrnující 351 pacientů s CML [24]. Pacienti užívali 400 mg imatinibu denně. V této studii byly c_{trough} stanovovány ve fázi steady state a korelovány s odpovědí během pětiletého sledování. Průměr

a medián všech hodnot c_{trough} v souboru dosahoval 979 ± 530 ng/mL a 879 ng/mL (min.–max., 153–3 910 ng/mL). Z důvodu vysoké interindividuální variability byli pacienti rozděleni na kvartily Q1–Q4 dle dosahovaných c_{trough} a tyto následně korelovány s odpovědí. Kumulativní relativní četnosti CCyR i MMR se statisticky významně lišily mezi jednotlivými kvartily ($p = 0,01$; resp. $p = 0,02$ celkově). c_{trough} byly statisticky významně vyšší u pacientů, kteří dosáhli CCyR ve srovnání s těmi, kteří CCyR nedosáhli ($1\,009 \pm 544$ ng/mL, vs. 812 ± 409 ng/mL, průměr \pm SD; $p = 0,01$). Byl také pozorován trend ke kratšímu přežívání bez sledované události (event-free survival – EFS) u pacientů s nižšími c_{trough} . Očekávané relativní četnosti EFS po pěti letech léčby byly 78 %, 83 % a 89 % pro Q1, Q2–Q3 a Q4 ($p = 0,16$) [24].

Takahashi et al provedli soubornou analýzu dat šesti japonských studií s pacienty s CML ($n = 254$) [25]. Průměr a medián c_{trough} celého souboru činily $1\,011 \pm 565$ a 900 ng/mL (min.–max., 111–3 620 ng/mL). Autoři pozorovali statisticky významně vyšší c_{trough} u pacientů, kteří dosáhli MMR ($1\,107 \pm 594$ ng/mL vs. 873 ± 529 ng/mL; $p = 0,002$) a CCyR ($1\,058 \pm 585$ ng/mL vs. 835 ± 524 ng/mL; $p = 0,033$) oproti těm, kteří MMR a CCyR nedosáhli. Pravděpodobnost dosažení MMR byla statisticky významně vyšší u pacientů s $c_{\text{trough}} > 1\,002$ ng/mL oproti $c_{\text{trough}} < 1\,002$ ng/mL ($p = 0,012$) [25].

Koren-Michowitz et al ve své studii analyzovali plazmatické koncentrace u 191 pacientů s CML léčených imatinibem a tyto porovnávali s dosažením CCyR [26]. Medián a průměr c_{trough} v celém souboru dosahoval 994 ng/mL, resp. $1\,070 \pm 686$ ng/mL. Pacienti, kteří dosahovali CCyR, měli statisticky hraničně vyšší c_{trough} ($1\,078 \pm 545$ ng/mL) než pacienti bez CyR (827 ± 323 ng/mL; $p = 0,045$). Při souborném hodnocení po rozdělení pouze do dvou skupin pacienti s CCyR/částečnou CyR dosahovali statisticky významně vyšších c_{trough} než pacienti s minimální/žádnou CyR ($1\,066 \pm 534$ ng/mL vs. 814 ± 314 ng/mL; $p = 0,002$) [26]. Marin et al ve studii s 84 pacienty s CML znamenali statisticky významně vyšší procentuální četnost MMR u pacientů

s $c_{\text{trough}} \geq 1\,000$ ng/mL oproti nižším c_{trough} ($p = 0,02$) [27].

Vztah mezi plazmatickými koncentracemi a klinickou odpovědí u pacientů s CML byl pozorován také v observačních studiích v reálných klinických podmínkách s velkým počtem zařazených pacientů ($n = 1\,216$ [28] a $n = 2\,478$ [29]).

V roce 2014 byla publikována praktická guidelines autorské skupiny Yu et al (Cancer Institute-Antoni van Leeuwenhoek, Amsterdam) pro terapeutické monitorování inhibitorů tyrozinkináz (TKi) [30], která na základě dosavadní evidence z observačních studií navrhuje u pacientů s CML léčených imatinibem $c_{\text{trough}} \geq 1\,000$ ng/mL jako cílový farmakokinetický parametr.

Publikovány byly výsledky zatím jediné dokončené prospektivní randomizované intervenční studie Imatinib COncentration Monitoring Evaluation (I-COME) [22]. Cílem studie bylo zjistit, zda *rutinní* TDM s individualizací dávkování (k dosažení cílové plazmatické koncentrace $c_{\text{trough}} = 1\,000$ ng/mL) může zlepšit klinickou odpověď u pacientů s CML oproti kontrolní skupině bez *rutinního* TDM během jednoletého sledování. Autoři uvádějí, že bohužel nebylo možné formálně prokázat benefit *rutinního* TDM, protože během dvouletého náboru nebylo dosaženo plánovaného počtu zařazených pacientů (předpoklad 300, celkem zařazeno pouze 56), a dále z důvodu překvapivě nízké adherence lékařů (50 %) k doporučeným úpravám dávkování v intervenční skupině. Autoři diskutují určitá pozitivní zjištění u pacientů, u kterých byly úpravy dávkování respektovány, nicméně tato nebyla statisticky hodnotitelná. Očekávají se výsledky další prospektivní intervenční randomizované studie OPTIM IMATINIB [31], která si klade jako hlavní cíl posoudit účinnost a realizovatelnost individualizace dávkování imatinibu založené na měření údolních plazmatických koncentrací imatinibu ve vztahu k dosažení MMR po 12 měsících léčby.

Guidelines NCCN pro léčbu CML [2] aktuálně *rutinní* TDM imatinibu (tedy *rutinní* individualizací dávkování k dosažení cílových plazmatických koncentrací) nedoporučují. Důvodem je doposud chybějící

evidence z prospektivně vedených intervenčních studií, které by prokazovaly benefit *rutinního* TDM ve vztahu ke klinické odpovědi. Uvádí však užitečnost TDM např. při posuzování adherence k léčbě.

GIST

Demetri et al zkoumali u 73 pacientů s pokročilým GIST vztah mezi plazmatickými koncentracemi imatinibu a odpovědí [32]. Pacienti byli randomizováni do skupin užívajících 400 nebo 600 mg imatinibu denně. C_{trough} v ustáleném stavu (pro obě skupiny) vykazovaly významnou interindividuální variabilitu (min.–max., 414–4 182 ng/mL). Mezi skupinami pacientů s rozdílnou odpovědí na léčbu (kompletní nebo partiální odpovědi nebo stabilizací onemocnění) nebyl pozorován statisticky významný rozdíl mediánů C_{trough} ($p = 0,25$). Když byli pacienti rozděleni do kvartilů dle dosažených C_{trough} , pacienti v dolním kvartilu Q1 ($< 1 100$ ng/mL) dosahovali statisticky významně kratšího času do progresse onemocnění (time to progression – TTP, medián 11,3 měsíce) než pacienti ve vyšších kvartilech: medián TTP 30,6 měsíce v Q2–Q3 (1 100–2 040 ng/mL), resp. 33,1 měsíce v Q4 ($> 2 040$ ng/mL) ($p = 0,0105$ celkově, $p = 0,0029$ pro Q1 vs. Q2–Q4). Statisticky signifikantní rozdíl mezi jednotlivými kvartily nebyl pozorován ve vztahu k mediánu celkového přežití (overall survival – OS) ($p = 0,16$) [32].

Praktická guidelines autorské skupiny Yu et al (Cancer Institute-Antoni van Leeuwenhoek, Amsterdam) navrhuje u pacientů s GIST léčených imatinibem cílovou $C_{\text{trough}} \geq 1 100$ ng/mL [30]. Zatím jediná prospektivní intervenční studie SARC019 [33], která měla za cíl zjistit, zda eskalace dávky imatinibu k dosažení $C_{\text{trough}} \geq 1 100$ ng/mL zlepší klinickou odpověď u nemocných s metastazujícím GIST, byla ukončena předčasně kvůli pomalému náboru pacientů, přičemž data nebylo možno analyzovat. Evidence z prospektivních studií tedy aktuálně chybí a v současnosti rovněž nelze na základě principů evidence-based medicine (EBM) rutinní TDM imatinibu v léčbě GIST doporučit.

Diskuze a závěr

V klinických studiích i v reálné klinické praxi lze pozorovat významnou inter-

individuální variabilitu ve vztahu k terapeutickým účinkům i účinkům nežádoucím. V klinické praxi vidíme pacienty, kteří při doporučeném dávkování neodpovídají na léčbu dle předpokladů, kteří mají řadu nežádoucích účinků či naopak u kterých žádné nežádoucí účinky neznamenáváme. Z výzkumného hlediska jsou tyto variability v onkologii, zejm. ve vztahu k účinku, zkoumány především z hlediska rozdílnosti cílové struktury či signální dráhy na úrovni tumoru s využitím dnes již celkem bezproblémově dostupných molekulárně-genetických nebo proteomických metod; publikované práce s touto tematikou lze počítat dnes již v tisících. Mnohem méně prací se však zabývá variabilitou na úrovni samotného „nositele“ tumoru, tedy pacienta. K základním postulátům farmakologie patří fakt, že léčivo ovlivní onemocnění konkrétního pacienta a jeho nádor, ale i konkrétní pacient (resp. organizmus) ovlivní chování léčiva po jeho podání. Fakt, který bývá opomíjen, resp. nebývá zdůrazňován, je, že „personalizovaně“ musíme vnímat nejen strukturu, na kterou léčivo působí – tedy „target“, ale i hostitele – tedy jedince, kterému je léčivo podáváno – tedy „host-related factors“. Tento typ personalizace má vycházet ze znalosti genetického pozadí (farmakogenetiky), souběžných komorbidit, lékových interakcí, u perorální léčby i adherence pacienta a podobně. Nesmíme zapomenout, že „personalizovaná terapie“ se vždy týká pacienta – neléčíme nádor, ale konkrétního jedince s nádorem.

Obdobně je tomu i u tzv. targeted therapy, kdy tato molekulárně cílená léčba např. inhibitory tyrozinkináz vychází ve svém standardním dávkování z principu zahájení léčby fixními dávkami, které nerespektují významné a již publikované interindividuální rozdíly ve farmakokinetice těchto léčiv. Podávání fixních dávek může rezultovat v suboptimální plazmatické koncentrace nedostačující k inhibici cílové struktury, jak je patrné z výsledků klinických studií uvedených výše. Konkrétně u imatinibu je diskuze stran optimální dávky a délky podávání stále živá. Je otázkou, jakým způsobem upravit dávkování v klinické praxi. Navržených přístupů je několik a jedním z nich

je koncept terapeutického monitorování léčiv a úprava dávky během léčby na základě naměřených údolních plazmatických koncentrací (C_{trough} ; koncentrace před podáním další dávky) ve fázi steady-state.

Dalším možným a i v praxi využívaným postupem „targeted therapy“ je tzv. koncept TAD (toxicity-adjusted dosing) a úprava dávky na základě klinicky pozorovaných nežádoucích účinků, kdy jejich absence je považována za projev nedostatečného dávkování a naopak významné nežádoucí účinky (grade 3–4) za projev „předávkování“. Třetím zmiňovaným postupem je tzv. ramp-dosing (varianta TAD), kdy v klinické praxi postupně zvyšujeme dávku až k projevům toxicity. Nežádoucí účinky jsou v druhém a třetím případě využívány jako náhradní cílový parametr. První varianta, tedy TDM s klinicky ověřeným vztahem mezi plazmatickou koncentrací a účinkem léčiva (kdy je známa „cut-off“ plazmatická koncentrace nebo ještě lépe terapeutické rozmezí, stanovené ideálně na základě randomizovaných prospektivně vedených intervenčních klinických studií) s následným standardním zavedením do klinické praxe se jeví jako optimální.

Lze uvést příklady zemí, ve kterých má terapeutické monitorování plazmatických koncentrací protinádorových léčiv dlouhou tradici a kde je i TDM perorálních TKI (ve formě rescue TDM) zavedeno do praxe řady klinických pracovišť. K těmto zemím patří zejm. Francie, Nizozemí nebo Švýcarsko. V květnu 2014 byla v European Journal of Cancer publikována kolektivem autorů právě z těchto zemí práce s názvem „Therapeutic drug monitoring in cancer – Are we missing a trick?“, která řeší příspěvek TDM k možnému vylepšení terapeutických postupů u řady cílených protinádorových léčiv, nikoliv však specificky pouze u imatinibu [34].

Jak již bylo uvedeno výše, v případě imatinibu jsou známy výsledky observačních studií, které popisují korelaci plazmatických koncentrací a odpovědi na léčbu u pacientů s CML a GIST. Publikováno bylo systematické review na toto téma [21] a v případě CML také výsledky observačních studií v reál-

ných klinických podmínkách [28,29]. Cílené prospektivní intervenční randomizované studie [22,33] zatím nerozšířily naše poznatky; další cílená prospektivní studie s pacienty s CML [31] stále běží. V případě, že se podaří potvrdit pozorování a poznatky z observačních studií v robustních prospektivních intervenčních klinických studiích, může se *rutinní* TDM (s úpravou dávkování k cílovým plazmatickým koncentracím) zařadit mezi cenné nástroje sloužící k optimalizaci a individualizaci léčby imatinibem. Ve světle současné evidence a při zachování principů EBM nelze *rutinní* TDM imatinibu aktuálně doporučit. Nicméně poznatky ze zahraničí napovídají, že tzv. *rescue* TDM, tedy využití stanovení plazmatických koncentrací imatinibu individuálně ve specifických případech (posouzení adherence k léčbě, vlivu lékové interakce, v případě suboptimální klinické odpovědi, selhání léčby či výskytu neobvyklých/závažných nežádoucích účinků) může být užitečné již nyní, což je v souladu s guidelines NCCN v případě obou diagnóz, tedy CML i GIST.

Literatura

- Klener P, Klener P Jr. ABL1, SRC a další nerekceptorové tyrozinkinázy jako nové cíle specifické protinádorové léčby. *Klin Onkol* 2010; 23(4): 203–209.
- National Comprehensive Cancer Network [homepage on the Internet]. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines): Chronic Myelogenous Leukemia, Version 1.2015 [cited 2015 Jan 18]. Available from: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/cml.pdf.
- National Comprehensive Cancer Network [homepage on the Internet]. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines): Soft Tissue Sarcoma, Version 2.2014 [cited 2015 Feb 1]. Available from: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/sarcoma.pdf.
- Baccarani M, Deininger MW, Rosti G et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* 2013; 122(6): 872–884. doi: 10.1182/blood-2013-05-501569.
- Liu Y, Ramirez J, Ratain MJ. Inhibition of paracetamol glucuronidation by tyrosine kinase inhibitors. *Br J Clin Pharmacol* 2011; 71(6): 917–920. doi: 10.1111/j.1365-2125.2011.03911.x.
- Schmidl H, Peng B, Riviere GJ et al. Population pharmacokinetics of imatinib mesylate in patients with chronic-phase chronic myeloid leukaemia: results of a phase III study. *Br J Clin Pharmacol* 2005; 60(1): 35–44.
- SPC GLIVEC 400 MG [online]. [citováno 8. prosince 2014]. Dostupné z: http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000406/WC500022207.pdf.
- Lexi-Comp, Inc. (Lexi-Drugs®) [online]. Lexi-Comp, Inc. [cited 2014 Jul 28]. Available from: <http://online.lexi.com/>.
- Filppula AM, Laitila J, Neuvonen PJ et al. Potent mechanism-based inhibition of CYP3A4 by imatinib explains its liability to interact with CYP3A4 substrates. *Br J Clin Pharmacol* 2012; 165(8): 2787–2798. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01732.x.
- Haouala A, Widmer N, Duchosal MA et al. Drug interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, dasatinib, and nilotinib. *Blood* 2011; 117(8): E75–E87. doi: 10.1182/blood-2010-07-294330.
- Dutreix C, Peng B, Mehring G et al. Pharmacokinetic interaction between ketoconazole and imatinib mesylate (Glivec) in healthy subjects. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004; 54(4): 290–294.
- White DL, Saunders VA, Dang PO et al. OCT-1-mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib, (AMN107): reduced OCT-1 activity is the cause of low in vitro sensitivity to imatinib. *Blood* 2006; 108(2): 697–704.
- Bolton AE, Peng B, Hubert M et al. Effect of rifampicin on the pharmacokinetics of imatinib mesylate (Gleevec, ST1571) in healthy subjects. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004; 53(2): 102–106.
- Houghton PJ, Germain GS, Harwood FC et al. Imatinib mesylate is a potent inhibitor of the ABCG2 (BCRP) transporter and reverses resistance to topotecan and SN-38 in vitro. *Cancer Res* 2004; 64(7): 2333–2337.
- Breccia M, Santopietro M, Loggisci G et al. Concomitant use of imatinib and warfarin in chronic phase chronic myeloid leukemia patients does not interfere with drug efficacy. *Leuk Res* 2010; 34(8): e224–e225. doi: 10.1016/j.leukres.2010.03.015.
- Lin AM, Rini BI, Derynck MK et al. A phase I trial of docetaxel/estramustine/imatinib in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer* 2007; 5(5): 323–328.
- MacKichan JJ. Interpretation of serum drug concentrations. In: Lee M (ed.). *Basic skills in interpreting laboratory data*. 5th ed. Bethesda: American Society of Health-System Pharmacists 2013: 71–117.
- Baccarani M, Dreyling M, Group EG. Chronic myeloid leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2010; 21 (Suppl 5): v165–167. doi: 10.1093/annonc/mdq201.
- Teng JF, Mabasa VH, Ensom MH. The role of therapeutic drug monitoring of imatinib in patients with chronic myeloid leukemia and metastatic or unresectable gastrointestinal stromal tumors. *Ther Drug Monit* 2012; 34(1): 85–97. doi: 10.1097/FTD.0b013e31823cdec9.
- Gao B, Yeap S, Clements A et al. Evidence for therapeutic drug monitoring of targeted anticancer therapies. *J Clin Oncol* 2012; 30(32): 4017–4025. doi: 10.1200/JCO.2012.43.5362.
- Gotta V, Buclin T, Csajka C et al. Systematic review of population pharmacokinetic analyses of imatinib and relationships with treatment outcomes. *Ther Drug Monit* 2013; 35(2): 150–167. doi: 10.1097/FTD.0b013e318284ef11.
- Gotta V, Widmer N, Decosterd LA et al. Clinical usefulness of therapeutic concentration monitoring for imatinib dosage individualization: results from a randomized controlled trial. *Cancer Chemother Pharmacol* 2014; 74(6): 1307–1319. doi: 10.1007/s00280-014-2599-1.
- Picard S, Titier K, Etienne G et al. Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2007; 109(8): 3496–3499.
- Larson RA, Druker BJ, Guilhot F et al. Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. *Blood* 2008; 111(8): 4022–4028. doi: 10.1182/blood-2007-10-116475.
- Takahashi N, Wakita H, Miura M et al. Correlation between imatinib pharmacokinetics and clinical response in Japanese patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Clin Pharmacol Ther* 2010; 88(6): 809–813. doi: 10.1038/clpt.2010.186.
- Koren-Michowitz M, Volchek Y, Naparstek E et al. Imatinib plasma trough levels in chronic myeloid leukaemia: results of a multicentre study CST1571AIL11TGLIVEC. *Hematol Oncol* 2012; 30(4): 200–205. doi: 10.1002/hon.2005.
- Marin D, Bazeos A, Mahon FX et al. Adherence is the critical factor for achieving molecular responses in patients with chronic myeloid leukemia who achieve complete cytogenetic responses on imatinib. *J Clin Oncol* 2010; 28(14): 2381–2388. doi: 10.1200/JCO.2009.26.3087.
- Bouchet S, Titier K, Moore N et al. Therapeutic drug monitoring of imatinib in chronic myeloid leukemia: experience from 1216 patients at a centralized laboratory. *Fundam Clin Pharmacol* 2013; 27(6): 690–697. doi: 10.1111/fcp.12007.
- Gotta V, Bouchet S, Widmer N et al. Large-scale imatinib dose-concentration-effect study in CML patients under routine care conditions. *Leuk Res* 2014; 38(7): 764–772. doi: 10.1016/j.leukres.2014.03.023.
- Yu H, Steeghs N, Nijenhuis CM et al. Practical guidelines for therapeutic drug monitoring of anticancer tyrosine kinase inhibitors: focus on the pharmacokinetic targets. *Clin Pharmacokinet* 2014; 53(4): 305–325. doi: 10.1007/s40262-014-0137-2.
- OPTIM IMATINIB. A prospective randomized phase II study evaluating the monitoring of imatinib mesylate (Gleevec®) plasma trough level in patients newly diagnosed with chronic phase chronic myelogenous leukaemia (CP-CML) [cited 2015 Jan 25]. Available from: <https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/trial/2010-019568-35/FR>.
- Demetri GD, Wang Y, Wehrle E et al. Imatinib plasma levels are correlated with clinical benefit in patients with unresectable/metastatic gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2009; 27(19): 3141–3147. doi: 10.1200/JCO.2008.20.4818.
- SARC019. A randomized, phase 3 study of dose escalation versus no dose escalation of Imatinib in metastatic GIST patients with Imatinib trough levels less than 1100 nanograms/mL [cited 2015 Jan 27]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01031628>.
- Bardin C, Veal G, Paci A et al. Therapeutic drug monitoring in cancer – are we missing a trick? *Eur J Cancer* 2014; 50(12): 2005–2009. doi: 10.1016/j.ejca.2014.04.013.

Immunohistochemical prediction of lapatinib efficacy in advanced HER2-positive breast cancer patients

Renata Duchnowska¹, Piotr J. Wysocki², Konstanty Korski³, Bogumiła Czartoryska-Arłukowicz⁴, Anna Niwińska⁵, Marlena Orlikowska⁶, Barbara Radecka⁷, Maciej Studziński⁸, Regina Demlova⁹, Barbara Ziółkowska¹⁰, Monika Merdalska¹¹, Łukasz Hajac¹², Paulina Myśliwiec¹³, Dorota Zuziak¹⁴, Sylwia Dębska-Szmich¹⁵, Istvan Lang¹⁶, Małgorzata Foszczyńska-Kłoda², Bożenna Karczmarek-Borowska¹⁷, Anton Żawrocki¹⁸, Anna Kowalczyk¹⁸, Wojciech Biernat¹⁸, Jacek Jassem¹⁸, for the Central and East European Oncology Group (CEE OG)

¹Military Institute of Medicine, Oncology Department, Warsaw, Poland

²West Pomeranian Cancer Center, Szczecin, Poland

³Greater Poland Cancer Center, Poznań, Poland

⁴Białystok Oncology Center, Białystok, Poland

⁵The Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Warsaw, Poland

⁶Warmia and Masuria Oncology Center, Olsztyn, Poland

⁷Opole Oncology Center, Poland

⁸Oncology Center, Bydgoszcz, Poland

⁹Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic

¹⁰Chemotherapy Department, Regional Hospital, Wrocław, Poland

¹¹Oncology Center, Kielce, Poland

¹²Oncology Center, Wrocław, Poland

¹³Oncology Center, Zielona Góra, Poland

¹⁴Oncology Center, Bielsko-Biała, Poland

¹⁵Medical University of Łódź, Łódź, Poland

¹⁶Department of Medical Oncology, National Institute of Oncology, Budapest, Hungary

¹⁷Department of Chemotherapy, Subcarpathian Oncology Center, Rzeszów, Poland

¹⁸Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland

Correspondence to: Renata Duchnowska, **e-mail:** rdt@wp.pl

Keywords: breast cancer, epidermal growth factor receptor type 2, lapatinib, mTOR, p-MAPK

Received: May 19, 2015

Accepted: November 13, 2015

Published: November 24, 2015

ABSTRACT

Molecular mechanisms of lapatinib resistance in breast cancer are not well understood. The aim of this study was to correlate expression of selected proteins involved in ErbB family signaling pathways with clinical efficacy of lapatinib. Study group included 270 HER2-positive advanced breast cancer patients treated with lapatinib and capecitabine. Immunohistochemical expression of phosphorylated adenosine monophosphate-activated protein (p-AMPK), mitogen-activated protein kinase (p-MAPK), phospho (p)-p70S6K, cyclin E, phosphatase and tensin homolog were analyzed in primary breast cancer samples. The best discriminative value for progression-free survival (PFS) was established for each biomarker and subjected to multivariate analysis. At least one biomarker was determined in 199 patients. Expression of p-p70S6K was independently associated with longer (HR 0.45; 95% CI: 0.25–0.81; $p = 0.009$), and cyclin E with shorter PFS (HR 1.83; 95% CI: 1.06–3.14;

$p = 0.029$). Expression of p-MAPK (HR 1.61; 95% CI 1.13–2.29; $p = 0.009$) and cyclin E (HR 2.99; 95% CI: 1.29–6.94; $p = 0.011$) was correlated with shorter, and expression of estrogen receptor (HR 0.65; 95% CI 0.43–0.98; $p = 0.041$) with longer overall survival. Expression of p-AMPK negatively impacted response to treatment (HR 3.31; 95% CI 1.48–7.44; $p = 0.004$) and disease control (HR 3.07; 95% CI 1.25–7.58; $p = 0.015$). In conclusion: the efficacy of lapatinib seems to be associated with the activity of downstream signaling pathways – AMPK/mTOR and Ras/Raf/MAPK. Further research is warranted to assess the clinical utility of these data and to determine a potential role of combining lapatinib with MAPK pathway inhibitors.

INTRODUCTION

The introduction of trastuzumab, a monoclonal antibody directed against the epidermal growth factor 2 receptor (HER2) has led to major improvement in the treatment of patients with HER2-positive breast cancer [1–5]. The therapeutic mechanisms of trastuzumab involve both the inhibition of HER2-dependent signaling pathways and the engagement of immune responses via antibody-dependent cellular cytotoxicity [6]. Despite impressive clinical efficacy of trastuzumab, many patients are refractory to this agent or develop secondary resistance. The postulated mechanism of trastuzumab resistance include the expression of the truncated-active form of the HER2 receptor (p95HER2), the cross-talk between HER2 and insulin-like growth factor-1 receptor, the deficiency of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (*PTEN*) and activating mutations in the p110- α subunit of phosphoinositide-3-kinase (*PI3K*), and activity of *Rac1* – a Ras-like small GTPase affecting trastuzumab-mediated endocytosis of the HER2 receptor [7–19]. A small-molecule HER2 kinase inhibitor – lapatinib entered the clinical practice later than trastuzumab and has been mostly used as a second-line therapy [20]. Due to its different mode of action, the molecular resistance mechanisms of lapatinib can not be simply extrapolated from those of trastuzumab [21, 22]. The resistance to this compound may be caused by mechanisms occurring at various levels within a cancer cell: the outer/inner leaflet of the plasma membrane, cytoplasm or nucleus [14, 23–30]. Normally, activation of growth factor-associated signaling cascades is initiated at the plasma membrane in response to receptor activation (homo-, or heterodimerization) [31]. Subsequently, the signal is transmitted downstream towards the nucleus via a signaling network, which comprises multiple kinases. Signal transduction pathways in cancer cells may become activated regardless of the receptor status. Spontaneously activated signal transduction elements may be responsible for resistance to receptor-targeted therapies, since crucial pathways remain active despite receptor blockade. Hence, the activity of signal transduction molecules may potentially correlate with the resistance to lapatinib.

This study investigated the immunohistochemical (IHC) expression of selected molecules involved in

the important signaling pathways associated with the family of epidermal growth factor (ErbB) receptors: phosphorylated adenosine monophosphate-activated protein alpha 1 (p-AMPK-Ser486), the mitogen-activated protein kinase (p-MAPK-T185 + Y187 + T202 + Y204), phospho (p)-p70S6K, the hypoxia-inducible factor 2 alpha (HIF2 alpha), PTEN, and cyclin E. Their status was retrospectively correlated with the clinical efficacy of lapatinib. Our aim was to shed new light on the molecular mechanisms involved in the resistance of breast cancer to lapatinib.

RESULTS

Patient characteristics

Tumor samples from 270 patients were subjected to analysis, of which in 199 at least one biomarker was determined (Figure 1, Table 1). Eighty-four percent of the tumors were invasive ductal cancers (no special type), 67% were estrogen receptor (ER)-negative and 77% progesterone receptor (PR)-negative. Eleven percent of patients presented with metastatic disease at initial breast cancer diagnosis. Radical surgery was performed in 91% of patients; 98% received chemotherapy in (neo)adjuvant and/or a metastatic setting, 36% received endocrine therapy and all were administered trastuzumab in an adjuvant or a metastatic setting, usually in combination with chemotherapy. In 69% of patients, the first manifestation of progression was distant metastasis, with viscera being the most common dominant metastatic site. Forty-three percent of patients developed brain metastases during the course of their disease.

Clinical outcomes

The median duration of lapatinib and capecitabine therapy was 6 months (range 0–52). In 82% of patients, treatment was terminated due to disease progression. Other reasons were toxicity (7%), patient refusal (2%), death (3%), others (5%) and unknown (1%).

The best response to a combination of lapatinib and capecitabine were CR (5%), PR (31%), stable disease (42%) and progression (16%); in the remaining 6% of patients response was unknown or not evaluated.

The duration of follow-up from breast cancer diagnosis varied from 6.7 to 242 months. The median PFS from the start of lapatinib therapy was 6.2 months (range 0–54). PFS was significantly longer in patients with response to treatment (median 10.4 months; hazard ratio [HR] 0.44, 95% confidence interval [CI] 0.35–0.56, $p < 0.01$) or disease control (median 8.1 months; HR 0.27; 95%CI 0.20–0.35; $p < 0.01$), compared to those with refractory disease (median 2.3 months).

The status of p-AMPK alpha1, p-MAPK, p-p70S6K, HIF-2 alpha, cyclin E and PTEN was determined in 176, 184, 190, 188, 180 and 176 cases, respectively (CONSORT Diagram, Figure 1). The immunostained sections of all studied proteins are shown on Figure 2. In all cases staining was heterogeneous. For cyclin E the staining was nuclear, for HIF-2 cytoplasmic and for p-AMPK alpha1, p-MAPK, p-p70S6K, and PTEN nuclear and cytoplasmic. Two of the examined biomarkers: p-p70S6K and cyclin E proved predictive for PFS, with the best discriminating H-scores of 10 and 200, respectively. The expression of p-p70S6K (HR 0.47; 95%CI 0.26–0.86; $p = 0.014$) was associated with longer, and the expression of cyclin E (HR 1.71; 95%CI 1.00–2.93; $p = 0.05$) with shorter PFS. The predictive value of these two biomarkers was confirmed in the multivariate analysis (HR 0.45; 95% CI 0.25–0.81; $p = 0.009$ and 1.83; 95%CI 1.06–3.14; $p = 0.029$, respectively; Figure 3A–3B and Table 2).

Negative prognostic factors for OS included the expression of p-MAPK (HR 1.68; 95%CI 1.18–2.40;

$p = 0.007$) and cyclin E (HR 2.86; 95%CI 1.23–6.66; $p = 0.015$; Figure 4A–4B and Table 2), in addition to regional vs. local type of first progression (HR 3.39; 95%CI 1.38–8.28; $p = 0.008$), whereas ER α expression positively impacted OS (HR 0.60; 95%CI 0.39–0.92; $p = 0.033$; Figure 4C and Table 2). The significance of these biomarkers was confirmed in the multivariate analysis (Table 2).

The expression of p-AMPK alpha1 negatively impacted response to treatment (HR 3.31; 95%CI 1.48–7.44; $p = 0.004$) and disease control (HR 3.07; 95%CI 1.25–7.58; $p = 0.015$) in the multivariate analysis.

A subset analysis considering ER status showed that p-MAPK expression in the ER-positive cohort was associated with significantly shorter PFS (HR 3.14; 95%CI 1.59–6.20; $p = 0.001$) and OS (HR 2.53; 95%CI 1.05–6.11; $p = 0.038$), whereas no such correlation was seen in the ER-negative cohort (Table 3). Another biomarker with adverse impact in the ER-positive cohort was HIF-2 alpha (HR for OS 3.38; 95%CI 1.13–10.08; $p = 0.029$). In turn, the expression p-p70S6K in the ER-positive cohort was associated with longer PFS (HR 0.22; 95%CI 0.06–0.75; $p = 0.016$; Table 3). The expression of cyclin E was more common in the ER-negative cohort ($p = 0.003$) and in this subset associated with shorter PFS (HR 1.78; 95%CI 1.02–3.09; $p = 0.041$) and OS (HR 2.38; 95%CI 1.09–5.18; $p = 0.029$). No such impact of cyclin E was found in the ER-positive subgroup. The significance of these biomarkers was confirmed in the multivariate analysis.

FFPE primary breast cancer tissue from advanced HER2-positive breast cancer patients administered lapatinib and capecitabine (n = 270)

↓
A total of 10 TMAs were constructed
 ↓

Number of cases subjected to analysis					
p-AMPK alpha1 (n = 244)	p-MAPK (n = 249)	p-p70S6K (n = 257)	HIF-2 alpha (n = 251)	Cyclin E (n = 248)	PTEN (n = 233)
Number of cases finally determined*					
(n = 176)	(n = 184)	(n = 190)	(n = 188)	(n = 180)	(n = 176)

*at least one biomarker was determined in 199 patients

abbreviation: FFPE: formalin-fixed paraffin embedded; TMA: tissue microarray

Figure 1: CONSORT Diagram. Origin of patients analyzed for p-AMPK alpha1, p-MAPK, p-p70S6K, cyclin E, HIF2 alpha and PTEN.

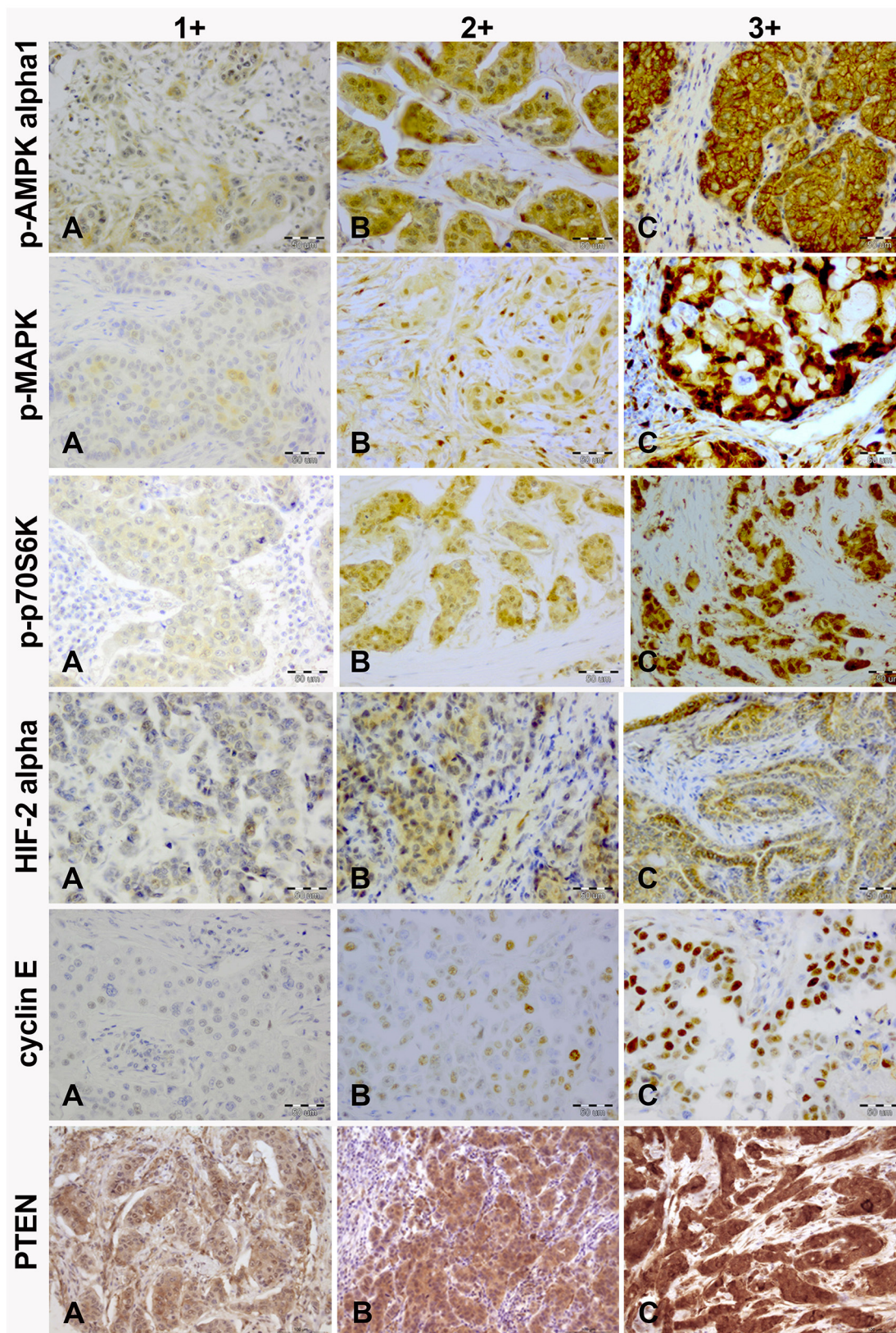


Figure 2: Immunohistochemical intensity scoring of p-AMPK alpha1, p-MAPK, p-p70S6K, HIF-2 alpha, cyclin E and PTEN (magnification, x20). A. weak; B. moderate; C. strong.

DISCUSSION

Despite spectacular progress in the treatment of HER2-positive breast cancer, overcoming primary and acquired resistance to anti-HER2 agents remains a critical challenge [32, 33]. In contrast to trastuzumab, the anti-tumor activity of lapatinib is based solely on the intracellular inhibition of cell-signaling by competing with ATP for the ATP-binding domain in the cytoplasmic

tail of the tyrosine kinase receptor – mostly HER2 and EGFR [34, 35]. Accordingly, the postulated mechanisms underlying lapatinib resistance differs from those reported for trastuzumab. Previous studies have shown up-regulated ER-associated signaling genes, including FOXO3a and caveolin-1, or Akt pathway transcripts (AKT1, MAPK9, HSPCA, IRAK1, CCND1) in lapatinib resistant cells [36]. Other factors contributing to lapatinib resistance include dominant activating mutations in *PIK3CA*, *E545K* and

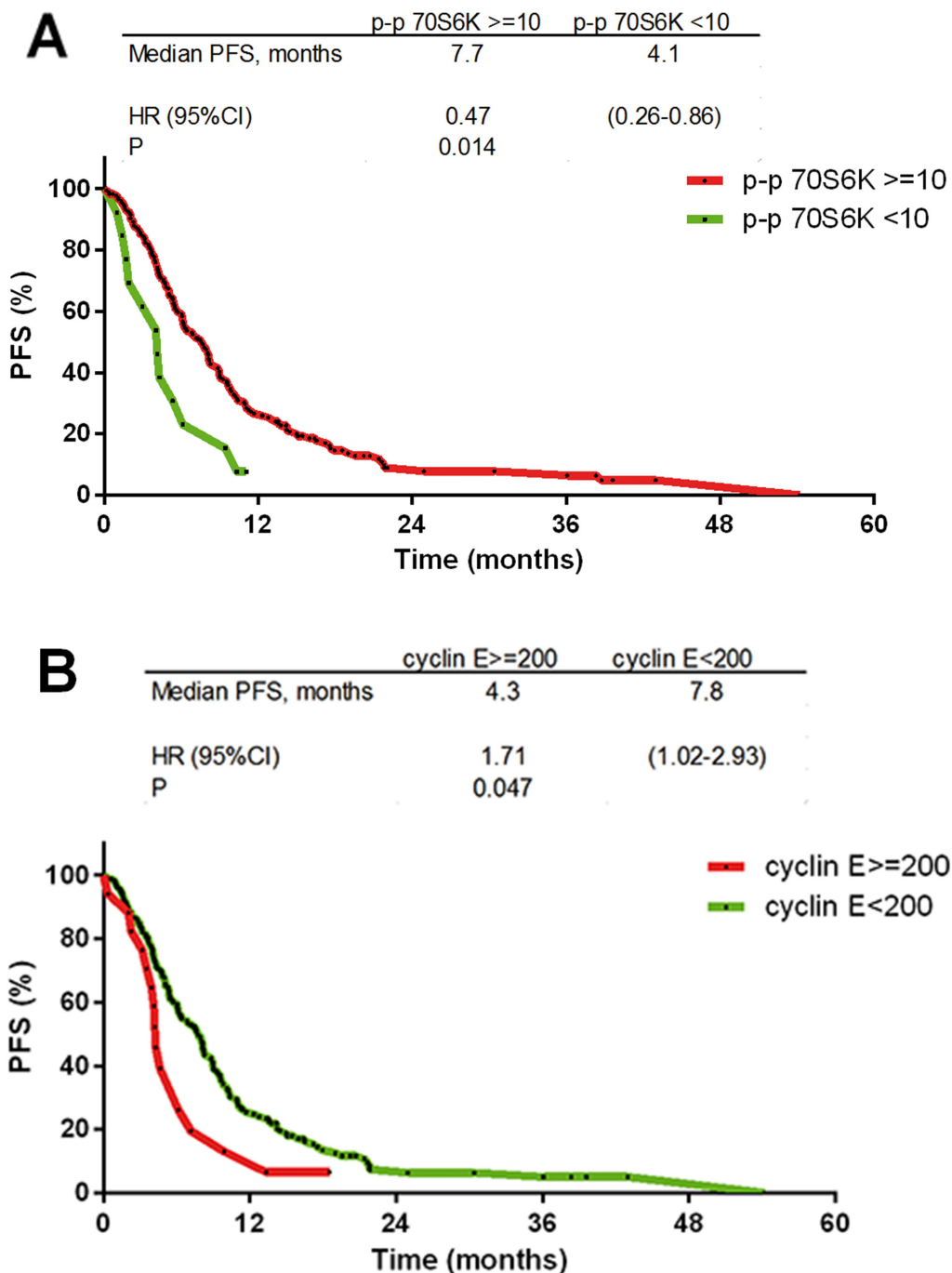


Figure 3: Kaplan-Meier progression free survival curves. A. p-p70S6K ≥ 10 staining H-score (HR 0.47; $p = 0.014$); **B.** cyclin E ≥ 200 staining H-score (HR 1.71; $p = 0.05$).

Table 1: Patient characteristics

Variable	<i>n</i> = 199
Mean age at diagnosis (range)	50 (23–81)
Menopausal status	
Premenopausal	78 (43)
Postmenopausal	102 (57)
Histology	
Ductal	168 (84)
Lobular	15 (8)
Other	5 (3)
Not determined	8 (4)
Ductal and lobular	2 (1)
Grade	
1	3 (2)
2	74 (46)
3	82 (52)
Estrogen receptor	
Negative	134 (67)
Positive	65 (33)
Progesterone receptor	
Negative	153 (77)
Positive	46 (23)
Clinical stage at diagnosis	
I	16 (8)
IIA	22 (12)
IIB	30 (16)
IIIA	44 (23)
IIIB	42 (22)
IIIC	16 (8)
IV	21 (11)
Breast cancer surgery	
No	17 (9)
Mastectomy	157 (79)
Breast conserving surgery	24 (12)
Radiotherapy	
No	44 (23)
Adjuvant	70 (36)
Definitive	18 (9)
Palliative	24 (12)
Combination thereof	40 (20)
Chemotherapy	
No	3 (2)
Neoadjuvant	86 (43)
Adjuvant	32 (16)
For advanced disease	36 (18)
Combination thereof	128 (64)

(Continued)

Variable	n = 199
Trastuzumab therapy	
No	0 (0)
Adjuvant	48 (24)
For advanced disease	136 (68)
Combination thereof	15 (8)
Endocrine therapy	
No	128 (64)
Neo(adjuvant)	36 (18)
For metastatic disease	17 (9)
Combination thereof	18 (9)
Type of first progression	
Local	20 (10)
Regional	19 (10)
Distant	138 (69)
Combined local, regional and/or distant	22 (11)
Dominant site of metastatic disease	
Soft tissue	34 (18)
Bone	26 (14)
Visceral	125 (68)
Brain metastases	
No	113 (57)
Yes	86 (43)

H1047R or overexpression of AXL, a membrane-bound tyrosine kinase receptor with resulting crosstalk between HER, AXL and ER receptor pathways [37]. There are two major signaling pathways controlled by receptors belonging to the ErbB-receptors family – Ras/Raf/MAPK, regulating cell division and proliferation, and PI3K/Akt/mTOR, regulating cell growth and survival [38]. Hence, particular impairments in these pathways result in improper activation of signaling cascades and may influence the clinical efficacy of lapatinib [39, 40].

Our study suggests that another key element involved in regulation of mTOR1 complex – phosphorylated AMPK alpha 1 protein kinase – may negatively impact response to lapatinib. AMPK acts as a crucial regulator of cell growth, proliferation and autophagy [41–42]. Intensive cellular energy-consuming processes, such as glucose deprivation, hypoxia, oxidative stress, hyperosmotic stress, or tissue ischemia, result in increased concentration of AMP, which leads to AMPK activation. Subsequently, activated AMPK, via phosphorylation of raptor or TSC2, inhibits activity of mTORC1, leading to general blockade of cellular anabolic processes and simultaneously activating catabolic processes [43]. The direct phosphorylation of raptor by AMPK leads to mTORC1 disruption and cell cycle arrest induced by energy stress [44–47]. Alteration of mTOR signaling networks, which is a common phenomenon in human

cancers, may result from impairment of upstream regulatory mechanisms [48].

We showed that p-70S6K phosphorylation, reflecting the PI3K/AKT/mTOR pathway activity, was associated with improved PFS in lapatinib-treated patients, particularly in those with ER-positive tumors. Phosphorylation of p-70S6K depends solely on the activation of mTORC1, whereas p-70S6K exerts a negative feedback loop that inhibits PI3K/Akt via IRS-1 [47]. It is possible, that the favorable impact of p70S6K is associated with its inhibitory activity against various (not only ErbB-family members) membrane receptor complexes. However, a genuine predictive value of p-70S6K for lapatinib would necessitate testing this biomarker also in lapatinib-untreated patients, to exclude its possible favorable prognostic impact shown previously in early ER α -positive breast cancer [49]. In our study a member of Ras/Raf/MAPK pathway – p-MAPK, appeared to be a negative prognostic factor, mainly in patients with ER-positive tumors. This may indicate that in advanced HER2-positive breast cancer patients treated with lapatinib, phosphorylation of p-70S6K reflects significant activity of the Ras/Raf/MAPK pathway, particularly when accompanied by p-AMPK up-regulation. However, since p-MAPK is a distant downstream element of the Ras/Raf/MAPK signaling pathway, its activity may result from crosstalk with various distinct signaling pathways. This

Table 2: Hazard ratios for progression free (PFS) and overall survival (OS): univariate and multivariate analyses

Univariate analysis		
Variable	PFS HR (95%CI); <i>p</i>	OS HR (95%CI); <i>p</i>
p-p70S6K	0.47 (0.26–0.86); 0.014	0.82 (0.43–1.56); 0.545
Cyclin E	1.71 (1.00–2.93); 0.05	2.86 (1.23–6.66); 0.015
p-MAPK	0.89 (0.60–1.29); 0.51	1.68 (1.18–2.40); 0.007
HIF-2 alpha	1.23 (0.60–2.51); 0.57	0.77 (0.39–1.52); 0.45
PTEN	1.04 (0.66–1.62); 0.88	1.08 (0.69–1.70); 0.728
p-AMPK	0.94 (0.23–3.79); 0.92	0.96 (0.31–3.03); 0.95
Type of first progression*	1.30 (0.91–1.86); 0.15	3.39 (1.38–8.28); 0.008
ER negative vs positive	0.95 (0.76–1.19); 0.65	0.60 (0.39–0.92); 0.033

Multivariate analysis		
Variable	PFS HR (95%CI); <i>p</i>	OS HR (95% CI); <i>p</i>
p-p70S6K	0.45 (0.25–0.81); 0.009	NC
Cyclin E	1.83 (1.06–3.14); 0.029	2.99 (1.29–6.94); 0.011
p-MAPK	NC	1.61 (1.13–2.29); 0.009
Type of first progression*	NC	1.87 (1.02–3.44); 0.044
ER negative vs positive	NC	0.65 (0.4–0.98); 0.041

PFS: progression free survival; OS: overall survival; ER: estrogen receptor;

*regional vs. local; NC: not calculated ($P > 0.1$ in univariate analysis and not included in the stepwise and Cox regression multivariate analysis)

observation may also suggest a potential role of combining lapatinib with MAPK pathway inhibitors. Previous studies have shown that, unlike trastuzumab, lapatinib affects cell cycle kinetics through Ras/MAPK, and had less effect on cell survival [14].

Our results suggest that the potential anti-tumor role of AMPK activators, such as metformin, may be limited in lapatinib-treated patients and requires further research [50]. A phase I trial evaluating a combination of lapatinib with metformin or sirolimus (mTOR inhibitor) in advanced cancer patients is currently ongoing (www.clinicaltrials.gov; NCT01087983). Similarly to previous studies [14, 22], we have not found a correlation between the PTEN status and clinical efficacy of lapatinib. Indeed, the activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway resulting from mutations of *PIK3CA* or loss/mutations of *PTEEN* has been attributed to the development of resistance to trastuzumab [7–12, 14] but not to lapatinib [14, 22].

As expected, in this series a high expression of cell cycle-regulating protein – cyclin E was more common in the ER-negative tumors, and in this subset was associated with apparently shorter PFS and OS. This biomarker was earlier shown to confer a poor clinical outcome in breast cancer [51]. Recent study demonstrated that cyclin E levels decrease upon HER2 down-regulation and HER2 inhibition, suggesting that HER2 regulates cyclin E function [52]. Finally, in a small group of HER2-positive breast cancer patients treated with trastuzumab-based therapy, cyclin E amplification or overexpression was

associated with significantly impaired clinical outcomes [52]. Taken together, these data indicate that cyclin E may represent another potential therapeutic target in overcoming lapatinib resistance.

In our study expression of HIF-2 alpha was associated with poor OS in the subset of ER-positive tumors. HIF-2 alpha is a key regulatory factor in tumor growth and its adverse prognostic impact has been previously reported [53, 54].

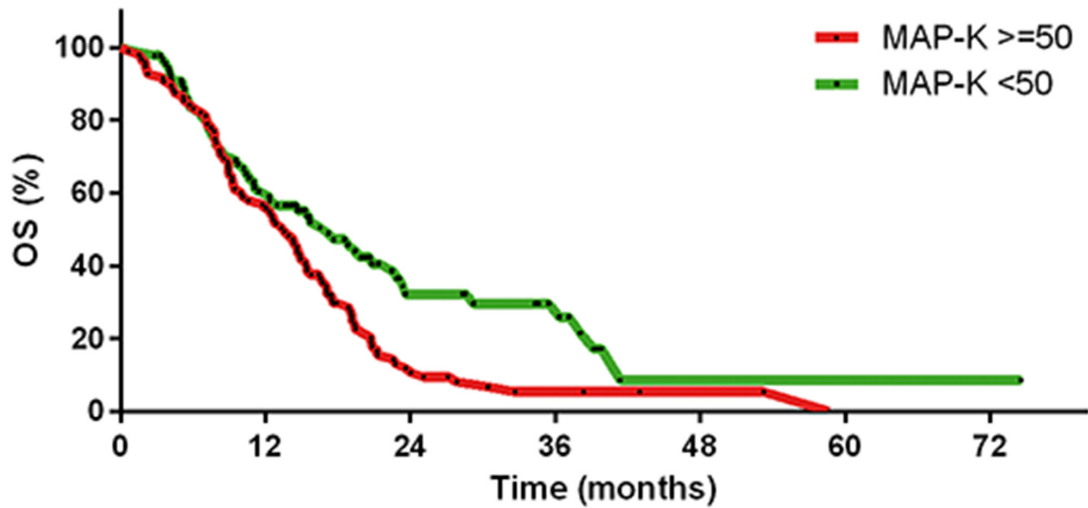
Not surprisingly, our study showed impaired survival in patients with ER-negative tumors. A negative prognostic impact of ER-negativity in HER2-positive breast cancer patients, was earlier reported by other authors [55, 56]. Indeed, the clinical behavior (including tumor kinetics and sites of recurrence) of ER-positive/HER2 positive subtype (HER2-positive luminal B breast cancer) differs from that of ER-negative HER2 enriched subtype [55–58].

A recent study suggested that the clinical benefit of first-line trastuzumab in advanced breast cancer may be predictive for the efficacy of second- and later lines of anti-HER2 therapies [59]. As our series included patients exposed to trastuzumab in both adjuvant and metastatic setting, we were unable to include this variable in the analysis.

In conclusion, our study suggests that the clinical efficacy of lapatinib may be associated with the activity of downstream signaling pathways – AMPK/mTOR and Ras/Raf/MAPK. These data may indicate a potential role of combining lapatinib with MAPK pathway inhibitors

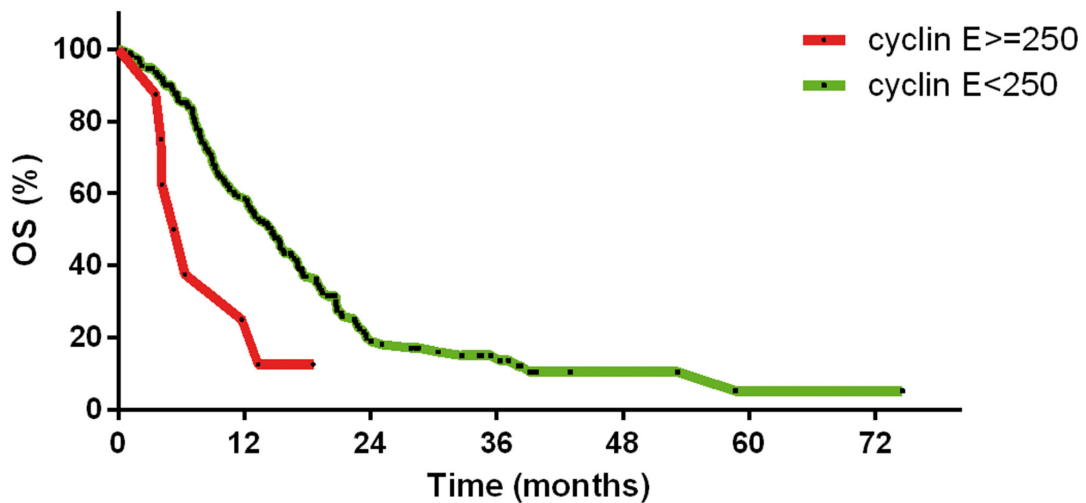
A

	MAP-K ≥ 50	MAP-K < 50
Median OS, months	13.5	17.2
HR (95%CI)	1.64	(1.14-2.25)
P	0.067	



B

	cyclin E ≥ 250	cyclin E < 250
Median OS, months	5.8	14.6
HR (95%CI)	2.86	(1.23-6.66)
P	0.015	



(Continued)

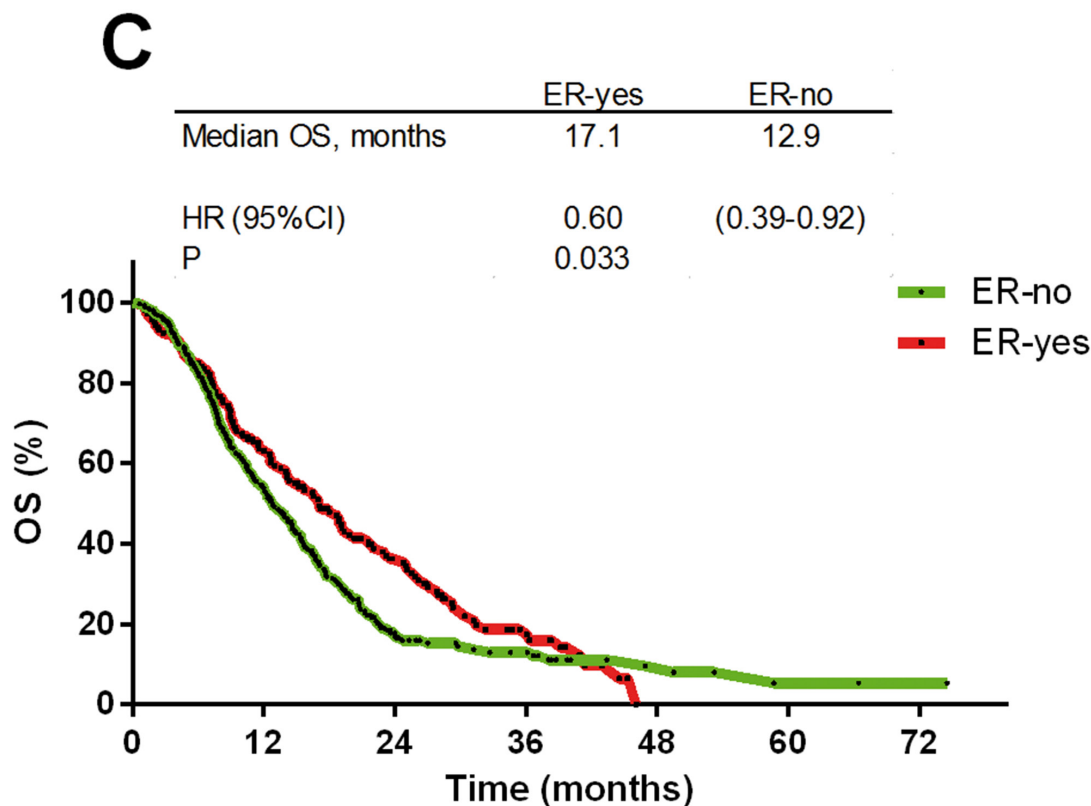


Figure 4: Kaplan-Meier overall survival curves. A. p-MAPK ≥ 50 staining H-score (HR 1.68; $p = 0.0007$); B. cyclin E ≥ 250 staining H-score (HR 2.86; $p = 0.0015$); C. estrogen receptor: positive vs. negative (HR 0.60; $p = 0.033$).

and justify further research on combinations of lapatinib with mTOR inhibitors, such as everolimus. We are aware of several limitations of this study. First, our investigations included only downstream signaling pathways, and not the underlying molecular alterations. Second, although our series was homogeneous, i.e. all patients were treated with lapatinib and capecitabine, a nonrandomized study design did not allow to test the predictive value of particular markers. Notably, a proportion of samples was excluded from analysis due to analytical problems, and there was no lapatinib-untreated control group. Finally, this analysis used material obtained from the primary tumor, whereas several studies showed phenotypic instability of metastatic sites, particularly in relation to hormone receptors [60, 61]. The question of whether biomarkers analyzed in this study are also a subject of such conversions, and whether this impacts response to lapatinib, remains to be answered. Hence, these results should be considered preliminary and only hypothesis generating. Further investigations are warranted to verify the clinical utility of our findings.

MATERIALS AND METHODS

Patients

This study was approved by the Institutional Review Board of the coordinating center (the Military Institute of

Medicine in Warsaw, Poland). An initial study population included HER2-positive advanced breast cancer patients treated in 31 oncology centers in Poland, Hungary, Czech Republic, Lithuania and Romania between 2004 and 2013. The patients should have received a combination of lapatinib at an initial dose of 1250 mg per day continuously and capecitabine at a dose of 2000 mg/m² of body-surface area on days 1 through to 14 of a 21-day cycle for at least 6 weeks. Patients must have earlier received trastuzumab and 1–3 lines of chemotherapy for advanced disease. Other eligibility criteria included age above 18 years, no previous or concomitant malignant disease except for basal cell carcinoma of the skin, tumor lesions evaluable for therapeutic response to lapatinib and the availability of formalin-fixed, paraffin embedded (FFPE) tumor tissue specimens for analysis. The following information was extracted from the medical records: the date of breast cancer diagnosis, previous local and systemic therapy, the date and type of the first progression (local, regional, distant), the dominant site of metastatic disease (soft tissue, bone, viscera), the date of brain metastasis diagnosis, the dates on which lapatinib and capecitabine were administered, the date of the first progression while on lapatinib and capecitabine therapy, and the date of death or the last follow-up visit. For tumors involving more than one category, the dominant site of distant disease was classified by the category associated

Table 3: Hazard ratios for progression free (PFS) and overall survival (OS): a subset univariate and multivariate analyses considering ER status

Univariate analysis				
Variable	N		PFS HR (95%CI); <i>p</i>	OS HR (95%CI); <i>p</i>
ER-positive				
p-p70S6K	61		0.22 (0.06–0.75); 0.016	0.45 (0.18–1.09); 0.077
Cyclin E	54		1.71 (0.53–5.55); 0.37	1.21 (0.29–5.12); 0.795
p-MAPK	57		3.14 (1.59–6.20); 0.001	2.53 (1.05–6.11); 0.038
HIF-2 alpha	58		1.86 (0.58–6.02); 0.299	3.38 (1.13–10.08); 0.029
PTEN	60		0.88 (0.41–1.88); 0.733	1.67 (0.70–4.01); 0.251
p-AMPK	54		0.54 (0.17–1.78); 0.313	0.41 (0.12–1.35); 0.142
ER-negative				
p-p70S6K	129		0.66 (0.31–1.44); 0.299	0.65 (0.31–1.34); 0.24
Cyclin E	126		1.78 (1.02–3.09); 0.041	2.38 (1.09–5.18); 0.029
p-MAPK	127		0.89 (0.59–1.41); 0.611	0.87 (0.54–1.38); 0.548
HIF-2 alpha	130		0.87 (0.35–2.15); 0.768	0.73 (0.30–1.80); 0.494
PTEN	116		1.14 (0.65–1.99); 0.64	0.79 (0.46–1.34); 0.375
p-AMPK	122		1.80 (0.44–7.32); 0.41	1.17 (0.37–3.71); 0.786
Multivariate analysis				
Variable	N	N	PFS HR (95%CI); <i>p</i>	HR (95%CI); <i>p</i>
ER-positive				
p-p70S6K		61	0.10 (0.02–0.38); 0.001	0.23 (0.06–0.81); 0.023
p-MAPK		57	4.48 (1.97–10.18); 0.001	3.91 (1.71–8.90); 0.001
HIF-2 alpha		58	1.51 (0.73–3.13); 0.263	4.74 (1.49–15.07); 0.008
ER-negative				
Cyclin E		126	1.78 (1.02–3.09); 0.041	2.38 (1.09–5.18); 0.029

PFS: progression free survival; OS: overall survival; ER: estrogen receptor; N: number of cases

with the worst prognosis, irrespective of the extent of involvement, in the following order of increasing gravity: soft tissue, bones, and viscera. Due to the retrospective nature of this study, tumor staging was performed using the American Joint Committee on Cancer/the Union for International Cancer Control classification from 1997. Follow-up information was extracted from medical records and tumor registries. All data were coded to secure full protection of personal information. Alive patients had to provide written informed consent for the use of their archival tumor samples for analysis, according to regulations in particular countries.

Pathology

The starting material from each patient was an archival formalin-fixed, paraffin embedded (FFPE) specimen(s) from the primary breast cancer obtained at surgery or by tissue biopsy. A pre-cut section of each tumor, stained with hematoxylin and eosin, was reviewed by two board-certified pathologists (WB and KK) to confirm breast cancer diagnosis and determine whether a

sufficient invasive breast cancer component was present (1 cm² invasive tissue; ≥ 30% tumor cells). In each case, assuming potential intratumoral heterogeneity, 2 tissue cores (1.5 mm in diameter) were punched out from the FFPE tissue blocks containing primary breast cancer (“donor”) and transferred into a “recipient” paraffin block using Manual Tissue MicroArrayer (MTA I, Beecher Instrument Inc.) A total of 10 tissue microarrays (TMAs) were constructed.

Immunohistochemistry (IHC) staining

IHC analysis was performed in tumor tissue in accordance with standard protocols, on 5 μm histological slides derived from the TMA blocks. The tumor-associated stromal cells were not analyzed. The staining was performed according to manufactures’ protocols with the use of the following antibodies: p-AMPK alpha1 (ab39400 rabbit polyclonal, Abcam, Cambridge, UK; dilution 1:300), p-MAPK (ab50011 mouse monoclonal, Abcam, Cambridge, UK; dilution 1:100), p-p70S6K (ab32359 rabbit monoclonal, Abcam, Cambridge, UK; dilution 1:25), HIF2alpha

(ab20654 rabbit monoclonal, Abcam, Cambridge, UK; dilution 1:250), cyclin E (HE12 mouse monoclonal, Thermo Sci, Waltham, MA, USA; dilution 1:50) and PTEN (6H2.1 mouse monoclonal, DAKO Denmark; dilution 1:100). Positive controls were used according to manufacturer's recommendations and negative controls included standard staining procedures with the omitting of the primary antibody step. TMA sections were deparaffinized in xylene and rehydrated through graded alcohols. Antigen retrieval procedure was performed using Target Retrieval Solution, with pH depending on monoclonal antibody in electric pressure cooker, followed by 20 min cooling before further immunostaining. Endogenous reactivity was blocked with normal goat serum. Following the preliminary stages, incubation with the primary antibody was carried out for 30 minutes. The binding of the monoclonal antibody was detected with biotin-labeled goat anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) and horseradish peroxidase-labeled avidin – biotin complex. IHC stains were scored manually according to staining intensity (0 – negative, 1 – weak, 2 – moderate, 3 – strong) and the percentage of positive tumor cells. Each tissue core was assessed separately and the core with the highest staining intensity was considered representative for the particular case. To accurately describe the extent of immunohistochemical staining of a tumor and to potentially increase the predictive information, expression of particular biomarkers was assessed using the staining H-score. The H-score was calculated for each biomarker by the formula: 3 x percentage of strong cellular (cytoplasmic or nuclear wherever appropriate) staining plus 2 x percentage of moderate cellular staining plus percentage of weak cellular staining, giving a range of 0 to 300. The cutoff values for each biomarker were optimized using Cox regression model to maximize the hazard ratio (HR) between patients with expression levels above vs. below the cutoff.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using STATA software version 11. Statistical significance was defined as $p < 0.05$. Categorical variables were compared using Pearson's chi-squared test (χ^2) and Spearman's R rang.

The primary endpoint was progression free survival (PFS), defined as the time from the date of the lapatinib start to the date of the disease progression or death, whichever occurred first. The secondary endpoints were an objective response, defined as a complete response (CR) or a partial response (PR) and disease control, defined as CR, PR and stable disease combined, determined according to Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) v 1.0 criteria. Survival curves were plotted using the Kaplan-Meier method, starting from the first day of lapatinib therapy to the date of death or the last follow-up. Univariate analyses were performed with a log-rank test, Wilcoxon test and Cox proportional hazard and logistic regression. Multivariate analysis used a stepwise forward selection of univariate model with $p \leq 0.10$.

ACKNOWLEDGMENTS

Central and East European Oncology Group members who contributed to this study: Wojciech Olszewski Oncology Center-Institute Warsaw, Poland; Anna Surus-Hyla, Jolanta Żok and Wojciech Rogowski, Warmia and Masuria Oncology Center, Olsztyn, Poland; Ewa Chmielowska, Oncology Center, Bydgoszcz, Poland; Rostislav Vyzula and Renata Horova, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic; Jolanta Smok-Kalwat, Oncology Center, Kielce, Poland; Tomasz Jankowski, Lublin Oncology Center, Poland; Agata Sałek, Subcarpathian Oncology Center, Rzeszów, Poland; Alexander Eniu and Gabriela Morar Bolba, Oncology Cancer Institute I. Chiricuta, Cluj-Napoca, Romania; Dorota Pólchłopek, Oncology Center, Brzozów, Poland; Elżbieta Nowara, Oncology Institute, Gliwice, Poland; Dorota Bogus and Andrzej Kałmuk, Regional Hospital, Częstochowa, Poland; Eduardas Aleknavicius, Oncology Institute, Vilnius University, Lithuania; Iwona Rynkiewicz-Zander and Piotr Wiosek, District Hospital, Elbląg, Poland; Łukasz Głogowski, Regional Hospital, Bytom, Poland; Ida Cedrych and Aleksandra Grela-Wojewoda, Oncology Institute, Kraków, Poland; Monika Kulma-Kreft, Gdynia Oncology Center, Poland; Piotr Sawrycki, Regional Hospital, Toruń, Poland; Zsuzsanna Kahan, Department of Oncology, University of Szeged, Hungary; Małgorzata Ploch-Głapińska, Regional Military Hospital, Wrocław, Poland.

Special thanks to the CEEOG Database Manager Anita Zakrzewska and the Statistician Barbara Zaborek for invaluable assistance.

CONFLICTS OF INTEREST

The author(s) indicated no potential competing interests.

GRANT SUPPORT

This work was supported by the GlaxoSmithKline Grant LAP114478 provided to Central and East European Oncology Group.

REFERENCES

1. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.* 2001; 344: 783–792.
2. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE Jr, Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman

- PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005; 353: 1673–1684.
3. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005; 353: 1659–1672.
 4. Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, Alanko T, Kataja V, Asola R, Utriainen T, Kokko R, Hemminki A, Tarkkanen M, Turpeenniemi-Hujanen T, Jyrkkiö S, Flander M, et al. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med.* 2006; 354: 809–820.
 5. Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Press M, Mackey J, Glaspy J, Chan A, Pawlicki M, Pinter T, Valero V, Liu MC, et al. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2011; 365: 1273–1283.
 6. Petricevic B, Laengle J, Singer J, Sachet M, Fazekas J, Steger G, Bartsch R, Jensen-Jarolim E, Bergmann M. Trastuzumab mediates antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and phagocytosis to the same extent in both adjuvant and metastatic HER2/neu breast cancer patients. *J Transl Med.* 2013; 11: 307.
 7. Spector NL, Blackwell KL. Understanding the mechanisms behind trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *J Clin Oncol.* 2009; 27: 5838–5847.
 8. Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, Klos KS, Li P, Monia BP, Nguyen NT, Hortobagyi GN, Hung MC, Yu D. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell.* 2004; 6: 117–127.
 9. Wang Y, Liu Y, Du Y, Yin W, Lu J. The predictive role of phosphatase and tensin homolog (PTEN) loss, phosphoinositide-3 (PI3) kinase (PIK3CA) mutation, and PI3K pathway activation in sensitivity to trastuzumab in HER2-positive breast cancer: a meta-analysis. *Curr Med Res Opin.* 2013; 29: 633–642.
 10. Duman BB, Sahin B, Acikalin A, Ergin M, Zorludemir S. PTEN, Akt, MAPK, p53 and p95 expression to predict trastuzumab resistance in HER2 positive breast cancer. *J BUON.* 2013; 18: 44–50.
 11. Gori S, Sidoni A, Colozza M, Ferri I, Mameli MG, Fenocchio D, Stocchi L, Foglietta J, Ludovini V, Minenza E, De Angelis V, Crinò L. EGFR, pMAPK, pAkt and PTEN status by immunohistochemistry: correlation with clinical outcome in HER2-positive metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab. *Ann Oncol.* 2009; 20: 648–654.
 12. Esteva FJ, Guo H, Zhang S, Santa-Maria C, Stone S, Lanchbury JS, Sahin AA, Hortobagyi GN, Yu D. PTEN, PIK3CA, p-AKT, and p-p70S6K status: association with trastuzumab response and survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Am J Pathol.* 2010; 177: 1647–1656.
 13. Wang L, Zhang Q, Zhang J, Sun S, Guo H, Jia Z, Wang B, Shao Z, Wang Z, Hu X. PI3K pathway activation results in low efficacy of both trastuzumab and lapatinib. *BMC Cancer.* 2011; 11: 248.
 14. Dave B, Migliaccio I, Gutierrez MC, Wu MF, Chamness GC, Wong H, Narasanna A, Chakrabarty A, Hilsenbeck SG, Huang J, Rimawi M, Schiff R, Arteaga C, et al. Loss of phosphatase and tensin homolog or phosphoinositide-3 kinase activation and response to trastuzumab or lapatinib in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing locally advanced breast cancers. *J Clin Oncol.* 2011; 29: 166–173.
 15. Raina D, Uchida Y, Kharbanda A, Rajabi H, Panchamoorthy G, Jin C, Kharbanda S, Scaltriti M, Baselga J, Kufe D. Targeting the MUC1-C oncoprotein downregulates HER2 activation and abrogates trastuzumab resistance in breast cancer cells. *Oncogene.* 2014; 33: 3422–3431.
 16. Nahta R, Yuan LX, Zhang B, Kobayashi R, Esteva FJ. Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer Res.* 2005; 65: 11118–11128.
 17. Lu Y, Zi X, Zhao Y, Mascarenhas D, Pollak M. Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93: 1852–1857.
 18. Zhang S, Huang WC, Li P, Guo H, Poh SB, Brady SW, Xiong Y, Tseng LM, Li SH, Ding Z, Sahin AA, Esteva FJ, Hortobagyi GN, Yu D. Combating trastuzumab resistance by targeting SRC, a common node downstream of multiple resistance pathways. *Nat Med.* 2011; 17: 461–469.
 19. Scaltriti M, Eichhorn PJ, Cortés J, Prudkin L, Aura C, Jiménez J, Chandarlapaty S, Serra V, Prat A, Ibrahim YH, Guzmán M, Gili M, Rodríguez O, et al. Cyclin E amplification/overexpression is a mechanism of trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108: 3761–3766.
 20. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, Jagiello-Gruszfeld A, Crown J, Chan A, Kaufman B, Skarlos D, Campone M, Davidson N, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med.* 2006; 355: 2733–2743.
 21. Xia W, Mullin RJ, Keith BR, Liu LH, Ma H, Rusnak DW, Owens G, Alligood KJ, Spector NL. Anti-tumor activity of GW572016: a dual tyrosine kinase inhibitor blocks EGF activation of EGFR/erbB2 and downstream Erk1/2 and AKT pathways. *Oncogene.* 2002; 21: 6255–6263.
 22. Xia W, Husain I, Liu L, Bacus S, Saini S, Spohn J, Pry K, Westlund R, Stein SH, Spector NL. Lapatinib anti-tumor activity is not dependent upon phosphatase and

- tensin homologue deleted on chromosome 10 in ErbB2-overexpressing breast cancers. *Cancer Res.* 2007; 67: 1170–1175.
23. Wang YC, Morrison G, Gillihan R, Guo J, Ward RM, Fu X, Botero MF, Healy NA, Hilsenbeck SG, Phillips GL, Chamness GC, Rimawi MF, Osborne CK, et al. Different mechanisms for resistance to trastuzumab versus lapatinib in HER2-positive breast cancers--role of estrogen receptor and HER2 reactivation. *Breast Cancer Res.* 2011; 13: R121.
 24. Wetterskog D, Shiu KK, Chong I, Meijer T, Mackay A, Lambros M, Cunningham D, Reis-Filho JS, Lord CJ, Ashworth A. Identification of novel determinants of resistance to lapatinib in ERBB2-amplified cancers. *Oncogene.* 2014; 33: 966–976.
 25. Brady SW, Zhang J, Seok D, Wang H, Yu D. Enhanced PI3K p110 α signaling confers acquired lapatinib resistance that can be effectively reversed by a p110 α -selective PI3K inhibitor. *Mol Cancer Ther.* 2014; 13: 60–70.
 26. De Luca A, D'Alessio A, Gallo M, Maiello MR, Bode AM, Normanno N. Src and CXCR4 are involved in the invasiveness of breast cancer cells with acquired resistance to lapatinib. *Cell Cycle.* 2014; 13: 148–156.
 27. Sato Y, Yashiro M, Takakura N. Heregulin induces resistance to lapatinib-mediated growth inhibition of HER2-amplified cancer cells. *Cancer Sci.* 2013; 104: 1618–1625.
 28. Wang Q, Quan H, Zhao J, Xie C, Wang L, Lou L. RON confers lapatinib resistance in HER2-positive breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2013; 340: 43–50.
 29. Johnston S, Trudeau M, Kaufman B, Boussen H, Blackwell K, LoRusso P, Lombardi DP, Ben Ahmed S, Citrin DL, DeSilvio ML, Harris J, Westlund RE, Salazar V et al. Phase II study of predictive biomarker profiles for response targeting human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) in advanced inflammatory breast cancer with lapatinib monotherapy. *J Clin Oncol.* 2008; 26:1066–1072.
 30. Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraro C, Colomer R, Brunet J, Menendez JA. Low-scale phosphoproteome analyses identify the mTOR effector p70 S6 kinase 1 as a specific biomarker of the dual-HER1/HER2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib (Tykerb) in human breast carcinoma cells. *Ann Oncol.* 2008; 19: 1097–1109.
 31. Yarden Y. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology.* 2001; 61: 1–13.
 32. Puglisi F, Minisini AM, De Angelis C, Arpino G. Overcoming treatment resistance in HER2-positive breast cancer: potential strategies. *Drugs.* 2012; 72: 1175–1193.
 33. Arteaga CL, Sliwkowski MX, Osborne CK, Perez EA, Puglisi F, Gianni L. Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011; 9: 16–32.
 34. Rusnak DW, Affleck K, Cockerill SG, Stubberfield C, Harris R, Page M, Smith KJ, Guntrip SB, Carter MC, Shaw RJ, Jowett A, Stables J, Topley P, et al. The characterization of novel, dual ErbB-2/EGFR, tyrosine kinase inhibitors: potential therapy for cancer. *Cancer Res.* 2001; 61: 7196–7203.
 35. Rusnak DW, Lackey K, Affleck K, Wood ER, Alligood KJ, Rhodes N, Keith BR, Murray DM, Knight WB, Mullin RJ, Gilmer TM. The effects of the novel, reversible epidermal growth factor receptor/ErbB-2 tyrosine kinase inhibitor, GW2016, on the growth of human normal and tumor-derived cell lines *in vitro* and *in vivo*. *Mol Cancer Ther.* 2001; 1: 85–94.
 36. Hegde PS, Rusnak D, Bertiaux M, Alligood K, Strum J, Gagnon R, Gilmer TM. Delineation of molecular mechanisms of sensitivity to lapatinib in breast cancer cell lines using global gene expression profiles. *Mol Cancer Ther.* 2007; 6: 1629–1640.
 37. Liu L, Greger J, Shi H, Liu Y, Greshock J, Annan R, Halsey W, Sathe GM, Martin AM, Gilmer TM. Novel mechanism of lapatinib resistance in HER2-positive breast tumor cells: activation of AXL. *Cancer Res.* 2009; 69: 6871–6878.
 38. Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Kempf RC, Long J, Laidler P, Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Stivala F, Mazzarino MC, Donia M, Fagone P, Malaponte G, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging (Albany NY).* 2011; 3: 192–222.
 39. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Franklin RA, Montalto G, Cervello M, Libra M, Candido S, Malaponte G, Mazzarino MC, Fagone P, Nicoletti F, et al. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascade inhibitors: how mutations can result in therapy resistance and how to overcome resistance. *Oncotarget.* 2012; 3: 1068–1111.
 40. Lauring J, Park BH, Wolff AC. The phosphoinositide-3-kinase-Akt-mTOR pathway as a therapeutic target in breast cancer. *J Natl Compr Canc Netw.* 2013; 11: 670–678.
 41. Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett.* 2003; 546: 113–120.
 42. Hardie DG, Carling D. The AMP-activated protein kinase—fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem.* 1997; 246: 259–273.
 43. Shackelford DB, Shaw RJ. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9: 563–575.
 44. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell.* 2008; 30: 214–226.
 45. Shaw RJ. LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. *Acta Physiol (Oxf).* 2009; 196: 65–80.
 46. Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway—new players upstream and downstream. *J Cell Sci.* 2004; 117: 5479–5487.

47. Green AS, Chapuis N, Lacombe C, Mayeux P, Bouscary D, Tamburini J. LKB1/AMPK/mTOR signaling pathway in hematological malignancies: from metabolism to cancer cell biology. *Cell Cycle*. 2011; 10: 2115–2120.
48. Menon S, Manning BD. Common corruption of the mTOR signaling network in human tumors. *Oncogene*. 2008; 27: S43–51.
49. Beelen K, Opdam M, Severson TM, Koornstra RH, Vincent AD, Wesseling J, Muris JJ, Berns EM, Vermorken JB, van Diest PJ, Linn SC. Phosphorylated p-70S6K predicts tamoxifen resistance in postmenopausal breast cancer patients randomized between adjuvant tamoxifen versus no systemic treatment. *Breast Cancer Res*. 2014; 16: R6.
50. Zakikhani M, Dowling R, Fantus IG, Sonenberg N, Pollak M. Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Res*. 2006; 66: 10269–10273.
51. Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz TA, Callister M, Ding Y, Hortobagyi GN, Bedrosian I, Knickerbocker C, Toyofuku W, Lowe M, Herliczek TW, Bacus SS. Cyclin E and survival in patients with breast cancer. *N Engl J Med*. 2002; 347: 1566–1575.
52. Mittendorf EA, Liu Y, Tucker SL, McKenzie T, Qiao N, Akli S, Biernacka A, Liu Y, Meijer L, Keyomarsi K, Hunt KK. A novel interaction between HER2/neu and cyclin E in breast cancer. *Oncogene*. 2010; 29: 3896–3907.
53. Wang HX, Qin C, Han FY, Wang XH, Li N. HIF-2 α as a prognostic marker for breast cancer progression and patient survival. *Genet Mol Res*. 2014; 13: 2817–2826.
54. Gilkes DM, Semenza GL. Role of hypoxia-inducible factors in breast cancer metastasis. *Future Oncol*. 2013; 9: 1623–1636.
55. Vaz-Luis I, Ottesen RA, Hughes ME, Marcom PK, Moy B, Rugo HS, Theriault RL, Wilson J, Niland JC, Weeks JC, Lin NU. Impact of hormone receptor status on patterns of recurrence and clinical outcomes among patients with human epidermal growth factor-2-positive breast cancer in the National Comprehensive Cancer Network: a prospective cohort study. *Breast Cancer Res*. 2012; 14: R129.
56. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MC, Voduc D, Speers CH, Nielsen TO, Gelmon K. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. 2010; 28: 3271–3277.
57. Paluch-Shimon S, Ben-Baruch N, Wolf I, Zach L, Kopolovic J, Kruglikova A, Modiano T, Yosepovich A, Catane R, Kaufman B. Hormone receptor expression is associated with a unique pattern of metastatic spread and increased survival among HER2-overexpressing breast cancer patients. *Am J Clin Oncol*. 2009; 32: 504–508.
58. Vaz-Luis I, Winer EP, Lin NU. Human epidermal growth factor receptor-2-positive breast cancer: does estrogen receptor status define two distinct subtypes? *Ann Oncol*. 2013; 24: 283–291.
59. Bonotto M, Gerratana L, Iacono D, Minisini AM, Rihawi K, Fasola G, Puglisi F. Treatment of Metastatic Breast Cancer in a Real-World Scenario: Is Progression-Free Survival With First Line Predictive of Benefit From Second and Later Lines? *Oncologist*. 2015; 20: 719–724.
60. Gong Y, Han EY, Guo M, Pusztai L, Sneige N. Stability of estrogen receptor status in breast carcinoma: a comparison between primary and metastatic tumors with regard to disease course and intervening systemic therapy. *Cancer*. 2011; 117: 705–713.
61. Lindström LS, Karlsson E, Wilking UM, Johansson U, Hartman J, Lidbrink EK, Hatschek T, Skoog L, Bergh J. Clinically used breast cancer markers such as estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 are unstable throughout tumor progression. *J Clin Oncol*. 2012; 30: 2601–2608.

The Safety of Therapeutic Monoclonal Antibodies: Implications for Cancer Therapy Including Immuno-Checkpoint Inhibitors

R. DEMLOVA^{1,2}, D. VALÍK^{1,2}, R. OBERMANNOVA^{1,2}, L. ZDRAŽILOVÁ-DUBSKÁ^{1,2}

¹Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Masaryk University Brno, Czech Republic,

²Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic

Received September 6, 2016

Accepted October 24, 2016

Summary

Monoclonal antibody-based treatment of cancer has been established as one of the most successful therapeutic strategies for both hematologic malignancies and solid tumors. In addition to targeting cancer antigens antibodies can also modulate immunological pathways that are critical to immune surveillance. Antibody therapy directed against several negative immunologic regulators (checkpoints) is demonstrating significant success in the past few years. Immune checkpoint inhibitors, ipilimumab, pembrolizumab and nivolumab, have shown significant clinical benefit in several malignancies and are already approved for advanced melanoma and squamous NSCLC. Based on their mechanism of action, these agents can exert toxicities that are unlike conventional cytotoxic chemotherapy, whose nature is close to autoimmune diseases - immune related adverse events (irAEs). In this review we focus on the spectrum of irAEs associated with immune checkpoint antibodies, discussing the pharmacological treatment strategy and possible clinical impact.

Key words

Cancer treatment • Monoclonal antibodies • Immune checkpoint inhibitors • Immune related adverse events

Corresponding author

R. Demlova, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic. Email: demlova@med.muni.cz

Monoclonal antibodies in cancer

Monoclonal antibodies (mAbs) are a rapidly growing class of human therapeutics representing

approximately 25 % of drugs under development (Datamonitor: Pipeline insights 2009). By 2014, 34 therapeutic mAbs are predicted to be on the market for treating cancer, autoimmune diseases, and infectious diseases (Datamonitor: Pipeline insights 2009). Since their discovery in 1975, mAbs have been described as "magic bullets" with the potential to seek out and bind targets with high affinity and specificity (Kohler *et al.* 1975). Cancer diseases are one of the major groups where monoclonal antibodies are used in clinical practice. There have been twelve antibodies that have received approval from the FDA for the treatment of a variety of solid tumors and hematological malignancies in 2014 (Scott *et al.* 2012). In addition, there are a large number of additional therapeutic antibodies that are currently being tested in early- and late-stage clinical trials. The most common type of mAbs used to treat cancer are "naked mAbs". Most naked mAbs attach to antigens on cancer cells, but some work by binding to antigens on other, non-cancerous cells, or even free-floating proteins. We can simplify three major mechanism of actions of naked mAbs. One principle is boosts a person's immune response against cancer cells by attaching to them and acting as a marker for the body's immune system to destroy them. An example is alemtuzumab, which binds to the CD52 antigen on lymphocytes and is used to treat some patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). Another naked mAbs work mainly by attaching to and blocking antigens on cancer cells that help cancer cells grow or spread. For example, trastuzumab is an antibody against the HER2 protein. Currently the most researched mAbs are naked mAbs which boost the immune response

by targeting immune system checkpoints like anti-CTLA-4 monoclonal antibody ipilimumab or nivolumab and pembrolizumab targeting programmed cell death 1 receptor (PD-1). Adverse effects of this immune checkpoint inhibitors will be discussed in this review in more detail.

In cancer therapy apart from the naked Mabs we can use also conjugated monoclonal antibodies, mAbs joined to a chemotherapy drug or to a radioactive particle. Conjugated mAbs are also sometimes referred to as tagged, labeled, or loaded antibodies. Ibritumomab tiuxetan is an example of a radiolabeled mAb. Antibody-drug conjugates (ADCs) like brentuximab vedotin targets the CD30 antigen, trastuzumab emtansine (also called TDM-1) is an antibody that targets the HER2 protein attached to a chemo drug called DM1. It's used to treat some breast cancer patients whose cancer cells have too much HER2. Bispecific monoclonal antibodies are made up of parts of 2 different mAbs, meaning they can attach to 2 different proteins at the same time. An example is blinatumomab, which is used to treat some types of acute lymphocytic leukemia (ALL). One part of blinatumomab attaches to the CD19 protein, which is found on some leukemia and lymphoma cells. Another part attaches to CD3, a protein found on immune cells called T cells. By binding to both of these proteins, this drug brings the cancer cells and immune cells together, which is thought to cause the immune system to attack the cancer cells.

Compared with chemotherapy drugs, monoclonal antibodies tend to have fewer serious side effects, however, as with all agents, administration of mAbs should be associated with adverse events (AEs) as a result of enhancing/inhibiting the activity of the target molecule on the target tissue, or due to interactions of the mAb with target molecules on tissues other than the intended ones (Catapano *et al.* 2013).

Classification of adverse effects of biological agents

Traditionally, adverse reactions should be subclassified according to their action (Naisbitt *et al.* 2000) (Table 1): so-called type A reactions correspond to the pharmacological activity of the drug, and are thus predictable (Hoigne *et al.* 1993). About 16 % of side effects are type B reactions (Naisbitt *et al.* 2000), which are not related to the pharmacological activity of the drug and are nonpredictable. The majority of type B reactions are immune-mediated side-effects like hypersensitivity reactions. Types C, D, and E are not mechanisms but characteristics of their manifestations; they are not referred to frequently in the literature. The letter C refers to continuous, chronic. Type D refers to delayed in appearance, making them difficult to diagnose. Type E refers to end of use, F means failure of therapy (Edwards *et al.* 2000).

Table 1. Classification of adverse drug reactions (Naisbitt *et al.* 2000).

Type A (augmented) reactions	Predicted from the known pharmacology of the drug. These reactions are dose-dependent: examples are bleeding with anticoagulants
Type B (bizarre) reactions	Reactions are not predicted from the known pharmacology of the drug. They appear (but actually are not) relatively dose-independent, as very small doses might already elicit symptoms. They include immune-mediated side-effects like maculopapular exanthema, but also other hypersensitivity reactions, like aspirin-induced asthma
Type C (chronic) reactions	Which are related to the chemical structure and its metabolism, e.g. paracetamol hepatotoxicity
Type D (delayed) reactions	Which appear after many years of treatment, e.g. bladder carcinoma after treatment with cyclophosphamide
Type E (end of treatment) reactions	Occur after drug withdrawal, e.g. seizures after stopping phenytoin

Biological agents differ from most drugs as they are not small chemical compounds (xenobiotics) but are proteins produced in a way to make them as similar to human proteins as possible. They are not metabolized like

drugs but are processed like other proteins, with the differences in pharmacokinetic as well as pharmacodynamic properties. Thus, adverse reactions to biological agents might differ from those elicited by

classical drugs. More appropriate classification of mAbs adverse effects is a subclassification published by Pichler *et al.* (2006) based on mechanism of action and structure, as illustrated in Figure 1. To distinguish it from the classification of side-effects to chemicals/drugs (Table 1), the Greek alphabet is used for the five types (type α , β , γ , δ and ϵ). Type α (high cytokine and cytokine release syndrome) are side-effects connected to the systematic application of cytokines in relatively high doses or to high concentrations of cytokines released into the circulation (Vasquez *et al.* 1995). Type β reactions can be termed as hypersensitivity. Thereby basically three forms of allergies can be differentiated: IgE-, IgG- and T cell-mediated reactions. Type γ immune (cytokine) imbalance

syndromes have immunological features, but cannot be explained by high cytokine levels or typical hypersensitivity reactions. As illustrated in Figure 1, these reactions can be further subdivided in, impaired functions, and unmasking or causing an immune imbalance leading to autoimmune, auto-inflammatory or allergic reactions. Type δ (cross-reactivity) might be that antibodies generated to an antigen expressed on tumour cells might also cross-react with normal cells, which express this structure as well, albeit to a lower degree (Perez-Soler *et al.* 2005). Type ϵ (non-immunological side-effects) may elicit symptoms not directly related to the immune system, sometimes revealing unknown functions of the biological agents given or targeted.

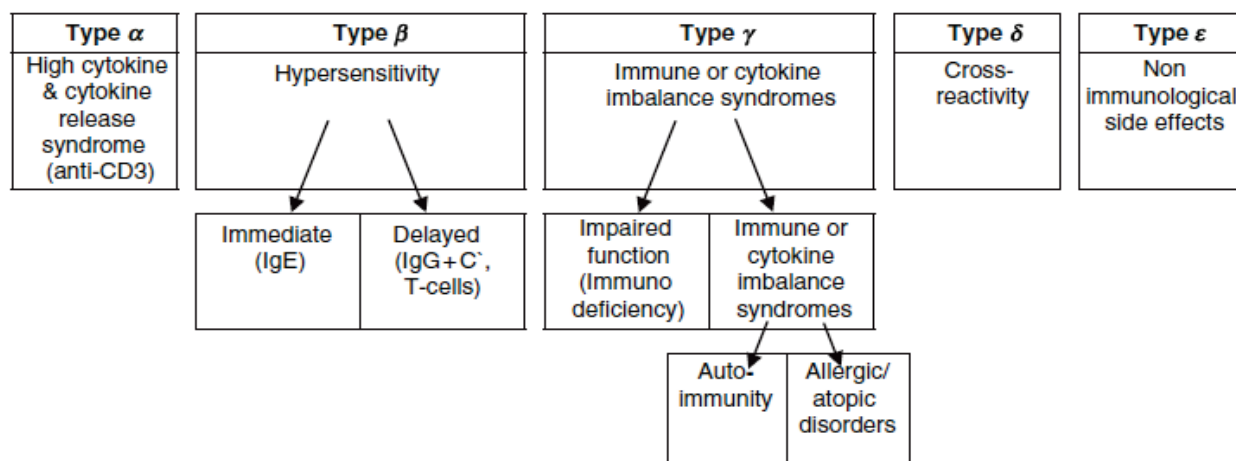


Fig. 1. Type of adverse effects of biological agents. (Pichler 2006).

Immuno-checkpoints inhibitors and immune related adverse events (irAEs)

Cancer therapy based on monoclonal antibodies against checkpoints of immune reaction is today considered a breakthrough method in oncology. Results with the anti-CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4) antibody ipilimumab in the treatment of advanced malignant melanoma have represented a revolution in anti-tumour therapy and been a catalyst for developing new antibodies focusing on other control molecules (checkpoints) (Lakomy *et al.* 2015) What is especially worth mentioning in this context are the antibodies against programmed cell death receptor (PD-1) – nivolumab and pembrolizumab and against its ligand (PD-L1), BMS-936559, MPDL3280A or lambrolizumab ((Weber *et al.* 2015, Hamid *et al.* 2013)). The development and use of immune therapy have achieved their greatest progress so far in advanced melanoma, but

soon we will be similarly treating non-small-cell pulmonary carcinoma and other tumour types.

These antibodies prevent an inhibition of interaction between PD-1 and PD-L1/L2, on the other hand cause secondary potentiation of the effector component of immunity on the “peripheral” level directly in the tumour tissue. Break of tolerance towards the tumour may, however, be accompanied by unwanted break of tolerance towards “normal tissues”, which leads to adverse reactions whose nature is close to autoimmune diseases – immune related adverse events (irAEs). IrAEs include dermatologic, GI, hepatic, endocrine, and other less common inflammatory events. Because irAEs likely arise from general immunologic enhancement, temporary immunosuppression with corticosteroids, tumor necrosis factor α antagonists or other agents is often necessary and should follow established algorithms (Postow *et al.* 2015). Due to the high frequency of irAEs with the risk of life-threatening complications, sufficient education of

patients, their family members and medical specialists is necessary. Warnings and recommendations have been prepared about how to proceed suspected irAEs. Early commencement of immunosuppressive therapy with corticosteroids is the key step towards management of the incident, reduction of morbidity and potentially also mortality. If corticoids are not sufficiently effective, other immunosuppressants are added, such as infliximab or mycophenolate mofetil (Lakomy *et al.* 2015).

Side effects of ipilimumab

Ani-CTLA-4 monoclonal antibody ipilimumab was the first immune checkpoint receptor used in daily clinical practice. The frequency of adverse effects of ipilimumab is relatively high; in a pre-authorization study of the dose of 3 mg/kg it ranged between 80 – 90 %. Luckily the toxicity was mild to moderate in the vast majority of the cases (grade 1 and 2 toxicity). Serious (grade 3) and life-threatening (grade 4) toxicity pursuant to NCI- CTCAE v3.0 (National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events version 3.0) was reported for about 20 – 25 % of the study population (Hodi *et al.* 2010). Adverse effects may already occur in the course of or after the infusion (nausea, vomiting, febrility, pain and vertigo, rash and pruritus), but these reactions are singular and mostly non-serious. The general recommendation is to suspend the infusion until symptoms retreat, with potential administration of antihistaminics or antipyretics, and subsequently to restart at a slower (about half) speed with patient monitoring (Fecher *et al.* 2013). Premedication with antihistaminics or antipyretics before the following administrations is recommended for consideration in those cases. In the case of serious adverse reaction of levels 3 and 4 (bronchospasm, hypotension, anaphylaxis) the procedure is identical to other hypersensitivity reactions, with the permanent discontinuation of therapy recommended. The irAEs are a bigger concern, though, as they are most common and grow with the dose. In the case of the dose of 3 mg/kg they appear in up to 60 % of patients, while severe irAE toxicity of levels 3 and 4 has been reported for 10 – 15 % of the study subjects (Hodi *et al.* 2010, Wolchok *et al.* 2010). The most frequent irAEs include dermal toxicity (rash, pruritus), enterocolitis and diarrhea, endocrinopathy (hypophysitis, thyroiditis) and liver test elevation. The immune system may, however, attack any part of the anatomy (heart, lungs, kidneys, nervous system, eyes, hematopoietic system etc.). Biopsy

then most often reveals tissue infiltration with T lymphocytes or with neutrophils (Fecher *et al.* 2013). Over time, we can first expect dermal toxicity (after three weeks), followed by colitis and diarrhea (after five weeks), hepatic toxicity (after 6 – 7 weeks) and finally endocrinopathy (after 7 – 8 weeks from therapy commencement) (Weber *et al.* 2012). We should also remember that IrAEs may, however, also appear a couple of weeks or months after therapy completion. The text below will deal with the most frequent irAEs and how to address them.

Immune-conditioned dermal toxicity

Dermal toxicity is one of the most common irAEs (40 – 45 %) usually first occurring after week 3 of therapy and culminating in week 6 (Lakomy *et al.* 2015, Hodi *et al.* 2010, Weber *et al.* 2012). This is mostly level 1 toxicity (affecting <10 % of the body surface) or toxicity level 2 (with an effect on between 10 and 30 % of the body surface). Severe toxicity (levels 3 and 4) is luckily rare, only ranging between 1 – 2 % in the pre-authorization study. Usual manifestations include maculopapular exanthema (20 %) and/or pruritus (25 %). Another manifestation may be vitiligo, which is rather cosmetic issue, but the patient must be educated about protection against UV radiation. Blisters are already a manifestation of a severe reaction. Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis occur in <1 % patients and are a reason for permanent discontinuation of therapy.

Immune-conditioned colitis and diarrhea

Diarrhea induced by ipilimumab is another of the most common autoimmune-conditioned adverse reactions. This effect appears after week 5 of therapy. In the case of an ipilimumab dose of 3 mg/kg, this AE occurs in about 30 % patients, and incidence rises with the dose – 44 % at 10 mg/kg i.v. (Hodi *et al.* 2010, Weber *et al.* 2012). Severe diarrhea or colitis levels 3 or 4 occur in the case of a 3 mg/kg dose in about 5 – 8 % of patients, colitis most often affecting the descending colon (Wolchok *et al.* 2010). A big threat is potential intestinal perforation, with potential fatal consequences.

Prophylactic administration of oral corticoids (budesonide) did not change the incidence of diarrhea (Weber *et al.* 2009). The so far published results suggest that immunosuppressive corticoid therapy administered in

the course of the immunotherapy does not substantially affect the therapeutic effect of ipilimumab (Weber *et al.* 2009, Harmankaya *et al.* 2011).

Immune-conditioned hepatic toxicity

Hepatic toxicity caused by ipilimumab, even though rarer in comparison to the previously mentioned immune-conditioned adverse effects, may also represent a life-threatening reaction. The onset of this irAE usually occurs after week 6 of ipilimumab therapy, becoming very rare after week 14 (Weber *et al.* 2012). If all recommendations for diagnosis and treatment are observed, the prognosis for patients with this type of irAE is excellent; the liver test results usually normalize very quickly after commencement of the appropriate therapy – in about two weeks (Della Scarpata *et al.* 2014). A patient with hepatic toxicity may be asymptomatic (laboratory results usually show elevated ALT and/or AST and/or bilirubin), but frequent complaints include febrility, fatigue, nausea, jaundice, changed stool color or urine colour, and sometimes pruritus. Patient examination must include taking a careful medical history to exclude other causes – fungi, alcohol, contact with chemicals or the effect of concurrent medication (such as paracetamol and others). Clinical examination may reveal, in addition to icterus, also hepatomegaly, the patient may be exhausted, or the find may be completely negative. An infectious cause must always be excluded in level 2 and higher of hepatic toxicity, and antibodies against nuclear antigen and mitochondrial antigen must be sampled (ANA, SMA). Exclusion of progression of the malignant disease by imaging methods is also necessary. In the case of level 3 and 4 toxicity, liver biopsy is to be considered (finds typical of hepatic toxicity include infiltration of the liver parenchyma with T lymphocytes, sometimes with necrosis of hepatocytes) (Lakomy *et al.* 2015).

Immune-conditioned endocrinopathy

Like the immune-conditioned hepatopathy endocrinopathy is also less frequent than dermal or gastrointestinal toxicity, but again represents a potentially life-threatening condition. The deceptiveness of endocrinopathy lies in its late onset (7 – 8 weeks after ipilimumab therapy commencement, with the highest incidence between weeks 12 and 24), and in the fact that, unlike hepatic toxicity, the probability of occurrence does

not decrease in time from completion of therapy; instead, the appearance of the curve is rather like a plateau (Weber *et al.* 2012).

Possible endocrinopathies include hypopituitarism (with or without hypophysitis), hypofunction of the adrenals, hypo- or hyperfunction of the thyroid gland and hypofunction of the gonads. In the case of a suspected adverse effect of this kind, the medical history of the patient is again important (incidence of endocrinopathies in the patient's personal and family history), the patient may complain of non-specific symptoms such as fatigue, weakness, febrilia, abdominal pain, vomiting, diarrhea, headaches or sensory disorders. Clinical warning symptoms include signs of dehydration, hypotension or other signs of commencing systemic inflammatory response syndrome. Laboratory examinations, apart from basic internal environment parameters (often hyperkalemia, hyponatremia and hypoglycemia) and blood count, include endocrinopathy screening: sampling of free T3 and T4, TSH, antibodies against thyroidal peroxidase – anti TPO, morning serum cortisol, levels of corticotropin (ACTH), and in males testosterone levels, and in females FSH and LH levels. For differential diagnosis, an ACTH stimulation test may be considered. Indicated imaging methods include MRI of the brain, with a focus on hypophysis and also on the exclusion of brain metastases. It must be mentioned at this point, that there does not exist any general consensus about the therapy and monitoring, and the literature shows conflicting data on the therapy of this adverse effect and the possibility of returning to ipilimumab therapy (Weber *et al.* 2012, Della Scarpata *et al.* 2014, O'Day *et al.* 2010). Repeated consultations and cooperation with an endocrinologist are a priority. If corticoids need to be administered (toxicity levels 3 and 4), then corticoids with mineralocorticoid activity are preferred with slow discontinuation (Lakomy *et al.* 2015).

Less frequent immune-conditioned adverse effects

Other possible, although rare (less than 1 % of cases), immune-conditioned adverse effects of ipilimumab include: meningitis, uveitis, pneumonitis, pancreatitis, pericarditis, myocarditis, nephritis, various angiopathies, hemolytic anemias, thrombocytopenia etc. Straightforward therapeutic procedures are not known, where such adverse effects occur therapy is managed like it is for other autoimmune diseases with corticoids as the

therapy of choice. Generally, level 3 and 4 toxicity is a reason for discontinuing ipilimumab therapy. Details are in the ipilimumab SmPC (EMA 2012).

Immune-conditioned adverse effects of anti-PD-1/PD-L1 antibodies and their combination with ipilimumab

Toxicity of these antibodies is generally lower than of ipilimumab Topalian *et al.* 2012, Wolchok *et al.* 2015). Severe dermal toxicity levels 3 and 4 are exceptional (2 %). Also, level 3 or 4 diarrhea is uncommon (1–2 %), as is hepatic toxicity (below 3 %) and severe endocrinopathy (<1 %). Unlike ipilimumab, pneumonitis occurs more often after anti-PD-1 antibodies (<5 %). Therapy of severe pneumonitis is again based on corticoids in high doses (methylprednisolone 2 mg/kg i.v. 1–2 times daily) or infliximab. Other toxicities are sporadic, but cannot be neglected either. The principles of therapy of irAEs caused by anti-PD-1/PD-L1 antibodies are the same as with ipilimumab. A considerably higher incidence of irAEs has been described in reports from studies of combinations of anti-PD-1 and anti CTLA-4 antibodies (nivolumab + ipilimumab). Here the occurrence of severe irAEs of levels 3 and 4 ranged around 50 %, with significant representations of gastrointestinal toxicity (15 %) and hepatic toxicity (19 %). A number of these severe toxicities, however, only met the laboratory criteria NCI-CTCAE (such as the elevation of amylase and lipase without clinical signs of pancreatitis). The combination resulted in no new toxicity (Wolchok *et al.* 2015).

Conclusions

The development of immune checkpoint inhibitors targeting cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) and programmed cell death-1 (PD-1) has significantly improved the treatment of a variety of cancers. Although these agents can lead to remarkable responses, their use can also be associated with unique adverse effects. The spectrum of AEs associated with

immune checkpoint antibodies are termed immune-related AEs (irAE's). The underlying pathophysiology relates to the immune-based mode of action of these agents, leading to T-cell inflammatory infiltration of solid organs, and increased serum inflammatory cytokines. IrAEs are frequent side effects of checkpoint inhibitors, they are possibly life-threatening and there is no known predictive biomarker for their occurrence. The most frequent irAEs include dermal toxicity (exanthema, pruritus), GIT toxicity (diarrhea, colitis), endocrine toxicity (hypopituitarism, hypophysitis, hypothyreosis, adrenal insufficiency), liver toxicity (elevation of transaminase, hepatitis), and in connection with anti-PD-1 antibodies, pneumonitis. IrAEs have their onset and duration (kinetics) well described, but since they can even occur several months after therapy completion (endocrinopathy), the safe interval after therapy completion is not known. Incidence of irAEs is higher for ipilimumab (dose-dependent) in comparison to anti-PD-1/PD-L1 antibodies, and even higher for the combination of ipilimumab and nivolumab. Retreat of toxicity may be slower in the case of anti-PD-1/PD-L1 antibodies; therefore long-term follow up is recommended (Weber *et al.* 2015). The important is the early medication of immunosuppressant with corticoids and their slow discontinuation, if the corticoids show insufficient or no effect, other immunosuppressants must be prescribed. These recommendations for therapy of irAEs are universal for all checkpoint inhibitors, although they are mainly based on experience from clinical studies with ipilimumab. New adverse effects may occur with the introduction of new antibodies and their combinations. The success of therapy with checkpoint inhibitors is conditional not only upon the erudition of the clinician, but also upon having an educated and cooperating patient (Lakomy *et al.* 2015).

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by Project of Research Infrastructure LM2015090 (CZECRIN).

References

- CATAPANO AL, PAPADOPOULOS N: The safety of therapeutic monoclonal antibodies: Implications for cardiovascular disease and targeting the PCSK9 pathway. *Atherosclerosis* **228**: 18-28, 2013.

- Datamonitor: Pipeline insight: Biologic targeted cancer therapies – Next generation jostles for market position, DMHC2573, 2009.
- DELLA SCARPATI GV, FUSCIELLO C, PERRI F, SABBATINO F, FERRONE S, CARLOMAGNO C, PEPE S: Ipilimumab in the treatment of metastatic melanoma: management of adverse events. *Onco Targets Ther* **7**: 203-209, 2014.
- EDWARDS IR, ARONSON JK: Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management. *Lancet* **356**: 1255-1259, 2000.
- EMA (European Medicines Agency) 2012, http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002213/WC500109299.pdf.
- FECHER LA, AGARWALA SS, HODI FS, WEBER JS: Ipilimumab and its toxicities: a multidisciplinary approach. *Oncologist* **18**: 733-743, 2013.
- HAMID O, ROBERT C, DAUD A, HODI FS, HWU WJ, KEFFORD R, WOLCHOK JD, HERSEY P, JOSEPH RW, WEBER JS, ET AL.: Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD- 1) in melanoma. *N Engl J Med* **369**: 134-144, 2013.
- HARMANKAYA K, ERASIM C, KOELBLINGER C, IBRAHIM R, HOOS A, PEHAMBERGER H, BINDER M, ET AL.: Continuous systemic corticosteroids do not affect the ongoing regression of metastatic melanoma for more than two years following ipilimumab therapy. *Med Oncol* **28**: 1140-1144, 2011.
- HODI FS, O'DAY SJ, MCDERMOTT DF, WEBER RW, SOSMAN JA, HAANEN JB, GONZALEZ R, ROBERT C, SCHADENDORF D, HASSEL JC, ET AL.: Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* **363**: 711-723, 2010.
- HOIGNE R, SCHLUMBERGER HP, VERVLOET D, ZOPPI M: Epidemiology of allergic drug reactions. *Monogr Allergy* **31**: 147-170, 1993.
- KOHLER G, MILSTEIN C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495-497, 1975.
- LAKOMY R, POPRACH A: Side-effects of modern immunotherapy and how to solve them in the clinics. *Klin Onkol* **28** (Suppl 4): 4S103-4S114, 2015.
- NAISBITT DJ, GORDON SF, PIRMOHAMED M, PARK BK: Immunological principles of adverse drug reactions: the initiation and propagation of immune responses elicited by drug treatment. *Drug Saf* **23**: 483-507, 2000.
- O'DAY SJ, MAIO M, CHIARION-SILENI V, GAJEWSKI TF, PEHAMBERGER H, BONDARENKO IN, QUEIROLO P, LUNDGREN L, MIKHAILOV S, ROMAN L, ET AL.: Efficacy and safety of ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a multicenter single-arm phase II study. *Ann Oncol* **21**: 1712-1717, 2010.
- PEREZ-SOLER R, SALTZ L: Cutaneous adverse effects with HER1/EGFR-targeted agents: is there a silver lining? *J Clin Oncol* **28**: 5235-5246, 2005.
- PICHLER WJ: Adverse side-effects to biological agents. *Allergy* **61**: 912-920, 2006.
- POSTOW MA, CALLAHAN MK, WOLCHOK JD: Immune checkpoint blockade in cancer therapy. *J Clin Oncol* **33**: 1974-1982.
- SCOTT AM, ALLISON JP, WOLCHOK JD: Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Cancer Immun* **12**: 14, 2012.
- TOPALIAN SL, HODI FS, BRAHMER JR, GETTINGER SN, SMITH DC, MCDERMOTT DF, POWDERLY JD, CARVAJAL RD, SOSMAN JA, ATKINS MB, ET AL.: Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* **366**: 2443-2454, 2012.
- VASQUEZ EM, FABREGA AJ, POLLAK R: OKT3-induced cytokine-release syndrome: occurrence beyond the second dose and association with rejection severity. *Transplant Proc* **27**: 873-874, 1995.
- WEBER JS, D'ANGELO SP, MINOR D, HODI FS, GUTZMER R, NEYNS B, HOELLER C, KHUSHALANI NI, MILLER WH JR, LAO CD, ET AL.: Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA- 4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* **16**: 375-384, 2015.
- WEBER JS, KAHLER KC, HAUSCHILD A: Management of immune- related adverse events and kinetics of response with ipilimumab. *J Clin Oncol* **30**: 2691-2697, 2012.

-
- WEBER J, THOMPSON JA, HAMID O, MINOR D, AMIN A, RON I, RIDOLFI R, ASSI H, MARAVEYAS A, BERMAN D, ET AL.: A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II study comparing the tolerability and efficacy of ipilimumab administered with or without prophylactic budesonide in patients with unresectable stage III or IV melanoma. *Clin Cancer Res* **15**: 5591-5598, 2009.
- WEBER JS, YANG JC, ATKINS MB, DISIS ML: Toxicities of immunotherapy for the practitioner. *J Clin Oncol* **33**: 2092-2099, 2015.
- WOLCHOK JD, CHIARION-SILENI V, GONZALEZ R, RUTKOWSKI P, GROB JJ, COWEY CL, LAO CD, SCHADENDORF D, FERRUCCI PF, SMYLIE M, ET AL.: Efficacy and safety results from a phase III trial of nivolumab (NIVO) alone or combined with ipilimumab (IPI) versus IPI alone in treatment-naïve patients (pts) with advanced melanoma (MEL) (CheckMate 067). *J Clin Oncol* **33** (Suppl: abstr. LBA1), 2015.
- WOLCHOK JD, NEYNS B, LINETTE G, NEGRIER S, LUTZKY J, THOMAS L, WATERFIELD W, SCHADENDORF D, SMYLIE M, GUTHRIE T, ET AL.: Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a randomized, double-blind, multicentre, phase 2, dose-ranging study. *Lancet Oncol* **11**: 155-164, 2010.
-

Nemalobuněčný karcinom plic – od imunobiologie k imunoterapii

Non-Small Cell Lung Cancer – from Immunobiology to Immunotherapy

Bílek O.^{1,2}, Bohovicová L.¹, Demlová R.^{2,3}, Poprach A.¹, Lakomý R.¹, Zdražilová-Dubská L.^{2,4}

¹ Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno

² Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

³ Oddělení klinických hodnocení, Masarykův onkologický ústav, Brno

⁴ Oddělení laboratorní medicíny, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Východiska: Základem léčby časných nebo lokálně pokročilých stadií nemalobuněčného karcinomu plic (non-small cell lung cancer – NSCLC) je chirurgická resekce, event. radioterapie. V případě inoperabilního či metastatického postižení je léčba paliativní systémová. Celosvětově představuje NSCLC nejčastější příčinu úmrtí v souvislosti s nádorovým onemocněním a dlouhodobě vyvstává potřeba nových terapeutických přístupů. Důkazy o úloze protinádorové aktivity imunitního systému vyvolaly v posledních letech nový zájem o imunoterapii, a to i v léčbě NSCLC. Předmětem vývoje a klinického hodnocení jsou různé strategie vakcinace s cílem posílení imunitní odpovědi a antigen-nespecifická imunomodulace. V této oblasti se dostávají do klinické praxe tzv. checkpoint inhibitory blokující inhibiční imunologické synapse jak cytotoxického T lymfocytárního antigenu 4 (CTLA-4) či proteinu programované buněčné smrti a jeho ligandu (PD-1, PD-L1). Mimo vývoj inovativních léčiv je významným cílem v oblasti imunoterapie solidních malignit identifikace a klinická aplikace efektivních biomarkerů odpovědi na protinádorovou imunoterapii a hodnocení přínosu kombinace imunoterapie s klasickými léčebnými metodami jako chemoterapie, radioterapie a s cílenou léčbou. **Cíl:** Cílem tohoto sdělení je 1. popsat základní imunobiologii NSCLC v kontextu inovativních imunomodulačních terapeutik, 2. popsat strategii a shrnout terapeutické výsledky protinádorových vakcín u NSCLC z klinických hodnocení fáze III, 3. shrnout výsledky terapie checkpoint inhibitory u NSCLC a 4. nastínit aktuální výzvy v oblasti imunoterapie NSCLC.

Klíčová slova

nemalobuněčný karcinom plic – imunoterapie – protinádorové vakcíny – biomarkery léčebné odpovědi

Summary

Background: The treatment of early or locally advanced stages of non-small cell lung cancer (NSCLC) is based on surgical resection or radiotherapy. Metastatic disease is always incurable, treatment is palliative, systemic based on chemotherapy or target therapy. NSCLC is the most common cause of cancer-related death worldwide, and new therapeutic approaches are needed. Based on the emerging data on the role of immune system in shaping of tumor outbreak and outcome, immunotherapy is currently in the center of interest of cancer research and therapy of solid cancers including NSCLC. Various anti-cancer vaccination approaches and antigen-independent immunomodulatory drugs are being developed and trialed. The most advanced in terms of approaching clinical practice are the so-called checkpoint inhibitors blocking cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) or programmed cell death of the protein and its ligand (PD-1, PD-L1). Beside innovative drug development, the field of cancer immunotherapy focuses on the identification and clinical application of effective biomarkers of clinical efficacy and on the evaluation of combinations of immunotherapeutic drugs or with classical anti-cancer approaches, such as chemotherapy, radiotherapy or with targeted therapy. **Aim:** In this review, we summarize basic principles of immunobiology of NSCLC in the context of innovative immunotherapeutics, strategy and phase III results of anti-cancer vaccines in NSCLC, results of NSCLC treatment with checkpoint inhibitors, and current challenges in immunotherapy of lung cancers.

Key words

non-small cell lung cancer – immunotherapy – cancer vaccines – drug response biomarkers

Práce byla podpořena grantem MŠMT – NPU I – LO1413.

This work was supported by MEYS – NPS I – LO1413.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



RNDr. Lenka Zdražilová-Dubská, Ph.D.
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Oddělení laboratorní medicíny
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: dubska@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 10. 6. 2016

Přijato/Accepted: 16. 6. 2016

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20164578>

Úvod

Incidence karcinomu plic v ČR je 38/100 000 žen a 87/100 000 mužů. Celosvětově představuje nejčastější příčinu úmrtí v souvislosti s nádorovým onemocněním. Základem léčby nemalobuněčného karcinomu (non-small cell lung cancer – NSCLC) stadia I a II je resekční výkon, event. radioterapie, není-li operace indikována. Stadium IIIA je rovněž považováno za operabilní, ale s výrazně horší prognózou nepřesahující 15% 5leté přežití, zvláště při N2 postižení. Adjuvantní chemoterapie je indikována u stadia II a III, přínos u stadia IB zůstává sporný, u stadia IA není žádný. Adjuvantní radioterapie má přínos jen u stadia III s uzlinovým postižením N2. Léčba metastatického bronchogenního karcinomu je paliativní systémová. Analytické možnosti posledních let přinesly zásadní informace o biologii a patofyziologii NSCLC, které svědčí o tom, že molekulární podstata této diagnózy je heterogenní a na základě přítomnosti kauzálních onkogenních mutací/aberrací se rozpadá do několika molekulárně definovaných podjednotek [1]. Jednot-

livé kauzální aberace se pak stávají cílem protinádorové terapie (tab. 1) [2–34]. V závislosti na přítomnosti aktivačních mutací EGFR či translokace EML4-ALK je volena cílená léčba kinázovým inhibito-rem nebo chemoterapií.

Imunobiologie NSCLC

Počátky hypotézy předpokládající schopnost imunitního systému eliminovat či kontrolovat maligní buňky se datují na přelom 19. a 20. století [35–38]. Existuje řada nástrojů imunitního systému, které mohou atakovat maligní buňky; příkladem je generace efektorových T lymfocytů namířených proti nádorovým antigenům (obr. 1) či cytolytická aktivita NK buněk. Na druhou stranu existuje řada imunopresivních mechanismů, jimiž může disponovat maligní buňka či spíše nádorové mikroprostředí a které odvrací protinádorovou aktivitu imunitních buněk. Koncept imunitního dohledu nad nádorovým bujením je v dnešní době rozpracován do konceptu nádorové imunoeditace (cancer immunoediting) popisujícího vzájemnou interakci nádorových buněk

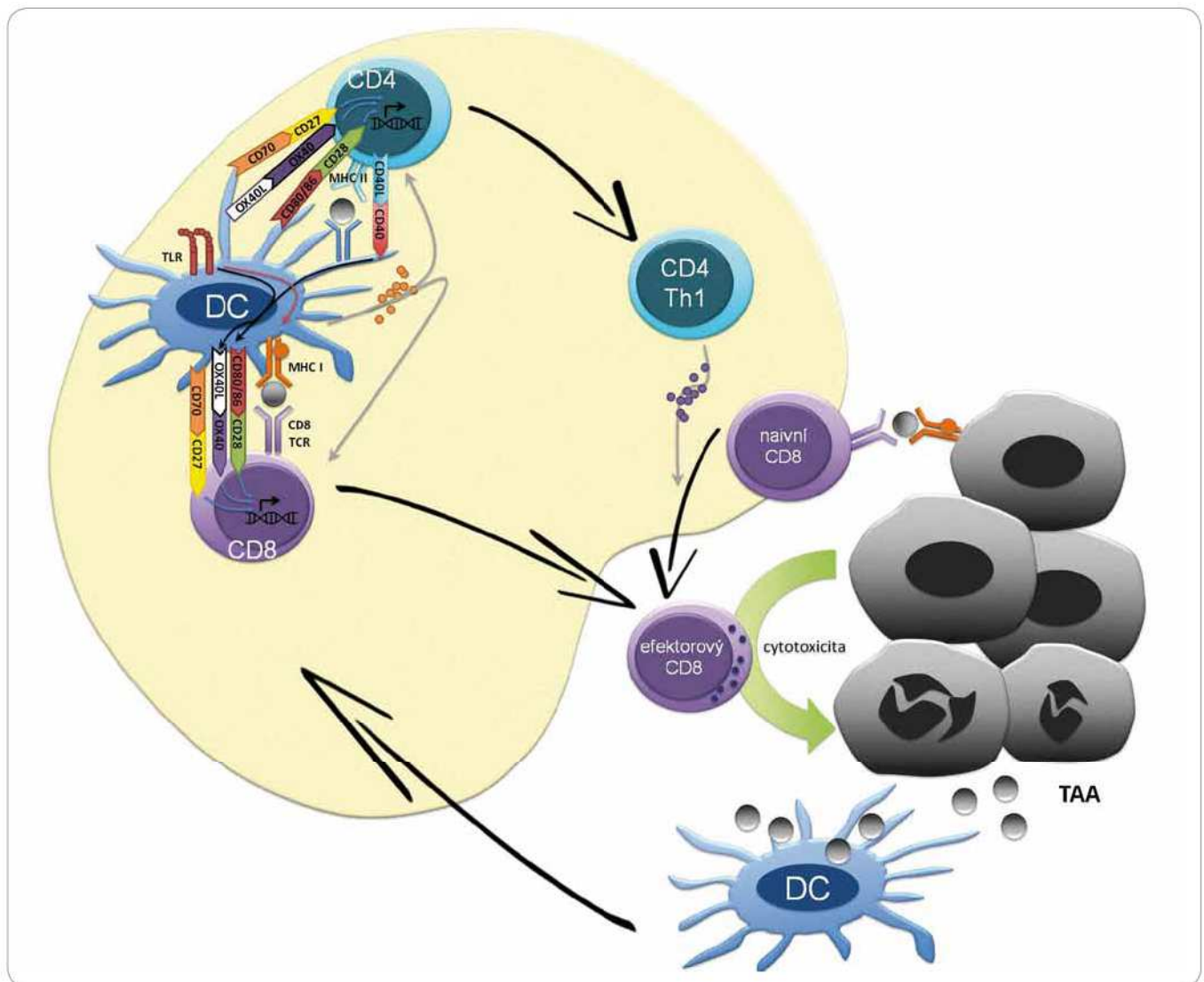
a imunitního systému. Imunoeditace spočívá ve vývoji protinádorových mechanismů imunitního systému, ale také prvků úniku nádorových buněk imunitnímu dohledu. Během imunoeditingu se tedy selektují klony nádorových buněk s nižší imunogenicitou nebo s antigenním spektrem, proti němuž nebyla namířena imunitní reakce. Vzájemná interakce nádorových buněk a imunitního systému může být rozdělena do tří fází (3Es), z anglického elimination, equilibrium, escape. Fáze eliminace je charakterizována převahou imunitního dohledu, tedy protinádorovými mechanismy imunitního systému, které vedou k eliminaci tumoru či efektivní kontrole jeho růstu. V rovnovážné fázi nádorové imunoeditace udržuje imunitní systém maligní tkáň z klinického hlediska v klidovém stadiu (dormancy). Nicméně v nádorové tkáni dochází ke genetickým a epigenetickým změnám a díky konstantnímu selekčnímu tlaku imunitního systému dále progredují klony buněk málo imunogenních, rezistentních k imunitní odpovědi a navozujících imunopresi, což představuje nádorovou imunoeditaci

Tab. 1. Nejčastější dosud známé aberace u NSCLC jako cíle stávající a potenciaální protinádorové terapie.

Cíl = aberace	Frekvence u NSCLC	Cílená léčba	Reference
aktivační mutace receptorů EGFR (delece v exonu 19 a bodová mutace v exonu 21 = L858R)	15–20 % u adenokarcinomů, málo časté u SCC	EGFR tyrozinkinázové inhibitory první generace/gefitinib**, erlotinib**	[2–7]
aktivační mutace receptorů EGFR vč. mutace T790M	mutace T790M vzniká sekundárně při léčbě; EGFR TKI	EGFR tyrozinkinázové inhibitory druhé generace/afatinib**, dacomitinib, neratinib	[8–13]
aktivační mutace EGFR T790M		EGFR tyrozinkinázové inhibitory třetí generace/rociletinib, osimertinib*	[14–18]
ALK-EML4 fúzní protein	5–7 %	inhibitory ALK tyrozinkinázy/ crizotinib**, ceritinib*, alectinib inhibice HSP90/ganetespil	[19–23]
fúze zahrnující ROS1	2 %	crizotinib** brigatinib	[19,24–26]
amplifikace cMET	4 % adeno, 6 % SCC	crizotinib** TK inhibitor/kabozantinib	[27–29]
mutace <i>BRAF</i>	2 % adenomů, 2 % SCC; V600E 1 % adenomů	dabrafenib, trametinib (MEK inhibitor)	[30–32]
mutace <i>KRAS</i>	20–30 % NSCLC	selumetinib (MEK inhibitor)	[33]
fúzní gen <i>RET</i>	1 % adenomů	kabozantinib, vandetanib	[28,34]

* V současnosti je registrováno pro léčbu NSCLC v rámci EU.

** V současnosti je registrováno pro léčbu NSCLC v rámci EU a současně hrazeno ze zdravotního pojištění v rámci ČR.



Obr. 1. Základní mechanismus antigen-dependentní stimulace T lymfocytů.

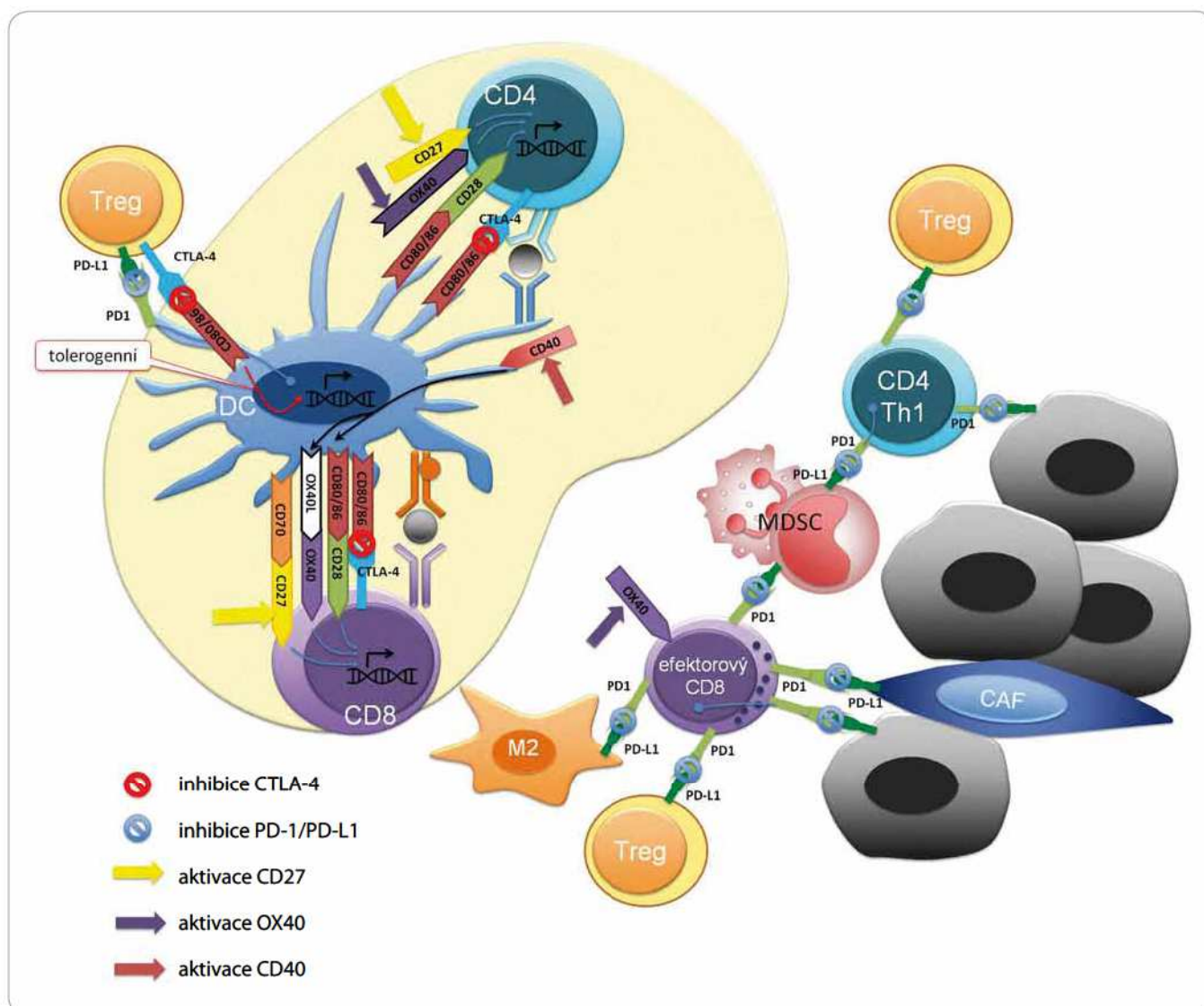
Na počátku buněčné (i protilátkové) imunitní odpovědi je internalizace antigenu dendritickou případně jinou antigen-přezentující buňkou (APC), následný rozklad antigenu na malé peptidy a prezentace na povrchu buňky v kontextu proteinů hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) I. a II. třídy. Dendritické buňky s antigenním peptidem cirkulují do lymfatických uzlin, po zrání umožní aktivaci naivních T lymfocytů na pomocné (Th1, Th2) CD4⁺ kostimulační reakci mezi receptory B7.1 (CD80) a B7.2 (CD86) přítomnými na APC a receptorem CD28 přítomným na Th buňkách. Prezentaci antigenu dendritickou buňkou potencuje signalizace z TLR receptorů pro PAMP molekuly, což vede v dendritické buňce k signalizaci stimulující expresi MHC II i kostimulačních molekul CD80/CD86. Signalizace mezi dendritickou buňkou a T lymfocyty je modulována řadou inhibičních a aktivačních signálů. Mezi aktivační signály dendritických buněk patří mimo CD80/CD86 také OX40L či CD70, jež vazbou na příslušné molekuly na T lymfocytech potencují jejich aktivaci, proliferaci a získání efektorových funkcí. Cross-prezentace antigenů dendritickou buňkou je potencionována tzv. licencováním (licensing) CD4⁺ Th lymfocytů se stejnou antigenní specifitou. V procesu licencování se uplatňuje např. signalizace z CD40 po interakci s CD40L Th lymfocytů, která vede k up-regulaci kostimulačních molekul na dendritické buňky a toto potažmo k aktivaci efektorových CD8⁺ cytotoxických T lymfocytů. Sekrece cytokinů jako IL-2 (Th1 lymfocyty), IL-12 (dendritické buňky), IFN-γ (Th1 lymfocyty) usnadňuje aktivaci CD8⁺ lymfocytů na cytotoxické T lymfocyty, které získávají a) schopnost rozpoznat nádorové buňky, prostřednictvím komplexu peptid – MHC I a b) efektorové funkce k indukci buněčné smrti maligních buněk. Proteiny z usmrčených maligních buněk jsou opět pohlceny APC buňkami, což navozuje antigen-dependentní stimulaci T lymfocytů.

TAA – antigen asociovaný s nádorem, TLR – toll-like receptor, DC – dendritická buňka

v pravém slova smyslu. Jako únik/escape se označuje stav, kdy mechanismy rezistence a navození imunosuprese nádoro-

vými buňkami převládnu, vzniká imunosupresivní nádorové mikroprostředí, dochází k růstu nádoru a ten se začíná

klinicky manifestovat. Ke vzniku imunosupresivního nádorového mikroprostředí přispívá celková imunosuprese



Obr. 2. Imunomodulační mechanismy checkpoint inhibitorů v sekundárních lymfatických orgánech a nádorovém mikroprostředí. CTLA-4 (CD152) je exprimována na T lymfocytech a slouží k supresi imunitní reakce. CTLA-4 kompetuje s aktivací molekulou CD28 o vazbu s kostimulačním komplexem dendritických buněk CD80/CD86. Vazba CTLA-4 a CD80/CD86 vede k navození tolerogenní/immunosupresivní signalizace v dendritických buňkách vedoucí k produkci imunosupresivních působků např. TGF- β či IDO. Terapeutické protilátky interferující s vazbou CTLA-4 a CD80/CD86 jsou ipilimumab a tremelimumab. Imunosupresivní systém PD-1/PD-L1 se uplatňuje v potlačení funkce efektorových T lymfocytů v místě zánětu [52]. Povrchová molekula PD-1 (CD279) je exprimována T, B lymfocyty, NK buňkami, dendritickými buňkami, monocyty. Vazba PD-L1 (CD274) či PD-L2 (CD275) na PD-1 vede ke snížení produkce cytokinů a proliferace a navození apoptózy PD-1⁺ buněk. PD-L1 je exprimován řadou buněk vč. maligních buněk, fibroblastů asociovaných s nádorem, T regulačních lymfocytů, myeloidních supresorových buněk MDSC či M2 s nádorem asociovaných makrofágů. Terapeuticky se využívá blokáce PD-1/PD-L1 vazby, jak prostřednictvím anti-PD-1 mAb (nivolumab, pembrolizumab) tak anti-PD-L1 protilátek (avelumab, atezolizumab, durvalumab). CD27 je stimulační molekula na povrchu T lymfocytů, jejíž interakce s CD70 APC přispívá k antigen-dependentní klonální expanzi a získání efektorových funkcí T lymfocytů. Předmětem klinického hodnocení aktuálně časných fází je agonista CD27 varlilumab. Signální molekula OX-40 je exprimována na efektorových T lymfocytech. Interakce OX-40 a OX-40L exprimovaného zralými dendritickými buňkami vede k signalizaci důležité pro přežití efektorových T lymfocytů a tvorbu a reaktivaci paměťových T lymfocytů. Na stimulaci OX-40 cílí agonistická protilátka anti-OX-40 či fúzní protein imunoglobulinu a OX-40L; v současnosti v klinických hodnoceních časných fází. CD40 je exprimován na APC a na řadě buněk mimo imunitní systém vč. maligních buněk. Aktivace CD40 stimuluje antigen-přezentační schopnosti dendritických buněk např. prostřednictvím upregulace ko-stimulačních molekul CD80/CD86 poskytujících 2. signál pro aktivaci T lymfocytů. Mimo to anti-CD40 agonistické protilátky potencují protinádorovou aktivitu makrofágů a navozují ADCC maligních buněk exprimujících CD40 (popsáno především u hematologických malignit). Předmětem klinického hodnocení jsou agonistické anti-CD40 protilátky a rekombinantní CD-40L.

Treg – regulační T lymfocyt, CAF – fibroblast asociovaný s malignitou, MDSC – myeloidní supresorová buňka, M2 – M2 polarizovaný makrofág

jedince. Mezi konkrétní imunosupresivní mechanismy nádoru patří exprese PD-L1 na membránách maligních buněk či antigen-prezentujících buněk (APC) navozující supresi efektorových T lymfocytů. K dalším mechanismům rozvoje imunologické tolerance patří snížená exprese antigenů, MHC (major histocompatibility complex) I. třídy a kostimulačních molekul na povrchu nádorových buněk, sekrece cytokinů jako např. TGF- β , která interferuje s vyžíváním dendritických buněk a zvyšuje podíl myeloidních supresorových buněk (myeloid-derived suppressor cells – MDSC) a regulačních T lymfocytů (Tregs) v nádorovém stromatu (obr. 2). Konečně může být příčinou imunologické rezistence odolnost nádorových buněk vůči navození apoptózy CD8 lymfocyty.

Pro rozeznání maligní buňky a efektivní protinádorové odpovědi imunitního systému jsou zásadní nádorové neoantigeny, jež jsou produkty translace mutovaných genů, intronových sekvencí, translace z alternativních čtecích rámců, pseudogenů, antisense řetězců, translokovaných genů či genů se začleněným virovým genomem. Množství nádorových antigenů/neoantigenů, které nádorová buňka produkuje, souvisí s množstvím somatických mutací dané buňky a nádory s vysokým podílem somatických mutací jsou více imunogenní v porovnání s nádory s malým množstvím mutací. Obecně nacházíme nejvíce somatických mutací v nádorech, které jsou spojené s fyzikálně, chemicky či biologicky indukovanou kancerogenezi – tj. v maligním melanomu, skvamobuněčném karcinomu plic, bronchogenním adenokarcinomu, karcinomu močového měchýře a malobuněčném karcinomu plic [39]; díky mutagenně podmíněné kancerogenezi jsou tyto typy malignit nejvíce imunodependentní a imunoresponsezivní. Z pohledu jednotlivých případů NSCLC je vysoká proporce nádorových neoantigenů spojena s delším celkovým přežitím (overall survival – OS) a naopak heterogenita nádoru ve smyslu přítomnosti více subklonů se specifickým neoantigenním repertoárem je spojena s horším OS [40]. Popsaný mechanismus pravděpodobně souvisí s klinickým pozorováním lepší léčebné

odpovědi na terapii checkpoint inhibice PD-1/PD-L1 u kuřáků s NSCLC oproti nekuřákům s NSCLC [41].

Imunoterapie NSCLC

Z hlediska přístupu je možné obecně rozdělit imunoterapeutické postupy na pasivní a aktivní a dále na antigen-specifické či nespecifické a výsledkem jsou pak čtyři základní subkategorie imunoterapie, do kterých spadá: 1. aktivní nespecifická imunoterapie humorálními působky, která v případě léčby NSCLC **cytokiny** IL-2 či IFN- α nepřinesla úspěch [42]; 2. pasivní imunoterapie aplikací **monoklonálních protilátek** cílených proti tumorem-asociovaným antigenům s cílem vyvolání protilátkami indukované cytotoxicity (antibody-dependent cellular cytotoxicity – ADCC). Příkladem tohoto typu protinádorové terapie je herceptin (anti-Her2) či cetuximab (anti-EGFR). Nicméně pro léčbu NSCLC není aktuálně žádný přípravek pasivní imunoterapie registrován; 3. **protinádorová vakcinace** stimulující protinádorovou imunitní odpověď CD8⁺ cytotoxických lymfocytů a CD4⁺ Th lymfocytů proti nádorovým antigenům a tvorbu antigen specifických protilátek. Některé z těchto přístupů jsou ve vývoji a ty, které byly předmětem klinického hodnocení fáze III, jsou popsány v následující podkapitole; 4. modulace imunitního systému bez antigenní specifity, např. stimulace efektorových funkcí T lymfocytů imunomodulačními monoklonálními protilátkami (tzv. **checkpoint inhibitory**), které jsou v současné době největším předmětem zájmu v oblasti imunoterapie nádorů plic.

Terapeutické protinádorové vakcíny

Jako zdroj antigenů, proti němuž se vyvolá protinádorová imunitní odpověď, mohou sloužit imortalizované nádorové buňky, lyzáty z nádorových buněk, definované nádorové peptidy, které jsou spolu s adjuvans aplikovány onkologickým pacientům. Jako adjuvans jsou používány mikrobiální látky, např. inkompletní Freundovo adjuvans, CpG, cytokiny, jako je GM-CSF, IL-2, IL-12, IFN- α či fosfolipidy a sloučeniny hliníku. Nádorové antigeny mohou být apliko-

vány přímo či spolu s vektorem, který může zároveň poskytovat imunostimulační kontext. Příkladem jsou virové vektory či dendritické buňky. Mechanismus účinku protinádorových vakcín předpokládá, že aplikace nádorových antigenů spolu s adjuvans spustí přirozenou imunitní odpověď, tedy správnou prezentaci antigenů prostřednictvím APC efektorovým T lymfocytům, což způsobí cytolyzu nádorových buněk v primárním ložisku i v metastázách. Vývoj protinádorových vakcín je technologicky náročný a nákladný a následně je pak v klinických hodnoceních zpravidla limitovaný počet pacientů, což prakticky znemožňuje identifikaci prediktivních faktorů a subkohort jedinců, kteří by z léčby protinádorovými vakcínami benefitovali. Nicméně některá léčiva typu protinádorových vakcín se dostala do fáze III klinického zkoušení léčby NSCLC.

Tecemotide (L-BLP25)

L-BLP25 je lipozomální vakcína proti antigenu MUC1 exprimovanému u většiny nádorů vč. NSCLC a jeho vysoká exprese je spojena s horší prognózou [43]. Vakcína byla zkoušena ve studii START v léčbě pacientů s neresekabilním NSCLC v klinickém stadiu III po léčbě chemoterapií a radioterapií. U celkového souboru pacientů nebylo dosaženo primárního cíle prodloužení OS. U subpopulace pacientů, kteří absolvovali léčbu v konkomitantní podobě a nikoli sekvenčně, však došlo k významnému prodloužení mediánu OS (30,8 vs. 20,6 měsíce; HR 0,78; $p = 0,016$). Analýza nežádoucích účinků nezaznamenala klinicky významné rozdíly mezi léčebnými rameny [44]. Na základě výsledků klinického hodnocení fáze III, které probíhalo v Japonsku (EMR 63325-021) a které neprokázalo efektivitu L-BLP25, byly další zkoušky a vývoj preparátu zastaveny ve prospěch checkpoint inhibitorů.

TG4010 (MVA-MUC1-IL2)

Další vakcínou zaměřenou proti antigenu MUC1 je TG4010. Jejím základem je atenuovaný virový vektor exprimující sekvenci MUC1 a IL-2 [45]. V randomizované studii fáze IIb/III zahrnující 222 dříve neléčených pacientů klinického stadia IIIB/IV byl hodnocen efekt

přidání vakcíny k paliativní chemoterapii 1. linie v režimu cisplatina/gemcitabin. V rameni s TG4010 došlo k signifikantnímu prodloužení doby přežití bez progresu (progression-free survival – PFS) (5,9 vs. 5,1 měsíce; HR 0,74; $p = 0,019$). V mediánu OS však nebylo dosaženo významného rozdílu. Léčba nebyla spojena se závažnými nežádoucími účinky [46].

Melanom asociovaný antigen (MAGE-A3)

MAGE-A3 patří do rodiny tumorspecifických antigenů a je exprimován výlučně nádorovými buňkami. Pozitivita je uváděna v 35–55 % případů NSCLC [47]. Hodnocený imunoterapeutický přípravek využívající imunogenicity tohoto antigenu obsahoval rekombinantní protein MAGE-A3 a komplexní adjuvans AS15. Rozsáhlá studie MARGIT (NCT00480025) neprokázala významné prodloužení PFS proti placebo v adjuvantním podání pacientům klinického stadia IB–III (60,5 vs. 57,9 měsíce; HR 0,970; $p = 0,7572$). Tolerance léčby byla dobrá, závažné nežádoucí účinky stupně 3, 4 nebyly zaznamenány [48]. Vzhledem k tomu, že adjuvantní podání této vakcíny nevedlo k prodloužení celkového bezpříznakového přežití (disease-free survival – DFS) v porovnání se standardním chemoterapeutickým režimem v adjuvanci, není tato vakcína dále vyvíjena.

Rekombinantní lidský epidermální růstový faktor (CimaVax-EGF)

Antigenně specifická vakcína je tvořená rekombinantním EGF fúzovaným s nosným proteinem a adjuvans. Mechanizmem účinku je tvorba anti-EGF protilátek a tím navození blokáce signální dráhy z receptorů EGFR na maligních buňkách. Ve studii fáze III bylo léčeno a sledováno 405 pacientů s NSCLC stadia IIIB/IV pro stanovení benefitu maintenance podání CimaVax-EGF po absolvování 1. linie paliativní chemoterapie proti nejlepší podpůrné léčbě. Studie prokázala signifikantní prodloužení mediánu OS oproti nejlepší podpůrné léčbě (12,43 vs. 9,43 měsíce; HR 0,77; $p = 0,04$). Nežádoucí účinky stupně 3 byly hlášeny u 3,6 % pacientů (nejčastěji bolest hlavy, dušnost, eozinofilie), stupně 4 pozorováno

nebyly. Vysoké hladiny EGF před zahájením léčby byly prediktorem léčebné odpovědi [49].

Belagenpumatucel-L

Jedná se o celobuněčnou alogenní vakcínu připravovanou transfekcí čtyř různých buněčných linií odvozených od NSCLC antisense TGF- β 2 transgenem a ozářením před aplikací. Mechanizmus účinku je navození imunitní odpovědi proti nádorovým antigenům a potlačení imunosupresivní aktivity nádorového mikroprostředí. Vakcína byla testována v rámci maintenance aplikace pacientům v klinickém stadiu IIIB/IV, u kterých nebyla zaznamenána progresivní onemocnění po absolvování 1. linie paliativní chemoterapie na bázi platiny (NCT00676507). V celkovém souboru nebylo prokázáno prodloužení mediánu OS (20,3 vs. 17,8 měsíce; HR 0,94; $p = 0,594$), ani prodloužení PFS. Benefit v mediánu OS byl pouze u pacientů s jinou histologií než adenokarcinom a u těch, kteří absolvovali radioterapii (28,4 vs. 16,0 měsíce; HR 0,61; $p = 0,032$). Vakcína byla dobře tolerována, závažné nežádoucí účinky nebyly hlášeny [50].

Racotumomab

Racotumomab je protilátková vakcína, jejímž cílovým antigenem jsou N-glycolilneuraminovou kyselinu (NeuGc) obsahující gangliosidy. Tyto gliolipidy nejsou přítomny na cytoplazmatické membráně normálních lidských buněk, byly však zachyceny u některých typů nádorů vč. NSCLC. Racotumomab je myší protilátka proti NeuGc obsahujícím gangliosidům, která vyvolává tvorbu IgG a IgM protilátek proti těmto epitopům. V rámci testování na myších modelech byla zaznamenána schopnost vyvolání vysoké protinádorové odpovědi. Aktuálně probíhá randomizovaná studie fáze III k ověření léčebného efektu u pacientů ve stadiu pokročilého neresekabilního nebo metastatického NSCLC, u kterých byl zaznamenán minimálně efekt stabilizace onemocnění po absolvování 1. linie paliativní léčby [51].

Nespecifická imunoterapie

Hlavním předmětem zájmu vývoje protinádorové imunoterapie jsou antigen-independentní modulatory imunitního

systemu, jejichž mechanismus působení je založen na eliminaci imunosupresivních mechanismů nádoru a/nebo nespecifické stimulaci imunitní odpovědi (obr. 2) [52]. Nejvíce prozkoumaný a popsaný je mechanismus působení a klinické výsledky inhibice CTLA-4 a interakce PD-1/PD-L1.

Anti-CTLA-4 protilátky

Ipilimumab

Ipilimumab je humanizovaná IgG1 monoklonální protilátka. V současné době je součástí standardní léčby např. maligního melanomu, kde jsou zaznamenány případy dlouhodobých léčebných odpovědí. Efekt je zkoušen i v rámci jiných diagnóz vč. NSCLC. Výsledky studie fáze II srovnávající efekt přidání ipilimumabu k chemoterapii v kombinaci karboplatina/paclitaxel pacientům se skvamózním NSCLC klinického stadia III/IV prokázaly prodloužení PFS ve skupině s ipilimumabem, a to v případě sekvenčního podání chemoterapie a imunoterapie. Prodloužení mediánu OS nebylo statisticky signifikantní (12,2 vs. 8,3 měsíce; HR 0,87; $p = 0,23$) [53]. V současné době probíhají studie fáze III hodnotící efekt 1. přidání ipilimumabu k chemoterapii u pacientů s pokročilým skvamózním NSCLC (NCT02279732) a 2. hodnotící efekt přidání ipilimumabu do kombinace s anti-PD-1 protilátkou nivolumabem v 1. linii léčby NSCLC (CheckMate 227, NCT02477826).

Četnost vedlejších účinků ipilimumabu se v registrační studii pro léčbu maligního melanomu s dávkou 3 mg/kg pohybuje kolem 80–90 %. Ve většině případů šlo o mírnou až střední toxicitu (stupeň 1, 2). Závažná (stupeň 3) a život ohrožující toxicita (stupeň 4) byla zaznamenána u cca 20–25 % pacientů. K vedlejším účinkům může dojít již v průběhu infuze nebo po ní. Více obávané jsou však imunitně podmíněné vedlejší účinky (immune related adverse events – ir-AE), které jsou nejčastější a rostou s dávkou. Při dávce 3 mg/kg se objevují až u 60 % pacientů, vážná ir-AE toxicita stupně 3 a 4 byla zaznamenána u 10–15 % pacientů. K nejčastějším ir-AEs patří kožní toxicita (vyrážka, svědění kůže), enterokolitida a průjemy, endokrinopatie (hypofyzitida, tyreoidi-

tida) a elevace jaterních testů. Imunitní systém však může napadnout jakýkoliv orgán v těle (srdce, plíce, ledviny, nervový systém, oči, hematopoetický systém a další). Je třeba důsledný management toxicity léčby [54].

Tremelimumab

Tremelimumab je humanizovaná monoklonální protilátka proti CTLA-4. Ve studii fáze II [55] nebyl prokázán efekt maintenance aplikace proti nejlepší podpůrné péči pacientům s metastatickým NSCLC, u kterých nebyla zaznamenána progresse onemocnění po 1. linii paliativní chemoterapie (NCT02000947). Probíhá studie fáze III ověřující přínos kombinace tremelimumabu s anti-PD-L1 protilátkou darvalumab (MEDI4736) vs. standardní chemoterapie (NCT02352948).

Anti-PD-1, anti-PD-L1 protilátky

Nivolumab

Nivolumab je plně humanizovaná monoklonální IgG4 anti-PD-1 protilátka standardně používaná např. v léčbě maligního melanomu (NCT01721772) [56]. Studie fáze III srovnávaly benefit podání nivolumabu pacientům s metastatickým NSCLC ve 2. linii paliativní léčby proti standardní chemoterapii docetaxelem. Studie CheckMate 017 týkající se skvamózního karcinomu plic prokázala statisticky významné prodloužení PFS a zejména mediánu OS (9,2 vs. 6,0 měsíce; HR 0,59; $p = 0,0004$). Tato studie neprokázala korelaci mezi přítomností PD-L1 na nádorových buňkách a léčebnou odpovědí (NCT01642004). U adenokarcinomu byl rovněž prokázán léčebný benefit nivolumabu studií fáze III CheckMate 057 (NCT01673867), která srovnávala monoterapii nivolumabem v dávce 3 mg/m² každé dva týdny s podáním docetaxelu 75 mg/m² jednou za tři týdny. Monoterapie nivolumabem vedla k prodloužení mediánu OS (12,2 vs. 9,4 měsíce; HR 0,73; $p = 0,002$), rozdíly v PFS nebyly v celém souboru statisticky významné (medián PFS 2,3 vs. 4,2 měsíce; HR 0,92; $p = 0,393$). U této studie však byla zjevná signifikantní závislost mezi procentuálně vyjádřeným zastoupením PD-L1 na buněčné membráně nádorové buňky a mírou buněčné odpovědi. Na základě údajů o mož-

ném zlepšení léčebné odpovědi kombinací anti-CTLA-4 a anti-PD-1 protilátek probíhá studie CheckMate 227 hodnotící efekt v 1. linii paliativní léčby NSCLC (NCT02477826).

Toxicita anti-PD-1 a anti-PD-L1 protilátek je obecně menší než u ipilimumabu. Vážná kožní toxicita stupně 3 a 4 se vyskytuje výjimečně (2 %). Také průměrný stupeň 3 a 4 je málo častý (1–2 %), podobně jako hepatotoxicita (do 3 %) a vážné endokrinopatie (< 1 %). Na rozdíl od ipilimumabu se ale častěji po anti-PD-1 protilátkách objevuje pneumonitida (< 5 %). Podstatně vyšší četnost ir-AEs byla popsána ve studiích s kombinací anti-PD-1 a anti-CTLA-4 protilátkou (nivolumab + ipilimumab). Zde se výskyt vážných ir-AEs stupně 3 a 4 pohyboval kolem 50 %, s významným zastoupením gastrointestinální toxicity (15 %) a hepatotoxicity (19 %) [54,57].

Pembrolizumab

Jedná se opět o anti-PD-1 protilátku, jejíž účinnost u NSCLC byla hodnocena ve studii fáze III Keynote 010 (NCT01905657). Do studie byli zařazováni pacienti po selhání předchozí 1. linie s platinou a současně s prokázanou expresí PD-L1 min. v 1 % nádorových buněk s randomizací do jednoho ze tří léčebných ramen, pembrolizumab 2 mg/kg, 10 mg/kg nebo standardní rameno s docetaxelem 75 mg/m² každé tři týdny. OS bylo signifikantně delší v obou ramenech s pembrolizumabem (dávka 2 mg/kg medián OS 12,7 vs. 8,5 měsíce; HR 0,71; $p = 0,0008$, resp. 10 mg/kg HR 0,61; $p < 0,0001$). Přítomnost PD-L1 ligandu na nádorových buňkách měla významný vliv na míru léčebné odpovědi s dopadem i na prodloužení OS [58]. U pacientů s přítomností PD-L1 vyšší než v 50 % nádorových buněk byl medián OS 14,9 vs. 8,2 měsíce; HR 0,54; $p = 0,0002$ v dávce 2 mg/kg a 17,3 vs. 8,2 měsíce; HR 0,5; $p < 0,0001$ při dávkování 10 mg/kg. FDA udělila pro tuto indikaci v říjnu 2015 na základě publikovaných výsledků tzv. accelerated approval, na evropské úrovni EMA je pembrolizumab v procesu posuzování.

Avelumab

Avelumab je anti-PD-L1 protilátka, ovlivňuje tedy nádorovou buňku a nikoli

přímo lymfocyt. Aktuálně probíhají studie Javelin Lung 100 (NCT02576574) a Javelin Lung 200 (NCT02395172) fáze III hodnotící efekt u pacientů s metastatickým NSCLC v 1. a 2. linii léčby. V 1. linii léčby je avelumab v dávce 10 mg/kg jednou za dva týdny srovnáván se standardní chemoterapií na bázi platiny, primárním cílem je hodnocení PFS a sekundárně i celkového přežití. Klinická studie Javelin Lung 200 ve 2. linii léčby hodnotí podání avelumabu oproti standardnímu podání docetaxelu v dávce 75 mg/m² jednou za tři týdny, primárním cílem je hodnocení OS a první výsledky jsou očekávány ke konci roku 2017. U obou studií je současně prospektivně hodnocena přítomnost PD-L1 v nádoru.

Atezolizumab

Jedná se o anti-PD-L1 protilátku zkoušenou u řady onkologických diagnóz. Recentně publikované výsledky studie POPLAR fáze II prokazují prodloužení OS proti docetaxelu v 2. linii paliativní léčby (OS 12,6 vs. 9,7 měsíce; HR 0,73; $p = 0,004$). Výsledky byly v korelaci s mírou exprese PD-L1 nádorovou buňkou [59]. Obdobné výsledky přinesla i další studie BIRCH fáze II, kde byla pozorována odpověď na léčbu u 27 % pacientů s vyšší expresí PD-L1 [60]. V současnosti probíhají studie fáze III hodnotící přínos atezolizumabu v 1. linii paliativní léčby ve srovnání se standardní chemoterapií (NCT02409342, NCT02409355), zde jsou první výsledky očekávány v roce 2019.

Výzvy v imunoterapii NSCLC

Nádorová imunologie a imunoterapie maligních onemocnění jsou v současné době v popředí zájmu onkologického výzkumu a podstatné místo zaujímají i v klinické praxi. Z hlediska klasifikace a managementu léčby časnějších stadií maligních onemocnění je významným počínem posledních let koncept imunoscóre/immunoscore, který je nejvíce rozpracován a aktuálně validován u kolořektálního karcinomu [61], nicméně je předmětem klinického výzkumu také u jednotlivých stadií NSCLC [62].

Vzhledem k tomu, že imunoterapie současnosti vstupuje především do

Tab. 2. Aktuálně probíhající studie fáze III/IV s checkpoint inhibitory u NSCLC.

Studie	Linie léčby	Číslo studie
nivolumab ± ipilimumab vs. nivolumab/cisplatina/pemetrexed	paliativní, 1. linie	NCT02477826
nivolumab – safety trial	paliativní, min. 2. linie	NCT02066636
nivolumab vs. dispenzarizace	adjuvantní	NCT02595944
pembrolizumab vs. placebo po resekci	adjuvantní	NCT02504372
pembrolizumab vs. chemoterapie na bázi platiny, PD-L1 pozitivní	paliativní, 1. linie	NCT02220894
avelumab vs. standardní chemoterapie (Javelin Lung 100)	paliativní, 1. linie	NCT02576574
avelumab vs. docetaxel (Javelin Lung 200)	paliativní, 2. linie	NCT02395172
atezolizumab vs. gemcitabin/cisplatina nebo karboplatina	paliativní, 1. linie	NCT02409355
atezolizumab vs. cisplatin nebo karboplatina + pemetrexed	paliativní, 1. linie	NCT02409342
atezolizumab vs. docetaxel	paliativní, 2. linie	NCT02008227
atezolizumab vs. nejlepší podpůrná péče	adjuvantní	NCT02486718
durvalumab ± tremelimumab vs. chemoterapie na bázi platiny	paliativní, 1. linie	NCT02453282
durvalumab vs. placebo	adjuvantní	NCT02273375
durvalumab ± tremelimumab vs. standardní chemoterapie	paliativní, min. 3. linie	NCT02352948

anti-CTLA-4 – ipilimumab, tremelimumab, anti-PD-1 – nivolumab, pembrolizumab, anti-PD-L1 – avelumab, atezolizumab, durvalumab

léčby pokročilých nádorových onemocnění, jejichž charakteristikou je repertoár imunopresivních vlastností prostředí nádoru, je nadějí pro pacienty s pokročilými onemocněními identifikace opodstatněných kombinací imunoterapie (stávající protilátky, nové protilátky, vakcíny) se standardními léčebnými modalitami (chemoterapie, radioterapie, cílená léčba), kde se jistě uplatní i „drug repositioning“. Kombinací léčebných metod by mohlo být dosaženo komplementárního, či dokonce synergického působení [63]. Je však nutno zvažovat míru toxicity léčby, např. v případě maligního melanomu sice přinesla kombinace dakarbazinu s ipilimumabem (10 mg/kg) prodloužení OS z 9,1 na 11,2 měsíce, ale závažné nežádoucí účinky stupně 3, 4 byly zaznamenány v 56 % [64]. Při hledání konkomitantních a sekvenčních protinádorových postupů je racionální kombinovat imunoterapii především s terapeutickými postupy dosahujícími léčebného efektu nejen na základě cytotoxických účinků, ale vyvolávajícími i tzv. imunogenní buněčnou smrt, kdy dochází ke stimulaci imunitního systému proti antigenům uvolněným z imunogenně likvidované maligní

buňky. Imunogenní buněčnou smrt navozují některá chemoterapeutika, termické ablace či radioterapie. Klinicky pozorovatelnou konsekvencí popsaného způsobu buněčné smrti je abskopální efekt radioterapie vedoucí k regresi nádorového onemocnění i mimo ozařované pole a kombinace radioterapie s checkpoint inhibitory by mohla vést k podpoře tohoto efektu [65]. V souvislosti s kombinací imunoterapie s cílenou léčbou je zmiňována např. podpora vyžrávání dendritických buněk či aktivity a diferenciací T lymfocytů, přičemž četné studie již probíhají [66]. V rámci kombinací se testuje i současné podání checkpoint inhibitorů (tab. 2), jejichž relevance pro klinickou praxi je vzhledem k toxicitě a nákladovosti bez znalosti prediktivního biomarkeru limitovaná.

Přestože jsou dosavadní data získaná z klinických hodnocení imunoterapie checkpoint inhibitory povzbuzivá ve smyslu dosažení déle trvajících odpovědí u metastatických onemocnění (především u maligního melanomu), je proporce léčených pacientů, u kterých je dosaženo významné dlouhotrvající klinické odpovědi, malá [67]. Podstatnou výzvou je tedy identifikace prediktiv-

ních biomarkerů jednotlivých modalit protinádorové imunoterapie. V případě inhibice interakce PD-1/PD-L1 se jako prediktivní biomarker nabízí, v analogii na prediktivní vlastnosti míry exprese Her-2 buňkami karcinomu prsu, kvantifikace míry exprese PD-L1 v maligní tkáni. Ve studiích jako CheckMate 017 hodnotící efekt nivolumabu u skvamózního NSCLC nebyla úloha exprese PD-L1 v maligní tkáni jako prediktoru léčby potvrzena; naopak v případě bronchogenního adenokarcinomu korelovala míra exprese ligandu PD-L1 s mírou léčebného efektu (např. CheckMate 057). Mimo roztržitost projektů hodnotících expresi PD-L1 s ohledem na použitý detekční systém (typ diagnostických protilátek, hodnota cut-off, hodnocení exprese na maligních buňkách vs. nádorovém stroma) je podstatným úskalím v ustanovení míry PD-L1 pozitivnosti jako prediktivního biomarkeru inducibilní exprese tohoto ligandu, jež nemusí být pouze reflexí imunopresivních vlastností nádorových buněk, ale může být naopak navozena parakrinní stimulací T lymfocytárního infiltrátu [68].

Na příkladu maligního melanomu se ukazuje, že prediktorem léčby check-

point inhibitory mohou být i cirkulující parametry hodnotitelné z periferní krve, kde jsou významnými biomarkery – mimo hladinu LDH (laktátdehydrogenázy) spojenou s aktivitou onemocnění – také parametry reflektující míru imunosuprese resp. efektorových funkcí imunitního systému, jako je proporce lymfocytů, absolutní počet eozinofilů a monocytů, ale také zastoupení Tregs a MDSC [69,70]. Je racionální předpokládat, že mimo baselinové hladiny parametrů imunitního systému poskytuje určitou informaci o úspěšnosti léčby také dynamika vývoje jednotlivých imunitních parametrů. Tímto způsobem je možné sledovat např. dynamiku efektorových T lymfocytů či jiných leukocytárních subpopulací; při znalosti konkrétního nádorového antigenu (např. v případě peptidových vakcín) je možno sledovat dynamiku T lymfocytární frakce se specificitou k danému antigenu.

Hledání vhodných prediktorů odpovědí na léčbu checkpoint inhibitory je významné nejen z výzkumného hlediska a z hlediska reality klinické praxe s ohledem na optimalizaci efektivity při minimalizaci toxicity léčby, ale rovněž může zásadně přispívat k finanční udržitelnosti těchto terapeutických postupů. Dnes je již více než zřejmé, že pravděpodobně žádný zdravotnický systém, tedy nejen v ČR, nebude schopen absorbovat zvyšující se finanční zátěž spojenou s cílenou protinádorovou terapií vč. nákladné moderní imunoterapie. Pokud je během výzkumu v časných fázích zřejmé, že se bude jednat o inovativní léčivo s významným budoucím finančním dopadem do rozpočtu, a rovněž bude zřejmé, že profitovat z nákladné léčby bude jen určité procento pacientů, je nezbytné nutné, aby klinické studie pozdější fáze III byly designovány již souběžně s vývojem a ověřením diagnostické metody pro stanovení vhodného biomarkeru. Tím by došlo k ideálnímu stavu, kdy případná registrace léčiva bude souběžně doprovázena i „registrací“ diagnostické metody tak, jak je již delší dobu v FDA guidelines [71,72]. Jedním z příkladů takto FDA chválených léčiv s diagnostickým kitem může být olaparib a BRACAnalysis CDx™ nebo crizotinib a VENTANA ALK (D5F3) CDx Assay™ [73]. Přestože ne-

jsou na evropské úrovni zatím tyto validované prediktivní testy při registraci léčiv Evropskou lékovou agenturou vyžadovány, je diskuze na toto téma evropskými regulátory vedena a pravděpodobně se v blízké době stane realitou. Tento způsob regulace inovativních a cílených protinádorových terapeutik patří k těm smysluplnějším a má reálný potenciál povzbudit farmaceutické firmy, aby intenzivněji implementovaly hledání vhodných biomarkerů již během klinického výzkumu nového léčiva, nikoliv až následně retrospektivně při hledání „vhodných podskupin“ pacientů v případě, kdy se neprokáže superiority efektu hodnoceného léčivého přípravku v celé kohortě testovaných subjektů, případně po registraci léčiva, kdy je identifikace a implementace prediktorů léčby v rozporu s komerčními zájmy držitelů registrací.

Literatura

- Chen Z, Fillmore CM, Hammerman PS et al. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nat Rev Cancer* 2014; 14(8): 535–546. doi: 10.1038/nrc3775.
- Lee DH, Park K, Kim JH et al. Randomized phase III trial of gefitinib versus docetaxel in non-small cell lung cancer patients who have previously received platinum-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2010; 16(4): 1307–1314. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1903.
- Han JY, Park K, Kim SW et al. First-SIGNAL: first-line single-agent iressa versus gemcitabine and cisplatin trial in never-smokers with adenocarcinoma of the lung. *J Clin Oncol* 2012; 30(10): 1122–1128. doi: 10.1200/JCO.2011.36.8456.
- Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010; 11(2): 121–128. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70364-X.
- Mok TS, Wu YL, Thongprasert S et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009; 361(10): 947–957. doi: 10.1056/NEJMoa0810699.
- Zhou C, Wu YL, Chen G et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol* 2011; 12(8): 735–742. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70184-X.
- Rosell R, Carcereny E, Gervais R et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13(3): 239–246. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70393-X.
- Katakami N, Atagi S, Goto K et al. LUX-Lung 4: a phase II trial of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer who progressed during prior treatment with erlotinib, gefitinib, or both. *J Clin Oncol* 2013; 31(27): 3335–3341. doi: 10.1200/JCO.2012.45.0981.
- Janjigian YY, Smit EF, Groen HJ et al. Dual inhibition of EGFR with afatinib and cetuximab in kinase inhibitor-

resistant EGFR-mutant lung cancer with and without T790M mutations. *Cancer Discov* 2014; 4(9): 1036–1045. doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-0326.

- Sequist LV, Besse B, Lynch TJ et al. Neratinib, an irreversible pan-ErbB receptor tyrosine kinase inhibitor: results of a phase II trial in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28(18): 3076–3083. doi: 10.1200/JCO.2009.27.9414.
- Oxnard GR, Arcila ME, Sima CS et al. Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant lung cancer: distinct natural history of patients with tumors harboring the T790M mutation. *Clin Cancer Res* 2011; 17(6): 1616–1622. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2692.
- Reckamp KL, Giaccone G, Camidge DR et al. A phase 2 trial of dacomitinib (PF-00299804), an oral, irreversible pan-HER (human epidermal growth factor receptor) inhibitor, in patients with advanced non-small cell lung cancer after failure of prior chemotherapy and erlotinib. *Cancer* 2014; 120(8): 1145–1154. doi: 10.1002/cncr.28561.
- Lee JS, Hirsh V, Park K et al. Vandetanib versus placebo in patients with advanced non-small-cell lung cancer after prior therapy with an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor: a randomized, double-blind phase III trial (ZEPHYR). *J Clin Oncol* 2012; 30(10): 1114–1121. doi: 10.1200/JCO.2011.36.1709.
- Sequist LV, Soria JC, Camidge DR. Update to rociletinib data with the RECIST confirmed response rate. *N Engl J Med* 2016; 374(23): 2296–2297. doi: 10.1056/NEJMc1602688.
- Sequist LV, Soria JC, Goldman JW et al. Rociletinib in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; 372(18): 1700–1709. doi: 10.1056/NEJMoa1413654.
- Cross DA, Ashton SE, Ghiorghiu S et al. AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer. *Cancer Discov* 2014; 4(9): 1046–1061. doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-0337.
- Yver A. Osimertinib (AZD9291)-a science-driven, collaborative approach to rapid drug design and development. *Ann Oncol* 2016; 27(6): 1165–1170. doi: 10.1093/annonc/mdw129.
- Janne PA, Yang JC, Kim DW et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; 372(18): 1689–1699. doi: 10.1056/NEJMoa1411817.
- Costa DB, Shaw AT, Ou SH et al. Clinical experience with crizotinib in patients with advanced ALK-rearranged non-small-cell lung cancer and brain metastases. *J Clin Oncol* 2015; 33(17): 1881–1888. doi: 10.1200/JCO.2014.59.0539.
- Ou SH, Janne PA, Bartlett CH et al. Clinical benefit of continuing ALK inhibition with crizotinib beyond initial disease progression in patients with advanced ALK-positive NSCLC. *Ann Oncol* 2014; 25(2): 415–422. doi: 10.1093/annonc/mdt572.
- Gadgeel SM, Gandhi L, Riely GJ et al. Safety and activity of alectinib against systemic disease and brain metastases in patients with crizotinib-resistant ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (AF-002JG): results from the dose-finding portion of a phase 1/2 study. *Lancet Oncol* 2014; 15(10): 1119–1128. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70362-6.
- Li S, Qi X, Huang Y et al. Ceritinib (LDK378): a potent alternative to crizotinib for ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2015; 16(2): 86–91. doi: 10.1016/j.clcc.2014.09.011.
- Gainor JF, Tan DS, De Pas T et al. Progression-free and overall survival in ALK-positive NSCLC patients treated with sequential crizotinib and ceritinib. *Clinical Cancer Res* 2015; 21(12): 2745–2752. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-3009.
- Bergethon K, Shaw AT, Ou SH et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol* 2012; 30(8): 863–870. doi: 10.1200/JCO.2011.35.6345.

25. Rosell R, Gettinger SN, Bazhenova LA et al. 1330: Brigatinib efficacy and safety in patients (Pts) with anaplastic lymphoma kinase (ALK)-positive (ALK+) non-small cell lung cancer (NSCLC) in a phase 1/2 trial. *J Thorac Oncol* 2016; 11 (4 Suppl): S114. doi: 10.1016/S1556-0864(16)30245-3.
26. Chin LP, Soo RA, Soong R et al. Targeting ROS1 with anaplastic lymphoma kinase inhibitors: a promising therapeutic strategy for a newly defined molecular subset of non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2012; 7(11): 1625–1630. doi: 10.1097/JTO.0b013e31826baf83.
27. Zou HY, Li Q, Lee JH et al. An orally available small-molecule inhibitor of c-Met, PF-2341066, exhibits cytoreductive antitumor efficacy through antiproliferative and antiangiogenic mechanisms. *Cancer Res* 2007; 67(9): 4408–4417.
28. Drilon A, Wang L, Hasanovic A et al. Response to Cabozantinib in patients with RET fusion-positive lung adenocarcinomas. *Cancer Discov* 2013; 3(6): 630–635.
29. Padda S, Neal JW, Wakelee HA. MET inhibitors in combination with other therapies in non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* 2012; 1(4): 238–253. doi: 10.3978/j.issn.2218-6751.2012.10.08.
30. Dabrafenib active in rare NSCLC subtype. *Cancer Discov* 2016; 6(7). OF4. doi: 10.1158/2159-8290.CD-NB2016-062.
31. Blumenschein GR Jr, Smit EF, Planchard D et al. A randomized phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor trametinib (GSK1120212) compared with docetaxel in KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) dagger. *Ann Oncol* 2015; 26(5): 894–901. doi: 10.1093/annonc/mdv072.
32. Planchard D, Kim TM, Mazieres J et al. Dabrafenib in patients with BRAF(V600E)-positive advanced non-small-cell lung cancer: a single-arm, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17(5): 642–650. doi: 10.1016/S1470-2045(16)00077-2.
33. Janne PA, Shaw AT, Pereira JR et al. Selumetinib plus docetaxel for KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer: a randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2013; 14(1): 38–47. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70489-8.
34. Heymach JV, Lockwood SJ, Herbst RS et al. EGFR biomarkers predict benefit from vandetanib in combination with docetaxel in a randomized phase III study of second-line treatment of patients with advanced non-small cell lung cancer. *Ann Oncol* 2014; 25(10): 1941–1948. doi: 10.1093/annonc/mdu269.
35. Coley WB. II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Ann Surg* 1891; 14(3): 199–220.
36. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. *Clin Orthop Relat Res* 1893; 1991(262): 3–11.
37. Ehrlich P. The partial function of cells. (Nobel Prize address given on 11 December 1908 at Stockholm). *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1954; 5(2): 67–86.
38. Ehrlich P. Address in pathology, on chemotherapy: delivered before the Seventeenth International Congress of Medicine. *Br Med J* 1913; 2(2746): 353–359.
39. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 2013; 500(7463): 415–421. doi: 10.1038/nature12477.
40. McGranahan N, Furness AJ, Rosenthal R et al. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science* 2016; 351(6280): 1463–1469. doi: 10.1126/science.aaf1490.
41. Gettinger SN, Horn L, Gandhi L et al. Overall survival and long-term safety of nivolumab (anti-programmed death 1 antibody, BMS-936558, ONO-4538) in patients with previously treated advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2015; 33(18): 2004–2012. doi: 10.1200/JCO.2014.58.3708.
42. Jansen RL, Slingerland R, Goey SH et al. Interleukin-2 and interferon-alpha in the treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Immunother* 1992; 12(1): 70–73.
43. Agrawal B, Gendler SJ, Longenecker BM. The biological role of mucins in cellular interactions and immune regulation: prospects for cancer immunotherapy. *Mol Med Today* 1998; 4(9): 397–403.
44. DeGregorio M, Soe L, Wolf M. Tecemotide (L-BLP25) versus placebo after chemoradiotherapy for stage III non-small cell lung cancer (START): a randomized, double-blind, phase III trial. *J Thorac Dis* 2014; 6(6): 571–573. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2014.05.15.
45. Rochlitz C, Figlin R, Squiban P et al. Phase I immunotherapy with a modified vaccinia virus (MVA) expressing human MUC1 as antigen-specific immunotherapy in patients with MUC1-positive advanced cancer. *J Gene Med* 2003; 5(8): 690–699.
46. Quoix E, Lena H, Losonczy G et al. TG4010 immunotherapy and first-line chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer (TIME): results from the phase 2b part of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b/3 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17(2): 212–223. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00483-0.
47. Jang SJ, Soria JC, Wang L et al. Activation of melanoma antigen tumor antigens occurs early in lung carcinogenesis. *Cancer Res* 2001; 61(21): 7959–7963.
48. Vansteenkiste JF, Cho BC, Vanakesa T et al. Efficacy of the MAGE-A3 cancer immunotherapeutic as adjuvant therapy in patients with resected MAGE-A3-positive non-small-cell lung cancer (MAGRIT): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17(6): 822–835. doi: 10.1016/S1470-2045(16)00099-1.
49. Rodriguez PC, Popa X, Martinez O et al. A Phase III clinical trial of the epidermal growth factor vaccine CIMAvax-EGF as switch maintenance therapy in advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2016; 22(15): 3782–3790. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0855.
50. Giaccone G, Bazhenova LA, Nemunaitis J et al. A phase III study of belagenpumatucel-L, an allogeneic tumour cell vaccine, as maintenance therapy for non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 2015; 51(16): 2321–2329. doi: 10.1016/j.ejca.2015.07.035.
51. Alfonso S, Valdes-Zayas A, Santiesteban ER et al. A randomized, multicenter, placebo-controlled clinical trial of racotumomab-alum vaccine as switch maintenance therapy in advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2014; 20(14): 3660–3671. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1674.
52. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 677–704. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331.
53. Lynch TJ, Bondarenko I, Luft A et al. Ipilimumab in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line treatment in stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer: results from a randomized, double-blind, multicenter phase II study. *J Clin Oncol* 2012; 30(17): 2046–2054. doi: 10.1200/JCO.2011.38.4032.
54. Lakomy R, Poprach A. Side effects of modern immunotherapy and how to solve them in the clinics. *Klin Onkol* 2015; 28 (Suppl 4): 45103–45114. doi: 10.14735/amko201545103.
55. Zatloukal P, Heo DS, Park K et al. Randomized phase II clinical trial comparing tremelimumab (CP-675,206) with best supportive care (BSC) following first-line platinum-based therapy in patients (pts) with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 2009; 27 (Suppl 15): abstr. 8071.
56. Robert C, Long GV, Brady B et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Eng J Med* 2015; 372(4): 320–330. doi: 10.1056/NEJMoa1412082.
57. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Eng J Med* 2012; 366(26): 2443–2454. doi: 10.1056/NEJMoa1200690.
58. Herbst RS, Baas P, Kim DW et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet* 2016; 387(10027): 1540–1550. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01281-7.
59. Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M et al. Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet* 2016; 387(10030): 1837–1846. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00587-0.
60. Besse B, Johnson M, Janne PA. Phase II, single-arm trial (BIRCH) of atezolizumab as first-line or subsequent therapy for locally advanced or metastatic PD-L1-selected non-small cell lung cancer (NSCLC). *Ann Oncol* 2015; 26 (Suppl 6): 16LBA.
61. Galon J, Larkin J, Ascierto PA. Immuno-oncology combinations: a review of clinical experience and future prospects. *Clin Cancer Res* 2014; 20(24): 6258–6268. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1457.
62. Robert C, Thomas L, Bondarenko I et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Eng J Med* 2011; 364(26): 2517–2526. doi: 10.1056/NEJMoa1104621.
63. Formenti SC, Demaria S. Combining radiotherapy and cancer immunotherapy: a paradigm shift. *J Natl Cancer Inst* 2013; 105(4): 256–265. doi: 10.1093/jnci/djs629.
64. Schilling B, Sucker A, Griewank K et al. Vemurafenib reverses immunosuppression by myeloid derived suppressor cells. *Int J Cancer* 2013; 133(7): 1653–1663. doi: 10.1002/ijc.28168.
65. Wolchok JD, Neyns B, Linette G et al. Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 2, dose-ranging study. *Lancet Oncol* 2010; 11(2): 155–164. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70334-1.
66. Gowrishankar K, Gunatillake D, Gallagher SJ et al. Inducible but not constitutive expression of PD-L1 in human melanoma cells is dependent on activation of NF-κB. *PLoS One* 2015; 10(4): e0123410. doi: 10.1371/journal.pone.0123410.
67. Weide B, Martens A, Hassel JC et al. Baseline biomarkers for outcome of melanoma patients treated with pembrolizumab. *Clin Cancer Res*. In press 2016.
68. Martens A, Wistuba-Hamprecht K, Geukes Foppen M et al. Baseline peripheral blood biomarkers associated with clinical outcome of advanced melanoma patients treated with ipilimumab. *Clin Cancer Res* 2016; 22(12): 2908–2918. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2412.
69. Hinman LM, Huang SM, Hackett J et al. The drug diagnostic co-development concept paper: commentary from the 3rd FDA-DIA-PWG-PhRMA-BIO pharmacogenomics workshop. *Pharmacogenomics J* 2006; 6(6): 375–380.
70. Fda.gov [homepage on the Internet]. Drug-diagnostic co-development concept paper. U.S. Food and Drug Administration, MD; [updated 2016 June 22; cited 2016 June 23]. Available from: www.fda.gov/downloads/Drugs/ScienceResearch/ResearchAreas/Pharmacogenetics/ucm116689.pdf.
71. Fda.gov [homepage on the Internet]. List of cleared or approved companion diagnostic devices (in vitro and imaging tools). U.S. Food and Drug Administration, MD; [updated 2016 June 22; cited 2016 June 23]. Available from: www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/InVitroDiagnostics/ucm301431.htm.

Systemic Administration of miRNA Mimics by Liposomal Delivery System in Animal Model of Colorectal Carcinoma

J. MERHAUTOVÁ^{1,2}, P. VYCHYTILOVÁ-FALTEJSKOVÁ¹, R. DEMLOVÁ², O. SLABÝ¹

¹Molecular Oncology II – Solid Cancer, CEITEC, Masaryk University, Brno, Czech Republic,

²Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Received August 28, 2016

Accepted September 12, 2016

Summary

MiRNAs are important regulators of gene expression and changes in their levels are linked with various pathological states, including solid tumors. MiR-215 has been identified as a tumor suppressor in colorectal cancer (CRC). Following our previous *in vitro* and *in vivo* experiments, the aim of this project was to study the possibility of increasing the levels of miR-215 in tumor cells by systemic administration of miRNA mimics in liposomal delivery system *in vivo*. By subcutaneous xenotransplantation of human cancer cells to NSG mice, CRC model was established. The treatment [miR-215 mimics in liposomes (20 and 40 µg/mouse), control oligonucleotide in liposomes, or saline] was administered repeatedly by i.v. injection *via* tail-vein. Animals were sacrificed, tumor were dissected and measured by a caliper. Expression of miR-215 in tumors, lungs and liver was quantified by RT-PCR. There was no significant differences in tumor volume and miR-215 expression between all three treatment groups. Therefore, the decrease in tumor volume was not achieved. By comparing the levels of miR-215 in lungs, liver and tumors after the treatment, we suggest that the liposomes are accumulated in the lungs and do not concentrate sufficiently in the tumor site to exert significant tumor-suppressive effect.

Key words

Colorectal neoplasms • microRNAs • Liposomes • Mice

Corresponding author

O. Slabý, Molecular Oncology II – Solid Cancer, CEITEC, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic. E-mail: ondrej.slaby@ceitec.muni.cz

Introduction

Colorectal carcinoma (CRC) represents the second most frequent cancer disease in men and women in the Czech Republic. For the last 10 years, the incidence of CRC is stable ranging around 80 cases per 100,000 persons a year and the mortality is slowly decreasing (Dušek *et al.* 2007, Ferlay *et al.* 2013). Nevertheless, a large proportion of patients is diagnosed with advanced or metastatic disease (stages III, IV). Clinical outcomes of therapy in metastatic stage are quite worse in comparison with early (I, II) stages and the pharmacotherapy is mostly palliative.

Treatment of advanced and metastatic CRC consists of chemotherapy regimens based on 5-fluorouracil (5-FU) and leucovorin combined with irinotecan, or oxaliplatin. 5-FU could be also replaced with capecitabine (Fínek *et al.* 2016). Cytostatics are nowadays frequently combined with targeted therapy. There are more target molecules: epidermal growth factor receptor (EGFR), vascular endothelial growth factor (VEGF), and tyrosine kinases associated with various receptors including VEGFR, PDGFR, FGFR, KIT, RET etc. The most frequently used targeted therapy agents are monoclonal antibodies against EGFR (cetuximab, panitumumab) and VEGF (bevacizumab). Anti-EGFR therapy is designated for patients with confirmed wild-type *RAS* oncogene (*KRAS*, *NRAS*), as mutations in *RAS* are associated with poor anti-EGFR therapy outcomes (Lin *et al.* 2011, Adelstein *et al.* 2011). Multikinase inhibitor regorafenib, and fusion protein (“soluble VEGF receptor”) aflibercept are designated for patients with progression on standard therapy, or intolerance of it

(Van Cutsem *et al.* 2016, Fínek *et al.* 2016).

Even in this more targeted and moderately personalized treatment settings, a group of patients does not have clinical benefit from the therapy, or their tumor gains secondary resistance. Besides finding new predictive biomarkers to distinguish more precisely patients with or without clinical benefit from the therapy in advance, there is a constant need to bring new therapeutics with new mechanisms of action into the clinical practice. MiRNA-based therapeutics, that emerged in the drug research and development with increasing knowledge about the roles of miRNAs in the cell and in the cancer cell specifically, could represent such new targeted substances and some of them are heading towards the clinical practice. Besides growing number of *in vitro* and *in vivo* studies that aim to discover potential therapeutic properties of miRNA mimics, inhibitors, or expression vectors, there are several ongoing clinical trials in oncology, e.g. with miR-34a mimics (Adams *et al.* 2015) or miR-16 mimics (Kao *et al.* 2015, Quinn *et al.* 2015).

MiRNAs are endogenous small non-coding RNAs. They attenuate mRNA translation post-transcriptionally by binding to the 3'-untranslated region of mRNA. The matching is guided by specific "seed" sequence of 6-8 nucleotides of a miRNA and results in the inhibition of translation, destabilization and subsequent degradation of target mRNA (Krol *et al.* 2012). One miRNA can regulate many genes which could be functionally different, or linked in a specific intracellular pathway. While miRNAs are supposed to regulate more than 50 % of human genes, their network interferes with most cellular processes like metabolic and energetic maintenance, differentiation, cell cycle and proliferation, survival, or death (Esquela-Kerscher *et al.* 2006). Therefore, dysregulation of miRNAs' expression is linked with various pathological states, including solid tumors (Ruan *et al.* 2009). Quantity of *in vitro* and *in vivo* evidences indicate, that change in pathological miRNAs levels is capable of transforming the cancer cell phenotype.

Significant changes in miRNA expression could be found in tumors compared with relevant healthy tissue. By large-scale miRNA profiling and following validation, our group has previously identified miRNAs significantly altered in CRC. Among others, miR-215 was identified as decreased, and *in vitro* functionally characterized as tumor suppressor (Faltejsková *et al.* 2012). It was also found down-regulated in patients with

CRC relapse (Karaayvaz *et al.* 2011). MiR-215 influences apoptosis, cell cycle, viability, and migration of CRC cells *in vitro* (Faltejsková *et al.* 2012). It is tightly associated with protein p53, since p53 is induced by miR-215, and miR-215 is regulated by p53 in a feedback loop. By induction of p21, miR-215 is able to stop cell cycle, and it also inhibits expression of thymidylate synthase, dihydrofolate reductase (Braun *et al.* 2008) and *BM11* gene, that plays a role in cancer cells self-renewal ability (Jones *et al.* 2015). Transcription of miR-215 is activated by transcription factor CDX1 (caudal-type homeobox 1), which regulates differentiation of enterocytes and is frequently down-regulated due to hypermethylation of promotor in CRC (Jones *et al.* 2015). Down-regulation of this miRNA is suggested to be one of the early steps in colorectal neoplastic transformation, as tumors initiated both by *APC* gene mutations, and chronic inflammation share this specific molecular pathology (Necela *et al.* 2011). Moreover, our group has recently found, that overexpression of miR-215 in colorectal cancer cell line leads to significant decrease in tumor volume in tumorigenicity assay *in vivo* (Vychytilová-Faltejsková data not yet published).

Altogether, these findings suggest possible therapeutic roles of miR-215 in CRC. Therefore, the aim of this work was to study the possibility of increasing the intracellular level of miR-215 in tumor by systemic administration of miRNA mimics in liposomal delivery system *in vivo*.

Methods

Subcutaneous xenotransplantation

All animal procedures were performed in accordance with the Czech legislation (Act No. 246/1992) and with approval of both local and national Committees for Animal Welfare. NSG mice (18-27 g, 8-14 weeks old) were housed and monitored in an individually ventilated cage system (Techniplast, Buguggiate, Italy) with *ad libitum* access to water and feeding. The subcutaneous xenotransplantation of human cancer cells was performed according to the protocol described by Morton and Houghton (2007) with minor changes. Briefly, mice were anesthetized with etomidate (30 mg/kg) by i.p. injection. 2.5×10^6 human CRC cells HCT-116^{+/+} suspended in 100 μ l of phosphate-buffered saline (PBS) were injected subcutaneously on dorsal site of a mouse. On Day 7 postinoculation, palpable tumor

with approximate volume of 500 mm³ were present in each animal (Fig. 1).

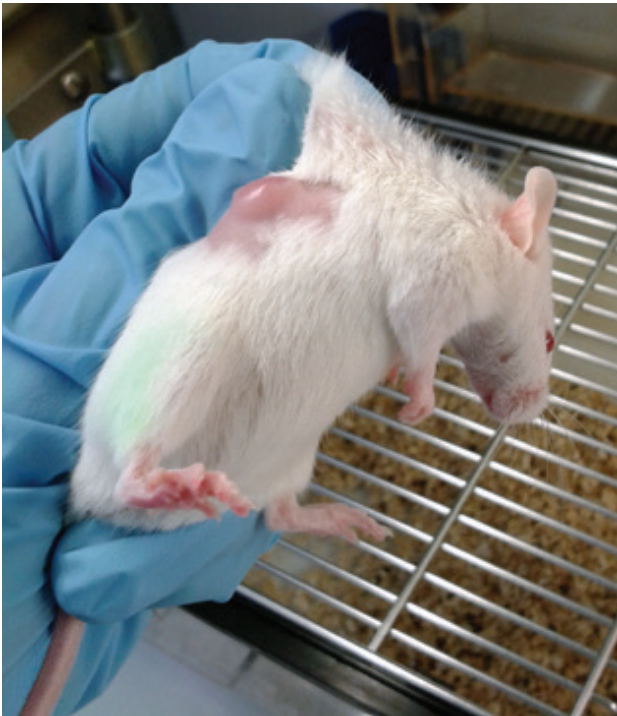


Fig. 1. Mouse with subcutaneous tumor seventh day postinoculation.

Preparation of miRNA mimics encapsulated in liposomes

MaxSuppressor™ In Vivo RNA-LANCER II (Bioo Scientific, Austin, USA) was used as a liposomal delivery system. MiRNA mimics (*mirVana*™ miRNA mimic hsa-miR-215, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) and negative control oligonucleotide (*mirVana*™ miRNA mimic Negative Control #1, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) were encapsulated into the liposomes according to the manufacturer's protocol. Briefly, RNA substances were diluted in water for injections (B.Braun Medical, Hessen, Germany) to 10 mg/ml and stored in -80 °C. 11 µl of RNA solution [10 µl (0.1 mg) + 10 % excess], 55 µl of PBS 10× and 434 µl RNase-free water were added into 1 bottle of MaxSuppressor™ which consists of 50 µl of neutral lipid emulsion (NLE). The mixture was sonicated for 5 min in room temperature.

Experimental treatment

Two doses [20 µg (1 nmol)/mouse, and 40 µg (2 nmol)/mouse] of miRNA mimics encapsulated in liposomes were tested in animal model of CRC, which was established by subcutaneous xenotransplantation. For

the dose of 20 µg/mouse, 1 bottle of MaxSuppressor™ mixture was divided into 5 doses of 100 µl volume, and 2.5 doses in the case of higher dosing, while the volume of injection was increased to 200 µl. Intravenous injection into the tail vein started on Day 7 postinoculation.

In the Experiment A, 12 NSG mice were randomly divided into 3 groups: a) active treatment (miRNA mimics in liposomes, 20 µg/mouse), b) negative control (negative control oligonucleotide in liposomes), and c) saline. Tail-vein injections were repeated after 48 h for total 4 times. 24 h after the last dose, mice were sacrificed by anesthetic overdosing.

In the Experiment B, 12 NSG mice were randomly divided into 3 groups: a) active treatment (40 µg/mouse), b) negative control, and c) saline. Following procedures were the same as in Experiment A.

In the Experiment C, 10 NSG mice were randomly divided into 2 groups: a) active treatment (20 µg/mouse), b) control (saline). Tail-vein injections were repeated after 48 h for total 3 times. 24 h after the last dose, mice were sacrificed.

At the end of all experiments, a necropsy was performed, tumors were extirpated, and measured by Vernier caliper. Lungs and liver were removed and washed with sterile saline. All tissues were stored in RNAlater (Sigma-Aldrich, Waltham, USA) for further analysis.

Determination of miR-215 expression in animal tissues

Tissue specimens were homogenized (MM301, Retsch GmbH & Co. KG, Germany) and total RNA was isolated using *mirVana* miRNA Isolation Kit (Ambion, Austin, USA) according to the manufacturer's protocol. Concentration and purity of the isolated RNA were determined spectrophotometrically using Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Reverse transcription was performed using gene-specific primer (hsa-miR-215-5p) according to the TaqMan MicroRNA Assay protocol. TaqMan Universal PCR Master Mix (NoUmpErase UNG; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) was used for RT-PCR quantification, which was performed on QuantStudio 12K Flex Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Data normalization and statistical analysis

Tumor volume was calculated using a mathematical approximation $V=0.5 \times (L \times W)^2$, where L and W stand for length and width of a tumor,

respectively. Tumor volumes were analyzed using Kruskal-Wallis test in the case of three groups of treatment, or Mann-Whitney test when comparing two groups (both GraphPad Prism 5.03). Normalized ($2^{-(Ct-40)}$) miR-215 expression data were analyzed by Kruskal-Wallis test or Mann-Whitney test, respectively (GraphPad Prism 5.03). p -values ≤ 0.05 were considered statistically significant.

Results

Effect of intravenous administration of miR-215 mimic on tumor volume

Experiments A and B assessed the effect of intravenous administration of miR-215 mimics on tumor growth in mice model of CRC. The model was established by subcutaneous xenotransplantation of human CRC cells HCT-116^{+/+}. Tail-vein injections started on Day 7 postinoculation and were repeated 4 times. In Experiment A, miRNA mimics were administered in the dose of 20 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ and were encapsulated in liposomes.

Interestingly, there were no statistically significant changes in tumor volume measured after 4 administrations of 20 μg miR-215 mimics compared with negative control (negative control oligonucleotide in liposomes), or saline (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$, Fig. 2A). Expression of miR-215 in tumor tissue was quantified by RT-PCR. In accordance with the results related to the tumor volume, miR-215 level was not significantly higher in the group of mice treated with miR-215 mimics compared with the negative control and saline (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$), however a slight trend in increase could be seen here (Fig. 2B).

As the results of Experiment A were negative, we stated two hypotheses of responsible issues. The first was potentially inappropriate dose. To test this, we increase the dose of miR-215 to 40 $\mu\text{g}/\text{mouse}$. The design of Experiment B was the same. Again, there were no significant changes in tumor volume measured after 4 administrations of miR-215 mimics compared with negative control and saline (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$, Fig. 3A). We have also measured the level of miR-215 in tumor tissue by qRT-PCR and the results were quite similar as in Experiment A, i.e. non-significant trend in increase of miR-215 in tumors of animal treated with miRNA mimics (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$, Fig. 3B).

The second hypothesis was related to extratumoral accumulation of liposomes. In order to verify this, we removed lungs and liver from 1 animal per group from Experiment B and analyzed the levels of miR-215. In these pilot settings, we obtain interesting comparison suggesting potential accumulation in lungs, although this result was quite preliminary because of minimal number of samples (data not shown).

Potential extratumoral accumulation with liposomes containing miRNA mimics cargo

Experiment C was intended to elucidate the potential undesired accumulation of the liposomal delivery system. Number of treatment groups was reduced to the active treatment by liposomal miR-215 mimics (20 $\mu\text{g}/\text{mouse}$), and saline. Tumors, lungs and liver were gathered from all animals ($N=10$). As was expected, there were no statistically significant changes in tumor volume measured after 3 administrations of miR-215 mimics compared with saline (Mann-Whitney test, $p > 0.05$, Fig. 4A). An increase in the levels of

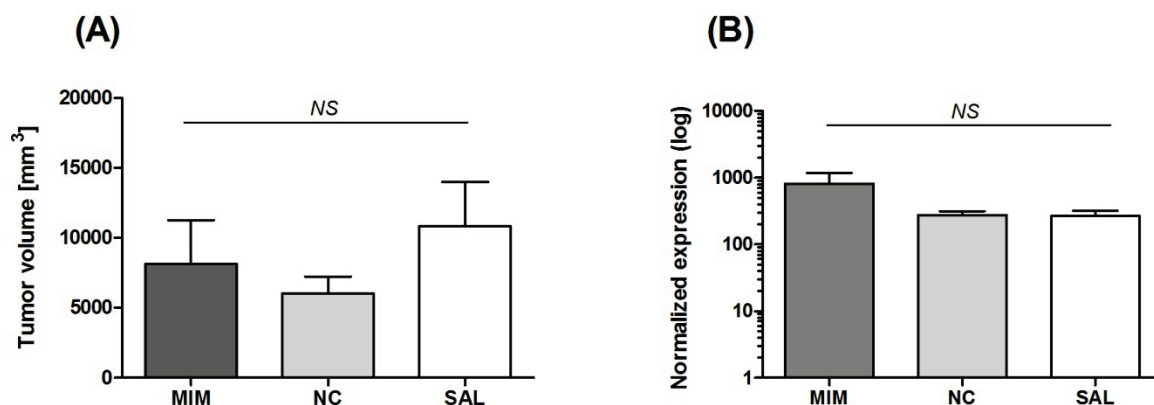


Fig. 2. Tumor volume (A) and miR-215 expression (B) in Experiment A after four administrations of miR-215 mimics (20 $\mu\text{g}/\text{mouse}$, MIM), negative control oligonucleotide (NC), or saline (SAL). Each group consisted of 4 mice. Kruskal-Wallis test, *NS* not significant ($p > 0.05$).

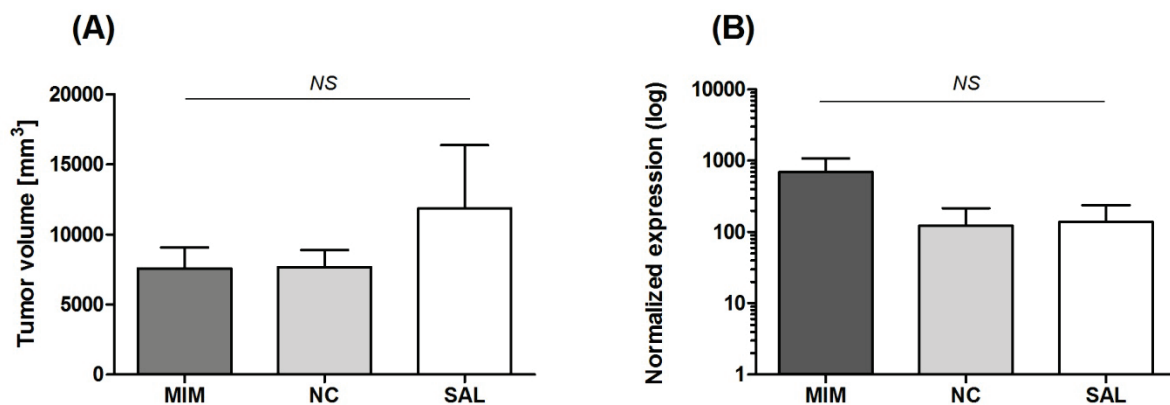


Fig. 3. Tumor volume (A) and miR-215 expression (B) in experiment B after four administrations of miR-215 mimics (40 µg/mouse, MIM), negative control oligonucleotide (NC), or saline (SAL). Each group consisted of 4 mice. Kruskal-Wallis test, *NS* not significant ($p > 0.05$).

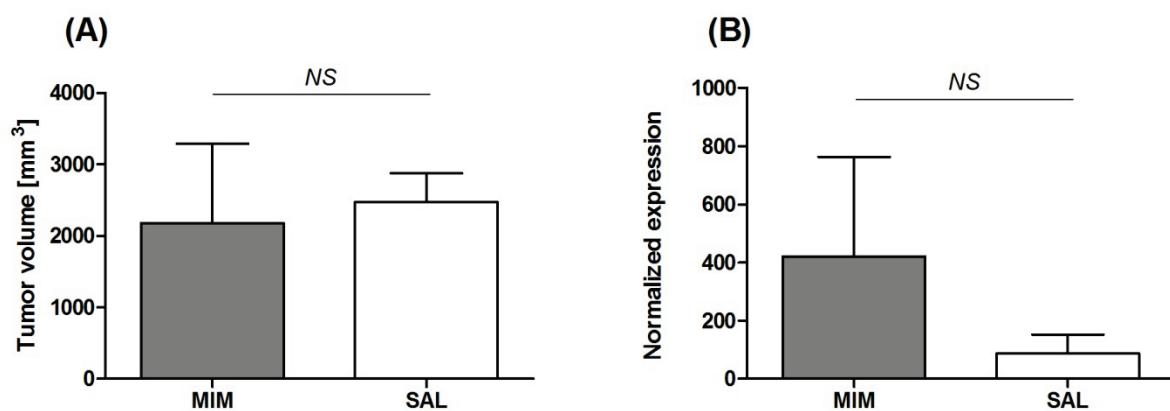


Fig. 4. Tumor volume (A) and miR-215 expression (B) in experiment C after three administrations of miR-215 mimics (20 µg/mouse, MIM), or saline (SAL). Each group consisted of 5 mice. Mann-Whitney test, *NS* not significant ($p > 0.05$).

miR-215 in tumors of mimics-treated mice was not statistically significant probably due to higher variability of measured levels (Mann-Whitney test, $p > 0.05$, Fig. 4B).

We have observed low expression of miR-215 in lungs and tumors of control animals treated with saline. MiR-215 levels was significantly higher in lungs of mimics-treated animals than in tumors of the same animals, and also than in tumors and lungs of control saline-treated mice (Kruskal-Wallis test, $p = 0.0277$, Fig. 5A). Although the result suffered with high variability of miR-215 lungs expression levels, the hypothesis of lung accumulation seems to be a possible explanation. The expression of miR-215 in liver was high both in active treatment and in control group, and the groups did not significantly differ (Mann-Whitney test, $p > 0.05$, Fig. 5B). Thus, we can assume no liver accumulation.

Discussion

MiR-215 was proved as tumor suppressor in

CRC both descriptively in human tumor tissue, and functionally in stable cell lines. As it is down-regulated in tumor, increase of miR-215 levels is associated with decreased proliferation, viability, and migration of cancer cells *in vitro*, and decreased tumor volume *in vivo* (Braun *et al.* 2008, Faltejsová *et al.* 2012).

The aim of our study was to increase miR-215 intracellular levels by systemic administration of miRNA mimics. These substances are oligonucleotides with various chemical modifications in the structure made in order to grant higher effect than native mature miRNAs through higher affinity to the target mRNA. We have chosen liposomal delivery system, since liposomes have already been a part of standard pharmacotherapy (e.g. liposomal doxorubicin, amphotericin B etc.). Liposomes could be accumulated in tumor site by enhanced permeability and retention effect caused by imperfect neoangiogenesis and delayed lymphangiogenesis (Matsumura and Maeda 1986). The most important benefit of the liposomal reagent MaxSuppressor™ In

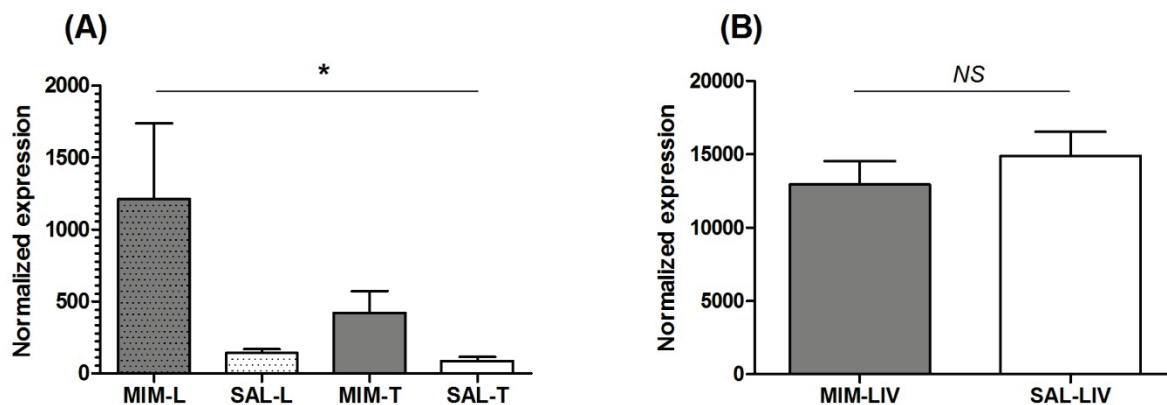


Fig. 5. Comparison of miR-215 expression in lungs and tumor (A) and in the liver (B) in experiment C after three administrations of miR-215 mimics (20 μ g/mouse, MIM), or saline (SAL). Each group consisted of 5 mice, L stands for lungs, LIV liver, T tumors. Kruskal-Wallis test (A), or Mann-Whitney test (B), NS not significant ($p > 0.05$), * $p = 0.0277$.

Vivo RNA-LANCER II is the use of charge neutral lipids (NLE). While cationic lipids have enhanced capacity for binding negatively charged oligonucleotides, they exert electrostatic interactions with various molecules on the cell surface and could decrease proliferation, or alter gene expression (Wu *et al.* 2001). Liposomes originating from positively charged lipids could also form aggregates with plasma proteins which leads to elimination by mononuclear phagocyte system and accumulation in liver and spleen (Zhang *et al.* 2012). By choosing charge neutral lipid emulsion, we assumed to avoid these issues and retain positive aspects of liposomal delivery system.

MaxSuppressor™ In Vivo RNA-LANCER II has been previously used in animal models of cancer diseases to delivery miRNA-based experimental therapeutics. Most of this experiments used intratumoral delivery of liposomes, but doses similar to ours were also used intravenously in subcutaneous xenografts, orthotopic models and metastasis models of lung, breast, and prostate carcinoma, multiple myeloma, Ewing's sarcoma etc. (Trang *et al.* 2011, DeVito *et al.* 2011, Amodio *et al.* 2012, Imam *et al.* 2012, DiMartino *et al.* 2013, Hatano *et al.* 2015).

Unfortunately, we were not able to significantly increase intracellular levels of miR-215 in tumor by intravenous administration of miR-215 mimics encapsulated in NLE liposomes. Not surprisingly with this finding, the tumor volume also did not differ between the treatment groups. In a search for a possible explanation, we have stated two hypotheses.

The first was related to the appropriate dose. Doses ranging from 20 to 30 μ g/mouse were frequent in the literature. Although we have assessed two doses, they were not proportionally different because we were limited

with the tolerable volume of intravenous injection in mice and from the other side with encapsulation capacity of NLE liposomes guaranteed by the manufacturer. Moreover, a trend in increase of miR-215 in the group of mice treated with 20 μ g miR-215 mimics, which was not statistically significant, was later repeated but not augmented after administration of 40 μ g mimics/mouse assuming no dose-dependent observable changes. The dose remains an important point that need further research, however we have focused on the second hypothesis – a possibility of extratumoral accumulation.

Almost all new delivery systems have to deal with plasma protein interactions and possible recognition by circulating or organ immune cells followed by elimination. Trang *et al.* (2011) described the situation 10 min after intravenous injection of 20 μ g of miR-214 mimics in NLE liposomes. They found highest level in blood (approx. 4 mil. copies/10 ng RNA), while in perfused lung, there were approx. 34,000 copies/10 ng RNA, and in the liver approx. 4,000/10 ng RNA. They also assessed distribution of NLE liposomes with oligonucleotide cargo into orthotopic lung tumors by *in vivo* bioimaging 48 h after administration and successfully used miR-34 and let-7b mimics in NLE formulation in orthotopic animal model of lung carcinoma (Trang *et al.* 2011). Together with our findings, it could be concluded, that lung accumulation probably prevails over time in NLE liposomes, which makes them suitable for distribution of drugs or experimental substances into the lung tissue.

Our study is limited primarily with variability of some of the measurements originating probably from small number (4-5) of mice in the treatment groups, which influences statistical significance of some of the

results. Another limitation lies in the use of subcutaneous model. As this setting is relatively easy to produce, monitor and maintain, and it is generally the most frequently used approach, it has quite limited translational potential. Our results cannot be applied for an estimation of intestinal or colonic distribution of liposomal dosage form. Orthotopic model of CRC, created by implantation of human cancer cells into the intestinal wall of *caecum* in mice under general anesthesia would produce more complex picture.

Conclusions

The application of NLE liposomes in animal model of CRC likely requires substantial optimization mainly in terms of the model type, route of administration and dosology. It could not also be excluded that it

represents an impasse. Nevertheless, miR-215 remains an auspicious therapeutic target in CRC for its tumor suppressor effects, even though there are still some obstacles to deal with in order to bring this miRNA closer to clinical practice.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors thank Jan Verner for his advice and everyday care for the animals, and Jaroslav Nádeníček and Kamila Součková for technical assistance in the Animal Facility. This work was supported by Faculty of Medicine internal projects MUNI/11/InGA09/2014, MUNI/A/1116/2014 and MUNI/A/1284/2015, and by the project GA16-18257S of The Grant Agency of Czech Republic.

References

- ADAMS BD, PARSONS C, SLACK FJ: The tumor-suppressive and potential therapeutic functions of miR-34a in epithelial carcinomas. *Expert Opin Ther Targets* **20**: 737-753.
- ADELSTEIN BA, DOBBINS TA, HARRIS CA, MARSCHNER IC, WARD RL: A systematic review and meta-analysis of KRAS status as the determinant of response to anti-EGFR antibodies and the impact of partner chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer* **47**: 1343-1354, 2011.
- AMODIO N, LEOTTA M, BELLIZZI D, DI MARTINO M, D'AQUILA P, LIONETTI M, FABIANI F, LEONE E, GULLÀ A, PASSARINO G, CARAGLIA M, NEGRINI M, NERI A, GIORDANO A, TAGLIAFERRI P, TASSONE P: DNA-demethylating and anti-tumor activity of synthetic miR-29b mimics in multiple myeloma. *Oncotarget* **3**: 1246-1258, 2012.
- BRAUN CJ, ZHANG X, SAVELYEVA I, WOLFF S, MOLL UM, SCHEPELER T, ØRNTTOFT TF, ANDERSEN CL, DOBBELSTEIN M: p53-responsive microRNAs 192 and 215 are capable of inducing cell cycle arrest. *Cancer Res* **24**: 10094-10104, 2008.
- DE VITO C, RIGGI N, SUVÀ ML, JANISZEWSKA M, HORLBECK J, BAUMER K, PROVERO P, STAMENKOVIC I: Let-7a is a direct EWS-FLI-1 target implicated in ewing's sarcoma development. *PLoS ONE* **6**: e23592, 2011.
- DI MARTINO MT, GULLÀ A, CANTAFIO ME, LIONETTI M, LEONE E, AMODIO N, GUZZI PH, FORESTA U, CONFORTI F, CANNATARO M, NERI A, GIORDANO A, TAGLIAFERRI P, TASSONE P: In vitro and in vivo anti-tumor activity of miR-221/222 inhibitors in multiple myeloma. *Oncotarget* **4**: 242-255, 2013.
- DUŠEK L, MUŽÍK J, KUBÁSEK M, KOPTÍKOVÁ J, ŽALOUĐÍK J, VYZULA R: Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita [cit. 2016-7-22]. Dostupný z WWW: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0, 2007, ISSN 1802-8861.
- ESQUELA-KERSCHER A, SLACK FJ: Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* **6**: 259-269, 2006.
- FALTEJSKOVÁ P, SVOBODA M, ŠRUTOVÁ K, MLČOCHOVÁ J, BEŠŠE A, NEKVINDOVÁ J, RADOVÁ L, FABIAN P, SLABÁ K, KISS I, VYZULA R, SLABÝ O: Identification and functional screening of microRNAs highly deregulated in colorectal cancer. *J Cell Mol Med* **16**: 2655-2666, 2012.
- FERLAY J, SOERJOMATARAM I, ERVIK M, DIKSHIT R, ESER S, MATHERS C, REBELO M, PARKIN DM, FORMAN D, BRAY F: GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 11 [online]. International Agency for Research on Cancer [cit. 2016-7-22]. Dostupný z WWW: <http://globocan.iarc.fr>. 2013.

- FÍNEK J, HOCH J, KALA Z, KISS I, KOCÁKOVÁ I, KOLÁŘOVÁ I, OBERMANNOVÁ R, PETRUŽELKA L, PRAUSOVÁ J, RYSKA M, SOUMAROVÁ R, TOMÁŠEK J, VÁLEK V, VYZULA R, ZAVORAL M: Zhoubný novotvar kolorekta (C18-20). In: *Modrá kniha České Onkologické Společnosti*. VYZULA R. (ed.), Masarykův Onkologický Ústav, Brno, 2016, pp 27-38.
- HATANO K, KUMAR B, ZHANG Y, COULTER JB, HEDAYATI M, MEARS B, NI X, KUDROLLI TA, CHOWDHURY WH, RODRIGUEZ R, DEWEESE TL, LUPOLD SE: A functional screen identifies miRNAs that inhibit DNA repair and sensitize prostate cancer cells to ionizing radiation. *Nucl Acids Res* **43**: 4075-4086, 2015.
- IMAM JS, PLYLER JR, BANSAL H, PRAJAPATI S, BANSAL S, REBELES J, CHEN HH, CHANG YF, PANNEERDOSS S, ZOGHI B, BUDDAVARAPU KC, BROADDUS R, HORNSBY P, TOMLINSON G, DOME J, VADLAMUDI RK, PERTSEMLIDIS A, CHEN Y, RAO MK: Genomic loss of tumor suppressor miRNA-204 promotes cancer cell migration and invasion by activating AKT/mTOR/Rac1 signaling and actin reorganization. *PLoS ONE* **7**: e52397, 2012.
- JONES MF, HARA T, FRANCIS P, LI XL, BILKE S, ZHU Y, PINEDA M, SUBRAMANIAN M, BODMER WF, LAL A: The CDX1-microRNA-215 axis regulates colorectal cancer stem cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: E1550-E1558, 2015.
- KAO SC, FULHAM M, WONG K, COOPER W, BRAHMBHATT H, MACDIARMID J, PATTISON S, SAGONG JO, HUYNH Y, LESLIE F, PAVLAKIS N, CLARKE S, BOYER M, REID G, VAN ZANDWIJK N: A significant metabolic and radiological response after a novel targeted microRNA-based treatment approach in malignant pleural mesothelioma. *Am J Respir Crit Care Med* **191**: 1467-1469, 2015.
- KARAAVAZ M, PAL T, SONG B, ZHANG C, GEORGAKOPOULOS P, MEHMOOD S, BURKE S, SHROYER K, JU J: Prognostic significance of miR-215 in colon cancer. *Clin Colorectal Cancer* **10**: 340-347, 2011.
- KROL J, LOEDIGE I, FILIPOWICZ W: The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* **11**: 597-610, 2010.
- LIN AY, BUCKLEY NS, LU AT, KOUZMINOVA NB, SALPETER SR: Effect of KRAS mutational status in advanced colorectal cancer on the outcomes of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy: a systematic review and meta-analysis. *Clin Colorectal Cancer* **10**: 63-69, 2011.
- MATSUMURA Y, MAEDA H: A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* **46**: 6387-6392, 1986.
- MORTON CL, HOUGHTON PJ: Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Nature Protoc* **2**: 247-250, 2007.
- NECELA BM, CARR JM, ASMANN YW, THOMPSON EA: Differential expression of microRNAs in tumors from chronically inflamed or genetic (APC(Min/+)) models of colon cancer. *PLoS ONE* **6**: e18501, 2011.
- QUINN L, FINN SP, CUFFE S, GRAY SG: Non-coding RNA repertoires in malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer* **90**: 417-426, 2015.
- RUAN K, FANG X, OUYANG G: MicroRNAs: novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer Lett* **285**: 116-126, 2009.
- TRANG P, WIGGINS JF, DAIGE CL, CHO C, OMOTOLA M, BROWN D, WEIDHAAS JB, BADER AG, SLACK FJ: Systemic delivery of tumor suppressor microRNA mimics using a neutral lipid emulsion inhibits lung tumors in mice. *Mol Ther* **19**: 1116-1122, 2011.
- VAN CUTSEM E, CERVANTES A, ADAM R, SOBRERO A, VAN KRIEKEN JH, ADERKA D, ARANDA AGUILAR E, BARDELLI A, BENSON A, BODOKY G, ET AL.: ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* **27**: 1386-1422, 2016.
- WU J, LIZARZABURU ME, KURTH MJ, LIU L, WEGE H, ZERN MA, NANTZ MH: Cationic lipid polymerization as a novel approach for constructing new DNA delivery agents. *Bioconj Chem* **12**: 251-257, 2001.
- ZHANG XX, MCINTOSH TJ, GRINSTAFF MW: Functional lipids and lipoplexes for improved gene delivery. *Biochimie* **94**: 42-58, 2012.



MicroRNA-Based Therapy in Animal Models of Selected Gastrointestinal Cancers

Jana Merhautova^{1,2}, Regina Demlova² and Ondrej Slaby^{1,3*}

¹ Molecular Oncology II – Solid Cancer, Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic, ² Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic, ³ Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic

OPEN ACCESS

Edited by:

Gautam Sethi,
National University of Singapore,
Singapore

Reviewed by:

Dhiraj Kumar,
National Centre for Cell Science, India
Subash Gupta,
Banaras Hindu University, India

*Correspondence:

Ondrej Slaby
ondrej.slaby@ceitec.muni.cz

Specialty section:

This article was submitted to
Cancer Molecular Targets and
Therapeutics,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 28 June 2016

Accepted: 06 September 2016

Published: 27 September 2016

Citation:

Merhautova J, Demlova R and
Slaby O (2016) MicroRNA-Based
Therapy in Animal Models of Selected
Gastrointestinal Cancers.
Front. Pharmacol. 7:329.
doi: 10.3389/fphar.2016.00329

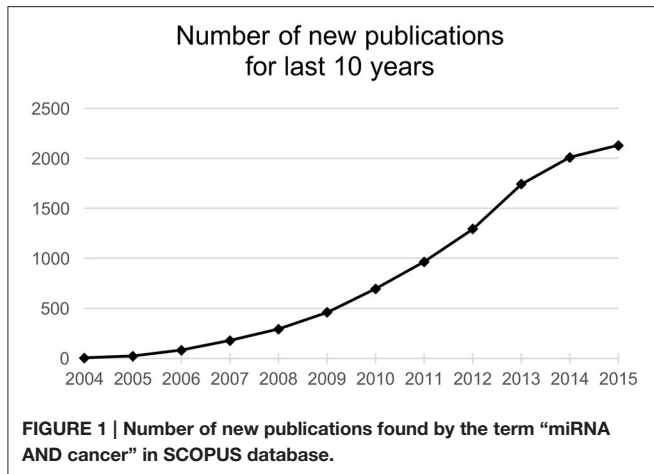
Gastrointestinal cancer accounts for the 20 most frequent cancer diseases worldwide and there is a constant urge to bring new therapeutics with new mechanism of action into the clinical practice. Quantity of *in vitro* and *in vivo* evidences indicate, that exogenous change in pathologically imbalanced microRNAs (miRNAs) is capable of transforming the cancer cell phenotype. This review analyzed preclinical miRNA-based therapy attempts in animal models of gastric, pancreatic, gallbladder, and colorectal cancer. From more than 400 original articles, 26 was found to assess the effect of miRNA mimics, precursors, expression vectors, or inhibitors administered locally or systemically being an approach with relatively high translational potential. We have focused on mapping available information on animal model used (animal strain, cell line, xenograft method), pharmacological aspects (oligonucleotide chemistry, delivery system, posology, route of administration) and toxicology assessments. We also summarize findings in the field pharmacokinetics and toxicity of miRNA-based therapy.

Keywords: microRNA, gastric cancer, pancreatic cancer, gallbladder cancer, colorectal cancer, animal model, mice, preclinical testing

INTRODUCTION

Research in the field of non-coding nucleic acids has advanced extensively in the last 15 years. It is now well known, that dysregulation of miRNAs, powerful regulators of gene expression, is associated with many diseases. MiRNAs are investigated thoroughly in cancer biology and oncology and the number of published articles is growing (**Figure 1**). Last 10 years brought us an immense amount of information about the roles of miRNAs in cancer cell pathophysiology. All described hallmarks of cancer (Hanahan and Weinberg, 2011) are in relation with some miRNA imbalance (Ruan et al., 2009). Attempts to therapeutically interfere with miRNAs levels in pathologic cells are moving forward to preclinical and clinical phases of new therapies development. Although there are severe limitations and barriers facing miRNA-based therapy, more and more studies are performed with auspicious results.

The purpose of this review is to analyze preclinical studies carried out on animal models of selected gastrointestinal cancer (gastric, pancreatic, gallbladder, and colorectal). We have focused primarily on pharmacological aspects of miRNA-based therapy with the emphasis on delivery systems, and also on the type of animal model, and on toxicity assessments. Eventually, we summarize important findings in the field pharmacokinetics and toxicity of miRNA-based therapy to make the picture comprehensive.



The Biogenesis of Endogenous miRNAs

MiRNAs are endogenous small (~22 nt) single-stranded non-coding RNAs. Their main role in the cell lies in post-transcriptional attenuation of mRNA translation. The biosynthesis of miRNAs begins in the nucleus. Long double-stranded transcripts (pri-miRNAs) are formed by RNA-polymerases II and III. Pri-miRNAs are cleaved by the ribonuclease Drosha and DGCR8 protein to form pre-miRNAs, double-stranded chains ~70 nt long. Pre-miRNAs are then transported from the nucleus to the cytoplasm via Exportin-5 protein. In the cytoplasm, mature miRNAs are created through the interaction with endonuclease Dicer and TRBP protein. Double-stranded formation is rearranged, the guide strand forms a complex with Argonaut and other proteins forming miRISC complex, and plays an active role in the gene expression attenuation. The other strand, called passenger strand, is usually degraded in the cytoplasm, or persists and may exert its own biological activity. For detailed information on miRNA biogenesis see a recent review by Romero-Cordoba et al. (2014).

There are also number of proofs of mature miRNAs' presence and activities in the nucleus (Hwang et al., 2007; Park et al., 2010; Jeffries et al., 2011; Li et al., 2013). It seems that these miRNAs could transfer from cytoplasm to nucleus and nucleolus via Exportin-1 and Importin-8 (Li et al., 2013; Wei et al., 2014) and influence expression of other miRNAs, or of its own (Tang et al., 2012; Zisoulis et al., 2012; Wei et al., 2014).

Mechanism of Action

MiRNAs bind mainly to the 3'-untranslated region of mRNA (3'-UTR), although there are several evidences that miRNAs could bind to the 5'-UTR, or to the coding sequence itself (Ott et al., 2011; Gu et al., 2014). In the case of imperfect matching, the duplex mRNA:miRNA is not translated, or it is translated incompletely and the polypeptide chain is subsequently degraded. Binding of miRNA to mRNA target also activates deadenylation of 3'-poly(A) end of mRNA through deadenylases, which is a first step of mRNA destabilization and later degradation by 3'- and 5'-exonucleases (Figure 2). Perfect matching leads to direct cleavage of the target mRNA. Imperfect

matching is more common in animal cells, while perfect matching is typical for plant cells (Axtell et al., 2011). The binding specificity is ensured by the seed sequence of miRNA, which contains 6–8 nt and which is very often conservative through the species (Hogg and Harries, 2014). One miRNA can regulate many different genes, and more than 50% of all genes are suggested to be regulated by miRNAs. Thus, miRNA network affect most of cellular processes from the basic metabolic maintenance, through differentiation, cell division and proliferation, to the death (Calin and Croce, 2006; Esquela-Kerscher and Slack, 2006; Garzon et al., 2006; Zhang et al., 2013).

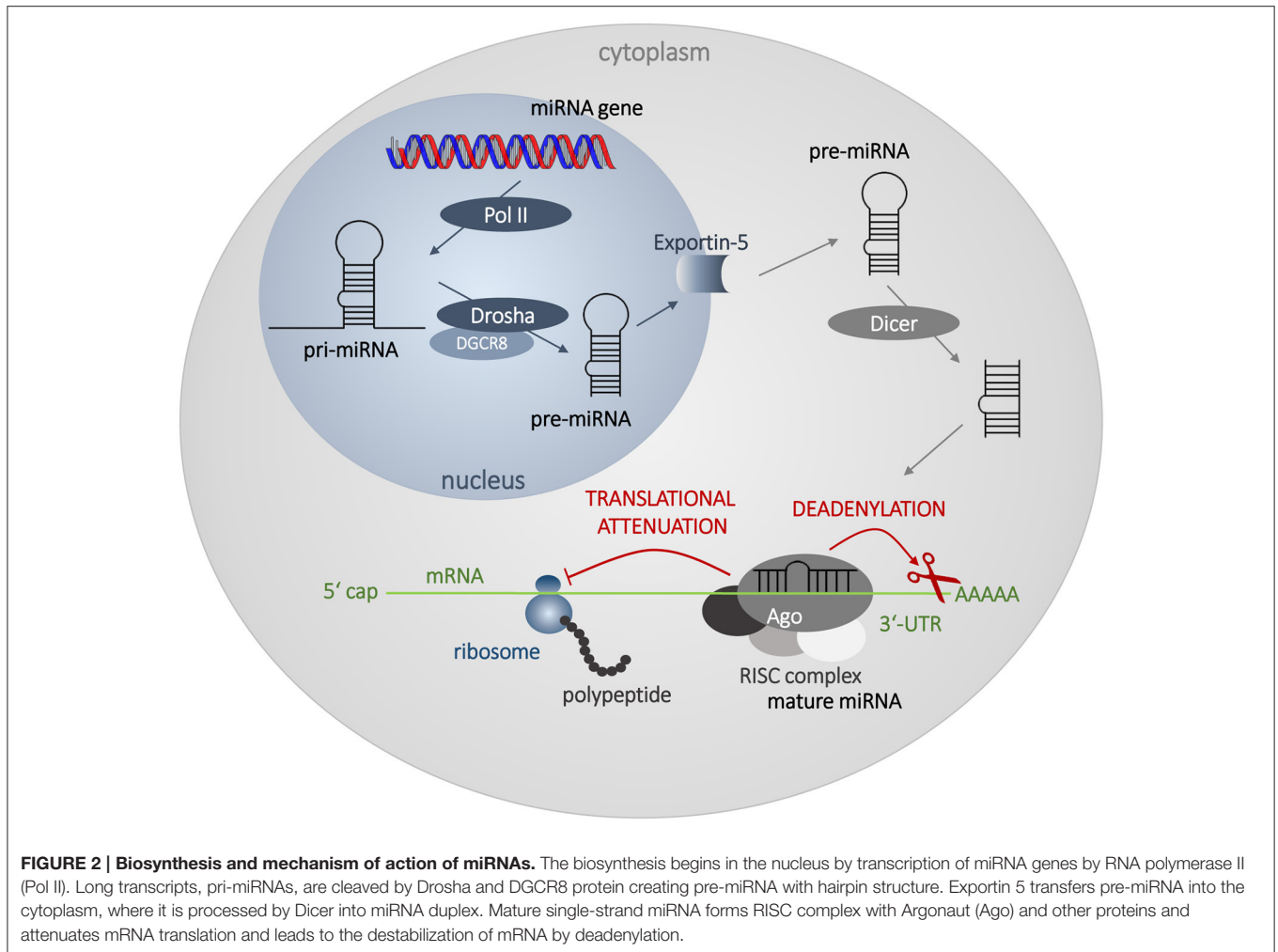
In cancer tissues, a lot of changes in miRNA levels could be found. MiRNAs decreased in cancer cells are termed tumor suppressors and reversely, oncogenic miRNAs are those abundant in cancer tissue. There have already been signs of miRNAs that function both as tumor suppressors, and oncogenes depending on the cell type and state (context-dependent miRNAs) (Esquela-Kerscher and Slack, 2006; Kasinski and Slack, 2011).

To reverse the pathologic imbalance of miRNAs mature miRNAs, miRNA-mimics, precursors, or expression vectors are administered to increase the level of a specific tumor-suppressor miRNA, and miRNA inhibitors are administered to decrease the level of oncogenic miRNA (Figure 3). Promising results of *in vitro* studies are nowadays being verified on animal models and first preclinical, or even clinical trials are under way.

SEARCH STRATEGY

Web of Science database was searched for *in vivo* studies published in the last 5 years (2010–2015) that were focused on colorectal, pancreatic, gallbladder and gastric cancer. Searching formulas *miRNA AND vivo AND colorectal/pancreatic/gallbladder/gastric* in article topic (title, abstract and keywords) was used. The search was finished by the end of February 2016. About 430 articles were found and further analyzed to select the specific experimental design: at first, induction of a tumor by transplantation of human or murine tumor cells, or tumor tissue, then followed by the administration of miRNA mimic, precursor, expression vector, or inhibitor. The bulk of the studies found by the searching formula were excluded because of using different methods, e.g., influencing the expression level of miRNA in cancer cells before transplantation into the animal body, or administration of other substances that affect miRNA levels and processes like natural compounds, siRNAs etc. 26 studies included in this review matched the aforementioned criteria.

Both the articles themselves and the supplemental materials were scrutinized with accent on animal model used (animal strain and gender, xenograft method, cancer cell line, or source), pharmacological aspects (oligonucleotide chemistry, delivery system, posology, route of administration), toxicology assessments (methods and findings), and eventually the experimental therapy effect. Some of the information could not be obtained from articles or supplements, as they lacked e.g., animal gender specification.

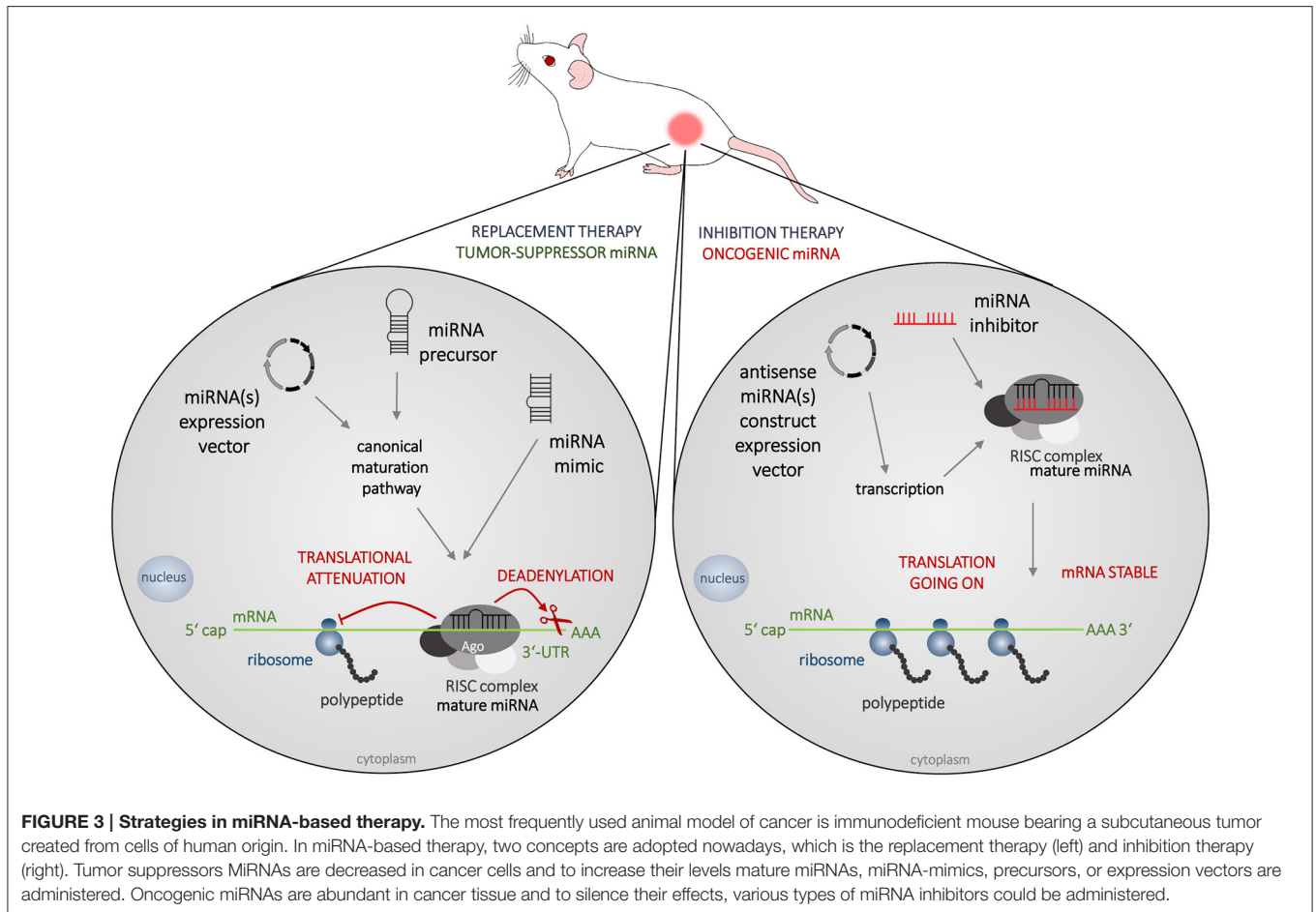


OVERVIEW OF THE SELECTED STUDIES

All selected studies assorted by the organ of cancer cells' origin are summarized in **Tables 2–5**. Visual summary of therapeutic strategy, type of animal model and routes of administration of miRNA-based therapy is demonstrated in **Figures 4–6**. We have analyzed 26 studies, 20 of them used the miRNA replacement therapy regimen, and others were miRNA inhibitions. Two studies combined miRNA replacement therapy with chemotherapy, two studies combined miRNA inhibition with either chemotherapy, or immunotherapy. Subcutaneous xenograft model was used in 23 cases, orthotopic xenotransplantation was performed in two experiments, and combination of both was done in one study. In 17 studies, miRNA-based therapeutics were administered locally, i.e., injected intratumorally. Five studies involved systemic administration by tail-vein, or intraperitoneal injection, while four studies combined both routes of administration in a separate substudies, or combined systemic administration of e.g., chemotherapy, with local administration of miRNA-based therapy.

MiRNAs studied in the selected articles were both known tumor suppressors, or oncogenes, and also context-dependent miRNAs whose effect varies according to the type of cancer cell. All of them influence the main hallmarks of cancer such as uncontrolled tumor cell proliferation, impaired process of apoptosis, defects in the control of cell cycle, increased migration and invasivity, or tumor angiogenesis (**Table 1**). Some miRNAs were tested in combination with cytostatic agents (doxorubicin, gemcitabine, or oxaliplatin) to achieve sensitization of chemotherapy-resistant cells and tumors, e.g., by decreasing the expression of efflux proteins such as ABCB1 (P-glycoprotein). The main result of all *in vivo* studies was inhibition of tumor xenograft growth, at least in a transient manner. All results and references could be found in **Tables 2–5**.

Toxicity assessment was part of 11 studies. It was performed at least as animal body weight control but usually was followed by animal behavior observation, histopathology examination of tissue dissections of various organs (brain, heart, liver, lungs, spleen, kidney), or blood biochemistry with regard to liver and kidney functions (blood urea nitrogen, liver enzymes, bilirubin). There were two declared deaths of experimental



animals in the selected studies. These mice were administered cholesterol-conjugated oligonucleotide, but both were from the negative control group. The cause of death was not determined (Ye et al., 2013). One study declared slight but statistically significant elevation of blood urea nitrogen in the group of mice treated systemically with mature miRNA conjugated with carbonate apatite nanoparticles (Hiraki et al., 2015). Transient hepatotoxicity was found in mice systemically treated with adenoviral vector Ad-L5-8miR148aT, but the symptoms were milder than those produced by administration of Ad-wt (Bofill-De Ros et al., 2015). No immune response to the RNA-based treatment was reported in the selected studies, as they used immune deficient strains. Depending on the specific genotype, nude or severe immunodeficient (SCID) mice lack normal cytokine production together with other immune impairments.

The selected studies utilized various types of administered miRNA-based substances and different delivery systems. These issues and their fine tuning are the main points in the successful development of a miRNA-based therapy. Ability to overcome natural barriers that face transferring an oligonucleotide into the cell has to be balanced with the extent of toxicity, as systems with good cell penetration are usually more cytotoxic in a non-specific manner. To bring a complex sight on

the development of miRNA-based therapy in gastrointestinal cancer, we gathered relevant information about the type of substances, delivery systems and routes of administration used in the selected 26 studies and we discuss them in detail. The issue of toxicity is described for each delivery system and later on also for the concept of miRNA-based therapy itself.

IMPORTANT ISSUES IN THE FIELD OF miRNA-BASED THERAPY PRECLINICAL TESTING

Routes of Administration and Delivery Systems

MiRNA-based therapeutics in animal studies summarized in this review were administered either systemically, or locally. In systemic delivery, the intravenous (tail-vein) and intraperitoneal injections were used (Figure 6). Local administration was performed as intratumoral injection into the subcutaneous tumors. Delivery systems employed in the presented studies include viral vectors, biocompatible cationic polymers and copolymers, inorganic nanoparticles, atelocollagen, and liposomes.

TABLE 1 | Examples of studied miRNAs in association with some of the hallmarks of cancer and other cancer cells attributes (I, inhibition strategy; R, replacement strategy).

Cancer cell attribute	Studied miRNA	Replacement or inhibition strategy	References
Uncontrolled cell proliferation	miR-21	I	Sicard et al., 2013
	miR-27a	R	Bao et al., 2014
	miR-33a	R	Ibrahim et al., 2011
	miR-145	R	Ibrahim et al., 2011
	miR-218	R	He et al., 2012
	miR-429	R	Sun Y. et al., 2014
Impaired apoptosis	let-7	I	Geng et al., 2011
	miR-20a	I	Chang et al., 2013; Wang et al., 2013
	miR-21	I	Frampton et al., 2011; Sicard et al., 2013
	miR-27a	R	Bao et al., 2014
	miR-145	R	Ibrahim et al., 2011
	miR-4689	R	Hiraki et al., 2015
Dysfunction in cell cycle control	miR-133a	R	Dong et al., 2013
	miR-200a	R	Cong et al., 2013
	miR-218	R	He et al., 2012
	miR-1266	R	Chen et al., 2014
Cell migration and invasivity	miR-27a	R/I	Frampton et al., 2011; Bao et al., 2014
	miR-200a	R	Cong et al., 2013
	miR-429	R	Sun Y. et al., 2014
	miR-1207-5p	R	Chen et al., 2014
Neoangiogenesis	miR-27a	I	Frampton et al., 2011
	miR-27b	R	Ye et al., 2013
Resistance to cytostatic agents	miR-103	R	Zhang et al., 2015
	miR-107	R	Zhang et al., 2015

Viral Vectors

Viral vectors could be administered both locally, and systemically and they include lentiviruses, adenoviruses, and adeno-associated viruses (Chen et al., 2015). Viral delivery of antisense construct expression vectors was used to inhibit miR-21 and miR-148a in animal models of pancreatic cancer (Bao et al., 2014; Bofill-De Ros et al., 2015), while expression vector for miR-1266/1207-5p was examined in replacement therapy in gastric carcinoma (Chen et al., 2014). Viruses are able to effectively deliver miRNA therapeutics (precursors, mimics, genes, or inhibitors) into the tumor cell, but their use could be associated with the risk of insertional mutagenesis, gain of replication competency of viral particles, or immune activation. Nucleic acid of adenoviruses (dsDNA viruses) and adeno-associated viruses (ssDNA viruses) usually do not integrate into the host cell genome, while lentiviral (ssRNA viruses) integrates (Soriano et al., 2013; Chen et al., 2015). Adeno-associated viruses are generally less immunogenic, but

adenovirus-based delivery system could produce at least transient hepatotoxicity (Broderick and Zamore, 2011; Aslam et al., 2012) as was also observed by Bofill-De Ros et al. in animal model of pancreatic ductal adenocarcinoma (Bofill-De Ros et al., 2015).

Cationic Polymer Polyethylenimine

In the selected studies, the most frequently used synthetic polymer was polyethylenimine (PEI). It was utilized to deliver mimics or expression vectors of miR-34a, miR-206, and miR-217 in animal model of pancreatic cancer, or miR-33a and miR-145 in the model of colorectal carcinoma (Tables 4, 5). PEI is cationic polymer able to produce nanoparticles. It has linear or branched structure and different molecular weight according to the reaction conditions during the synthesis. Due to the positive charge, PEI has high capacity for negatively charged oligonucleotides and nucleic acids which are moreover condensed after complexation with PEI, and thus protected from nucleases. The charge of PEI also facilitate cellular uptake by electrostatic interaction with negatively charged surface molecules (e.g., heparin sulfate proteoglycans), after which the particles enter the cell by endocytosis. PEI is able to disrupt the endosome and release the cargo into the cytoplasm, which grants this method high transfection efficacy. The disruption of endosome is achieved by protonization of PEI and buffering of acidic environment of the vesicle. These processes are followed by osmolarity changes and water intake which leads to the swelling and burst of the endosome (Höbel and Aigner, 2013; Zhang et al., 2013). Better capacity and efficacy is achieved by branched PEI but at the cost of higher non-specific cytotoxicity. In the presented studies, mostly linear PEI is used, like commercially available transfection reagents ExGen500™ (Euromedex, Mundolsheim, France) and *in vivo*-jetPEI™ (Polyplus Transfection, Illkirch, France) assigned for *in vivo* experiments. Other issues associated with PEI delivery are an aggregation of created nanoparticles, or opsonization in the plasma recognized by phagocytes. PEI with high density of positive charge could also trigger erythrocyte aggregation and thrombosis (Kanasty et al., 2012). PEI particles could be conjugated with various molecules [e.g., polyethylene glycol (PEG), or antibodies] to resolve such difficulties (Malek et al., 2009). PEI is not a biodegradable polymer, thus its toxicity is intensively discussed. It depends strongly on molecular weight and branching (Fischer et al., 1999) and also on the cargo, as it may neutralize the charge of PEI. There are studies describing immune activation *in vivo*, (Beyerle et al., 2011) hepatotoxicity and lethality in mice (Chollet et al., 2002) and increased apoptosis *in vitro* (Merkel et al., 2011), and also those that proved no immune response, or hepatotoxicity in mice (Bonnet et al., 2008).

Inorganic Nanoparticles—Iron Oxide, and Carbonate Apatite

Sun et al. used iron oxide nanoparticles to deliver miR-16 and overcome doxorubicin resistance in animal model of gastric adenocarcinoma (Sun Z. et al., 2014). Iron oxide nanoparticles (IONPs) are biocompatible and biodegradable particles with magnetic properties. They are composed of magnetite [Fe₃O₄, iron (II,III) oxide], or maghemite (Fe₂O₃,

ferric oxide) and are usually coated with various other molecules (PEI, PEG, chitosan etc.) to improve their properties (Kievit and Zhang, 2011). IONPs could also serve as theranostics (i.e., substances with both diagnostic and therapeutic purpose). As well as other nanoparticles, IONPs protect nucleic acids from being cleaved by nucleases (Kievit et al., 2009) but could also be opsonized in the plasma and recognized by phagocytes, mainly by the reticuloendothelial system (RES). Non-coated IONPs are distributed in heart, liver, spleen, lungs, kidney, brain, stomach, small intestine, and bone marrow, while the highest concentration are reached in the liver and spleen due to the elimination by RES and macrophages (Wang et al., 2010). IONPs enter the cell by endocytosis and are degraded in the endosomes (Xie et al., 2009). Particles between 10 and 60 nm are the most effective, as they undergo limited kidney and liver/RES uptake, and are absorbed by tumor cells (Kievit and Zhang, 2011). Cytotoxicity of IONPs coated with PEI occurs *in vitro* in higher concentration than is needed for sufficient transfection (Lellouche et al., 2015). The administration *in vivo* could increase blood iron and intracellularly increase oxidative stress (Mahmoudi et al., 2011). Non-coated particles could produce hepatotoxicity, and lung or kidney damage (Hanini et al., 2011).

Study of Hiraki et al. describes utilization of different inorganic nanomaterial, carbonate apatite nanoparticles. They used these particles as a delivery system for mature miR-4689 in animal model of colorectal adenocarcinoma (Hiraki et al., 2015). Carbonate apatite $[Ca_{10}(PO_4)_6-x(CO_3)_x(OH)_2]$ is composed of calcium cations and phosphate and carbonate anions in defined ratios. It was firstly described as a transfection reagent and a delivery system for plasmid DNA by Chowdhury et al. (2006). Nanoparticles of carbonate apatite are stable in plasma (pH = 7.4), protect nucleic acids from nuclease cleavage, but in acidic environment of endosomes, they are quickly degraded. Their cargo is then released and could probably escape from endosomes, as high effectivity of this transfection method was proved for DNA (Wu et al., 2015) and RNA (Hossain et al., 2010). In mice, these nanoparticles are accumulated in tumor probably due to the EPR effect (discussed below), but slight accumulation was found also in the liver (Wu et al., 2015). As this method arose from calcium phosphate co-precipitation, which is known to produce certain level of cytotoxicity *in vitro*, adverse effects in animals were inquired. In mice, Wu et al. declared no mortality, weight loss, or histological damage in liver, kidney, and spleen after administration of common dose, and also after 2.5 and 5-fold higher doses. They also do not observed any urinary calculi in a mouse model of repeated administration. The team advanced to the evaluation of the delivery system on monkeys (macaques *Macaca fascicularis*, formerly *M. cynomolgus*). Monkeys received repeated i.v. infusions during a movement restraint. Equivocal results were obtained, as some animals had reversible increase in AST, ALT, LDH, and CPK enzymes, but from further analyses of isoenzymes, authors suggested that these increments might arise from the stress associated with body restriction rather from heart or liver damage (Wu et al., 2015).

Atelocollagen

For direct intratumoral treatment, atelocollagen was used in the study of Frampton et al. in pancreatic ductal adenocarcinoma to deliver miR-21, miR-23a, and miR-27a (Frampton et al., 2011). Atelocollagen is a biocompatible and biodegradable polymer. It was developed and tested *in vivo* for gene (plasmid) delivery with controlled release by Ochiya et al. (Ochiya et al., 1999; Hao et al., 2016). Atelocollagen is prepared from collagen extracted from bovine dermis. Natural collagen contains specific amino acid sequences on both C- and N-terminus (“telopeptides”), which are highly immunogenic. By digestion with pepsin, these telopeptides are cleaved. The polymer is liquid at low temperatures, but solidifies at temperatures above 30°C (Ochiya et al., 2001; Komatsu et al., 2016). After intramuscular injection of plasmid DNA in complex with glucose and atelocollagen in mice, the transfection was efficient and last more than 60 days. No apparent toxicity, or hematologic changes were observed in this study, (Ochiya et al., 1999) as well as Frampton et al. described neither changes in mice body weight, nor serious adverse effects (Frampton et al., 2011).

Cationic Lipids and Liposomes

For intratumoral administration, several studies used lipid-based transfection reagent Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) designed originally for *in vitro* experiments, e.g., Dong et al. in animal model of colorectal adenocarcinoma to deliver miR-133a (Dong et al., 2013). Pramanik et al. utilized DOTAP (*N*-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammonium methyl-sulfate) with co-lipids formula to deliver plasmid expression vector of miR-34a, and miR-143/145 cluster systemically in animal model of pancreatic ductal adenocarcinoma (Pramanik et al., 2011). Both delivery systems are composed of cationic lipids that form liposomes, vesicles with lipophilic bilayer and aqueous core able to encapsulate hydrophilic molecules (Mallick and Choi, 2014). By electrostatic interaction, cationic lipids have increased capacity for negatively charged nucleic acids (Xue et al., 2015). They enter the cells by endocytosis and are able to destabilize and breach endosomal membrane by interaction with its phospholipids (Zelphati and Szoka, 1996). Cationic lipids exert detergent effect on lipid membranes and interact also with enzymes, thus could irritate cells, decrease proliferation, alter gene expression, and even trigger cell lysis (Wu et al., 2001). They share the same advantages and disadvantages that account for positive charge as cationic polymers. They form aggregates with plasma proteins leading to RES elimination and accumulation in spleen and liver (Nchinda et al., 2002; Zhang et al., 2012). With decrease of positive charge, RNA encapsulation and transfection efficacy is decreasing. PEGylation increases blood circulation time of liposomes, (Pathak et al., 2011; Suk et al., 2016) but could lead to the formation of anti-PEG IgM antibodies (Ishida et al., 2006). Liposomes are generally less immunogenic than cationic polymers. But after processing of liposomes, some RNA molecules might remain on the surface of a particle. In the studies using siRNA, these residues lead to the significant immune activation (Xue et al., 2015). Inflammatory response in the liver followed by hepatotoxicity and with higher doses

TABLE 2 | *In vivo* studies in animal models of gastric adenocarcinoma.

Xenografted cell line	MiRNA(s) of interest	Therapeutic strategy	Animal model	Animal strain (gender)	Delivery system and chemical modifications	Route of administration	Dosage	Frequency of administration	Results	Toxicity, undesired effects	References
SGC-7901	miR-17-5p/20a	IT	SX	BALB/c mice	AntagomiR-17-5p and antagomiR-20a (RiboBio)	Intratumoral inj.	25 µmol	Twice weekly for 2 weeks	Inhibition of tumor growth, increase in the percentage of apoptotic cells in tumor tissue	Not assessed	Wang et al., 2013
SGC-7901	miR-200a	RT	SX	BALB/c-A mice	miRNA-mimics (GenePharma) with Lipofectamine 2000 (Invitrogen)	Intratumoral inj.	10 µl	Twice after 2 days	Inhibition of tumor growth	Not assessed	Cong et al., 2013
SGC-7901	miR-1266/1207-5p	RT	SX	Nude mice (females)	Lentiviral vector (Lv-miR-166/1207-5p, GeneChem Management)	Intratumoral inj.	0.1 ml 10 ⁷ PFU/ml	Single dose	Inhibition of Tumor growth and tumor cells proliferation	Not assessed	Chen et al., 2014
Doxorubicin resistant SGC-7901/ADR ^{fluc}	miR-16	RT + chemotherapy	SX	BALB/c mice (females)	miRNA oligonucleotides (GenePharma) bound on PEG-coated Fe ₃ O ₄ nanoparticles	Tail-vein inj.	5 mg/kg (1 nmol)	Seven times (days 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21 post inocul)	Tumor size reduction, increase of number of apoptotic nuclei, increased sensitivity to doxorubicin	No noticeable damage in histology analysis of heart, liver, spleen and kidney	Sun Z. et al., 2014
Doxorubicin resistant SGC-7901/ADR	miR-103/107	RT + chemotherapy	SX	BALB/c mice	Doxorubicin	Intraperitoneal inj.	2.5 mg/kg	Once a week for 4 weeks (days 0, 7, 14, 21)	Delayed tumor growth, reduction in tumor volume, lower proliferative potential, increased sensitivity to doxorubicin	No obvious signs of toxicity such as weight loss over the course of the treatment	Zhang et al., 2015

Ad-wt, wild type adenovirus; ALT, alanine transaminase; AST, aspartate aminotransferase; BUN, blood urea nitrogen; DOTAP, N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methyl-sulfate; DSPE-PEG, 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000]; GEM, gemcitabine; incl., including; inj., injection; IT, inhibition therapy; mAb, monoclonal antibody; NOD/SCID, non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency; OD, optical density; OX, orthotopic xenograft; PEG, polyethylene glycol; PEI, polyethylenimine; PFLU, plaque-forming units; post inocul., post inoculation; RT, replacement therapy; SCID, severe combined immunodeficiency; SX, subcutaneous xenograft; TNF-α, tumor necrosis factor α; VP, viral particles.

TABLE 3 | *In vivo* study in animal models of gallbladder carcinoma.

Xenografted cell line	MiRNA(s) of interest	Therapeutic strategy	Animal model	Animal strain (gender)	Delivery system and chemical modifications	Route of administration	Dosage	Frequency of administration	Results	Toxicity, undesired effects	References
GBC-SD initially transfected with miR-20a antagomir (200 nM) for 3 days	miR-20a	IT	SX	Nude mice	Antagomir-20a	Intratumoral inj.	5 nmol	Twice weekly for 2 weeks	Inhibition of tumor growth	Not assessed	Chang et al., 2013

even lethality was described (Tan and Huang, 2002; Zhang et al., 2005).

Pharmacokinetics of Therapeutic Oligonucleotides Chemistry, Physico-Chemical Properties, and Absorption

Pharmacokinetics of therapeutically administered oligonucleotides is strongly driven by their physico-chemical properties. Generally, these properties are not sequence-specific in qualitative point of view, but can be quantitatively different from sequence to sequence, and could differ also between chemistries. Native oligonucleotides are small, negatively charged molecules, which means that the transfer through lipophilic membranes necessary for the absorption into systemic blood circulation and also later into the intracellular space is quite problematic.

The most common change in oligonucleotide chemistry is the replacement of phosphodiester bond with phosphorothioate bond in the backbone. This change goes usually hand in hand with chemical modification of the 2' functional group on ribose in the nucleotide (2'-hydroxyl could be substituted e.g., to 2'-O-methyl, 2'-O-methoxyethyl, or 2'-fluoro group), and conjugation with cholesterol. These modifications either increase the stability of oligonucleotides modifying their susceptibility to RNase cleavage (phosphorothioate bonds, 2'-O-modifications), or increase cellular uptake of the molecule (cholesterol conjugation). Cholesterol-conjugated 2'-O-methyl/methoxyethyl-modified oligonucleotides are sometimes termed "agomiRs" or "antagomiRs" depending on their mechanism of action, and they were utilized in some of the studies focused on gastrointestinal cancer presented in this article (Chang et al., 2013; Wang et al., 2013; Zhang et al., 2015; Zou et al., 2015). Modification on 2' position could also change the affinity of oligonucleotides to plasma proteins which has a high impact on pharmacokinetics, most importantly on distribution and excretion (Crooke, 2007).

Another possibility to change oligonucleotide structure is chemical modification of the ribose forming a 2',4'-bicyclic structure, which is termed locked nucleic acid (LNA) (Kumar et al., 1998). The most common type of LNA is oligonucleotide with one or more 2'-O-4'-methylene-β-D-ribose structure. This bicyclic bridge locks ribose in one of its conformation increasing binding affinity and decrease the susceptibility to nuclease cleavage (Braasch and Corey, 2001).

Various chemical modifications in the oligonucleotide structure are now available owing to the development of commercially available miRNA mimics. According to the information provided by manufacturers, miRNA mimics should possess higher affinity to miRISC and thus to the mRNA of interest. MiRNA-mimics should have no off-target biological activities due to the passenger strand, and should exert higher effect than native mature miRNAs. The chemistry modifications differ between passenger and guide strand, and the molecules could also be triple-stranded (e.g., Exiqon, Vedbaek, Denmark). Detailed information about the specific chemistry of the

miRNA mimic are usually not released. Some evidences were published last year, that bring the commercially available miRNA mimics into focus because of non-specific dampening effect on overall gene expression, accumulation of non-endogenous high molecular weight RNA species and unintentional passenger strand loading into the RISC discovered after transient transfection of human cell lines. Søskilde et al. describe variations even between batches of a commercially available miRNA mimic obtained from one manufacturer (Søskilde et al., 2015). The authors emphasize the issue of a proper dosage of miRNA mimic and its optimization, and suggest to prefer viral and genetic approaches, as the created transcripts follow the physiological biosynthesis pathway and their mechanism of action could be considered as the very same as endogenous miRNAs (Jin et al., 2015).

Undesirable physico-chemical properties of oligonucleotides could be attenuated by delivery systems mentioned before, which subsequently influence pharmacokinetic processes of miRNA-based therapeutics.

Distribution, Protein Binding, and Tissue Accumulation

After being absorbed or injected into systemic circulation, charged molecules of oligonucleotides bind to various plasma proteins, above all on albumin and α_2 -macroglobulin (Cheng et al., 2013). The binding and the distribution is non-linear, saturable, changes slightly with length and sequence of oligonucleotides and is different in rodents and in human. Distribution to the tissues is very quick and prevails over metabolic degradation (Levin, 1999). Naked oligonucleotides accumulate in the liver, kidneys, spleen, bone marrow and lymphatic nodes, while they do not cross the blood-brain barrier, placental barrier and they are not present in *testes*.

In the treatment of cancer, accumulation of a drug in the tumor tissue or in the metastasis site is a desirable state. MiRNA-based therapeutics could achieve this due to enhanced permeability and retention (EPR) effect of a tumor. Enhanced permeability of new vessels and relative lack of lymphatic vessels in the tumor site was firstly described by Matsumura and Maeda (1986). Charge-neutral small particles complexed or loaded with miRNA-based therapeutics have enhanced extravasation and could accumulate in the tumor. Metastatic sites are generally less accessible, as their EPR effect is not so significant (Maeda, 2015).

According to the technology of the delivery system used, miRNA-based therapeutic could accumulate also extratumorally in various tissues. All cells capable of phagocytosis accumulate naked oligonucleotides, liposomes, or nanoparticles, e.g., RES cells present in the liver (Kupfer cells) and in the circulation, tissue monocytes and macrophages, and proximal tubular cells (Chen et al., 2015). In this case, the delivery system alone as a protection could be insufficient, because in plasma, these particles get coated by proteins recognized by the RES. The most common defense against RES is PEGylation, binding of polyethylene glycol substituents on the surface of a nanoparticle or liposome, which prevent binding of opsonization proteins and became very common. Contrarily, the excess of PEG on the surface of a delivery system particle could diminish cellular

uptake, therefore the process of PEGylation should be optimized (Seto, 2010).

Oligonucleotides, liposomes and polymer-based nanocarriers enter the cell by active mechanism, endocytosis. Escape from endosomes is desired to reach the interaction of miRNA with mRNA, however, this is another obstacle in miRNA-based therapy. Some of the carriers could enhance endosomal escape by steric or osmotic effects. pH sensitive molecules could change structure in relatively acidic environment due to electrostatic interactions, which is leading to the mechanical disruption of the vesicle and release of miRNA into cytoplasm (Ju et al., 2014). Other molecules are accepting H^+ (proton sponges) and by alteration of ion homeostasis cause swelling and burst of the endosome (Akinc et al., 2005; Chen et al., 2015).

Metabolism of miRNA-Based Therapeutics

Ubiquitous nucleases begin to degrade oligonucleotides shortly after administration. According to the chemistry changes, free oligonucleotides are metabolized by 3'- and 5'-exonucleases or by endonucleases, and the rate of metabolism depends on the chemical modifications. Endonuclease cleavage is slower and takes place only when 3' and 5' end of oligonucleotide is protected by methoxyethyl-modified nucleotides. As was mentioned before, modifications on 2'-hydroxyl on ribose or structural changes in the backbone such as LNA structure can decrease the affinity of nucleases to cleave miRNA-based therapeutics. Also the complexes of oligonucleotides with nanoparticles or liposomes have modified susceptibility to nuclease cleavage.

The metabolites of nuclease cleavage are weakly bound to the plasma proteins and therefore are rapidly excreted in urine. Oligonucleotides do not undergo liver oxidation by cytochrome P450, or conjugation processes (Levin, 1999; Crooke, 2007).

Excretion

Oligonucleotides not bound to proteins are excreted in the urine, while binding to plasma proteins, or other delivery systems like liposomes and nanoparticles of specific parameters (e.g., hydrodynamic diameter up to 5–6 nm) results in protection from being urinary excreted (Crooke, 2007; Cheng et al., 2013). As oligonucleotides accumulate also in the liver, they could be excreted by both these organs. About 10% of the administered dose of naked oligonucleotides, and 80% of the metabolites are urinary excreted. The remaining are excreted by *faeces*, or endure bound to the tissue, or inside the cells. The elimination half-life of oligonucleotides is 1–30 days depending on the type of tissue. This attribute allows designing a therapeutic regimen comfortable for potential patients with one dose administration for a week, 2 weeks, or a month (Crooke, 2007).

Toxicity of miRNA-Based Therapy

The toxicity of oligonucleotide administration was largely studied in the field of antisense therapy. In miRNA-based therapy specifically, toxicity assessments are not a part every *in vivo* study and we have very limited information from the first phases of clinical research. For antisense oligonucleotides not targeted to miRNAs, there are evidences from rodent and non-rodent

TABLE 4 | In vivo studies in animal models of pancreatic ductal adenocarcinoma.

Xenografted cell line	miRNA(s) of interest	Therapeutic strategy	Animal model	Animal strain (gender)	Delivery system and chemical modifications	Route of administration	Dosage	Frequency of administration	Results	Toxicity, undesired effects	References
Mia PaCa-2 Lucia F1	miR-21	IT	OX	SCID CB17 mice	Lentiviral vector producing hairpins antisense to miR-21 [LV(a/miR-21)]	Intratumoral inj.	150 ng	Single dose	Inhibition of tumor growth and proliferation, induction of apoptosis, activation of angiogenesis	No changes in body weight	Sicard et al., 2013
		IT + chemotherapy			Lentiviral vector producing hairpins antisense to miR-21 [LV(a/miR-21)]	Intratumoral inj.	150 ng	Single dose	synergic effect, strong inhibition of tumor growth		
					Gemcitabine	Intraperitoneal inj.	125 mg/kg	Twice weekly for 14 days			
MiaPaCa-2	miR-34a, miR-143/145 cluster	RT	SX OX	CD-1 mice	Liposomal nanoparticles from cationic amphiphile DOTAP and co-lipids (cholesterol, DSPE-PEG-OMe) with plasmid expression construct of miR-34a and miR-143/145 (Clontech Laboratories)	Tail-vein inj.	50 µg	Three times per week for 3 weeks	Inhibition of tumor growth, more widespread apoptosis	No histopathology or biochemical evidence of toxicity (incl. hematology, liver and renal function)	Pramanik et al., 2011
Capan-1, Capan-2	miR-219-1-3p	RT	SX	SCID CB17 mice (males)	Plasmid pcDNA6.2-miR-219 with ExGen 500 transfection reagent (Euromedex)	Intratumoral inj.	20 µg	Single dose	Decrease of tumor growth and proliferation	Not assessed	Lahdeoui et al., 2014

(Continued)

TABLE 4 | Continued

Xenografted cell line	MiRNA(s) of interest	Therapeutic strategy	Animal model	Animal strain (gender)	Delivery system and chemical modifications	Route of administration	Dosage	Frequency of administration	Results	Toxicity, undesired effects	References
PANC-1	miR-34a	RT	SX	BALB/c mice (females)	Cationic polymer from PEI and β -cyclodextrin conjugated with CC9 peptide	Tail-vein inj.	15 μ mol (20 μ g)	Twice weekly for 2 weeks	Inhibition of tumor growth and decrease in size, induction of cancer cell apoptosis	Not assessed	Hu et al., 2013
PANC-1	miR-217	RT	SX	BALB/c mice (males)	miR-217 expression vector <i>in vivo</i> -jetPEI™ (201-50G; Polyplus)	Intratumoral inj.	100 μ g	twice	Decrease of tumor growth	Not assessed	Zhao et al., 2010
RWP-1	miR-148a	IT	SX	Athymic nu/nu mice (males)	Engineered oncolytic adenovirus Ad-L5-8miR148aT (insertion of 8 target sites for miR-148a)	Intratumoral inj.	5 x 10 ¹⁰ VP/tumor	Single dose	Significant inhibition in tumor growth and reduced tumor weight	Less induction of ALT, AST and bilirubin indicative of attenuated viral toxicity than Ad-wt, hepatotoxicity is transient	Bofill-De Ros et al., 2015
Patient derived CP13						Intratumoral inj.					
Patient derived CP15						Tail-vein inj.					
M/A PaCa-2, PANC-1	miR-21/23a/27a	IT	SX	BALB/c mice (females)	AntimiR-21 with atelocollagen	Intratumoral inj.	12 μ mol	Once weekly for 3 weeks followed by 3-week pause and again once weekly for 3 weeks	Suppression of tumor growth, the effect was lost after 3 weeks	No death, loss of body weight, or gross adverse effects occurred in the mice	Frampton et al., 2011

(Continued)

TABLE 4 | Continued

Xenografted cell line	MiRNA(s) of interest	Therapeutic strategy	Animal model	Animal strain (gender)	Delivery system and chemical modifications	Route of administration	Dosage	Frequency of administration	Results	Toxicity, undesired effects	References
MIA PaCa-2, PANC-1	miR-21/23a/27a	IT	SX	BALB/c mice (females)	AntimiR-21/23a/27a with atelocollagen	Intratumoral inj.	4 µmol for each antimiR		Reduction in tumor volume sustained to the end of the experiment despite a 3-week rest period	No death, loss of body weight, or gross adverse effects occurred in the mice	Frampton et al., 2011
PANC-1, PANC10.05	miR-206	RT	SX	SCID mice	mirVana miR-206 mimics (Ambion) with <i>in vivo</i> -jet PEI (Polyplus) in 0.015% collagenase II (Sigma) solution	Intratumoral inj.	10 µg	Three times (day 1, 8, 13)	Increased tumor necrosis, no changes in total tumor burden	Not assessed	Keklikoglou et al., 2015
Gemcitabine-resistant MIA PaCa-2R	miR-205	RT	SX	athymic nude mice (males)	Gemcitabine conjugated miR-205 polyplexes from amphiphilic copolymer with PEG	Intratumoral inj.	1 mg/kg (GEM 40 mg/kg)	Three times a week for 2 weeks	Reduction in tumor growth rate and weight, reduction in cell proliferation, increase in apoptosis	No significant change in body weight	Mittal et al., 2014
Capan-2, MiaPaCa-2	miR-29a, 330-5p	RT	SX	SCID CB-17 mice (males)	miRNAs cloned into the pCDNA6.2emGFP vector administered with Exgen 500 (Euromedex) reagent and glucose 5% (v/v)	Intratumoral inj.	20 µg	Single dose	Significant decrease of tumor growth and weight	Not assessed	Tréhoux et al., 2015
Hs766t-L2 initially transfected with a miR-29c agomir (200 nM)	miR-29c	RT	OX	nude mice	agomir-29c	Intraperitoneal inj.	5 nmol	Twice weekly for 2 weeks	Reduced liver metastasis	Not assessed	Zou et al., 2015

TABLE 5 | *In vivo* studies in animal models of colorectal adenocarcinoma.

Xenografted cell line	MiRNA(s) of interest	Therapeutic strategy	Animal model	Animal strain (gender)	Delivery system and chemical modifications	Route of administration	Dosage	Frequency of administration	Results	Toxicity, undesired effects	Reference
LS174T	miR-33a	RT	SX	Athymic nude mice (Hsd:ATHymic Nude-Foxn1 ^{nu})	PEI complexes (PEI F25-LM/miRNA)	Intraperitoneal inj.	0.77 nmol (10 µg)	Three times per week for 25 days	Reduction in tumor proliferation and growth	No changes in body weight, behavioral alterations, or other signs of discomfort, no changes in ALT and AST, and no induction of TNF α	Ibrahim et al., 2011
HCT-116	miR-145					intratumoral inj.	0.3 nmol (4 µg)				
HCT-116	miR-218	RT	SX	Nude mice (females)	miR-218 or control miR preincubated with Lipofectamine 2000 (Invitrogen)	Intratumoral inj.	1.2 nmol	Every 3 days	Inhibition of tumor growth	Not assessed	He et al., 2012
LoVo	miR-K-ras	RT	SX	SCID-C.B-17/lcrHsd-Prkdc ^{scid} mice (females)	Plasmid DNA encoding miRNA specific to K-ras	Intratumoral inj. followed by percutaneous electroporation	50 µg	Single dose	Transient suppression of tumor growth for 6 days, increased necrosis	No side effects observed	Vidic et al., 2010
MC38 (murine colon adenocarcinoma)	miR-27a	RT	SX	Normal C57B/6 mice	miR-27a precursor (GenePharma) with Lipofectamine 2000 (Invitrogen)	Intratumoral inj.	6.26 µg	Every 3 days for 3 times	Inhibition of tumor growth, reduction of tumor sizes and weight	Not assessed	Bao et al., 2014
HCT-116	miR-133a	RT	SX	BALB/c nude mice (females)	miR-133a preincubated with Lipofectamine 2000 (Invitrogen)	Intratumoral inj.	0.3 nmol	Every 3 days for 4 times	Reduced tumor growth rate	Not assessed	Dong et al., 2013

(Continued)

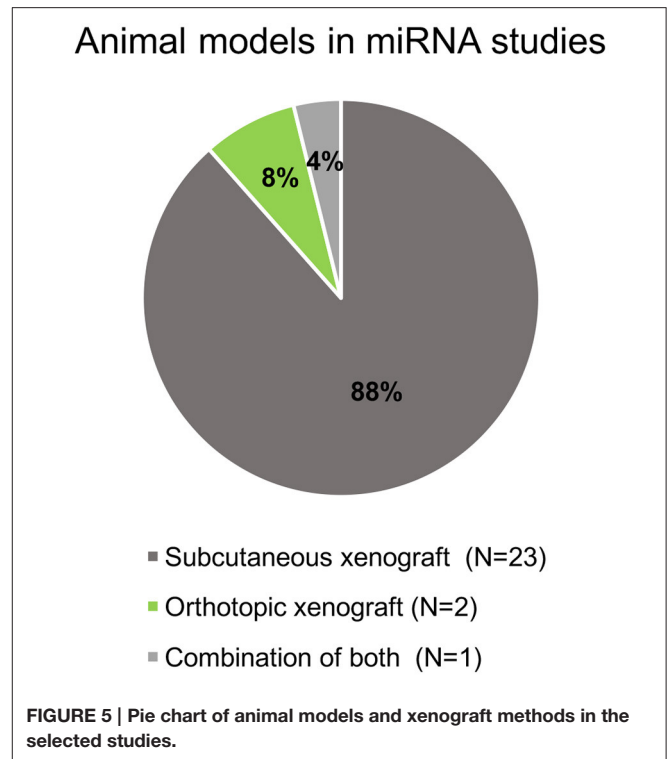
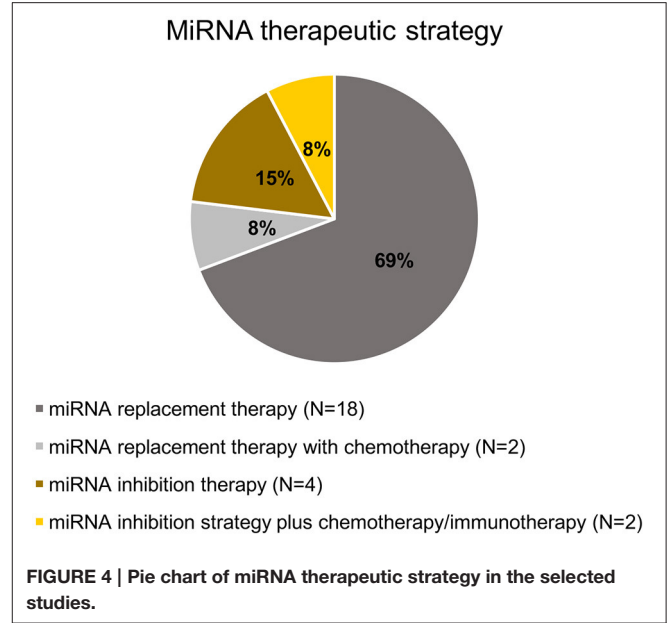
TABLE 5 | Continued

Xenografted cell line	MiRNA(s) of interest	Therapeutic strategy	Animal model	Animal strain (gender)	Delivery system and chemical modifications	Route of administration	Dosage	Frequency of administration	Results	Toxicity, undesired effects	Reference
HT29	let-7	IT + SX immunotherapy		Athymic nude mice (females)	Anti-Fas activating mAb clone CH11 (Millipore Corporate) let-7 inhibitor (GMR-miR™ microRNA inhibitor, GenePharma)	Intratumoral inj.	20 µg	Three times (days 4, 6, 8)	Reduction in tumor size, increased sensitivity of tumor cells to Fas-related apoptosis	Not assessed	Geng et al., 2011
DLD1 (KRAS ^{G13D})	miR-4689	RT	SX	Nude mice (females)	Carbonate apatite nanoparticles conjugated with mature hsa-miRNA (Gene Design)	Tail-vein inj.	40 µg	Three times a week for 8 times	Inhibition of tumor growth	No mortalities or body weight loss, no significant differences in blood chemistry tests, except for the slight increase in BUN, histological damage not observed (brain, heart, lung, liver, kidney, spleen, small intestine, and colon)	Hiraki et al., 2015
SW620	miR-429	RT	SX	Nude mice (males)	Mature miRNA	Intratumoral inj.	1 µg	Single dose	Inhibition of tumor growth, reduction of tumor weight	Not assessed	Sun Y. et al., 2014

(Continued)

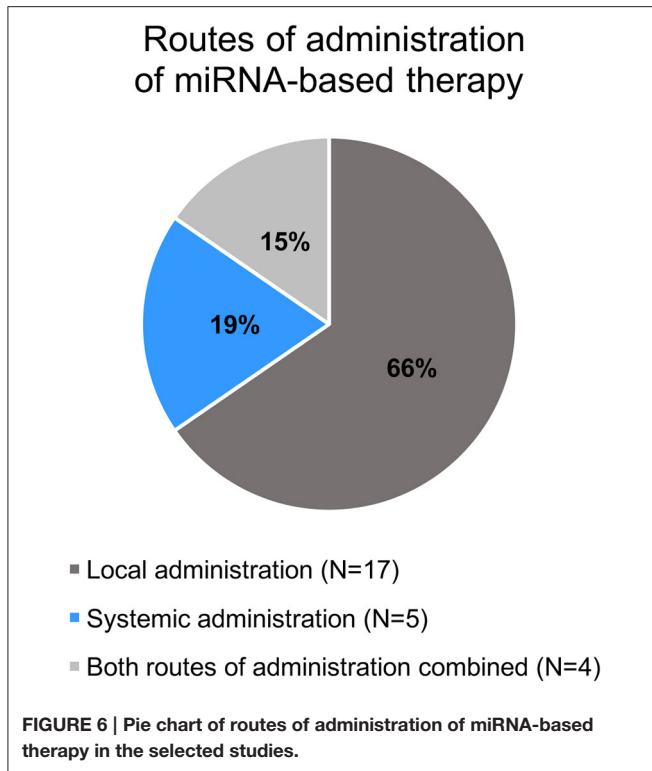
TABLE 5 | Continued

Xenografted cell line	MiRNA(s) of interest	Therapeutic strategy	Animal model	Animal strain (gender)	Delivery system and chemical modifications	Route of administration	Dosage	Frequency of administration	Results	Toxicity, undesired effects	Reference
SW620	miR-27b	RT	SX	NOD/SCID mice (females)	Cholesterol-conjugated mimics (GenePharma)	Intratumoral inj.	1 OD/mouse	Twice a week for 5 weeks	Inhibition of angiogenesis, severe tumor necrosis, one xenograft disappeared completely (a scab remained)	Two mice from negative control group died after 4-week treatment, cause of death was not determined	Ye et al., 2013



animal models, and also from human volunteers. Potential adverse effects could be provoked by hybridization-dependent or independent mechanisms, and could be linked with specific sequence motifs or length of an oligonucleotide. It means that some of the findings from antisense therapy in general are quite relevant for extrapolation to miRNA-based therapy.

Immunostimulation was described for phosphorothioate antisense oligonucleotides. It is a sequence-dependent,



hybridization-independent process, which leads to the reversible activation of various immune cells (e.g., NK cells, B lymphocytes, mononuclear cells) and increased production of cytokines such as IL-6, IL-12 and interferon γ (Levin, 1999; Henry et al., 2002). The main responsible sequence motif is CpG (p stands for phosphodiester bond) or CG palindromic sequences naturally occurring mostly in bacterial genome (Krieg et al., 1995). While unmethylated, this motif is recognized by TLR receptors on immune cells and activates them. The effect is also exerted by oligonucleotides with both phosphorothioate, and phosphodiester bonds in the structure. In rodents, which are more sensitive than primates to this effect, splenomegaly, lymphoid hyperplasia, and multiple organ mononuclear infiltrates were described (Levin, 1999).

Another severe adverse effect relating with immunity is an activation of complement cascade. It prevails over TLR-mediated immune stimulation in primates and its mechanism is probably hybridization/sequence-independent originating from physico-chemical properties (polyanionic character) of oligonucleotides. In the study of Henry et al., after reaching a threshold plasma concentration after i.v. infusion, macaques suffered from emesis, ataxia, and facial edema. Hemodynamic changes (fluctuation of blood pressure and tachycardia), changes in blood count (neutropenia followed by neutrophilia), and increase of cytokines mentioned above were described (Henry et al., 2002). When maintaining plasma concentration below the threshold, symptoms were mild or not present, which is in accordance with the results of phase I clinical study with antisense oligonucleotide against intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) (Glover et al., 1997).

Similar hybridization/sequence-independent mechanism leads also to the influencing of blood coagulation cascade observed in rodents, primates and human (Glover et al., 1997; Henry et al., 1997). Negative charge of oligonucleotides could inhibit intrinsic tenase complex (consisting of factor IXa and VIIIa, which activate factor X), and thus leads to the reversible prolonging of blood clotting and to the increase of activated partial thromboplastin time (aPTT) (Sheehan and Lan, 1998; Levin, 1999).

After administration of relatively high doses of antisense oligonucleotides (above 100 mg/kg in rodents), histological or laboratory signs of hepatotoxicity and renal toxicity were present in experimental animals. Mostly, immune-mediated cellular infiltrations in liver, multi-focal liver necrosis, and proximal tubules infiltrations were found in rodents. Posology studies indicate that lower doses (below 3 mg/kg) do not cause liver and kidney pathologies in monkey and human (Levin, 1999).

Different mechanism could potentially lead to hepatotoxicity, which was proven in rodents (Grimm et al., 2006). By introducing oligonucleotides into the cell, enzymes and other proteins that physiologically deal with these molecules could be saturated, and thus processing of other endogenous RNAs sharing these pathways could be diminished (Bader et al., 2010). This effect was described on mice treated with shRNA (short hairpin RNA) expression vectors. Mice suffered from multifocal liver necrosis followed by ascites, edema, increase of bilirubin and liver enzymes, and decrease of plasma proteins and body weight. Several mice died within 1 month. There were no signs of blood count changes, or increases in cytokine productions. ShRNAs compete of Dicer cleavage and exportin-5 stabilization in cytoplasm with endogenous pre-miRNAs, therefore mature liver miRNAs were found decreased and shRNAs precursors increased in mice with symptoms of hepatotoxicity. As Grimm et al. studied almost 50 distinct shRNAs, they assume that the effect was not sequence related (Grimm et al., 2006). Introducing of miRNA-precursors into the cell could produce the same effect, but the data concerning safety of miRNA-based therapies are limited. Again, proper posology studies are needed.

Another possible mechanism of toxicity is hybridization-dependent. But the toxicity arisen from both binding to the desired mRNAs, and off-target binding is hypothesized to be rare (Bader et al., 2010; van Rooij et al., 2012). MiRNA-mimics and precursors are suggested to be generally better tolerated than antisense therapy (Bader et al., 2010). One miRNA could regulate number of genes, frequently functionally linked in a specific pathway. Targeting more genes in one or more pathologically deregulated pathway could be beneficial. The potential for targeting other genes in different pathways still remains, but influencing of target or off-target genes with impact on cell viability should be revealed during accurate *in vitro* testing.

MiRNA-BASED THERAPEUTICS IN CLINICAL TRIALS

Certain chemical modifications of oligonucleotides structure and also several delivery systems for miRNAs have already

entered clinical phase of drug development. There are no reports of clinical trials of miRNA-based therapies in gastrointestinal malignancies on which we have focused in this review—colorectal, pancreatic, gallbladder and gastric cancer. Two experimental miRNA-based therapies are now listed on ClinicalTrials.gov. MiR-34a mimics in an amphoteric liposomal formulation administered i.v. are tested in the phase I in patients with primary liver cancer and advanced or metastatic lung and kidney cancer, melanoma, multiple myeloma and lymphoma (NCT01829971, Adams et al., 2015).

MiR-16 mimic is evaluated in the treatment of malignant pleural mesothelioma also in the phase I (NCT02369198). The therapeutic system used is termed TargomiR and it is based on specific nanoscale delivery system—nonliving bacterial minicells (EnGeneIC Delivery Vehicle, EnGeneIC, New York, USA), and targeted to cancer cells by an anti-EGFR antibody, since EGFR is known to be overexpressed by certain types of cancer. Kao et al. even published some of the preliminary results achieved in the cohort of six patients with malignant pleural mesothelioma describing significant radiologic and metabolic responses indicated by PET-scan (Kao et al., 2015; Quinn et al., 2015).

In non-cancer diseases, the first miRNA-based drug in clinical settings was miravirsin (LNA miR-122 inhibitor) tested as a hepatitis C treatment. The drug entered clinical trials phase II (NCT02031133, NCT02508090, NCT02452814), but van den Ree has recently referred that the development of miravirsin had been ceased. A more potent miR-122 inhibitor conjugated with *N*-acetylgalactosamine entered phase II (RG-101, 2016; van der Ree et al., 2016).

Other delivery systems, used in the selected animal studies as carriers for miRNA-based therapeutics, are evaluated in clinical trials for non-miRNA treatment. Future results from these trials may serve also for the development of miRNA-based therapies, as we may obtain e.g., the information about the potential toxicity, or pharmacokinetic aspects of a specific delivery system regardless of its cargo.

Lentiviral vectors are mostly used to transfect cells that are subsequently injected into the patient, e.g., in the treatment of lymphoma (NCT02337985). Adenoviral vectors are evaluated in various solid cancers and are usually administered locally, intraperitoneally, or even intratumorally. They are tested in urinary bladder cancer (NCT00003167), ovarian (NCT00964756), breast (NCT01703754), prostate (NCT01931046), or pancreatic carcinoma (NCT02705196). Adeno-associated viruses are tested in non-cancer diseases to deliver genes for the experimental treatment of hemophilia B (coagulation factor IX; NCT01620801), lipoprotein lipase deficiency (NCT00891306), Pompe disease (α -glucosidase; NCT00976352), or genetic retinopathies (NCT01482195). In gastric cancer, AAV is used to transfect patient's dendritic cells, which are later mixed with his T lymphocytes to produce specific cytotoxic T lymphocytes injected i.v. back to the patient (NCT02496273). IONPs are investigated in various applications in biomedicine, above all in diagnostics and tissue imaging (e.g., NCT00147238, NCT01895829). Ferumoxyde, superparamagnetic iron

oxide, has already been used in clinical practice in the United States for the treatment iron-deficiency anemia in patients with chronic kidney disease. Finally, PEI particles for delivering gene therapy are utilized in the clinical trials phase I and II of pancreatic ductal adenocarcinoma (NCT01274455), hepatocellular carcinoma (NCT00825474) and urinary bladder carcinoma (NCT00595088, NCT01274455, NCT00393809).

FUTURE PERSPECTIVES

In addition to animal models and techniques described in this review, there are also novel and promising approaches to target miRNAs under development. Very intriguing strategy present small-molecule inhibitors that target specific miRNAs (SMIRs, e.g., diazobenzene inhibiting miR-21) that usually interfere with miRNA biogenesis and maturation (Wen et al., 2015). SMIRs constitutes a reasonable and evidence based strategy with strong potential and chance for success. The progress of screening techniques and computational stimulation may address bright future in this field. CRISPR/Cas 9 technology is another emerging technique to be used in miRNA targeting therapy. For instance, construction of sequence specific CRISPR/Cas9 based miRNA inhibitor was reported to downregulate miR-17-92 cluster and miR-21, two canonical oncogenic miRNAs in cancer (Ho et al., 2015; Narayanan et al., 2016). Since single miRNA has the potential of regulating thousand genes, long non-coding RNA (lncRNA) that is capable of binding multiple miRNAs could consequently impact the expression of thousands of genes. In light of this potentially fundamental biological role, all the lncRNAs that act as endogenous miRNA sponges presents another promising strategy to target miRNAs in cancer. Finally, it can also be envisioned that blocking production, transportation and release of exosome miRNAs may have beneficial effects in controlling cancer development, and this may be achieved by targeting other non-cancerous cells such as the inflammatory cells in the cancer microenvironment.

CONCLUSIONS

MiRNA-based therapies as a new class of targeted therapy are heading toward from bench to the bedside. It is now generally accepted and many times proved that influencing pathologically changed intracellular levels of miRNAs change oncogenic phenotype of cancer cells *in vitro* and *in vivo*. However, as there is no ideal animal model of a human pathology, the translational potential of most studies is somehow limited. In the studies selected for this review, change of a specific miRNA was followed by significant diminishing of tumor size or volume *in vivo*. The subcutaneous tumor model used in the bulk of the studies clearly do not respond with microenvironment of the normal tumor cells, and also the necessary immunodeficiency of experimental animals do not correspond with immune status of an average

oncology patient, nevertheless, the results of animal studies are promising.

Serious obstacles still lie in the way to the clinical practice. The main issue is efficient delivery of miRNA-mimics, precursors, expression vectors, or inhibitors. Other important difficulty is an assessment of a proper dose sufficient for anticipated intracellular effects, but lacking or possessing acceptable adverse effects relating to immunostimulation, blood coagulation, or toxicities that account for the specific delivery systems. We also see the importance of non-rodent models in the development of new drugs, as shown on the immunostimulation triggered by oligonucleotides which is significantly different in nature in rodents and primates.

Several miRNAs and delivery system are now tested in clinical trials. Most of them are in phase I or II. Together with more information obtained from preclinical experiments, the results could move us forward on the way to a new approach in targeted therapy—drugs that aim on epigenetic mechanisms of pathophysiological processes.

REFERENCES

- Adams, B. D., Parsons, C., and Slack, F. J. (2015). The tumor-suppressive and potential therapeutic functions of miR-34a in epithelial carcinomas. *Expert Opin. Ther. Targets* 20, 737–753. doi: 10.1517/14728222.2016.1114102
- Akinc, A., Thomas, M., Klibanov, A. M., and Langer, R. (2005). Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *J. Gene Med.* 7, 657–663. doi: 10.1002/jgm.696
- Aslam, M. I., Patel, M., Singh, B., Jameson, J. S., and Pringle, J. H. (2012). MicroRNA manipulation in colorectal cancer cells: from laboratory to clinical application. *J. Transl. Med.* 10:128. doi: 10.1186/1479-5876-10-128
- Axtell, M. J., Westholm, J. O., and Lai, E. C. (2011). Vive la différence: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biol.* 12:221. doi: 10.1186/gb-2011-12-4-221
- Bader, A. G., Brown, D., and Winkler, M. (2010). The promise of MicroRNA replacement therapy. *Cancer Res.* 70, 7027–7030. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2010
- Bao, Y., Chen, Z., Guo, Y., Feng, Y., Li, Z., Han, W., et al. (2014). Tumor suppressor MicroRNA-27a in colorectal carcinogenesis and progression by targeting SGPP1 and Smad2. *PLoS ONE* 9:e105991. doi: 10.1371/journal.pone.0105991
- Beyerle, A., Braun, A., Merkel, O., Koch, F., Kissel, T., and Stoeger, T. (2011). Comparative *in vivo* study of poly (ethylene imine)/siRNA complexes for pulmonary delivery in mice. *J. Control Release Off. J. Control Release Soc.* 151, 51–56. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.12.017
- Bofill-De Ros, X., Villanueva, E., and Fillat, C. (2015). Late-phase miRNA-controlled oncolytic adenovirus for selective killing of cancer cells. *Oncotarget* 6, 6179–6190. doi: 10.18632/oncotarget.3350
- Bonnet, M.-E., Erbacher, P., and Bolcato-Bellemin, A.-L. (2008). Systemic delivery of DNA or siRNA mediated by linear polyethylenimine (L-PEI) does not induce an inflammatory response. *Pharm. Res.* 25, 2972–2982. doi: 10.1007/s11095-008-9693-1
- Braasch, D. A., and Corey, D. R. (2001). Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. *Chem. Biol.* 8, 1–7. doi: 10.1016/S1074-5521(00)00058-2
- Broderick, J. A., and Zamore, P. D. (2011). MicroRNA therapeutics. *Gene Ther.* 18, 1104–1110. doi: 10.1038/gt.2011.50
- Calin, G. A., and Croce, C. M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev. Cancer* 6, 857–866. doi: 10.1038/nrc1997

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JM did the literature search and wrote the text, JM and OS made the figures, RD and OS advised on the concept of the review and lately rearranged, corrected and critically revised the text.

FUNDING

This work was supported by the grant GA16-18257S of The Grant Agency of Czech Republic, by the internal Masaryk University Faculty of Medicine grants MUNI/A/1284/2015 and MUNI/11/InGA09/2014, by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic under the project CEITEC 2020 (LQ1601) and by the Czech Ministry of Health under the project MZ CR – RVO (MOU, 00209805).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully thank for the funding. We apologized to the many authors whose work could not be quoted due to lack of space.

- Chang, Y., Liu, C., Yang, J., Liu, G., Feng, F., Tang, J., et al. (2013). miR-20a triggers metastasis of gallbladder carcinoma. *J. Hepatol.* 59, 518–527. doi: 10.1016/j.jhep.2013.04.034
- Chen, L., Lü, M.-H., Zhang, D., Hao, N.-B., Fan, Y.-H., Wu, Y.-Y., et al. (2014). miR-1207-5p and miR-1266 suppress gastric cancer growth and invasion by targeting telomerase reverse transcriptase. *Cell Death Dis.* 5:e1034. doi: 10.1038/cddis.2013.553
- Chen, Y., Gao, D.-Y., and Huang, L. (2015). *In vivo* delivery of miRNAs for cancer therapy: challenges and strategies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 81, 128–141. doi: 10.1016/j.addr.2014.05.009
- Cheng, C. J., Saltzman, W. M., and Slack, F. J. (2013). Canonical and non-canonical barriers facing antimir cancer therapeutics. *Curr. Med. Chem.* 20, 3582–3593. doi: 10.2174/0929867311320290004
- Chollet, P., Favrot, M. C., Hurbin, A., and Coll, J.-L. (2002). Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNA complexes. *J. Gene Med.* 4, 84–91. doi: 10.1002/jgm.237
- Chowdhury, E. H., Maruyama, A., Kano, A., Nagaoka, M., Kotaka, M., Hirose, S., et al. (2006). pH-sensing nano-crystals of carbonate apatite: effects on intracellular delivery and release of DNA for efficient expression into mammalian cells. *Gene* 376, 87–94. doi: 10.1016/j.gene.2006.02.028
- Cong, N., Du, P., Zhang, A., Shen, F., Su, J., Pu, P., et al. (2013). Downregulated microRNA-200a promotes EMT and tumor growth through the Wnt/beta-catenin pathway by targeting the E-cadherin repressors ZEB1/ZEB2 in gastric adenocarcinoma. *Oncol. Rep.* 29, 1579–1587. doi: 10.3892/or.2013.2267
- Crooke, S. T. (2007). *Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications, 2nd Edn.* Boca Raton, FL: CRC Press.
- Dong, Y., Zhao, J., Wu, C.-W., Zhang, L., Liu, X., Kang, W., et al. (2013). Tumor suppressor functions of miR-133a in colorectal cancer. *Mol. Cancer Res.* 11, 1051–1060. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0061
- Esquela-Kerscher, A., and Slack, F. J. (2006). Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 259–269. doi: 10.1038/nrc1840
- Fischer, D., Bieber, T., Li, Y., Elsässer, H. P., and Kissel, T. (1999). A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm. Res.* 16, 1273–1279. doi: 10.1023/A:1014861900478
- Frampton, A. E., Castellano, L., Colombo, T., Giovannetti, E., Krell, J., Jacob, J., et al. (2011). MicroRNAs cooperatively inhibit a network of tumor suppressor genes to promote pancreatic tumor growth and progression. *Gastroenterology* 146, 268.e18–277.e18. doi: 10.1053/j.gastro.2013.10.010

- Garzon, R., Fabbri, M., Cimmino, A., Calin, G. A., and Croce, C. M. (2006). MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol. Med.* 12, 580–587. doi: 10.1016/j.molmed.2006.10.006
- Geng, L., Zhu, B., Dai, B.-H., Sui, C.-J., Xu, F., Kan, T., et al. (2011). A let-7/Fas double-negative feedback loop regulates human colon carcinoma cells sensitivity to Fas-related apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 408, 494–499. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.04.074
- Glover, J. M., Leeds, J. M., Mant, T. G. K., Amin, D., Kisner, D. L., Zuckerman, J. E., et al. (1997). Phase I safety and pharmacokinetic profile of an intercellular adhesion molecule-1 antisense oligodeoxynucleotide (ISIS 2302). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282, 1173–1180.
- Grimm, D., Streetz, K. L., Jopling, C. L., Storm, T. A., Pandey, K., Davis, C. R., et al. (2006). Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441, 537–541. doi: 10.1038/nature04791
- Gu, W., Xu, Y., Xie, X., Wang, T., Ko, J.-H., and Zhou, T. (2014). The role of RNA structure at 5' untranslated region in microRNA-mediated gene regulation. *RNA* 20, 1369–1375. doi: 10.1261/rna.044792.114
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hanini, A., Schmitt, A., Kacem, K., Chau, F., Ammar, S., and Gavard, J. (2011). Evaluation of iron oxide nanoparticle biocompatibility. *Int. J. Nanomed.* 6, 787–794. doi: 10.2147/IJN.S17574
- Hao, Z., Fan, W., Hao, J., Wu, X., Zeng, G. Q., Zhang, L. J., et al. (2016). Efficient delivery of micro RNA to bone-metastatic prostate tumors by using aptamer-conjugated atelocollagen *in vitro* and *in vivo*. *Drug Deliv.* 23, 874–881. doi: 10.3109/10717544.2014.920059
- He, X., Dong, Y., Wu, C. W., Zhao, Z., Ng, S. S. M., Chan, F. K. L., et al. (2012). MicroRNA-218 inhibits cell cycle progression and promotes apoptosis in colon cancer by downregulating BMI1 polycomb ring finger oncogene. *Mol. Med.* 18, 1491–1498. doi: 10.2119/molmed.2012.00304
- Henry, S. P., Beattie, G., Yeh, G., Chappel, A., Giclas, P., Mortari, A., et al. (2002). Complement activation is responsible for acute toxicities in rhesus monkeys treated with a phosphorothioate oligodeoxynucleotide. *Int. Immunopharmacol.* 2, 1657–1666. doi: 10.1016/S1567-5769(02)00142-X
- Henry, S. P., Bolte, H., Auletta, C., and Kornbrust, D. J. (1997). Evaluation of the toxicity of ISIS 2302, a phosphorothioate oligonucleotide, in a four-week study in cynomolgus monkeys. *Toxicology* 120, 145–155. doi: 10.1016/S0300-483X(97)03661-5
- Hiraki, M., Nishimura, J., Takahashi, H., Wu, X., Takahashi, Y., Miyo, M., et al. (2015). Concurrent targeting of KRAS and AKT by miR-4689 is a novel treatment against mutant KRAS colorectal cancer. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 4:e231. doi: 10.1038/mtna.2015.5
- Höbel, S., and Aigner, A. (2013). Polyethylenimines for siRNA and miRNA delivery *in vivo*. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 5, 484–501. doi: 10.1002/wnan.1228
- Ho, T. T., Zhou, N., Huang, J., Koirala, P., Xu, M., Fung, R., et al. (2015). Targeting non-coding RNAs with the CRISPR/Cas9 system in human cell lines. *Nucleic Acids Res.* 43:e17. doi: 10.1093/nar/gku1198
- Hogg, D. R., and Harries, L. W. (2014). Human genetic variation and its effect on miRNA biogenesis, activity and function. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 1184–1189. doi: 10.1042/BST20140055
- Hossain, S., Stanislaus, A., Chua, M. J., Tada, S., Tagawa, Y., Chowdhury, E. H., et al. (2010). Carbonate apatite-facilitated intracellularly delivered siRNA for efficient knockdown of functional genes. *J. Control Release Off. J. Control Release Soc.* 147, 101–108. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.06.024
- Hu, Q. L., Jiang, Q. Y., Jin, X., Shen, J., Wang, K., Li, Y. B., et al. (2013). Cationic microRNA-delivering nanovectors with bifunctional peptides for efficient treatment of PANC-1 xenograft model. *Biomaterials* 34, 2265–2276. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.12.016
- Hwang, H.-W., Wentzel, E. A., and Mendell, J. T. (2007). A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science* 315, 97–100. doi: 10.1126/science.1136235
- Ibrahim, A. F., Weirauch, U., Thomas, M., Grünweller, A., Hartmann, R. K., and Aigner, A. (2011). MicroRNA replacement therapy for miR-145 and miR-33a is efficacious in a model of colon carcinoma. *Cancer Res.* 71, 5214–5224. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4645
- Ishida, T., Ichihara, M., Wang, X., Yamamoto, K., Kimura, J., Majima, E., et al. (2006). Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes. *J. Control Release Off. J. Control Release Soc.* 112, 15–25. doi: 10.1016/j.jconrel.2006.01.005
- Jeffries, C. D., Fried, H. M., and Perkins, D. O. (2011). Nuclear and cytoplasmic localization of neural stem cell microRNAs. *RNA* 17, 675–686. doi: 10.1261/rna.2006511
- Jin, H. Y., Gonzalez-Martin, A., Miletic, A. V., Lai, M., Knight, S., Sabouri-Ghomi, M., et al. (2015). Transfection of microRNA mimics should be used with caution. *Front. Genet.* 6:340. doi: 10.3389/fgene.2015.00340
- Ju, C., Mo, R., Xue, J., Zhang, L., Zhao, Z., Xue, L., et al. (2014). Sequential intra-intercellular nanoparticle delivery system for deep tumor penetration. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 6253–6258. doi: 10.1002/anie.201311227
- Kanasty, R. L., Whitehead, K. A., Vegas, A. J., and Anderson, D. G. (2012). Action and reaction: the biological response to siRNA and its delivery vehicles. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 20, 513–524. doi: 10.1038/mt.2011.294
- Kao, S. C., Fulham, M., Wong, K., Cooper, W., Brahmabhatt, H., MacDiarmid, J., et al. (2015). A significant metabolic and radiological response after a novel targeted MicroRNA-based treatment approach in malignant pleural mesothelioma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 191, 1467–1469. doi: 10.1164/rccm.201503-0461LE
- Kasinski, A. L., and Slack, F. J. (2011). Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 11, 849–864. doi: 10.1038/nrc3166
- Keklikoglou, I., Hosaka, K., Bender, C., Bott, A., Koerner, C., Mitra, D., et al. (2015). MicroRNA-206 functions as a pleiotropic modulator of cell proliferation, invasion and lymphangiogenesis in pancreatic adenocarcinoma by targeting ANXA2 and KRAS genes. *Oncogene* 34, 4867–4878. doi: 10.1038/onc.2014.408
- Kievit, F. M., Veiseh, O., Bhattarai, N., Fang, C., Gunn, J. W., Lee, D., et al. (2009). PEI-PEG-chitosan copolymer coated iron oxide nanoparticles for safe gene delivery: synthesis, complexation, and transfection. *Adv. Funct. Mater.* 19, 2244–2251. doi: 10.1002/adfm.200801844
- Kievit, F. M., and Zhang, M. (2011). Surface engineering of iron oxide nanoparticles for targeted cancer therapy. *Acc. Chem. Res.* 44, 853–862. doi: 10.1021/ar2000277
- Komatsu, K., Shibata, T., Shimada, A., Ideno, H., Nakashima, K., Tabata, Y., et al. (2016). Cationized gelatin hydrogels mixed with plasmid DNA induce stronger and more sustained gene expression than atelocollagen at calvarial bone defects *in vivo*. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 27, 419–430. doi: 10.1080/09205063.2016.1139486
- Krieg, A. M., Yi, A.-K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., et al. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374, 546–549. doi: 10.1038/374546a0
- Kumar, R., Singh, S. K., Koshkin, A. A., Rajwanshi, V. K., Meldgaard, M., and Wengel, J. (1998). The first analogues of LNA (locked nucleic acids): phosphorothioate-LNA and 2'-thio-LNA. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8, 2219–2222. doi: 10.1016/S0960-894X(98)00366-7
- Lahtaoui, F., Delpu, Y., Vincent, A., Renaud, F., Messenger, M., Duchêne, B., et al. (2014). miR-219-1-3p is a negative regulator of the mucin MUC4 expression and is a tumor suppressor in pancreatic cancer. *Oncogene* 34, 780–788. doi: 10.1038/onc.2014.11
- Lellouche, E., Israel, L. L., Bechor, M., Attal, S., Kurlander, E., Asher, V. A., et al. (2015). MagRET nanoparticles: an iron oxide nanocomposite platform for gene silencing from microRNAs to long noncoding RNAs. *Bioconjug. Chem.* 26, 1692–1701. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00276
- Levin, A. A. (1999). A review of the issues in the pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Biochim. Biophys. Acta* 1489, 69–84. doi: 10.1016/S0167-4781(99)00140-2
- Li, Z. F., Liang, Y. M., Lau, P. N., Shen, W., Wang, D. K., Cheung, W. T., et al. (2013). Dynamic localisation of mature microRNAs in Human nucleoli is influenced by exogenous genetic materials. *PLoS ONE* 8:e70869. doi: 10.1371/journal.pone.0070869
- Maeda, H. (2015). Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 91, 3–6. doi: 10.1016/j.addr.2015.01.002
- Mahmoudi, M., Laurent, S., Shokrgozar, M. A., and Hosseinkhani, M. (2011). Toxicity evaluations of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: cell "vision" versus physicochemical properties of nanoparticles. *ACS Nano* 5, 7263–7276. doi: 10.1021/nn2021088

- Malek, A., Merkel, O., Fink, L., Czubayko, F., Kissel, T., and Aigner, A. (2009). *In vivo* pharmacokinetics, tissue distribution and underlying mechanisms of various PEI(-PEG)/siRNA complexes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 236, 97–108. doi: 10.1016/j.taap.2009.01.014
- Mallik, S., and Choi, J. S. (2014). Liposomes: versatile and biocompatible nanovesicles for efficient biomolecules delivery. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 14, 755–765. doi: 10.1166/jnn.2014.9080
- Matsumura, Y., and Maeda, H. (1986). A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumor-tropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* 46(12 Part 1):6387–6392.
- Merkel, O. M., Beyerle, A., Beckmann, B. M., Zheng, M., Hartmann, R. K., Stöger, T., et al. (2011). Polymer-related off-target effects in non-viral siRNA delivery. *Biomaterials* 32, 2388–2398. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.11.081
- Mittal, A., Chitkara, D., Behrman, S. W., and Mahato, R. I. (2014). Efficacy of gemcitabine conjugated and miRNA-205 complexed micelles for treatment of advanced pancreatic cancer. *Biomaterials* 35, 7077–7087. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.04.053
- Narayanan, A., Hill-Teran, G., Moro, A., Ristori, E., Kasper, D. M., and Roden, C., et al. (2016). *In vivo* mutagenesis of miRNA gene families using a scalable multiplexed CRISPR/Cas9 nuclease system. *Sci. Rep.* 6:32386. doi: 10.1038/srep32386
- Nchinda, G., Uberla, K., and Zschörnig, O. (2002). Characterization of cationic lipid DNA transfection complexes differing in susceptibility to serum inhibition. *BMC Biotechnol.* 2:12. doi: 10.1186/1472-6750-2-12
- Ochiya, T., Nagahara, S., Sano, A., Itoh, H., and Terada, M. (2001). Biomaterials for gene delivery: atelocollagen-mediated controlled release of molecular medicines. *Curr. Gene Ther.* 1, 31–52. doi: 10.2174/1566523013348887
- Ochiya, T., Takahama, Y., Nagahara, S., Sumita, Y., Hisada, A., Itoh, H., et al. (1999). New delivery system for plasmid DNA *in vivo* using atelocollagen as a carrier material: the Minipellet. *Nat. Med.* 5, 707–710. doi: 10.1038/9560
- Ott, C. E., Grünhagen, J., Jäger, M., Horbelt, D., Schwill, S., Kallenbach, K., et al. (2011). MicroRNAs differentially expressed in postnatal aortic development downregulate elastin via 3' UTR and coding-sequence binding sites. *PLoS ONE* 6:e16250. doi: 10.1371/journal.pone.0016250
- Park, C. W., Zeng, Y., Zhang, X., Subramanian, S., and Steer, C. J. (2010). Mature microRNAs identified in highly purified nuclei from HCT116 colon cancer cells. *RNA Biol.* 7, 606–614. doi: 10.4161/rna.7.5.13215
- Pathak, K., Keshri, L., and Shah, M. (2011). Lipid nanocarriers: influence of lipids on product development and pharmacokinetics. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 28, 357–393. doi: 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v28.i4.20
- Pramanik, D., Campbell, N. R., Karikari, C., Chivukula, R., Kent, O. A., Mendell, J. T., et al. (2011). Restitution of tumor suppressor microRNAs using a systemic nanovector inhibits pancreatic cancer growth in mice. *Mol. Cancer Ther.* 10, 1470–1480. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0152
- Quinn, L., Finn, S. P., Cuffe, S., and Gray, S. G. (2015). Non-coding RNA repertoires in malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer Amst. Neth.* 90, 417–426. doi: 10.1016/j.lungcan.2015.11.002
- RG-101, (2016). *Regulus Therapeutics*. Available online at: <http://regulusrx.com/programs/clinical-pipeline/rg-101/>
- Romero-Cordoba, S. L., Salido-Guadarrama, I., Rodriguez-Dorantes, M., and Hidalgo-Miranda, A. (2014). miRNA biogenesis: biological impact in the development of cancer. *Cancer Biol. Ther.* 15, 1444–1455. doi: 10.4161/15384047.2014.955442
- Ruan, K., Fang, X., and Ouyang, G. (2009). MicroRNAs: novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer Lett.* 285, 116–126. doi: 10.1016/j.canlet.2009.04.031
- Seto, A. G. (2010). The road toward microRNA therapeutics. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 1298–1305. doi: 10.1016/j.biocel.2010.03.003
- Sheehan, J. P., and Lan, H.-C. (1998). Phosphorothioate oligonucleotides inhibit the intrinsic tenase complex. *Blood* 92, 1617–1625.
- Sicard, F., Gayral, M., Lulka, H., Buscail, L., and Cordelier, P. (2013). Targeting miR-21 for the therapy of pancreatic cancer. *Mol. Ther.* 21, 986–994. doi: 10.1038/mt.2013.35
- Søskilde, R., Newie, I., Persson, H., Borg, Å., and Rovira, C. (2015). Passenger strand loading in overexpression experiments using microRNA mimics. *RNA Biol.* 12, 787–791. doi: 10.1080/15476286.2015.1020270
- Soriano, A., Jubierre, L., Almazán-Moga, A., Molist, C., Roma, J., de Toledo, J. S., et al. (2013). microRNAs as pharmacological targets in cancer. *Pharmacol. Res.* 75, 3–14. doi: 10.1016/j.phrs.2013.03.006
- Suk, J. S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J., and Ensign, L. M. (2016). PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 99(Pt A):28–51. doi: 10.1016/j.addr.2015.09.012
- Sun, Y., Shen, S., Liu, X., Tang, H., Wang, Z., Yu, Z., et al. (2014). MiR-429 inhibits cells growth and invasion and regulates EMT-related marker genes by targeting Onecut2 in colorectal carcinoma. *Mol. Cell. Biochem.* 390, 19–30. doi: 10.1007/s11010-013-1950-x
- Sun, Z., Song, X., Li, X., Su, T., Qi, S., Qiao, R., et al. (2014). *In vivo* multimodality imaging of miRNA-16 iron nanoparticle reversing drug resistance to chemotherapy in a mouse gastric cancer model. *Nanoscale* 6, 14343–14353. doi: 10.1039/C4NR03003F
- Tan, Y., and Huang, L. (2002). Overcoming the inflammatory toxicity of cationic gene vectors. *J. Drug Target* 10, 153–160. doi: 10.1080/10611860290016757
- Tang, R., Li, L., Zhu, D., Hou, D., Cao, T., Gu, H., et al. (2012). Mouse miRNA-709 directly regulates miRNA-15a/16-1 biogenesis at the posttranscriptional level in the nucleus: evidence for a microRNA hierarchy system. *Cell Res.* 22, 504–515. doi: 10.1038/cr.2011.137
- Tréhoux, S., Lahdaoui, F., Delpu, Y., Renaud, F., Leteurtre, E., Torrisoni, J., et al. (2015). Micro-RNAs miR-29a and miR-330-5p function as tumor suppressors by targeting the MUC1 mucin in pancreatic cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1853, 2392–2403. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.05.033
- van der Ree, M. H., van der Meer, A. J., van Nuenen, A. C., de Bruijne, J., Ottosen, S., Janssen, H. L., et al. (2016). Miravirsin dosing in chronic hepatitis C patients results in decreased microRNA-122 levels without affecting other microRNAs in plasma. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 43, 102–113. doi: 10.1111/apt.13432
- van Rooij, E., Purcell, A. L., and Levin, A. A. (2012). Developing microRNA therapeutics. *Circ. Res.* 110, 496–507. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.247916
- Vidic, S., Markelc, B., Sersa, G., Coer, A., Kamensek, U., Tevz, G., et al. (2010). MicroRNAs targeting mutant K-ras by electrotransfer inhibit human colorectal adenocarcinoma cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Gene Ther.* 17, 409–419. doi: 10.1038/cgt.2009.87
- Wang, J., Chen, Y., Chen, B., Ding, J., Xia, G., Gao, C., et al. (2010). Pharmacokinetic parameters and tissue distribution of magnetic Fe(3)O(4) nanoparticles in mice. *Int. J. Nanomed.* 5, 861–866. doi: 10.2147/IJN.S13662
- Wang, M., Gu, H., Qian, H., Zhu, W., Zhao, C., Zhang, X., et al. (2013). miR-17-5p/20a are important markers for gastric cancer and murine double minute 2 participates in their functional regulation. *Eur. J. Cancer* 49, 2010–2021. doi: 10.1016/j.ejca.2012.12.017
- Wei, Y., Li, L., Wang, D., Zhang, C.-Y., and Zen, K. (2014). Importin 8 regulates the transport of mature microRNAs into the cell nucleus. *J. Biol. Chem.* 289, 10270–10275. doi: 10.1074/jbc.C113.541417
- Wen, D., Danquah, M., Chaudhary, A. K., and Mahato, R. I. (2015). Small molecules targeting microRNA for cancer therapy: promises and obstacles. *J. Control Release* 219, 237–247. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.08.011
- Wu, J., Lizarzaburu, M. E., Kurth, M. J., Liu, L., Wege, H., Zern, M. A., et al. (2001). Cationic lipid polymerization as a novel approach for constructing new DNA delivery agents. *Bioconjug. Chem.* 12, 251–257. doi: 10.1021/bc000097e
- Wu, X., Yamamoto, H., Nakanishi, H., Yamamoto, Y., Inoue, A., Tei, M., et al. (2015). Innovative delivery of siRNA to solid tumors by super carbonate apatite. *PLoS ONE* 10:e0116022. doi: 10.1371/journal.pone.0116022
- Xie, J., Huang, J., Li, X., Sun, S., and Chen, X. (2009). Iron oxide nanoparticle platform for biomedical applications. *Curr. Med. Chem.* 16, 1278–1294. doi: 10.2174/092986709787846604
- Xue, H., Guo, P., Wen, W.-C., and Wong, H. (2015). Lipid-based nanocarriers for RNA delivery. *Curr. Pharm. Des.* 21, 3140–3147. doi: 10.2174/1381612821666150531164540
- Ye, J., Wu, X., Wu, D., Wu, P., Ni, C., Zhang, Z., et al. (2013). miRNA-27b targets vascular endothelial growth factor c to inhibit tumor progression and angiogenesis in colorectal cancer. *PLoS ONE* 8:e60687. doi: 10.1371/journal.pone.0060687
- Zelphati, O., and Szoka, F. C. (1996). Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 11493–11498. doi: 10.1073/pnas.93.21.11493

- Zhang, J.-S., Liu, F., and Huang, L. (2005). Implications of pharmacokinetic behavior of lipoplex for its inflammatory toxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 689–698. doi: 10.1016/j.addr.2004.12.004
- Zhang, X.-X., McIntosh, T. J., and Grinstaff, M. W. (2012). Functional lipids and lipoplexes for improved gene delivery. *Biochimie* 94, 42–58. doi: 10.1016/j.biochi.2011.05.005
- Zhang, Y., Qu, X., Li, C., Fan, Y., Che, X., Wang, X., et al. (2015). miR-103/107 modulates multidrug resistance in human gastric carcinoma by downregulating Cav-1. *Tumor Biol.* 36, 2277–2285. doi: 10.1007/s13277-014-2835-7
- Zhang, Y., Wang, Z., and Gemeinhart, R. A. (2013). Progress in microRNA delivery. *J. Control Release Off. J. Control Release Soc.* 172, 962–974. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.09.015
- Zhao, W.-G., Yu, S.-N., Lu, Z.-H., Ma, Y.-H., Gu, Y.-M., and Chen, J. (2010). The miR-217 microRNA functions as a potential tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma by targeting KRAS. *Carcinogenesis* 31, 1726–1733. doi: 10.1093/carcin/bgq160
- Zisoulis, D. G., Kai, Z. S., Chang, R. K., and Pasquinelli, A. E. (2012). Autoregulation of microRNA biogenesis by let-7 and argonaute. *Nature* 486, 541–544. doi: 10.1038/nature11134
- Zou, Y., Li, J., Chen, Z., Li, X., Zheng, S., Yi, D., et al. (2015). miR-29c suppresses pancreatic cancer liver metastasis in an orthotopic implantation model in nude mice and affects survival in pancreatic cancer patients. *Carcinogenesis* 36, 676–684. doi: 10.1093/carcin/bgv027

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Merhautova, Demlova and Slaby. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Research Article

miR-155 and miR-484 Are Associated with Time to Progression in Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated with Sunitinib

Jana Merhautova,¹ Renata Hezova,^{2,3} Alexandr Poprach,³ Alena Kovarikova,²
Lenka Radova,² Marek Svoboda,^{2,3} Rostislav Vyzula,³ Regina Demlova,¹ and Ondrej Slaby^{2,3}

¹Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Masaryk University, 625 00 Brno, Czech Republic

²Central European Institute of Technology, Masaryk University, 625 00 Brno, Czech Republic

³Department of Comprehensive Cancer Care, Masaryk Memorial Cancer Institute, 656 53 Brno, Czech Republic

Correspondence should be addressed to Ondrej Slaby; on.slaby@gmail.com

Received 3 March 2015; Accepted 17 April 2015

Academic Editor: Paul L. Crispen

Copyright © 2015 Jana Merhautova et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. Sunitinib is a tyrosine kinase inhibitor used in the treatment of metastatic renal cell carcinoma. The main difficulty related to the treatment is the development of drug resistance followed by rapid progression of the disease. We analyzed tumor tissue of sunitinib treated patients in order to find miRNAs associated with therapeutic response. **Methods.** A total of 79 patients with metastatic renal cell carcinoma were included in our study. miRNA profiling in tumor tissue samples was performed by TaqMan Low Density Arrays and a group of selected miRNAs (miR-155, miR-374-5p, miR-324-3p, miR-484, miR-302c, and miR-888) was further validated by qRT-PCR. Normalized data were subjected to ROC and Kaplan-Meier analysis. **Results.** We reported decreased tissue levels of miR-155 and miR-484 as significantly associated with increased time to progression (miR-155: median TTP 5.8 versus 12.8 months, miR-484: median TTP 5.8 versus 8.9 months). **Conclusion.** miR-155 and miR-484 are potentially connected with sunitinib resistance and failure of the therapy. miR-155 is a known oncogene with direct influence on neovascularization. Biological role of miR-484 has to be clarified. Stratification of patients based on miRNA analysis would allow more personalized approach in therapy of metastatic renal cell carcinoma.

1. Introduction

Targeted therapy with tyrosine kinase inhibitors (TKIs) is used in the first line of metastatic renal cell carcinoma (mRCC) treatment. TKIs inhibit multiple receptor tyrosine kinases needed for the activation of intracellular signaling pathways controlling cell proliferation, survival, or angiogenesis. Almost all treated patients will eventually develop secondary resistance to TKIs [1]. Other therapeutic alternatives, such as TKIs pazopanib or sorafenib, mTOR inhibitor temsirolimus, VEGFR antibody bevacizumab, cytokine therapy with interferon- α , or clinical trials [2], could be provided, if there would be a possibility to distinguish individuals with and without benefit from sunitinib therapy.

Emerging evidence suggests that microRNAs (miRNAs) could be suitable biomarkers with diagnostic, prognostic, and predictive potential [3–6]. These small (18–25 nt) noncoding

RNAs are posttranscriptional regulators of gene expression. miRNAs affect most cellular processes and the dysregulation of their network has been linked to various malignant diseases including RCC [7]. miRNAs as biomarkers could be measured in tissues and body fluids and are relatively resistant to decay. The aim of our study was to find tissue miRNAs associated with the time to progression of mRCC in patients treated with sunitinib. To have an effective tool for distinguish patients according to the expected therapy outcome would contribute to more personalized mRCC therapy.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design, Patients, and Tissue Samples. The study protocol was approved by the local ethical committee and written informed consent was obtained from all patients. Metastatic RCC patients included in the study were from

TABLE 1: Clinicopathological characteristics of patients.

	Screening cohort		Validation cohort	
	Responders N = 8	Nonresponders N = 8	Responders N = 44	Nonresponders N = 19
Gender				
Male	6 (75%)	8 (100%)	34 (77.3%)	11 (57.9%)
Female	2 (15%)	0 (0%)	10 (22.7%)	8 (42.1%)
Age				
Median	64	64	66	66
Range	40–80	53–73	41–84	45–84
Histology				
Papillary carcinoma	1 (12.5%)	1 (12.5%)	3 (6.8%)	3 (5.8%)
Clear cell carcinoma	7 (87.5%)	7 (87.5%)	41 (93.2%)	16 (84.2%)
Grade				
1	0 (0%)	0 (0%)	6 (13.6%)	0 (0%)
2	2 (25%)	3 (37.5%)	11 (25%)	5 (26.4%)
3	5 (62.5%)	3 (37.5%)	13 (29.5%)	7 (36.8%)
4	1 (12.5%)	2 (25%)	5 (11.4%)	7 (36.8%)
Unknown	0 (0%)	0 (0%)	9 (20.5%)	0 (0%)
Response to sunitinib according to RECIST criteria				
Complete response	0 (0%)	0 (0%)	1 (2.3%)	0 (0%)
Partial response	6 (75%)	0 (0%)	19 (43.2%)	0 (0%)
Stable disease	2 (25%)	0 (0%)	24 (54.5%)	0 (0%)
Progressive disease	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	19 (100%)

South Moravian region of Czech Republic with uniform exposure to the environmental factors. Hereditary cases of RCC were excluded from the study. Two cohorts of patients with mRCC treated with sunitinib in a standard regimen were set up retrospectively. The screening group included 16 patients from Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic (MMCI). Response to the treatment was assessed according to RECIST criteria after 9 months and patients were divided into two groups: (a) responders to the treatment (complete, or partial response, and stable disease) and (b) nonresponders with rapid progression. A group of candidate miRNAs was chosen and the expression was analyzed by qRT-PCR in the validation cohort of 63 mRCC patients from MMCI. Clinicopathological characteristics of both cohorts are summarized in Table 1.

2.2. Tissue Samples and RNA Isolation. Tumor tissue was provided as formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) samples. Total RNA enriched with small RNA was isolated using mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion, Austin, USA). Concentration and purity of the isolated RNA were determined spectrophotometrically using Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Rockford, USA).

2.3. Microarray Profiling. miRNAs profiling was conducted using TaqMan Low Density Array (TLDA) technology. Megaplex miRNA RT primers set (pools A and B, version 3.0, Applied Biosystems, Foster City, USA) and TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems)

were used for reverse transcription. Reactions were carried out according to the manufacturer's protocol. 667 miRNAs were simultaneously quantified using ABI 7900 HT Instrument (Applied Biosystems).

2.4. RT-PCR Quantification. Gene-specific primers were used in reverse transcription according to the TaqMan MicroRNA Assay protocol (Applied Biosystems). qRT-PCR was performed on ABI 7500 HT Instrument (Applied Biosystems) using the Applied Biosystems 7500 Sequence Detection System. TaqMan (NoUmpErase UNG) Universal PCR Master Mix and specific primer and probe mix (Applied Biosystems) for each miRNA were used. PCR reactions were run in duplicates, and average threshold cycles and SD values were calculated.

2.5. Data Normalization and Statistical Analysis. Expression data from TLDA profiling were normalized using miR-625*, which was uniformly expressed in all samples from screening cohort. Normalized miRNA expression data were evaluated using Bioconductor Limma differential expression analysis. *P* value lower than 0.01 was selected according to the potential of identified miRNAs to accurately discriminate responders and nonresponders in consequent HCL analysis. In validation phase of the study, average expression levels of miRNAs in RT-PCR quantification were normalized using miR-1233 as a reference gene. miR-1233 was selected according to our previous experience with normalization of renal cell carcinoma FFPE samples. Normalized expression data were

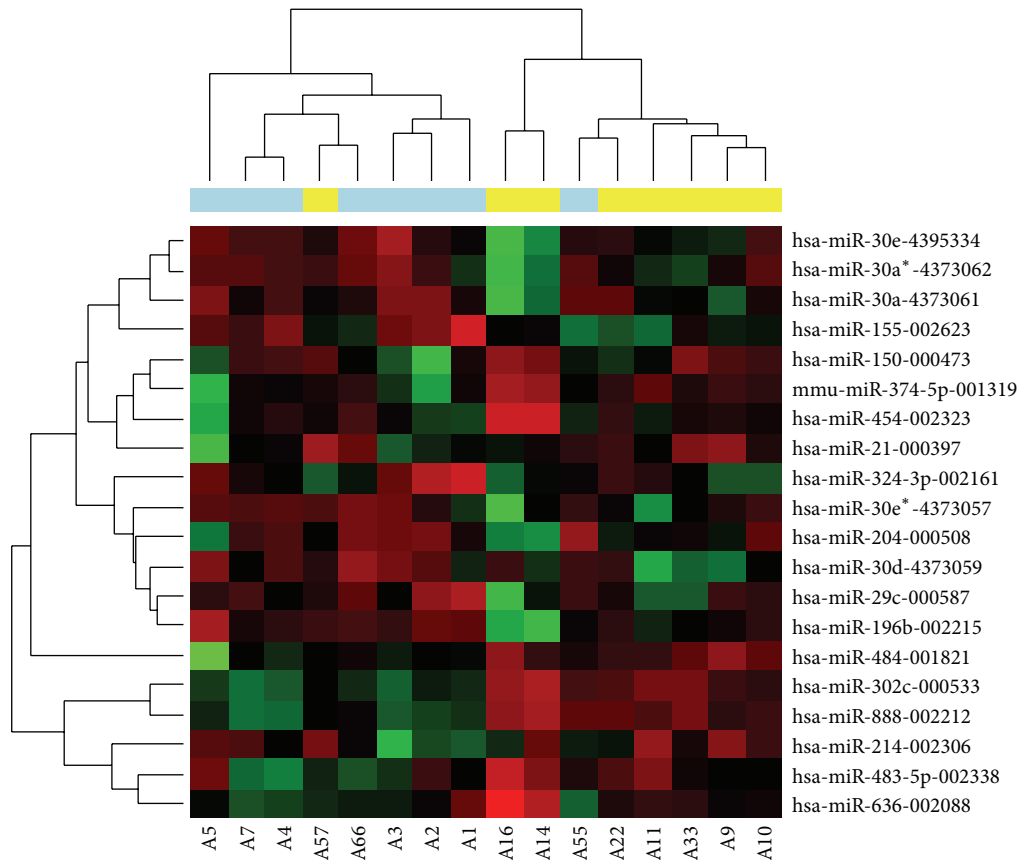


FIGURE 1: Hierarchical clustergram of miRNAs differentially expressed in sunitinib responding and nonresponding patients. Cluster analysis groups samples and miRNAs according to the expression similarity. miRNAs are in rows and samples in columns. Upregulated miRNAs are marked as red and downregulated miRNAs as green. Blue color indicates responders, yellow color indicates nonresponders. $P < 0.01$.

evaluated by ROC analysis (MedCalc 14.12.0) and Kaplan-Meier analysis followed by log-rank test (GraphPad Prism 5.03). P values lower than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Microarray Profiling Revealed 19 Differentially Expressed miRNAs between the Responders and Nonresponders Group. High-throughput miRNA analysis of tumor tissue of 16 patients treated with sunitinib belonging to either responding ($N = 8$) or nonresponding ($N = 8$) group was performed. Limma analysis of normalized expression data identified 19 miRNAs differentially expressed (Figure 1). Six miRNAs (miR-155, miR-374-5p, miR-324-3p, miR-484, miR-302c, and miR-888) were chosen as candidates for the verification using qRT-PCR (P value < 0.01 , $C_T < 35$).

3.2. Association between miR-155 and miR-484 Expression and Time to Progression in mRCC Treated with Sunitinib. The results obtained from the screening cohort were verified on the independent cohort ($N = 63$) by qRT-PCR. Normalized data were analyzed by ROC analysis and patients were separated into two groups according to the calculated criterion. Kaplan-Meier analysis revealed that lower level of miR-155

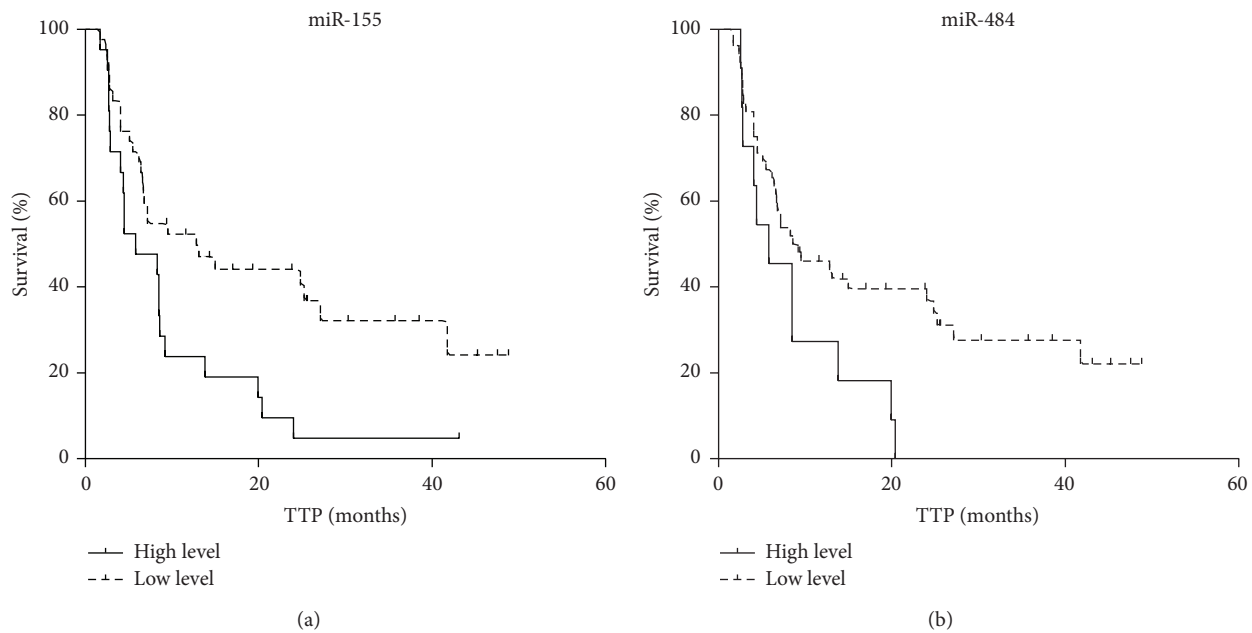
is associated with increased time to progression in patients on sunitinib treatment (Table 2 and Figure 2(a), median TTP 5.8 versus 12.8 months). Similar result was obtained for miR-484 (Table 2 and Figure 2(b), median TTP 5.8 versus 8.9 months). Kaplan-Meier plots of other miRNAs did not reach statistical significance, although some of them indicate potentially interesting trends (data not shown).

4. Discussion

Our findings suggest a link between two miRNAs (miR-155 and miR-484) and disease progression in mRCC patients treated with sunitinib. Tyrosine kinase inhibitors inhibit tyrosine kinase domains of growth factor receptors, albeit their main activity is promoted by the inhibition of VEGF receptor cascade, which leads to the decrease in blood tumor perfusion and to the inhibition of neovascularization. Tumors of TKI treatment-refractory patients are able to escape from the VEGFR blockade [1]. miR-155 is a potent oncomiR upregulated in diverse types of cancer including renal cancer [8, 9], which is in accordance with our findings. The role of miR-155 in angiogenesis is well described. Positive feedback loop between VEGF and miR-155 exists, and miR-155 decreases the expression of VHL tumor suppressor, a protein with ubiquitin ligase activity sequestering, for example, hypoxia-induced

TABLE 2: Validation of miR-155 and miR-484 on the independent cohort ($N = 63$) and their correlation with TTP (months).

	Number of patients ($N = 63$)	Median TTP (months)	Log-rank P	HR	95% CI
miR-155					
Low, <0.2381	42	12.8	0.0092	2.412	1.243–4.680
High, ≥ 0.2381	21	5.8			
miR-484					
Low, <1.4408	52	8.9	0.0296	2.623	1.100–6.254
High, ≥ 1.4408	11	5.8			

FIGURE 2: Kaplan-Meier survival curves estimating TTP in sunitinib treated mRCC patients ($N = 63$) according to miR-155 ((a); P value < 0.01) and miR-484 ((b); P value < 0.05) tumor tissue expression levels. Patients with low expression of the relevant miRNA are illustrated by dashed line.

factors (HIFs). Higher levels of HIFs promote expression of genes involved in angiogenesis, proliferation, and other aspects of the tumorigenesis, even in the condition of VEGFR blockade [10, 11].

Our data imply that patients with higher tissue expression of miR-155 have decreased time to progression on sunitinib treatment and thus limited benefit from the therapy. However, we have detected a discrepancy between the results obtained from the screening and independent cohort. TLDA screening indicated that the nonresponders from the screening group have lower expression of miR-155 than the responders. Opposite result was achieved by qRT-PCR in the independent cohort (data not shown). We suppose that a bias might occur due to a small number of the specimens analyzed by TLDA, which is also significant limitation of our study.

The expression of miR-484 in mRCC patients treated with sunitinib has already been noticed. Prior et al. described high tumor tissue levels of miR-484 as significantly associated with decreased TTP and overall survival [12]. Our findings are in agreement with this study.

Research in ovarian cancer proved that miR-484 is excreted from tumor cells as a paracrine regulator of tumor microenvironment [13] and it is also measurable in plasma [14, 15]. Therefore, it was found decreased in the tumor tissue [13] and increased in plasma [16]. However, adrenocortical cancer is typical with high tissue expression of miR-484 [17]. The role of this miRNA is probably diverse and depends on the tumor type and miRNA localization. Up to date, there are no reports of possible targets of miR-484 in renal cell carcinoma. Its paracrine function was described in ovarian cancer, where miR-484 targets VEGF B in tumor cells and VEGFR2 in adjacent endothelial cells [13]. Increased levels of miR-484 attenuate the intrinsic apoptotic pathway rising from mitochondria in anoxia, which was unveiled in experiments with myocardial infarction [18].

Independent validation of our results in responders and nonresponders to the sunitinib treatment on larger cohorts of patients and functional analysis of miR-155/miR-484 regulatory involvement in VEGFR signaling might help to understand the underlying mechanism of sunitinib resistance

and also prove the potential of these miRNAs to serve as a suitable predictive biomarkers in mRCC patients treated with sunitinib.

Conflict of Interests

The authors declare there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

The project was supported by MZCR NT/13547-4/2012, AZV NV15-34678A, CEITEC–Central European Institute of Technology (CZ.1.05/1.1.00/02.0068), the Project MZCR–RVO (MOU, 00209805), and The Ministry of Education, Youth and Sports for the Project BBMRI CZ (LM2010004).

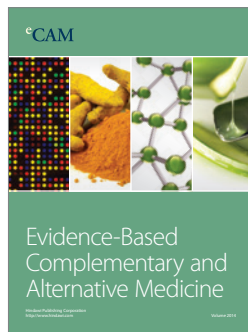
References

- [1] B. I. Rini and M. B. Atkins, “Resistance to targeted therapy in renal-cell carcinoma,” *The Lancet Oncology*, vol. 10, no. 10, pp. 992–1000, 2009.
- [2] A. Bex, B. K. Kroon, and R. de Bruijn, “Is there a role for neoadjuvant targeted therapy to downsize primary tumors for organ sparing strategies in renal cell carcinoma?” *International Journal of Surgical Oncology*, vol. 2012, Article ID 250479, 6 pages, 2012.
- [3] H. Mlcochova, R. Hezova, M. Stanik, and O. Slaby, “Urine microRNAs as potential noninvasive biomarkers in urologic cancers,” *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, vol. 32, no. 1, pp. 41.e1–41.e9, 2014.
- [4] C. Wang, J. Hu, M. Lu et al., “A panel of five serum miRNAs as a potential diagnostic tool for early-stage renal cell carcinoma,” *Scientific Reports*, vol. 5, article 7610, 2015.
- [5] P. J. Mishra, “MicroRNAs as promising biomarkers in cancer diagnostics,” *Biomarker Research*, vol. 2, no. 19, 2014.
- [6] T. F. Hansen, A. L. Carlsen, N. H. Heegaard, F. B. Sørensen, and A. Jakobsen, “Changes in circulating microRNA-126 during treatment with chemotherapy and bevacizumab predicts treatment response in patients with metastatic colorectal cancer,” *British Journal of Cancer*, vol. 112, no. 4, pp. 624–629, 2015.
- [7] N. M. A. White, T. T. Bao, J. Grigull et al., “MiRNA profiling for clear cell renal cell carcinoma: biomarker discovery and identification of potential controls and consequences of miRNA dysregulation,” *The Journal of Urology*, vol. 186, no. 3, pp. 1077–1083, 2011.
- [8] S. Li, T. Chen, Z. Zhong, Y. Wang, Y. Li, and X. Zhao, “MicroRNA-155 silencing inhibits proliferation and migration and induces apoptosis by upregulating BACH1 in renal cancer cells,” *Molecular Medicine Reports*, vol. 5, no. 4, pp. 949–954, 2012.
- [9] A. Wojcicka, A. Piekliko-Witkowska, H. Kedzierska et al., “Epigenetic regulation of thyroid hormone receptor beta in renal cancer,” *PLoS ONE*, vol. 9, no. 5, Article ID e97624, 2014.
- [10] S. Biswas, H. Troy, R. Leek et al., “Effects of HIF-1 α and HIF2 α on growth and metabolism of clear-cell renal cell carcinoma 786-0 xenografts,” *Journal of Oncology*, vol. 2010, Article ID 757908, 14 pages, 2010.
- [11] W. Kong, L. He, E. J. Richards et al., “Upregulation of miRNA-155 promotes tumour angiogenesis by targeting VHL and is associated with poor prognosis and triple-negative breast cancer,” *Oncogene*, vol. 33, no. 6, pp. 679–689, 2014.
- [12] C. Prior, J. L. Perez-Gracia, J. Garcia-Donas et al., “Identification of tissue microRNAs predictive of sunitinib activity in patients with metastatic renal cell carcinoma,” *PLoS ONE*, vol. 9, no. 1, Article ID e86263, 2014.
- [13] A. Vecchione, B. Belletti, F. Lovat et al., “A microRNA signature defines chemoresistance in ovarian cancer through modulation of angiogenesis,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, no. 24, pp. 9845–9850, 2013.
- [14] A. Li, J. Yu, H. Kim et al., “MicroRNA array analysis finds elevated serum miR-1290 accurately distinguishes patients with low-stage pancreatic cancer from healthy and disease controls,” *Clinical Cancer Research*, vol. 19, no. 13, pp. 3600–3610, 2013.
- [15] S. Zearo, E. Kim, Y. Zhu et al., “MicroRNA-484 is more highly expressed in serum of early breast cancer patients compared to healthy volunteers,” *BMC Cancer*, vol. 14, no. 1, article 200, 2014.
- [16] J. B. Kjersem, T. Ik Dahl, O. C. Lingjaerde, T. Guren, K. M. Tveit, and E. H. Kure, “Plasma microRNAs predicting clinical outcome in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line oxaliplatin-based treatment,” *Molecular Oncology*, vol. 8, no. 1, pp. 59–67, 2014.
- [17] E. I. Bimpaki, D. Iliopoulos, A. Moraitis, and C. A. Stratakis, “MicroRNA signature in massive macronodular adrenocortical disease and implications for adrenocortical tumorigenesis,” *Clinical Endocrinology*, vol. 72, no. 6, pp. 744–751, 2010.
- [18] K. Wang, B. Long, J.-Q. Jiao et al., “MiR-484 regulates mitochondrial network through targeting Fis1,” *Nature Communications*, vol. 3, article 781, 2012.



Hindawi

Submit your manuscripts at
<http://www.hindawi.com>





Aripiprazole-induced adverse metabolic alterations in polyI:C neurodevelopmental model of schizophrenia in rats



Katerina Horska^a, Jana Ruda-Kucerova^{b,*}, Eva Drazanova^{b,c}, Michal Karpisek^{a,d}, Regina Demlova^b, Tomas Kasperek^e, Hana Kotolova^a

^a Department of Human Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

^b Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

^c Institute of Scientific Instruments, ASCR, Brno, Czech Republic

^d R&D Department, Biovondor - Laboratorni Medicina, Brno, Czech Republic

^e Department of Psychiatry, University Hospital and Masaryk University, Brno, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 February 2017

Received in revised form

16 May 2017

Accepted 3 June 2017

Keywords:

Adipokine

Aripiprazole

Leptin

Lipid profile

PolyI:C

Schizophrenia

Wistar rats

ABSTRACT

Schizophrenia appears to be linked to higher incidence of metabolic syndrome even in the absence of antipsychotic treatment. Atypical antipsychotics substantially differ in their propensity to induce metabolic alterations. Aripiprazole is considered to represent an antipsychotic drug with low risk of metabolic syndrome development. The aim of this study was to evaluate metabolic phenotype of neurodevelopmental polyI:C rat model and assess metabolic effects of chronic aripiprazole treatment with regard to complex neuroendocrine regulations of energy homeostasis. Polyinosinic:polycytidylic acid (polyI:C) was administered subcutaneously at a dose of 8 mg/kg in 10 ml on gestational day 15 to female Wistar rats. For this study 20 polyI:C and 20 control adult male offspring were used, randomly divided into 2 groups per 10 animals for chronic aripiprazole treatment and vehicle. Aripiprazole (5 mg/kg, dissolved tablets, ABILIFY®) was administered once daily via oral gavage for a month. Altered lipid profile in polyI:C model was observed and a trend towards different dynamics of weight gain in polyI:C rats was noted in the absence of significant antipsychotic treatment effect. PolyI:C model was not associated with changes in other parameters i.e. adipokines, gastrointestinal hormones and cytokines levels. Aripiprazole did not influence body weight but it induced alterations in neurohumoral regulations. Leptin and GLP-1 serum levels were significantly reduced, while ghrelin level was elevated. Furthermore aripiprazole decreased serum levels of pro-inflammatory cytokines. Our data indicate dysregulation of adipokines and gastrointestinal hormones present after chronic treatment with aripiprazole which is considered metabolically neutral in the polyI:C model of schizophrenia.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Atypical antipsychotics, drugs with indisputable benefits in the treatment of a wide spectrum of psychiatric disorders, substantially differ in their propensity to induce metabolic alterations including weight gain, dyslipidemia, impaired glucose tolerance or insulin resistance, yet the underlying pathophysiological mechanisms are complex and have not been fully elucidated (Henderson et al., 2015). Aripiprazole (ARI) is considered a metabolically neutral antipsychotic agent with low risk of metabolic syndrome

* Corresponding author. Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic.

E-mail address: jkucer@med.muni.cz (J. Ruda-Kucerova).

development (Kasteng et al., 2011; Nasrallah et al., 2016). Switching to antipsychotics characterized by lower propensity to induce metabolic dysregulation represents one of the recommended strategies to reduce cardio-metabolic risk in patients experiencing metabolic alterations during antipsychotic treatment (American Diabetes Association et al., 2004). This approach is supported by clinical data as switching from olanzapine to ARI led to weight reduction and a decrease in cholesterol and triglyceride serum levels (Newcomer et al., 2008; Stroup et al., 2011; Takeuchi et al., 2010). However, ARI was also reported to induce significant weight gain (Malla et al., 2016).

In addition, there is evidence that antipsychotic-naïve first episode schizophrenia patients are more prone to metabolic abnormalities (Enez Darcin et al., 2015). Therefore, it seems that

schizophrenia *per se* is linked to higher incidence of metabolic syndrome development (Kritharides et al., 2016; Kucerova et al., 2015; Malan-Müller et al., 2016) and as the common underlying pathophysiology of schizophrenia and metabolic syndrome distorted inflammatory pathways have been suggested (Leonard et al., 2012). Pro-inflammatory cytokines have been implicated in etiology of neuropsychiatric disorders, while the low-grade pro-inflammatory state is associated with obesity, diabetes mellitus and cardiovascular morbidity (Aguilar-Valles et al., 2015; Reisinger et al., 2015).

The neurodevelopmental theory of schizophrenia postulates the association between the pre- and perinatal environmental factors such as prenatal infection, subsequent maternal immune activation and later risk of schizophrenia (Canetta and Brown, 2012; Ratnayake and Hill, 2016). This provides a concept for chronic neurodevelopmental animal models of neuropsychiatric disorders such as *in utero* exposure to a viral mimetic agent polyinosinic:polycytidylic acid (polyI:C) (Meyer and Feldon, 2012; Reisinger et al., 2015). Neurodevelopmental models of schizophrenia have several advantages over other types of preclinical models as the condition of the animals is chronic and reflects several aspects of schizophrenia-related symptomatology and pathophysiology (Micale et al., 2013). The polyI:C model is widely recognized and considered suitable for basic and translational schizophrenia research (Meyer and Feldon, 2012; Ratnayake and Hill, 2016).

Similarly as in human it could be assumed that schizophrenic-like phenotype in rodent models may involve intrinsic vulnerability to metabolic disturbances and susceptibility to metabolic alterations induced by antipsychotic medication further proving the validity and translational potential of the models (Kucerova et al., 2015). So far, preclinical research has extensively addressed metabolic effects of atypical antipsychotics (AAP) (Boyda et al., 2010) but despite the high clinical relevance, there is a lack of studies assessing the relation between metabolic abnormalities and schizophrenia-like phenotype in rodents *per se*. Moreover, to the best of our knowledge, metabolic abnormalities induced by antipsychotic treatment have not been evaluated in rodent schizophrenia-like models yet.

Furthermore, metabolic alterations after chronic ARI exposure in healthy rodents have been investigated less intensely compared to other antipsychotic agents (Boyda et al., 2010). Therefore, the need to focus on evaluating metabolic dysregulation also in antipsychotics carrying lower metabolic risks has been expressed (Erslund et al., 2015) and this approach may also contribute to better understanding of the underlying mechanisms. In rodent experiments, metabolic abnormalities induced by antipsychotics, specifically weight gain, glucose metabolism dysregulation and altered lipid profile have been described (Boyda et al., 2010). Nevertheless, the frequently inconsistent findings do not allow definite conclusions on the potential pathophysiological mechanisms likely due to methodological heterogeneity. More recently, the attention in this field has been drawn to complex energy homeostasis regulation and the role of adipokines, gastrointestinal hormones and other modulators, yet few preclinical studies have assessed these putative alterations with regard to antipsychotic treatment (Horska et al., 2016, 2017; Skrede et al., 2012; Zhang et al., 2013).

The aim of this study is to evaluate metabolic phenotype of polyI:C rat model and assess metabolic effects of chronic ARI treatment with regard to complex neuroendocrine regulations of energy homeostasis. Thus, in this study we analyzed apart from basic serum biochemical parameters a spectrum of gastrointestinal hormones, adipokines and markers of inflammation. This includes leptin, ghrelin, glucagon-like peptide 1 (GLP-1), glucagon, fibroblast

growth factor 21 (FGF-21) and pro-inflammatory cytokines – interleukin 1 and 6 (IL-1, IL-6) and tumor necrosis factor α (TNF- α). These hormones are involved in energy homeostasis regulations and associated with obesity and insulin resistance (Blüher and Mantzoros, 2015; Quarta et al., 2016). The role of cytokines in energy homeostasis is well-described (Fontana et al., 2007; Glund and Krook, 2008) and it is highly relevant in a model based on a pre-natal pro-inflammatory insult.

We hypothesized that the polyI:C model may possess intrinsic metabolic derangements as a part of the schizophrenia-like phenotype and ARI treatment may induce dysregulations in the metabolic parameters to a higher extent in the polyI:C animals even in the absence of significant changes in body weight. This study was designed to assess potential metabolic disturbances present in the polyI:C model *per se*, the effect of ARI on metabolic variables in normal rats and the possible interaction between the polyI:C model and ARI treatment.

2. Material and methods

2.1. Animals

Adult male and female Wistar rats were purchased from the Masaryk University breeding facility (Brno, Czech Republic) and time-mated. Polyinosinic:polycytidylic acid (polyI:C) was administered at a dose of 8 mg/kg in 10 ml subcutaneously on a gestational day (GD) 15 to 11 rats, while vehicle (saline) was injected to 10 control rats. The average surviving litter size was $n = 10.5$ in both control and polyI:C treated mothers. The average proportion of male and female offspring was 52% of males and 48% of females. No cross-fostering was used, the mothers were regularly weighed and no differences were observed between control and polyI:C treated mothers. The offspring were weaned on a postnatal day (PND) 22 and group-housed.

For this study 20 polyI:C and 20 control male offspring weighing 250–350 g were used. The polyI:C and control rats were randomly divided into 2 groups per 10 animals for chronic (28 days) ARI treatment or vehicle control. The treatment was initiated when the animals were 11 weeks old. All animals were pair-housed in standard polycarbonate housing cages. Environmental conditions during the whole study were constant: relative humidity 50–60%, temperature $23 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, normal 12-h light-dark cycle (6 a.m.–6 p.m. light). Standard rodent chow and water were available *ad libitum*. All procedures were performed in accordance with EU Directive no. 2010/63/EU and approved by the Animal Care Committee of the Faculty of Medicine, Masaryk University, Czech Republic and Czech Governmental Animal Care Committee, in compliance with Czech Animal Protection Act No. 246/1992.

2.2. Drugs and treatments

PolyI:C was purchased from Sigma-Aldrich spol. s.r.o., Prague, Czech Republic as a sodium salt and dissolved in saline to obtain a concentration of 8 mg/kg in 10 ml. Subcutaneous administration of 8 mg/kg on gestational day 15 was chosen according to validated protocol using a Wistar strain of rats (Missault et al., 2014). This protocol was validated but the complex schizophrenia-like phenotype was not assessed in this study due to concerns about non-standard energy expenditure and stress related to behavioural testing which may bias the metabolic data. However, this is a limitation of the study.

Aripiprazole (ARI) was obtained as ready-made preparation for human use in tablets (ABILIFY® non-coated tablets, 15 mg, Otsuka Pharmaceutical Europe Ltd., GB). The solution was prepared by dissolving the tablets to obtain ARI dose of 5 mg/kg in 1 ml. The

solvent vehicle (VEH) was purified water. All solutions were freshly prepared on the day of administration and both, ARI and water were administered once daily via oral gavage. The ARI dose was chosen based on our pilot experiments, when higher than 5 mg/kg doses administered orally produced apparent sedation. Importantly, ARI has a distinct pharmacokinetics and consequently pharmacodynamic actions in rats as it is extensively metabolized and, compared to human, different metabolites with the dissimilar pharmacological profile are formed in the rat (Wood et al., 2006). However, a relevant *in vivo* D2 receptor occupancy was reported already after 2.5 mg/kg given subcutaneously in rats (Wadenberg, 2007).

2.3. Body weight recording and analysis

Body weight (BW) was recorded daily in all animals and cumulative weight gain was calculated by subtracting the BW recorded the day before ARI treatment commencement from the subsequent values obtained in the following 28 days.

2.4. Treatment groups and sample collection

The rats were sacrificed immediately after completing the chronic treatment schedule (28 days) by decapitation under isoflurane inhalation anesthesia. The blood was collected and centrifuged to obtain serum. The serum samples were frozen in -70°C before being used to assay the basic biochemical parameters and hormonal levels.

2.5. Biochemical assays

Basic biochemical parameters were determined spectrophotometrically (Dimension Xpand Plus[®], kits Siemens[®]). The markers assayed were: total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol (LDL), high-density lipoprotein cholesterol (HDL), triglycerides (TAG), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). Adipokines, hormones and cytokines: leptin, ghrelin, glucagon like peptide-1 (GLP-1), glucagon, interleukins IL-1 α and IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF) and fibroblast growth factor-21 (FGF-21), were assessed using Bio-Plex[®] Multiplex System (immunoassay kits Bio-Rad[®]) and by immunochemical method (ELISA) using commercial sets (BioVendor[®]).

2.6. Statistical data analysis

Primary data were summarized using arithmetic mean and standard deviation (\pm SD). The cumulative body weight gain data were analyzed by repeated measures ANOVA with the factors of ARI treatment and polyI:C model while the day was the repeated factor, Tukey post-test was used when significant differences were detected. Basal and final BW, total BW gain, biochemical and adipokine parameters were evaluated by two-way ANOVA, factors: polyI:C model and ARI treatment, the dataset was distributed normally (Kolmogorov-Smirnov test of normality). The Pearson's correlation was calculated for identification of interrelationships among leptin, ghrelin, GLP-1 and glucagon. All analyses were calculated using Statistica 12 (StatSoft, USA). A value $p < 0.05$ was recognized as the boundary of statistical significance in all applied tests.

3. Results

Body weight data are depicted in Fig. 1. There was found no significant difference between the groups both before and after chronic ARI treatment (two-way ANOVA, n.s.). However, in the total

body weight (BW) gain a weak trend towards lower gain in the polyI:C model was identified (two-way ANOVA, the main effect of the model, $F_{(1,32)} = 3.161$, $p = 0.085$). To assess possibly different dynamics of the weight gain, daily cumulative BW gain was calculated. Repeated measures ANOVA revealed a significant day*polyI:C model interaction ($F_{(27,864)} = 1.7988$, $p = 0.0078$) suggesting slower BW gain in the polyI:C prenatally challenged rats but Tukey post-hoc test did not reveal any specific day of a significant difference.

Fig. 2 shows the serum lipid profile. Two-way ANOVA identified a significant effect of the polyI:C model in total cholesterol levels: $F_{(1,35)} = 4.953$, $p = 0.033$, Tukey post-hoc test: $p = 0.033$. Total cholesterol was elevated in polyI:C rats and similar data were recorded in LDL levels: significant effect of the polyI:C model, $F_{(1,35)} = 5.968$, $p = 0.020$, Tukey post-hoc test, $p = 0.017$ and HDL levels: significant effect of the polyI:C model, $F_{(1,35)} = 4.368$, $p = 0.044$, Tukey post-hoc test, $p = 0.043$. There were no significant differences in TAG levels. Furthermore, in order to evaluate possible interrelationships among the lipid profile variables, atherogenic index (AI) and atherogenic index of plasma (AIP), were calculated as total cholesterol/HDL and $\log(\text{TAG}/\text{HDL})$, respectively. Despite we found a significant influence of the polyI:C model on cholesterol parameters, two-way ANOVA analysis of AI revealed a significant effect of ARI treatment: $F_{(1,32)} = 17.670$, $p = 0.0002$, Tukey post-hoc test, $p = 0.0004$ but no influence of the polyI:C model. There was no difference in the AIP measure. To provide a complete overview of data, mean values of all lipid parameters \pm SD are shown in Table 1.

Markers of hepatic functions (ALT and AST) were not elevated after chronic ARI treatment (data not shown).

Levels of adipokines, cytokines and hormones in all groups are depicted in Fig. 3. Two-way ANOVA did not detect a significant effect of the polyI:C model in any of the markers. Interestingly, the interaction between the two factors, i.e. polyI:C model and ARI treatment, was not found to be significant in any marker either. However, there were numerous changes induced by the chronic ARI treatment.

Specifically, leptin level was decreased after ARI treatment in both polyI:C and control rats: two-way ANOVA: $F_{(1,29)} = 5.761$, $p = 0.023$, Tukey post-hoc test, $p = 0.022$. Similarly, two-way ANOVA showed a decrease of GLP-1 in both ARI groups: $F_{(1,31)} = 11.890$, $p = 0.002$, Tukey post-hoc test, $p = 0.002$. However, ghrelin showed an opposite trend and was elevated after ARI treatment disregarding the model, two-way ANOVA: $F_{(1,29)} = 26.041$, $p = 0.00002$, Tukey post-hoc test, $p = 0.0002$ and glucagon was not found to be different in any group probably due to high variability in the data. Importantly, significant correlations were identified between GLP-1 and leptin/glucagon levels, see Table 2.

All assayed markers of inflammation were suppressed by ARI administration (two-way ANOVA: significant effect of treatment) while polyI:C model *per se* did not lead to systemic inflammation (two-way ANOVA: no effect of the model). The specific results of statistical analysis follow. IL-1 α : two-way ANOVA, significant effect of treatment $F_{(1,30)} = 16.570$, $p = 0.0003$, Tukey post-hoc test: $p = 0.0004$. IL-6: two-way ANOVA, significant effect of treatment $F_{(1,30)} = 6.924$, $p = 0.013$, Tukey post-hoc test: $p = 0.012$. TNF- α : two-way ANOVA, significant effect of treatment $F_{(1,30)} = 4.601$, $p = 0.040$, Tukey post-hoc test: $p = 0.027$.

Lastly, levels of FGF-21 did not differ among the experimental groups.

4. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study focused on comprehensive metabolic profile characterization of

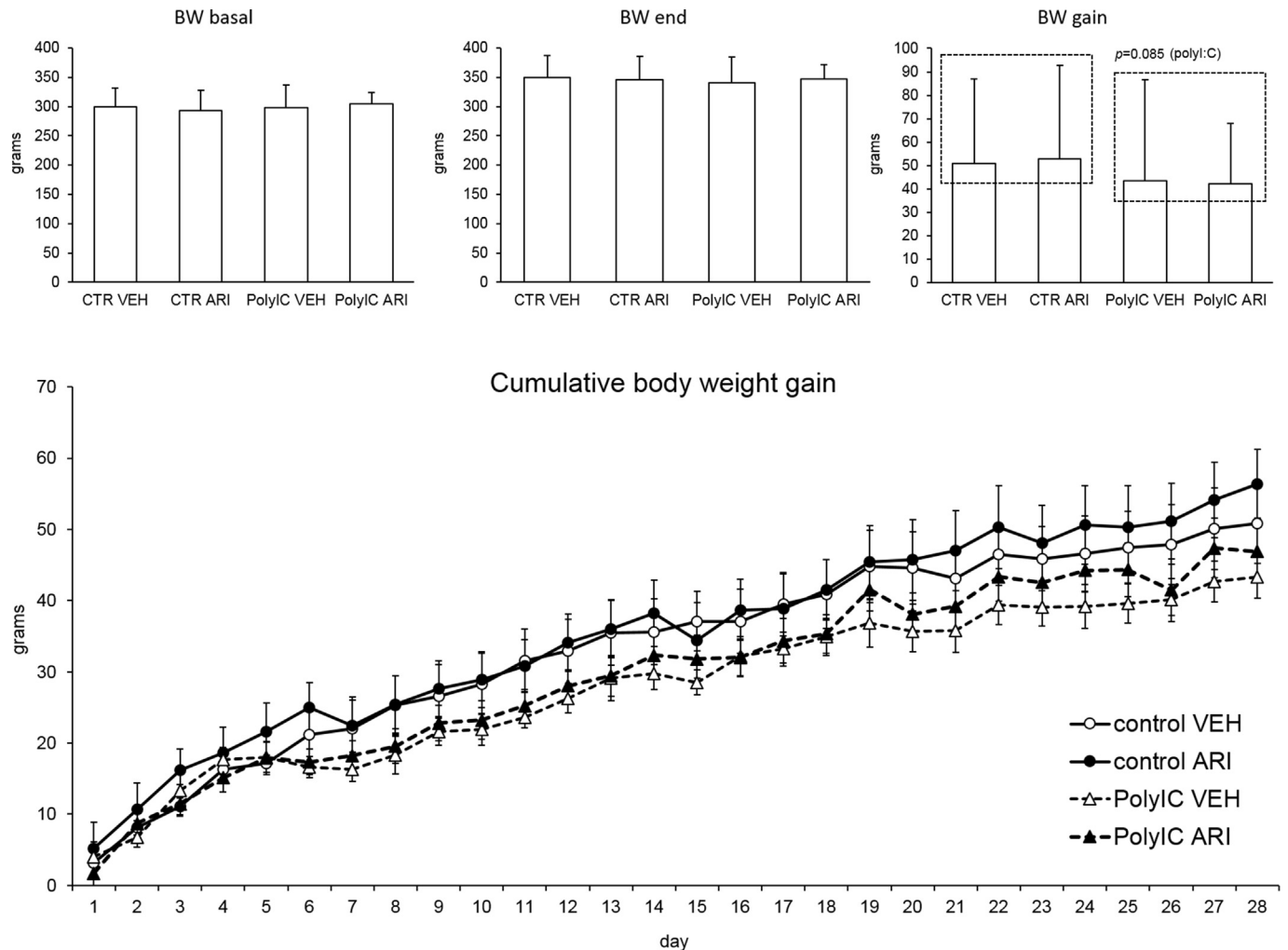


Fig. 1. Body weight analysis. The bar graphs indicate mean \pm SD levels of: basal body weight (BW), i.e. BW one day before commencing the aripiprazole treatment; BW at the end of the study, i.e. after 28 days of the treatment; and total BW gain over the course of the study. Two-way ANOVA did not detect any significant difference among the groups besides a trend to lower body weight gain in the polyI:C model ($p = 0.085$, the factor is indicated in brackets). Daily cumulative BW gain did not show any difference either (repeated measures ANOVA, n.s.).

schizophrenia-like phenotype in rodents. Below we discuss the observed metabolic alterations following chronic ARI treatment in the polyI:C neurodevelopmental model in rats taking into account the value of polyI:C model for the study of the metabolic disturbances related to the schizophrenia-like phenotype and effect of ARI.

4.1. Body weight and lipid profile

In our study, a trend towards different dynamics of weight gain in polyI:C rats was observed, showing non-significantly lower body weight gains compared to healthy animals in the absence of the antipsychotic treatment effect. Further polyI:C model was associated with alterations in lipid profile. ARI treatment did not induce significant weight gain during the course of the experiment.

Only few animal studies have evaluated metabolic effects of ARI with inconsistent findings. Specifically, a study by Han et al. (2008) found no effect of chronic ARI (2.25 mg/kg/day) treatment on body weight or fat deposits in female Sprague-Dawley rats (Han et al., 2008). Interestingly, body weight gain was reported after one-week treatment of ARI (at a similar oral dose as in our study) in female Wistar but not in female Sprague-Dawley rats (Kalinichev

et al., 2005). This may indicate that Wistar rat strain is well suited for modeling ARI-induced metabolic disturbances. In male Sprague-Dawley rats 10-week ARI treatment at a similar dose as in our experiment did not lead to significant changes in body weight (De Santis et al., 2014).

Of note, for AAP-induced weight gain modeling female rats are considered more susceptible than male rats, whereas other metabolic derangements, e.g. increased adiposity have been reported in male animals (Boyda et al., 2010). In this regard, lipogenic activation in the liver after chronic olanzapine exposure and adverse lipid spectrum were reported in male rats without concomitant weight gain (Ferno et al., 2015). Since we focused primary on possible metabolic derangements not secondary to weight gain, in our study we also used male rats. Moreover, the polyI:C model is well validated in male offspring while in females the phenotype seems to be less affected (Reisinger et al., 2015; Zhang et al., 2012).

Interestingly, after chronic ARI exposure unchanged triglyceride but decreased cholesterol parameters were found in female rats, in contrast to weight-independently elevated triglycerides in olanzapine-treated rats (Skrede et al., 2012). In line with these findings, our data show no alterations in triglyceride level. Contrary to the aforementioned findings, in our experiment we noted no

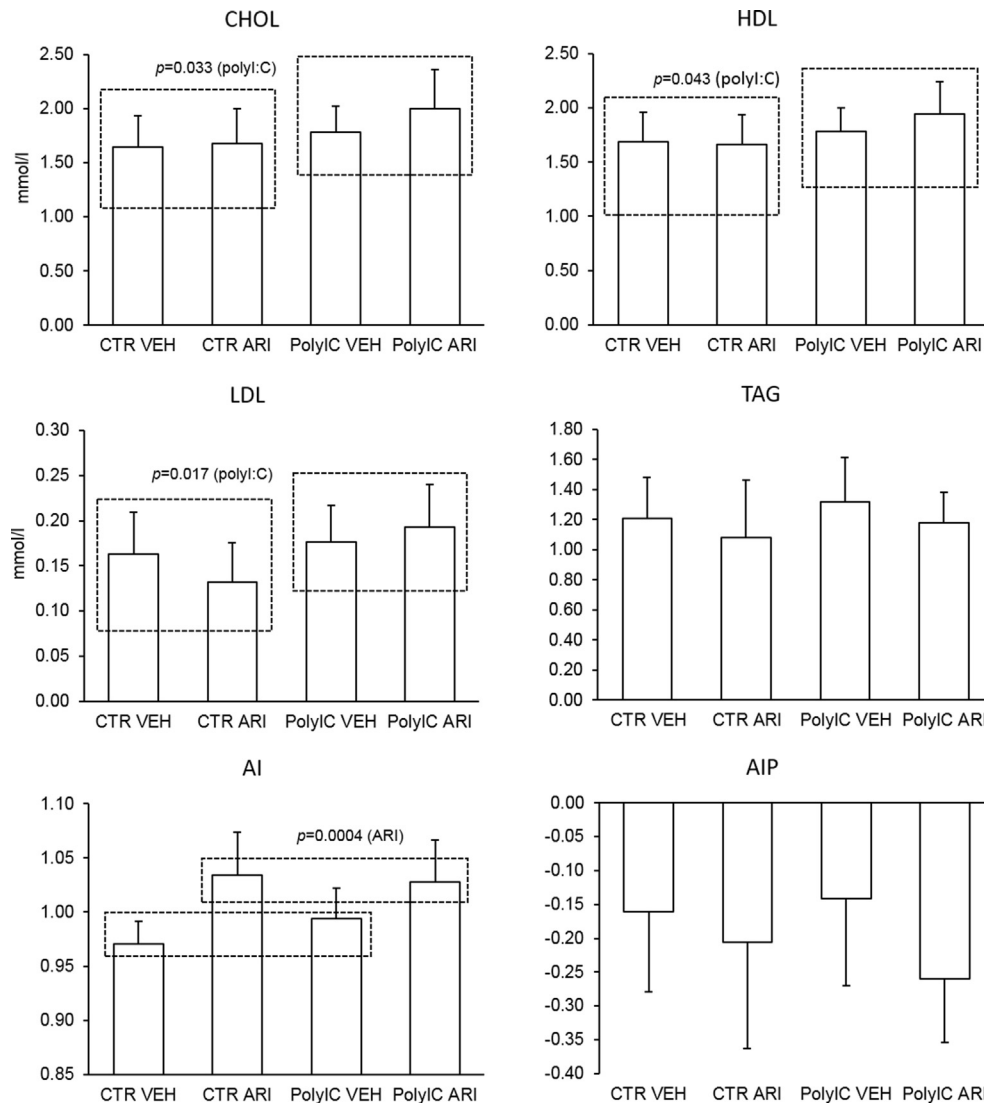


Fig. 2. Serum lipid profile. The bar graphs indicate mean \pm SD levels of total cholesterol (CHOL), HDL, LDL, triacylglycerides (TAG), atherogenic index (AI) and atherogenic index of plasma (AIP). Two-way ANOVA identified a significant effect of the polyI:C model which increased total cholesterol, HDL and LDL while ARI treatment did not show any influence. ARI was shown to have a significant increasing effect on AI while the model did not influence this parameter. All significant differences are marked by the dotted lines which pool the groups depending on the factor for which two-way ANOVA revealed a significant effect (the factor is indicated in brackets). The lipid parameters are reported as mmol/l.

Table 1
Serum lipid levels. The table indicates mean \pm SD levels of total cholesterol (CHOL), HDL, LDL, triacylglycerides (TAG), atherogenic index (AI) and atherogenic index of plasma (AIP). The grey background color indicates the statistically significant factor (either polyI:C model or ARI treatment). For details see the Results.

model	treatment	CHOL	HDL	LDL	TAG	AI	AIP
CTR	VEH	1.64 \pm 0.29	1.69 \pm 0.27	0.16 \pm 0.05	1.21 \pm 0.27	0.97 \pm 0.02	-0.06 \pm 0.12
	ARI	1.67 \pm 0.33	1.66 \pm 0.27	0.13 \pm 0.04	1.08 \pm 0.04	1.03 \pm 0.04	-0.21 \pm 0.16
PolyI:C	VEH	1.78 \pm 0.24	1.79 \pm 0.21	0.18 \pm 0.04	1.32 \pm 0.30	0.99 \pm 0.03	-0.14 \pm 0.13
	ARI	2.00 \pm 0.36	1.94 \pm 0.30	0.19 \pm 0.20	1.18 \pm 0.20	1.03 \pm 0.04	-0.26 \pm 0.09

changes in cholesterol serum levels associated with ARI treatment. Since another study found no alteration in body weight or lipid parameters in male rats after chronic ARI treatment (Cai et al., 2015), the inconsistency might be related to the gender specific metabolic effects of AAP. However, in our experiment we observed that ARI treatment led to significantly elevated atherogenic index in both healthy and polyI:C prenatally exposed animals.

The risk of AAP-induced dyslipidemia observed in clinic varies

among specific agents (American Diabetes Association et al., 2004; Newcomer et al., 2008; Stroup et al., 2011; Takeuchi et al., 2015) and several mechanisms have been suggested including direct weight-independent effects (Cai et al., 2015; Henderson et al., 2015; Yan et al., 2013). It has been demonstrated that AAP exert a direct action on lipid and cholesterol metabolism in primary rat hepatocytes cultures. While olanzapine exposure induced de novo lipogenesis with a significant increase in triglycerides, cholesterol and

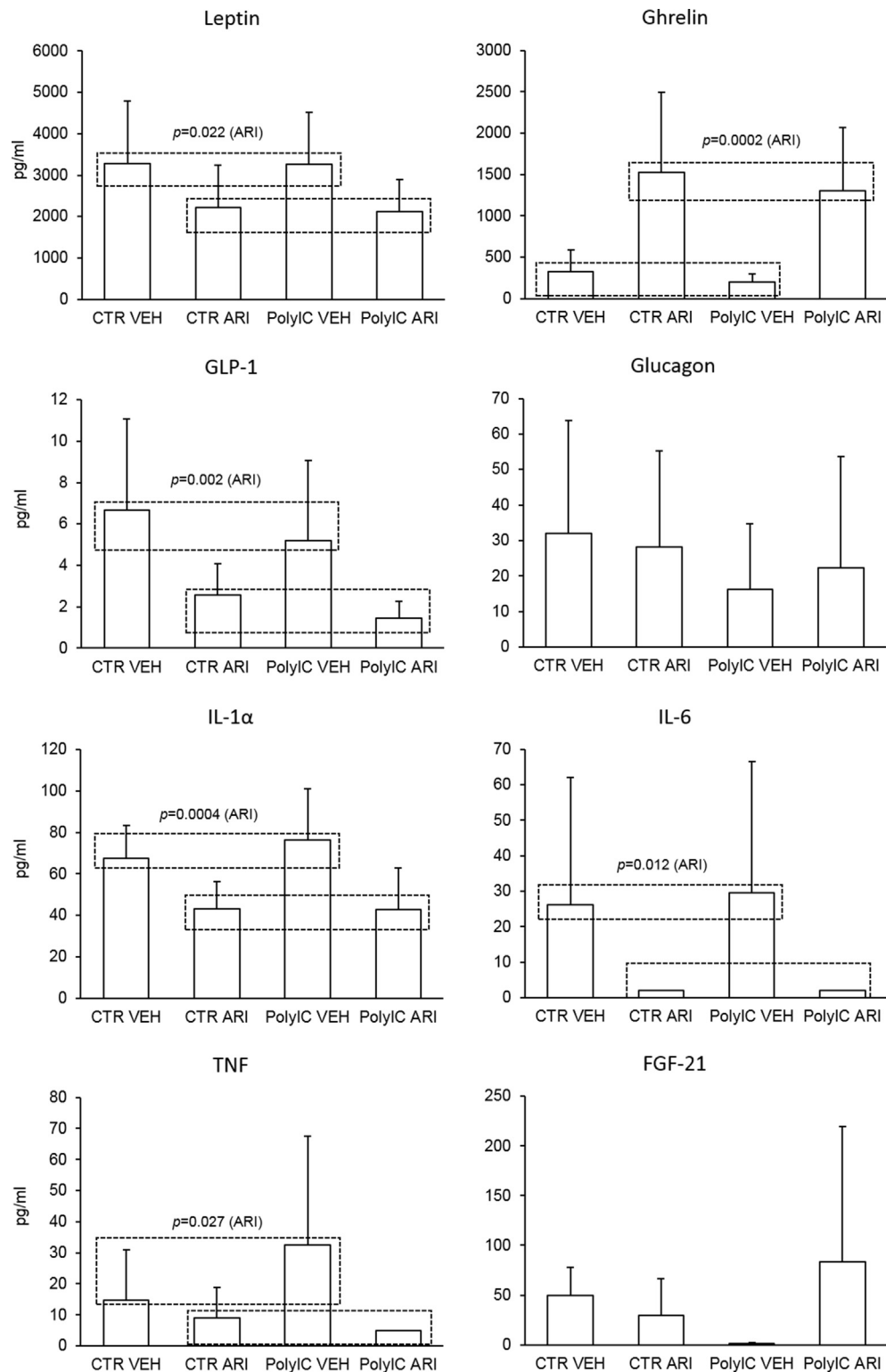


Fig. 3. Adipokines, hormones and cytokines. The graphs indicate mean \pm SD serum levels of hormones, cytokines and adipokines. Two-way ANOVA identified a significant effect of the ARI treatment only, the model did not show an influence. Ghrelin was increased by the ARI treatment in both groups of polyI:C rats and their control counterparts. An opposite effect is visible in leptin, GLP-1, IL-1 α , IL-6 and TNF- α where the levels were decreased by the ARI treatment. All significant differences are marked by the dotted lines which pool the groups depending on the factor for which two-way ANOVA revealed a significant effect (the factor is indicated in brackets). All parameters are reported as pg/ml.

phospholipids, ARI decreased synthesis of cholesterol and had no effect on triglycerides (Laouressergues et al., 2010). Preclinical *in vivo* experiments appear to be consistent with these findings, since comparable olanzapine and risperidone effects on the triglyceride

serum level were convincingly demonstrated in rodents (Cai et al., 2015; Horská et al., 2016, 2017; Skrede et al., 2012).

Further, an altered lipid profile in polyI:C model was revealed, since virtually all cholesterol parameters were significantly

Table 2
Correlation analysis. The table indicates results of Pearson's correlation calculated for identification of interrelationships among leptin, ghrelin, GLP-1 and glucagon (r, correlation coefficient; #p = 0.05, ##p = 0.01, significant results are marked bold).

model	treatment	GLP-1 vs. leptin			GLP-1 vs. glucagon		
		r	p	#	r	p	#
control	vehicle	r = 0.733	p = 0.038	#	r = 0.779	p = 0.023	#
	aripiprazole	r = 0.256	p = 0.624	n.s.	r = 0.948	p = 0.004	##
PolyI:C	vehicle	r = -0.427	p = 0.251	n.s.	r = 0.438	p = 0.238	n.s.
	aripiprazole	r = 0.668	p = -0.200	n.s.	r = -0.387	p = 0.391	n.s.

increased in the absence of the effect of ARI treatment. The pathophysiological basis of the observed lipid metabolism dysregulation could be linked to maternal immune activation following polyI:C exposure. The maternal pro-inflammatory state with altered interleukin production might have led to phenotype covering hyperlipidemia in the offspring, even though we observed no concomitant increases in cytokine levels in our study.

Consequently, an altered lipid profile might represent a trait of the phenotype of polyI:C neurodevelopmental schizophrenia-like model. The shared genetic link between schizophrenia and cardiovascular risk factors, specifically dyslipidemia, has been unraveled (Andreassen et al., 2013) and the increasing evidence of the genetic overlap between schizophrenia and lipid homeostasis has been recently reviewed (Steen et al., 2016). The polymorphism in lipid biosynthesis related genes has been also suggested as a factor influencing inter-individual variability to AAP-induced metabolic syndrome (Yang et al., 2016). The genetic association between schizophrenia and cardiovascular risk factors is strong; however, the pathophysiology involves environmental influences and interacting inflammatory, hormonal, endothelial and other mechanisms (Dieset et al., 2016).

4.2. Cytokines

Importantly, in our study the polyI:C prenatal exposure was not related to the apparent pro-inflammatory state, since no alterations were observed in IL-1, IL-6 and TNF- α serum levels. The association between the immune system and schizophrenia is strong (Ole, 2017). A low-grade inflammatory state is consistently reported in the acute phase of schizophrenia, some cytokines are considered as trait markers (Miller et al., 2011). However, results of our study indicate that this clinical finding is not reflected in the polyI:C model.

The long-term antipsychotic treatment modulates the immune system in schizophrenia and attenuates the pro-inflammatory signaling (Leonard et al., 2012; Meyer et al., 2011; Miller et al., 2011). This reported also a clinical trial after switching the patients from a variety of antipsychotics to ARI after the first month of therapy (Sobiś et al., 2015). In our study, the same effect of ARI treatment was observed, all of the assayed pro-inflammatory cytokines were significantly decreased. Nevertheless, it is in contrast to findings of our previous studies with depot risperidone and olanzapine in healthy rats; the treatment did not consistently affect these parameters (Horska et al., 2016, 2017). However, another study reported increased adiposity and low-grade inflammatory state after chronic olanzapine, with increased TNF- α expression in adipose tissue while plasma levels of TNF- α and IL-1 were not affected (Victoriano et al., 2010). Also in human adipocytes pro-inflammatory and lipogenic gene expression was induced by AAP including ARI (Sarvari et al., 2014). Taken together, it seems that anti-inflammatory effects of long-term AAP administration are not convincingly demonstrated in rodents with the exception of our study with ARI. Noteworthy, cytokine data presented in all of the above mentioned preclinical studies exhibit an extremely high

variability and an experiment with a substantially higher number of subjects may provide conclusive results.

Moreover, the cytokine-mediated model of antipsychotic-induced weight gain has been recently considered (Fonseka et al., 2016). Yet, the immune–neuroendocrine interactions are more intricate as the regulatory effects of cytokines on adipokines e.g. leptin action have been described (Trujillo et al., 2004), while leptin is involved in immune-system modulation (Procaccini et al., 2017) and metabolic regulations discussed in the following section.

4.3. Adipokines and gastrointestinal hormones

This study, as far as we know, is the first one focused on metabolic regulations and analysis of adipokine and hormone levels in polyI:C or another neurodevelopmental model of schizophrenia. The polyI:C induced phenotype was not characterized by significantly altered adipokine and gastrointestinal hormone serum level profile, while the effect of ARI treatment was revealed. ARI significantly reduced leptin and GLP-1 serum levels, while ghrelin level was elevated. Moreover, based on the correlation analysis, both polyI:C model and ARI treatment disrupted the interrelationship in hormone/adipokine regulations.

4.3.1. Leptin

In clinical settings, increased leptin is consistently reported in patients with schizophrenia and this finding was recently interpreted as not exclusively associated with antipsychotic treatment, although it was concluded that atypical antipsychotics may possess an additional risk (Stubbs et al., 2016). However, also ARI elevated leptin serum level in medication-naïve first-episode psychosis patients after the first three months of treatment (Pérez-Iglesias et al., 2014). Data from preclinical studies on comprehensive evaluation of antipsychotic-induced alterations in metabolically relevant hormones are limited. The majority of the studies focused on metabolic adverse effects induced by olanzapine as antipsychotic carrying high metabolic risks and particularly leptin, more recently ghrelin received attention (Skrede et al., 2012; Zhang et al., 2013). In our previous experiment, depot olanzapine treatment increased leptin level and even caused pronounced early leptin dysregulation in the absence of increased adiposity. We proposed that possibly due to methodological issues the long-term olanzapine effect on leptin level in other rodent studies was reported inconsistently either as elevated or unchanged (Horska et al., 2016). Chronic ARI treatment (6 mg/kg/day orally for two weeks) did not affect leptin level in female Sprague-Dawley rats (Skrede et al., 2012). Since we used a similar oral dose the possible interfering factors could be the strain and sex of the rats and length of treatment.

The effect of chronic ARI in clinical setting resulting in increased leptin level concomitant to weight gain (Pérez-Iglesias et al., 2014) is in stark contrast to our observation of reduced leptin in the absence of body weight changes in rats. A possible explanation may lie in the non-adequate translational validity of the animal model, an intervening variable playing a role could be the disparate ARI pharmacokinetic/pharmacodynamic profile in rats, compared to

that in humans (Wood et al., 2006), and D2 occupancy-functional relationship (Natesan et al., 2006). In this regard, one mechanism potentially involved could be represented by adipose tissue-specific regulation of leptin via dopamine D2 receptors (Cuevas et al., 2014). It is, however, reasonable to presume that more complex regulations are implicated. Moreover, leptin modulates dopaminergic system in both humans and rodents (Panariello et al., 2012). Nevertheless, based on our findings, the altered serum leptin level indicates direct effects of ARI on neurohormonal regulation independent of body weight changes. In this respect, our data may support the hypothesis that antipsychotics contribute to the development of leptin resistance, and this may establish a metabolic status resulting in weight gain later in subsequent treatment period (Panariello et al., 2012). In our study, adiposity which is associated with elevated leptin level both in rodents (Velasque et al., 2001) and humans (Considine et al., 1996) was not assessed and this is relevant to note as one of the limitations of the study. However, even a ten-week long 2.25 mg/kg/day ARI treatment was not found to affect adiposity in male Sprague-Dawley rats (De Santis et al., 2014). The intricate interplay of leptin with other hormones/adipokines assessed in this study is of importance.

4.3.2. Ghrelin

Our results show elevated ghrelin serum level after ARI treatment. Although in our previous studies of similar length of treatment, olanzapine did not affect ghrelin level, risperidone led to an increase in parallel to leptin (Horska et al., 2016, 2017). Normally, leptin dose-dependently suppresses ghrelin secretion (Kamegai et al., 2004) and leptin and ghrelin interaction was also described in both animal and clinical studies in the context of antipsychotic treatment (Hegedus et al., 2015; Sentissi et al., 2008). Thus ARI-induced elevation of ghrelin in our study could be viewed as associated with reduced leptin level; however, the correlation analysis did not confirm this relationship, so it does not support this hypothesis. Tri-phasic effect of AAP on ghrelin serum level has been recently proposed in a clinical setting and also in preclinical experiments with initial elevation, followed by secondary feed-back reduction and final re-increase (Zhang et al., 2013). This phenomenon may have been detected in our earlier study with depot risperidone (Horska et al., 2017). The role of ghrelin signaling system in antipsychotic-induced weight gain has been recently highlighted and considered as a potential target for pharmacological strategies in metabolic adverse effects of antipsychotics (Zhang et al., 2013) and our data support this notion. Furthermore, there is an existing interplay between ghrelin and dopamine signaling (Muller et al., 2015) and ghrelin antagonism was found to suppress morphine-induced dopamine release in rat brain (Sustkova-Fiserova et al., 2014) which may be implicated in the potential underlying mechanisms.

4.3.3. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)

The interactions of GLP-1 with leptin and ghrelin have been recently reviewed, though the understanding of the specific mechanism is incomplete (Ronveaux et al., 2015). Ghrelin enhances glucose-stimulated GLP-1 secretion (Gagnon et al., 2015) while leptin modulates GLP-1 and as proposed the leptin resistant state may lead to attenuation of GLP-1 mediated signaling (Lim and Brubaker, 2006). On the other hand, a long-acting GLP-1 agonist liraglutide, was shown to regulate leptin signaling (Kanoski et al., 2015) and there is substantial evidence that GLP-1 and also FGF-21 act as leptin-sensitizers increasing leptin responsiveness. This constitutes a new strategy to overcome leptin resistant state associated with obesity (Quarta et al., 2016).

In the present study, GLP-1 serum level was reduced following ARI treatment, though in other studies this effect was not

consistently observed after chronic risperidone or olanzapine treatment (Hegedus et al., 2015; Horska et al., 2016, 2017). In our study the interaction between GLP-1 and leptin was also revealed by a correlation analysis in untreated healthy animals which disappeared after ARI treatment. Interestingly this relationship was not at all present in the polyI:C model. Furthermore, GLP-1 level was reported to be acutely reduced 1 h after drug administration during clozapine and quetiapine chronic treatment in rats (Smith et al., 2009).

Interestingly, in healthy human subjects short-term (9 days) olanzapine administration led to dysregulation of postprandial GLP-1, but not leptin or ghrelin, whereas no similar effect was seen with ARI (Teff et al., 2013). Analogously as for obesity treatment, GLP-1 analogs were proposed to represent a potentially beneficial strategy in AAP-induced weight gain (Ebdrup et al., 2012). In animal experiments, chronic administration of liraglutide, reversed olanzapine-induced weight gain, accompanied with dyslipidemia (Lykkegaard et al., 2008; Sharma et al., 2015). However, very recent data from the first (randomized, placebo-controlled, double-blinded) clinical trial in obese schizophrenia patients treated with antipsychotics showed that 3 months treatment with exenatide (another FDA-approved long-acting GLP-1 analog) had no effects on metabolic parameters including body weight and serum lipid profile (Ishøy et al., 2017). However, the same treatment was seen to result in weight loss in non-psychiatric obese populations, thus the authors pointed also to the psychiatric condition *per se* or the effects of antipsychotic treatment as possible factors playing a role (Ishøy et al., 2017). This hypothesis is in line with the results of our correlation analysis showing loss of interrelationship between GLP-1, glucagon and leptin in the polyI:C model.

4.3.4. Glucagon

Normally, GLP-1 and leptin, both inhibit glucagon release (Lee et al., 2016). In this study despite reduced GLP-1 and leptin serum level, no significant glucagon serum level increase was detected. Correspondingly, we observed no alterations in glucagon serum level after olanzapine (Horska et al., 2016) or risperidone treatment (Horska et al., 2017). However, in this study the relationship was seen between GLP-1 and glucagon in healthy animals irrespective of ARI treatment, whereas this was not detected in any of polyI:C treated subgroups. These results indicate altered hormonal/adipokine regulation in the polyI:C model.

4.3.5. Fibroblast growth factor-21 (FGF-21)

FGF-21 levels are known to be elevated in obesity and metabolic syndrome (Zhang et al., 2008) and also in first-episode schizophrenia patients (Qing et al., 2015). Neither polyI:C model nor ARI treatment in this study had no effect on FGF-21 serum level, similarly no effects of olanzapine or risperidone were observed in our previous studies (Horska et al., 2016, 2017). As far as we know, no other preclinical studies focused on the putative role of FGF-21 in antipsychotic-induced metabolic effects. Preclinical data showed that FGF-21 restored leptin responsiveness in diet-induced obesity (Müller et al., 2012). Similarly, the treatment with exogenous FGF21 analog in obese patients with type 2 diabetes significantly improved dyslipidemia, led to less atherogenic profile, further beneficial effects on body weight, fasting insulin and adiponectin were noted (Gaich et al., 2013). Whether this effect would be observed in psychiatric patients or even could be translated to preclinical experiments using neurodevelopmental schizophrenia-like models remains to be clarified.

5. Conclusions

The neurodevelopmental polyI:C model of schizophrenia-like

phenotype in rats exhibited altered lipid profile which suggests its translational value. In addition, the model was not shown to be more susceptible to ARI-induced metabolic effects. However, this does not exclude that it may possess higher sensitivity to metabolic disturbances and susceptibility to metabolic alterations induced by antipsychotic medication carrying higher metabolic risks. Moreover, despite ARI is considered metabolically neutral, it induced dysregulation of adipokines and gastrointestinal hormones reducing leptin and GLP-1 and increasing ghrelin levels in both control and polyI:C rats. Importantly, metabolic derangements were not developed consequently to body weight changes. Finally, ARI treatment did not affect the polyI:C induced changes in any parameter. The incomplete understanding of complex hormonal regulations in adverse metabolic alterations induced by AAP requires further investigation.

Conflict of interest disclosure

All authors declare no conflict of interest. Michal Karpisek works in the company Biovendor-Laboratorni medicina, which manufactures the ELISA kits used in this study.

Acknowledgements

This study was performed at Masaryk university as part of the project „Experimental and translational pharmacological research and development” number MUNI/A/1063/2016 with the support of the Specific University Research Grant, as provided by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic in the year 2017. This work was further supported by research grant from the Ministry of Health of the Czech Republic – conceptual development of research organization (FNBr, 65269705).

The authors also wish to thank for the technical support and animal care to Marcela Kucirkova and Jaroslav Nadenicek.

References

- Aguilar-Valles, A., Inoue, W., Rummel, C., Luheshi, G.N., 2015. Obesity, adipokines and neuroinflammation. *Neuropharmacology* 96, 124–134. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.12.023>.
- American Diabetes Association, American Psychiatric Association, American Association of Clinical Endocrinologists, North American Association for the Study of Obesity, 2004. Consensus development conference on antipsychotic drugs and obesity and diabetes. *Diabetes Care* 27, 596–601. <http://dx.doi.org/10.2337/diacare.27.2.596>.
- Andreassen, O.A., Djurovic, S., Thompson, W.K., Schork, A.J., Kendler, K.S., O'Donovan, M.C., Rujescu, D., Werge, T., van de Bunt, M., Morris, A.P., McCarthy, M.I., International Consortium for Blood Pressure GWAS, Diabetes Genetics Replication and Meta-analysis Consortium, Psychiatric Genomics Consortium Schizophrenia Working Group, Roddey, J.C., McEvoy, L.K., Desikan, R.S., Dale, A.M., 2013. Improved detection of common variants associated with schizophrenia by leveraging pleiotropy with cardiovascular-disease risk factors. *Am. J. Hum. Genet.* 92, 197–209. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.01.001>.
- Blüher, M., Mantzoros, C.S., 2015. From leptin to other adipokines in health and disease: facts and expectations at the beginning of the 21st century. *Metabolism* 64, 131–145. <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2014.10.016>.
- Boyd, H.N., Tse, L., Procyshyn, R.M., Honer, W.G., Barr, A.M., 2010. Preclinical models of antipsychotic drug-induced metabolic side effects. *Trends Pharmacol. Sci.* 31, 484–497. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2010.07.002>.
- Cai, H.L., Tan, Q.Y., Jiang, P., Dang, R.L., Xue, Y., Tang, M.M., Xu, P., Deng, Y., Li, H.D., Yao, J.K., 2015. A potential mechanism underlying atypical antipsychotics-induced lipid disturbances. *Transl. Psychiatry* 5, e661. <http://dx.doi.org/10.1038/tp.2015.161>.
- Canetta, S.E., Brown, A.S., 2012. Prenatal infection, maternal immune activation, and risk for schizophrenia. *Transl. Neurosci.* 3, 320–327. <http://dx.doi.org/10.2478/s13380-012-0045-6>.
- Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Marco, C.C., McKee, L.J., Bauer, T.L., 1996. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* 334, 292–295. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM19960213340503>.
- Cuevas, S., Yang, Y., Upadhyay, K., Armando, I., Jose, P., 2014. Dopamine D2 receptors regulate leptin and IL-6 in 3T3 L1 adipocytes (1107.5). *FASEB J.* 28, 1.
- De Santis, M., Pan, B., Lian, J., Huang, X.-F., Deng, C., 2014. Different effects of bifeprunox, aripiprazole, and haloperidol on body weight gain, food and water intake, and locomotor activity in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 124, 167–173. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2014.06.004>.
- Dieset, I., Andreassen, O.A., Haukvik, U.K., 2016. Somatic Comorbidity in schizophrenia: some possible biological mechanisms across the life span. *Schizophr. Bull.* 42, 1316–1319. <http://dx.doi.org/10.1093/schbul/sbw028>.
- Ebdrup, B.H., Knop, F.K., Ishøy, P.L., Rostrup, E., Fagerlund, B., Lublin, H., Glenthøj, B., 2012. Glucagon-like peptide-1 analogs against antipsychotic-induced weight gain: potential physiological benefits. *BMC Med.* 10, 92. <http://dx.doi.org/10.1186/1741-7015-10-92>.
- Enez Darcin, A., Yalcin Cavus, S., Dilbaz, N., Kaya, H., Dogan, E., 2015. Metabolic syndrome in drug-naïve and drug-free patients with schizophrenia and in their siblings. *Schizophr. Res.* 166, 201–206. <http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2015.05.004>.
- Ersland, K.M., Skrede, S., Rost, T.H., Berge, R.K., Steen, V.M., 2015. Antipsychotic-induced metabolic effects in the female rat: direct comparison between long-acting injections of risperidone and olanzapine. *J. Psychopharmacol.* 29, 1280–1289. <http://dx.doi.org/10.1177/0269881115602490>.
- Ferno, J., Ersland, K.M., Duus, I.H., Gonzalez-Garcia, I., Fossan, K.O., Berge, R.K., Steen, V.M., Skrede, S., 2015. Olanzapine depot exposure in male rats: dose-dependent lipogenic effects without concomitant weight gain. *Eur. Neuro-psychopharmacol.* 25, 923–932. <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.03.002>.
- Fonseka, T.M., Muller, D.J., Kennedy, S.H., 2016. Inflammatory cytokines and antipsychotic-induced weight gain: review and clinical implications. *Mol. Neuro-psychiatry* 2, 1–14. <http://dx.doi.org/10.1159/000441521>.
- Fontana, L., Eagon, J.C., Trujillo, M.E., Scherer, P.E., Klein, S., 2007. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes* 56, 1010–1013. <http://dx.doi.org/10.2337/db06-1656>.
- Gagnon, J., Baggio, L.L., Drucker, D.J., Brubaker, P.L., 2015. Ghrelin is a novel regulator of GLP-1 secretion. *Diabetes* 64, 1513–1521. <http://dx.doi.org/10.2337/db14-1176>.
- Gaich, G., Chien, J.Y., Fu, H., Glass, L.C., Deeg, M.A., Holland, W.L., Kharitonov, A., Bumol, T., Schilke, H.K., Moller, D.E., 2013. The effects of LY2405319, an FGF21 analog, in obese human subjects with type 2 diabetes. *Cell Metab.* 18, 333–340. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2013.08.005>.
- Glund, S., Krook, A., 2008. Role of interleukin-6 signalling in glucose and lipid metabolism. *Acta Physiol. oxf. Engl.* 192, 37–48. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-1716.2007.01779.x>.
- Han, M., Deng, C., Burne, T.H., Newell, K.A., Huang, X.F., 2008. Short- and long-term effects of antipsychotic drug treatment on weight gain and H1 receptor expression. *Psychoneuroendocrinology* 33, 569–580. <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.01.018>.
- Hegedus, C., Kovacs, D., Kiss, R., Sari, R., Nemeth, J., Szilvassy, Z., Peitl, B., 2015. Effect of long-term olanzapine treatment on meal-induced insulin sensitization and on gastrointestinal peptides in female sprague-dawley rats. *J. Psychopharmacol.* 29, 1271–1279. <http://dx.doi.org/10.1177/0269881115602952>.
- Henderson, D.C., Vincenzi, B., Andrea, N.V., Ulloa, M., Copeland, P.M., 2015. Pathophysiological mechanisms of increased cardiometabolic risk in people with schizophrenia and other severe mental illnesses. *Lancet Psychiatry* 2, 452–464. [http://dx.doi.org/10.1016/S2215-0366\(15\)00115-7](http://dx.doi.org/10.1016/S2215-0366(15)00115-7).
- Horska, K., Ruda-Kucerova, J., Babinska, Z., Karpisek, M., Demlova, R., Opatrilova, R., Suchy, P., Kotolova, H., 2016. Olanzapine-depot administration induces time-dependent changes in adipose tissue endocrine function in rats. *Psychoneuroendocrinology* 73, 177–185. <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.07.218>.
- Horska, K., Ruda-Kucerova, J., Karpisek, M., Suchy, P., Opatrilova, R., Kotolova, H., 2017. Depot risperidone-induced adverse metabolic alterations in female rats. *J. Psychopharmacol. (Oxf.)*. <http://dx.doi.org/10.1177/0269881117691466>.
- Ishøy, P.L., Knop, F.K., Broberg, B.V., Bak, N., Andersen, U.B., Jørgensen, N.R., Holst, J.J., Glenthøj, B.Y., Ebdrup, B.H., 2017. Effect of GLP-1 receptor agonist treatment on body weight in obese antipsychotic-treated patients with schizophrenia: a randomized, placebo-controlled trial. *Diabetes Obes. Metab.* 19, 162–171. <http://dx.doi.org/10.1111/dom.12795>.
- Kalinichev, M., Rourke, C., Daniels, A.J., Grizzle, M.K., Britt, C.S., Ignar, D.M., Jones, D.N.C., 2005. Characterisation of olanzapine-induced weight gain and effect of aripiprazole vs olanzapine on body weight and prolactin secretion in female rats. *Psychopharmacol. (Berl.)* 182, 220–231. <http://dx.doi.org/10.1007/s00213-005-0081-9>.
- Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Ishii, S., Sugihara, H., Oikawa, S., 2004. Effects of insulin, leptin, and glucagon on ghrelin secretion from isolated perfused rat stomach. *Regul. Pept.* 119, 77–81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.regpep.2004.01.012>.
- Kanoski, S.E., Ong, Z.Y., Fortin, S.M., Schlessinger, E.S., Grill, H.J., 2015. Liraglutide, leptin and their combined effects on feeding: additive intake reduction through common intracellular signalling mechanisms. *Diabetes Obes. Metab.* 17, 285–293. <http://dx.doi.org/10.1111/dom.12423>.
- Kasteng, F., Eriksson, J., Sennfalt, K., Lindgren, P., 2011. Metabolic effects and cost-effectiveness of aripiprazole versus olanzapine in schizophrenia and bipolar disorder. *Acta Psychiatr. Scand.* 124, 214–225. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0447.2011.01716.x>.
- Kritharides, L., Rye, K.-A., Lambert, T.J., Jessup, W., 2016. Lipidology, cardiovascular risk, and schizophrenia. *Curr. Opin. Lipidol.* 27, 305–307. <http://dx.doi.org/10.1097/MOL.0000000000000307>.

- Kucerova, J., Babinska, Z., Horska, K., Kotolova, H., 2015. The common pathophysiology underlying the metabolic syndrome, schizophrenia and depression. a review. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc Czech Repub.* 159, 208–214. <http://dx.doi.org/10.5507/bp.2014.060>.
- Lauressergues, E., Staels, B., Valeille, K., Majd, Z., Hum, D.W., Duriez, P., Cussac, D., 2010. Antipsychotic drug action on SREBPs-related lipogenesis and cholesterologenesis in primary rat hepatocytes. *Naunyn. Schmiede. Arch. Pharmacol.* 381, 427–439. <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-010-0499-4>.
- Lee, Y.H., Wang, M.Y., Yu, X.X., Unger, R.H., 2016. Glucagon is the key factor in the development of diabetes. *Diabetologia* 59, 1372–1375. <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-016-3965-9>.
- Leonard, B.E., Schwarz, M., Myint, A.M., 2012. The metabolic syndrome in schizophrenia: is inflammation a contributing cause? *J. Psychopharmacol.* 26, 33–41. <http://dx.doi.org/10.1177/0269881111431622>.
- Lim, G.E., Brubaker, P.L., 2006. Glucagon-like peptide 1 secretion by the L-cell - the view from within. *Diabetes* 55, S70–S77. <http://dx.doi.org/10.2337/db06-S020>.
- Lykkegaard, K., Larsen, P.J., Vrang, N., Bock, C., Bock, T., Knudsen, L.B., 2008. The once-daily human GLP-1 analog, liraglutide, reduces olanzapine-induced weight gain and glucose intolerance. *Schizophr. Res.* 103, 94–103. <http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2008.05.011>.
- Malan-Müller, S., Kilian, S., van den Heuvel, L.L., Bardien, S., Asmal, L., Warnich, L., Emsley, R.A., Hemmings, S.M.J., Seedat, S., 2016. A systematic review of genetic variants associated with metabolic syndrome in patients with schizophrenia. *Schizophr. Res.* 170, 1–17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2015.11.011>.
- Malla, A., Mustafa, S., Rho, A., Abadi, S., Lepage, M., Joobar, R., 2016. Therapeutic effectiveness and tolerability of aripiprazole as initial choice of treatment in first episode psychosis in an early intervention service: a one-year outcome study. *Schizophr. Res.* 174, 120–125. <http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2016.04.036>.
- Meyer, U., Feldon, J., 2012. To poly(I: C) or not to poly(I: C): advancing preclinical schizophrenia research through the use of prenatal immune activation models. *Neuropharmacology* 62, 1308–1321. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.009>.
- Meyer, U., Schwarz, M.J., Muller, N., 2011. Inflammatory processes in schizophrenia: a promising neuroimmunological target for the treatment of negative/cognitive symptoms and beyond. *Pharmacol. Ther.* 132, 96–110. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.06.003>.
- Micale, V., Kucerova, J., Sulcova, A., 2013. Leading compounds for the validation of animal models of psychopathology. *Cell Tissue Res.* 354, 309–330. <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-013-1692-9>.
- Miller, B.J., Buckley, P., Seabolt, W., Mellor, A., Kirkpatrick, B., 2011. Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biol. Psychiatry* 70, 663–671. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.04.013>.
- Missault, S., Van den Eynde, K., Vanden Berghe, W., Fransens, E., Weeren, A., Timmermans, J.P., Kumar-Singh, S., Dedeurwaerdere, S., 2014. The risk for behavioural deficits is determined by the maternal immune response to prenatal immune challenge in a neurodevelopmental model. *Brain Behav. Immun.* 42, 138–146. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2014.06.013>.
- Muller, T.D., Nogueiras, R., Andermann, M.L., Andrews, Z.B., Anker, S.D., Argente, J., Batterham, R.L., Benoit, S.C., Bowers, C.Y., Broglio, F., Casanueva, F.F., D'Alessio, D., Depoortere, I., Geliebter, A., Ghigo, E., Cole, P.A., Crowley, M., Cummings, D.E., Dagher, A., Diano, S., Dickson, S.L., Dieguez, C., Granata, R., Grill, H.J., Grove, K., Habegger, K.M., Heppner, K., Heimann, M.L., Holsen, L., Holst, B., Inui, A., Jansson, J.O., Kirchner, H., Korbonits, M., Laferrere, B., LeRoux, C.W., Lopez, M., Morin, S., Nakazato, M., Nass, R., Perez-Tilve, D., Pfluger, P.T., Schwartz, T.W., Seeley, R.J., Sleeman, M., Sun, Y., Sussel, L., Tong, J., Thorne, M.O., van der Lely, A.J., van der Ploeg, L.H., Zigman, J.M., Kojima, M., Kangawa, K., Smith, R.G., Horvath, T., Tschöp, M.H., 2015. Ghrelin. *Mol. Metab.* 4, 437–460. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmet.2015.03.005>.
- Müller, T.D., Sullivan, L.M., Habegger, K., Yi, C.-X., Kabra, D., Grant, E., Ottaway, N., Krishna, R., Holland, J., Hembree, J., Perez-Tilve, D., Pfluger, P.T., DeGuzman, M.J., Siladi, M.E., Kraynov, V.S., Axelrod, D.W., DiMarchi, R., Pinkstaff, J.K., Tschöp, M.H., 2012. Restoration of leptin responsiveness in diet-induced obese mice using an optimized leptin analog in combination with exendin-4 or FGF21. *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.* 18, 383–393. <http://dx.doi.org/10.1002/psc.2408>.
- Nasrallah, H.A., Newcomer, J.W., Risper, R., Du, Y., Zummo, J., Bose, A., Stankovic, S., Silverman, B.L., Ehrlich, E.W., 2016. Effect of aripiprazole lauroxil on metabolic and endocrine profiles and related safety considerations among patients with acute schizophrenia. *J. Clin. Psychiatry* 77, 1519–1525. <http://dx.doi.org/10.4088/JCP.15m10467>.
- Natesan, S., Reckless, G.E., Nobrega, J.N., Fletcher, P.J., Kapur, S., 2006. Dissociation between in vivo occupancy and functional antagonism of dopamine D2 receptors: comparing aripiprazole to other antipsychotics in animal models. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 31, 1854–1863. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.npp.1300983>.
- Newcomer, J.W., Campos, J.A., Marcus, R.N., Breder, C., Berman, R.M., Kerselaers, W., Litalien, G.J., Nys, M., Carson, W.H., McQuade, R.D., 2008. A multicenter, randomized, double-blind study of the effects of aripiprazole in overweight subjects with schizophrenia or schizoaffective disorder switched from olanzapine. *J. Clin. Psychiatry* 69, 1046–1056. <http://dx.doi.org/10.4088/JCP.v69n0702>.
- Ole, A., 2017. Increasing support for association between immune system and severe mental illness - need to find the underlying mechanisms. *Acta Psychiatr. Scand.* 135, 95–96. <http://dx.doi.org/10.1111/acps.12692>.
- Panariello, F., Polsinelli, G., Borlido, C., Monda, M., De Luca, V., 2012. The role of leptin in antipsychotic-induced weight gain: genetic and non-genetic factors. *J. Obes.* 2012, 572848. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/572848>.
- Pérez-Iglesias, R., Ortiz-García de la Foz, V., Martínez García, O., Amado, J.A., García-Unzueta, M.T., Ayasa-Arriola, R., Suarez-Pinilla, P., Tabares-Seisdedos, R., Crespo-Facorro, B., 2014. Comparison of metabolic effects of aripiprazole, quetiapine and ziprasidone after 12 weeks of treatment in first treated episode of psychosis. *Schizophr. Res.* 159, 90–94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2014.07.045>.
- Procaccini, C., La Rocca, C., Carbone, F., De Rosa, V., Galgani, M., Matarese, G., 2017. Leptin as immune mediator: interaction between neuroendocrine and immune system. *Dev. Comp. Immunol.* 66, 120–129. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2016.06.006>.
- Qing, Y., Yang, J., Wan, C., 2015. Increased serum fibroblast growth factor 21 levels in patients with schizophrenia. *Aust. N. Z. J. Psychiatry* 49, 849–850. <http://dx.doi.org/10.1177/0004867415575380>.
- Quarta, C., Sánchez-Garrido, M.A., Tschöp, M.H., Clemmensen, C., 2016. Renaissance of leptin for obesity therapy. *Diabetologia* 59, 920–927. <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-016-3906-7>.
- Ratnayake, U., Hill, R., 2016. Studies on the effects prenatal immune activation on postnatal behavior: models of developmental origins of schizophrenia. In: Walker, D.W. (Ed.), *Prenatal and Postnatal Determinants of Development, Neuromethods*. Springer, New York, pp. 263–278. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-3014-2_13.
- Reisinger, S., Khan, D., Kong, E., Berger, A., Pollak, A., Pollak, D.D., 2015. The poly(I: C)-induced maternal immune activation model in preclinical neuropsychiatric drug discovery. *Pharmacol. Ther.* 149, 213–226. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.01.001>.
- Ronveaux, C.C., Tomé, D., Raybould, H.E., 2015. Glucagon-like peptide 1 interacts with ghrelin and leptin to regulate glucose metabolism and food intake through vagal afferent neuron signaling. *J. Nutr.* 145, 672–680. <http://dx.doi.org/10.3945/jn.114.206029>.
- Sarvari, A.K., Vereb, Z., Uray, I.P., Fesus, L., Balajthy, Z., 2014. Atypical antipsychotics induce both proinflammatory and adipogenic gene expression in human adipocytes in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 450, 1383–1389. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.005>.
- Sentissi, O., Epelbaum, J., Olie, J.P., Poirier, M.F., 2008. Leptin and ghrelin levels in patients with schizophrenia during different antipsychotics treatment: a review. *Schizophr. Bull.* 34, 1189–1199. <http://dx.doi.org/10.1093/schbul/sbm141>.
- Sharma, A.N., Ligade, S.S., Sharma, J.N., Shukla, P., Elased, K.M., Lucot, J.B., 2015. GLP-1 receptor agonist liraglutide reverses long-term atypical antipsychotic treatment associated behavioral depression and metabolic abnormalities in rats. *Metab. Brain Dis.* 30, 519–527. <http://dx.doi.org/10.1007/s11011-014-9591-7>.
- Skrede, S., Ferno, J., Vazquez, M.J., Fjaer, S., Pavlin, T., Lunder, N., Vidal-Puig, A., Dieguez, C., Berge, R.K., Lopez, M., Steen, V.M., 2012. Olanzapine, but not aripiprazole, weight-independently elevates serum triglycerides and activates lipogenic gene expression in female rats. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 15, 163–179. <http://dx.doi.org/10.1017/S1461145711001271>.
- Smith, G.C., Vickers, M.H., Cognard, E., Shepherd, P.R., 2009. Clozapine and quetiapine acutely reduce glucagon-like peptide-1 production and increase glucagon release in obese rats: implications for glucose metabolism and food choice behaviour. *Schizophr. Res.* 115, 30–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2009.07.011>.
- Sobiś, J., Rykaczewska-Czerwińska, M., Świętochowska, E., Gorczyca, P., 2015. Therapeutic effect of aripiprazole in chronic schizophrenia is accompanied by anti-inflammatory activity. *Pharmacol. Rep. P. R.* 67, 353–359. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2014.09.007>.
- Steen, V.M., Skrede, S., Polushina, T., López, M., Andreassen, O.A., Ferno, J., Hellard, S.L., 2016. Genetic evidence for a role of the SREBP transcription system and lipid biosynthesis in schizophrenia and antipsychotic treatment. *Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2016.07.011>.
- Stroup, T.S., McEvoy, J.P., Ring, K.D., Hamer, R.H., LaVange, L.M., Swartz, M.S., Rosenheck, R.A., Perkins, D.O., Nussbaum, A.M., Lieberman, J.A., 2011. A randomized trial examining the effectiveness of switching from olanzapine, quetiapine, or risperidone to aripiprazole to reduce metabolic risk: comparison of antipsychotics for metabolic problems (CAMP). *Schizophrenia Trials Network Am. J. Psychiatry* 168, 947–956. <http://dx.doi.org/10.1176/appi.ajp.2011.10111609>.
- Stubbs, B., Wang, A.K., Vancampfort, D., Miller, B.J., 2016. Are leptin levels increased among people with schizophrenia versus controls? a systematic review and comparative meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* 63, 144–154. <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.09.026>.
- Sustkova-Fiserova, M., Jerabek, P., Havlickova, T., Kacer, P., Krsiak, M., 2014. Ghrelin receptor antagonism of morphine-induced accumbens dopamine release and behavioral stimulation in rats. *Psychopharmacol. (Berl.)* 231, 2899–2908. <http://dx.doi.org/10.1007/s00213-014-3466-9>.
- Takeuchi, H., Uchida, H., Suzuki, T., Watanabe, K., Kashima, H., 2010. Changes in metabolic parameters following a switch to aripiprazole in Japanese patients with schizophrenia: one-year follow-up study. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 64, 104–106. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1819.2009.02036.x>.
- Takeuchi, Y., Kajiyama, K., Ishiguro, C., Uyama, Y., 2015. Atypical antipsychotics and the risk of hyperlipidemia: a sequence symmetry analysis. *Drug Saf.* 38, 641–650. <http://dx.doi.org/10.1007/s40264-015-0298-4>.
- Teff, K.L., Rickels, M.R., Grudziak, J., Fuller, C., Nguyen, H.-L., Rickels, K., 2013. Antipsychotic-induced insulin resistance and postprandial hormonal dysregulation independent of weight gain or psychiatric disease. *Diabetes* 62, 3232–3240. <http://dx.doi.org/10.2337/db13-0430>.
- Trujillo, M.E., Sullivan, S., Harten, I., Schneider, S.H., Greenberg, A.S., Fried, S.K.,

2004. Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 5577–5582. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2004-0603>.
- Velasque, M.T., Bhatena, S.J., Hansen, C.T., 2001. Leptin and its relation to obesity and insulin in the SHR/N-corpulent rat, a model of type II diabetes mellitus. *Int. J. Exp. Diabetes Res.* 2, 217–223. <http://dx.doi.org/10.1155/EDR.2001.217>.
- Victoriano, M., de Beaupaire, R., Naour, N., Guerre-Millo, M., Quignard-Boulangé, A., Huneau, J.F., Mathe, V., Tome, D., Hermier, D., 2010. Olanzapine-induced accumulation of adipose tissue is associated with an inflammatory state. *Brain Res.* 1350, 167–175. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2010.05.060>.
- Wadenberg, M.-L.G., 2007. Bifeprunox: a novel antipsychotic agent with partial agonist properties at dopamine D2 and serotonin 5-HT1A receptors. *Future Neurol.* 2, 153–165. <http://dx.doi.org/10.2217/14796708.2.2.153>.
- Wood, M.D., Scott, C., Clarke, K., Westaway, J., Davies, C.H., Reavill, C., Hill, M., Rourke, C., Newson, M., Jones, D.N.C., Forbes, I.T., Gribble, A., 2006. Aripiprazole and its human metabolite are partial agonists at the human dopamine D2 receptor, but the rodent metabolite displays antagonist properties. *Eur. J. Pharmacol.* 546, 88–94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.07.008>.
- Yan, H., Chen, J.D., Zheng, X.Y., 2013. Potential mechanisms of atypical antipsychotic-induced hypertriglyceridemia. *Psychopharmacol. Berl.* 229, 1–7. <http://dx.doi.org/10.1007/s00213-013-3193-7>.
- Yang, L., Chen, J., Li, Y., Wang, Y., Liang, S., Shi, Y., Shi, S., Xu, Y., 2016. Association between SCAP and SREBF1 gene polymorphisms and metabolic syndrome in schizophrenia patients treated with atypical antipsychotics. *World J. Biol. Psychiatry Off. J. World Fed. Soc. Biol. Psychiatry* 17, 467–474. <http://dx.doi.org/10.3109/15622975.2016.1165865>.
- Zhang, Q., Deng, C., Huang, X.F., 2013. The role of ghrelin signalling in second-generation antipsychotic-induced weight gain. *Psychoneuroendocrinology* 38, 2423–2438. <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.07.010>.
- Zhang, X., Yeung, D.C., Karpisek, M., Stejskal, D., Zhou, Z.G., Liu, F., Wong, R.L., Chow, W.S., Tso, A.W., Lam, K.S., Xu, A., 2008. Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes* 57, 1246–1253. <http://dx.doi.org/10.2337/db07-1476>.
- Zhang, Y., Cazakoff, B.N., Thai, C.A., Howland, J.G., 2012. Prenatal exposure to a viral mimetic alters behavioural flexibility in male, but not female, rats. *Neuropharmacol. Schizophr.* 62, 1299–1307. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.02.022>.



Olanzapine-depot administration induces time-dependent changes in adipose tissue endocrine function in rats



Katerina Horska^a, Jana Ruda-Kucerova^{b,*}, Zuzana Babinska^b, Michal Karpisek^{c,a}, Regina Demlova^b, Radka Opatrilova^d, Pavel Suchy^a, Hana Kotolova^a

^a Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

^b Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

^c R&D Department, Biovondor – Laboratorni Medicina, Brno, Czech Republic

^d Department of Chemical Drugs, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 May 2016

Received in revised form 23 June 2016

Accepted 26 July 2016

Keywords:

Adipokine

Adipose tissue

Dyslipidemia

Leptin

Olanzapine

Sprague-Dawley rats

ABSTRACT

Objective: Metabolic adverse effects of atypical antipsychotics (AAP) contribute significantly to increased risk of cardiovascular morbidity and mortality in patients suffering from schizophrenia. Extensive preclinical research has addressed this issue over the past years, though mechanisms underlying these adverse effects of AAP are still not understood completely. Recently, attention is drawn towards the role of adipose tissue metabolism and neurohormonal regulations.

Methods: The aim of this study was to evaluate the time-dependent effects of olanzapine depot administration at clinically relevant dosing on the regulation of energy homeostasis, glucose and lipid metabolism, gastrointestinal and adipose tissue-derived hormones involved in energy balance regulations in female Sprague-Dawley rats. The study lasted 8 weeks and the markers were assayed at day 8, 15, 29, 43 and 57. **Results:** The results indicate that in the absence of hyperphagia, olanzapine chronic exposure induced weight gain from the beginning of the study. In the later time-point, increased adiposity was also observed. In the initial phase of the study, lipid profile was altered by an early increase in triglyceride level and highly elevated leptin level was observed. Clear bi-phasic time-dependent effect of olanzapine on leptin serum concentration was demonstrated. Olanzapine treatment did not lead to changes in serum levels of ghrelin, FGF-21 and pro-inflammatory markers IL-1a, IL-6 and TNF- α at any time-point of the study.

Conclusion: This study provides data suggesting early alteration in adipose tissue endocrine function as a factor involved in mechanisms underlying metabolic adverse effects of antipsychotics.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The benefits of atypical antipsychotics (AAP) in the treatment of schizophrenia and other disorders not limited to psychotic spectrum are indisputable in general. One of the great advantages of AAP in the treatment of psychotic disorders is their low propensity to induce extrapyramidal symptoms, though the neurological side effects are 'replaced' by adverse metabolic effects (Nasrallah, 2008; Newcomer, 2007). These metabolic alterations, including weight gain, dyslipidemia, increased adiposity, glucose intolerance and insulin resistance which correspond to the cluster of metabolic

syndrome (MetS) symptoms further increase the risks for development of obesity, type-2 diabetes, cardiovascular morbidity, and the overall mortality of patients with schizophrenia (De Hert et al., 2012; Leucht et al., 2007). The overall rate of MetS was 32.5% in patients with schizophrenia and related disorders according to a recent meta-analysis (Mitchell et al., 2013).

The propensity to induce metabolic alterations substantially differs among the antipsychotic drugs. This can be partially explained by their unique receptor binding profiles (Nasrallah, 2008). The highest potential to induce weight gain, increased adiposity, dyslipidemia and to impair glucose tolerance has been reported in the context of treatment with multi-acting receptor targeted agents (MARTA) antipsychotics, especially olanzapine and clozapine. Olanzapine seems to be the drug most associated with the symptoms of metabolic syndrome (De Hert et al., 2012; Leucht et al., 2013; Mitchell et al., 2013). The exact pharmacological

* Corresponding author at: Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic.

E-mail address: jkucer@med.muni.cz (J. Ruda-Kucerova).

molecular mechanisms underlying metabolic adverse effects of AAP are poorly understood; however, there is increasing evidence suggesting metabolic dysregulations as an antecedent factor of obesity development (Correll et al., 2010; De Hert et al., 2012).

Extensive preclinical research has addressed this issue over the past years. Nevertheless, findings from preclinical studies are frequently inconsistent due to methodological issues such as use of different animal strains and gender, drug dose, route of administration and duration of treatment (Boyda et al., 2010; van der Zwaal et al., 2014). Above all, one of the important challenges has been represented by possibly inadequate dosing of AAP in animal studies not corresponding to the clinical condition, which arises from incomparable pharmacokinetic profiles of AAP in rodents and humans, because rodents have a much shorter half-life of AAP (Kapur et al., 2003). Recently the availability of AAP in the form of long-acting injections has enabled researchers to optimize the dosing regimens of AAP in preclinical studies, ensuring stable drug exposure. In humans there is evidence supporting the assumption that adverse metabolic effects of AAP may be associated to serum concentration, since olanzapine and clozapine induced metabolic abnormalities appear to show concentration-dependent relationship (Simon et al., 2009). This was clearly observed with regard to weight gain in patients receiving different doses of long-acting injectable olanzapine (Kane et al., 2010).

Despite the lack of definite evidence of gender-specific effects of AAP on weight changes or other metabolic parameters in humans (Correll et al., 2010; Mitchell et al., 2013), female rats were shown to be more suitable for modeling AAP-induced weight gain than males (Albaugh et al., 2006; Boyda et al., 2010; Davey et al., 2012; van der Zwaal et al., 2014). Furthermore, the AAPs with the least liability to metabolic dysregulation in humans, such as aripiprazole or ziprasidone (Leucht et al., 2013), were also associated with weight gain in rodent experiments (Boyda et al., 2010; Skrede et al., 2012; van der Zwaal et al., 2014).

Lately, with regard to metabolic alterations induced by AAP, attention has been paid to dysregulation of adipose tissue metabolism and its endocrine/paracrine function in human studies and animal experiments (Potvin et al., 2015; Skrede et al., 2012; Zhang et al., 2013). Particularly, the research has been focused on the potential effects of AAP on adipokines, as well as proteins released by adipose tissue and neurohormonal regulations. The intricacy of interplay of modulators of food intake and energy balance and gastrointestinal hormones in general is also being investigated intensively (Perry and Wang, 2012) but these variables were incompletely explored in context of AAP-induced metabolic adverse effects in animal models. Furthermore, specific biochemical marker which enables the identification of patients at a high risk of AAP-induced MetS has not yet been proposed, and the underlying molecular mechanisms of AAP-induced metabolic effects remain to be elucidated.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the time-dependent effects of olanzapine depot administration on the regulation of energy homeostasis, specifically feeding behavior, lipid profile, alterations of adipose tissue endocrine/paracrine functions and hormonal regulations in order to elucidate their interrelationships in the mechanisms of AAP-induced metabolic alterations. Apart from basic biochemical analysis (lipid spectrum, glucose serum level), serum levels of leptin, ghrelin, glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucagon, fibroblast growth factor-21 (FGF-21) were assessed to describe alterations in adipose tissue endocrine functions and in neurohumoral regulation. Spectrum of adipokines and hormones was selected for the analysis, in order to explore their possible interrelationships and roles in the mechanisms of AAP-induced metabolic alterations, since eg. leptin and ghrelin are suggested to have opposite an/orexigenic effects in appetite and energy homeostasis regulation (Klok et al.,

2007; Muller et al., 2015). These two factors have been studied most extensively with inconsistent findings in both preclinical and human studies (Potvin et al., 2015; Skrede et al., 2012; Zhang et al., 2013). However, the regulations are more complex, thus GLP-1 and adipokine FGF-21 were included as there is evidence confirming physiological role of GLP-1 in the complex regulation of appetite (Ronveaux et al., 2015), and FGF-21 is known regulator of glucose and lipid homeostasis, which possesses functions of endocrine hormones (Kharitonov, 2009). We also assessed pro-inflammatory cytokines (interleukin 1a and 6, tumor necrosis factor- α), which are known to be elevated in MetS (Kucerova et al., 2015).

2. Material and methods

2.1. Animals

Forty female 8 weeks old albino Sprague-Dawley rats weighing 200–225 g at the beginning of the study were purchased from Charles River (Germany) and housed individually in standard housing cages. Environmental conditions during the whole study were constant: relative humidity 50–60%, temperature $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, normal 12-h light-dark cycle (6 a.m.–6 p.m. light). Standard rodent chow and water were available *ad libitum*. All experiments were conducted in accordance with all relevant laws and regulations of animal care and welfare. The experimental protocol was approved by the Animal Care Committee of the Masaryk University, Faculty of Medicine, Czech Republic, and carried out under the European Community guidelines for the use of experimental animals.

2.2. Drugs and treatments

Olanzapine (OLA) was administered in a depot formulation for human use (ZypAdhera[®]) by an intramuscular injection at dose 100 mg/kg every 14 days in the evening hours (administration on day 1, 15, 29 and 43). The solvent vehicle was injected to the control group. The food was removed from the cages and all rats were subjected to overnight fasting in order to prevent weight gain differences induced by sedation in the OLA-treated group as we observed in our previous experiments (unpublished data) and was also already recently validated (Skrede et al., 2014).

2.3. Food consumption and body weight recording

Body weight (BW) and food consumption were recorded daily in all animals. Feeders in all cages were filled with 50 g of the rodent chow, the consumption was recorded after 24 h and then filled to 50 g again. On the days of drug administration when the chow was removed overnight the food consumption data were not recorded (day 1, 15, 29 and 43).

2.4. Treatment groups and sample collection

Rats were randomly assigned to 2 treatment groups: vehicle (VEH) treated (n = 17) and olanzapine (OLA) treated (n = 23). Two subgroups of animals, vehicle (n = 7) and olanzapine-treated rats (n = 8), were sacrificed by decapitation under short isoflurane anesthesia to collect blood (for serum), liver and visceral fat tissue 8 days after the first administration. The dissection was performed after decapitation by wide laparotomy, the liver was excised and weighted and abdominal fat tissue was collected and weighed. Other two subgroups of rats, vehicle (n = 10) and olanzapine-treated (n = 15), were kept until the day 57 (8 weeks of treatment) and then sacrificed and dissected in the same manner. Furthermore, 1.5–2 ml of blood for serum was collected under short isoflurane anesthesia every 2 weeks (day 1, 15, 29 and 43) by retro-orbital puncture and the same amount of liquid was supplied by the

intraperitoneal injection of saline. The serum samples were used to assay the biochemical parameters – lipid profile (total cholesterol, high-density cholesterol – HDL, low-density cholesterol – LDL and triglycerides – TAG), glucose serum level, adipokine and hormone levels – leptin, ghrelin, GLP-1 (glucagon-like peptide-1), FGF-21 (fibroblast growth factor-21), interleukins IL-1 α , IL-6, TNF- α (tumor-necrosis factor-alpha).

2.5. Biochemical assays

Basic biochemical parameters were determined spectrophotometrically – lipid profile, glucose serum level (Dimension Xpand Plus[®], kits Siemens[®]). Adipokines, hormones and cytokines were assessed using Bio-Plex[®] Multiplex System (immunoassay kits Bio-Rad[®]) and by immunochemical method (ELISA) using commercial sets (BioVendor[®]).

2.6. Statistical data analysis

Primary data were summarized using arithmetic mean and standard error of the mean estimate (SEM). The cumulative weight gain, cumulative food intake and feed efficiency data were analyzed by repeated measures ANOVA with the factor of OLA treatment and Dunnett *post-hoc* test. Organ weights (liver and adipose tissue) were compared at two time-points (day 8 and day 57) by 2 way ANOVA (factors: time-point and treatment) with Tukey *post-hoc* test. Biochemical parameters, adipokine, hormone and cytokine serum levels at day 8 were evaluated by *t*-test when the dataset was distributed normally (Kolmogorov-Smirnov test of normality) or Mann-Whitney *U* test when the normality test was significant (this was the case of interleukins and TNF- α). For the longitudinally monitored groups repeated measures ANOVA with the factor of OLA treatment and Dunnett *post-hoc* test was used in normal data and Kruskal-Wallis test in interleukins and TNF- α results. The analyses were calculated using Statistica 12 (StatSoft, USA). A value $p < 0.05$ was recognized as the boundary of statistical significance in all applied tests.

3. Results

3.1. Food consumption and body weight recording

Fig. 1 summarizes the body weight (BW) and standard rodent chow data. Repeated measures ANOVA revealed a highly significant increase in the mean daily cumulative weight gain of the OLA-treated group starting on the day 6 (Fig. 1A) except the last week of the study. Cumulative chow intake (assessed daily) is presented on days 8, 15, 29, 43 and 55 in both longitudinal groups and has shown no difference (Fig. 1B). Despite equal food intake, OLA treatment led to increase in body weight. Therefore feed efficiency was calculated as BW in grams/cumulative chow intake in grams at the same time-points (days 8, 15, 29, 43 and 55). Repeated measures ANOVA revealed a significant increase of the feed efficiency in the OLA-treated rats already at the beginning of the study (day 8). This effect was smaller yet significant until day 43, and no difference was found at the end of the study after 8 weeks of chronic treatment (Fig. 1C). Note that in the first time-point (8 days) data were pooled from the animals sacrificed at day 8 and the groups with the longitudinal assessment.

Liver and adipose tissue mass were recorded at the time of sacrifice only (day 8 and 57). As expected, Fig. 2 indicates that 2 way ANOVA (factors: time-point and treatment) with Tukey *post-hoc* test has revealed significant differences only in the adipose tissue mass. These changes were dependent on age in both treatment groups (significant increase when the time-points were compared) and

more importantly on drug treatment at day 57 (an increase of adiposity in the OLA-treated group). The weight of liver did not change after chronic olanzapine exposure, which indicates that olanzapine chronic treatment did not lead to apparent metabolic or structural liver tissue changes.

3.2. Blood lipid and glycaemic profiles

Lipid profiles were evaluated independently in the groups sacrificed on day 8 and the longitudinal design. Fig. 3 depicts the total cholesterol, HDL, LDL and TAG data on the day 8 analyzed by *t*-test. There was a significant decrease in LDL and increase in TAG of the OLA-treated group. Fig. 4 reports the same variables in the longitudinal assessment. In longitudinal design, repeated measures ANOVA did not reveal any significant changes in lipid spectrum. The glycaemic profiles did not differ significantly between the groups at any time-point (data not shown).

3.3. Cytokine and hormonal levels

Analogously, the adipokine and hormone data were analyzed separately for the day 8 and the longitudinal study. Leptin, ghrelin, glucagon, GLP-1 and FGF-21 data were analyzed by parametric *t*-test, while IL-1 α , IL-6 and TNF- α were evaluated using Mann-Whitney *U* test. As shown in Fig. 5, at this early time-point the only alteration in the parameters evaluated was a highly significant increase of leptin level in the OLA-treated group. Fig. 6 summarizes the longitudinal data on the same variables analyzed by repeated measures ANOVA (or Kruskal-Wallis test for IL-1 α , IL-6 and TNF- α data). Interestingly, the leptin dysregulation was found significant again only in the last time-point of the study after 8 weeks of chronic treatment (day 57). Furthermore, decreases of glucagon and GLP-1 serum levels were found on day 29 in the OLA-treated group. Despite some apparent trends the Kruskal-Wallis test for IL-1 α , IL-6 and TNF- α data did not detect significant differences between the groups.

4. Discussion

This study reports comprehensive time-dependent data on basic biochemical profile, neurohumoral regulation and endocrine function of adipose tissue during chronic olanzapine exposure under conditions corresponding to clinical settings. The specific findings will be discussed in sections.

4.1. AAP-induced changes in feeding behavior and body weight

As expected we recorded a significant increase in body weight increment after olanzapine treatment during the whole study. In contrast to findings from other studies, hyperphagia expressed as increased food intake concomitant to weight gain was not observed in this experiment. Hyperphagia has been considered as the key behavioral factor mediating weight gain (Davoodi et al., 2009; Weston-Green et al., 2011), however increases in adipose tissue mass were noted in male rats even without concomitant hyperphagia and weight gain (Girault et al., 2014; Minet-Ringuet et al., 2007; van der Zwaal et al., 2014). As described earlier (Skrede et al., 2014; Weston-Green et al., 2011), we calculated feed efficiency and noted markedly increased values in the olanzapine treatment group, starting from the first time-point (day 8) but not present at the end of the study (day 55). Our results demonstrate significantly increased visceral adipose tissue deposits after 8 weeks of chronic olanzapine treatment. Increased fat deposition, adipocyte size enlargement and alteration of adipocyte metabolism after chronic treatment with olanzapine have been characterized, indicating primary effects of AAP on adipose tissue (Minet-Ringuet

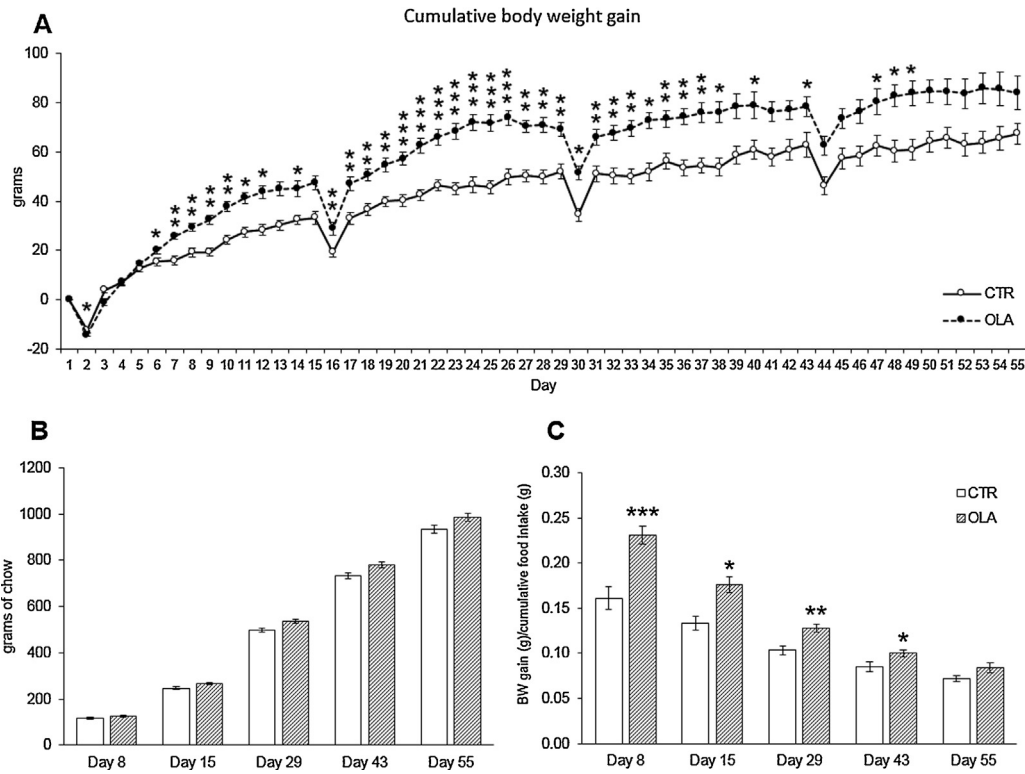


Fig 1. body weight and food intake.

Fig. 1A shows daily means \pm SEM of cumulative body weight gain in VEH and OLA-treated animals. Till the day 8 the data are pooled with the early sacrificed groups. Repeated measures ANOVA, main effect of treatment $p=0.026$, Dunnet post-test ($*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$). Fig. 1B depicts cumulative chow intake at days 1, 15, 29 and 43, repeated measures ANOVA, n.s. Fig. 1C reports feed efficiency calculated as BW gain (g)/cumulative food intake (g). Repeated measures ANOVA, main effect of treatment $p=0.01$, Dunnet post-test ($*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$). The last assessment of feeding behavior was on day 55 while animals were sacrificed on day 57.

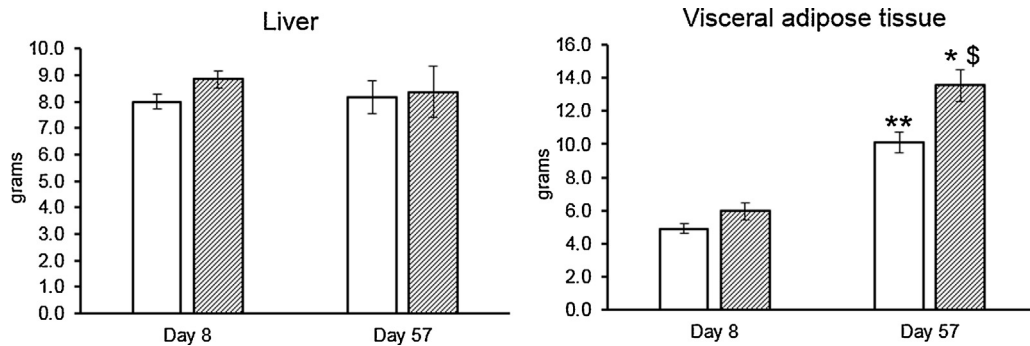


Fig. 2. liver and adipose tissue mass.

ANOVA (factors: time-point and treatment) has detected no differences in the liver mass. Adipose tissue mass has shown the effect of both treatment ($p=0.015$) and time-point ($p \leq 0.001$). Tukey post-test has revealed a significant increase in both groups at day 57 as compared to day 8 (symbol: $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$) and an OLA-induced increase of fat mass on the day 57 (symbol: $\$p \leq 0.05$). White bars: control rats, hatched bars: OLA treated rats.

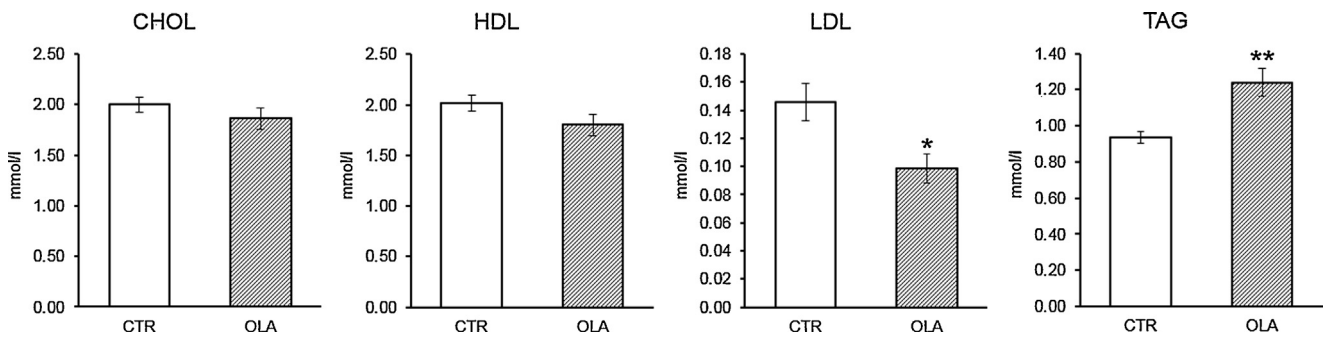


Fig. 3. blood lipid profile at day 8.

The graphs indicate the levels of total cholesterol (CHOL), HDL, LDL and TAG on the day 8 analyzed by *t*-test. *T*-test identified a significant decrease in LDL and increase of TAG in the OLA-treated group ($*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$).

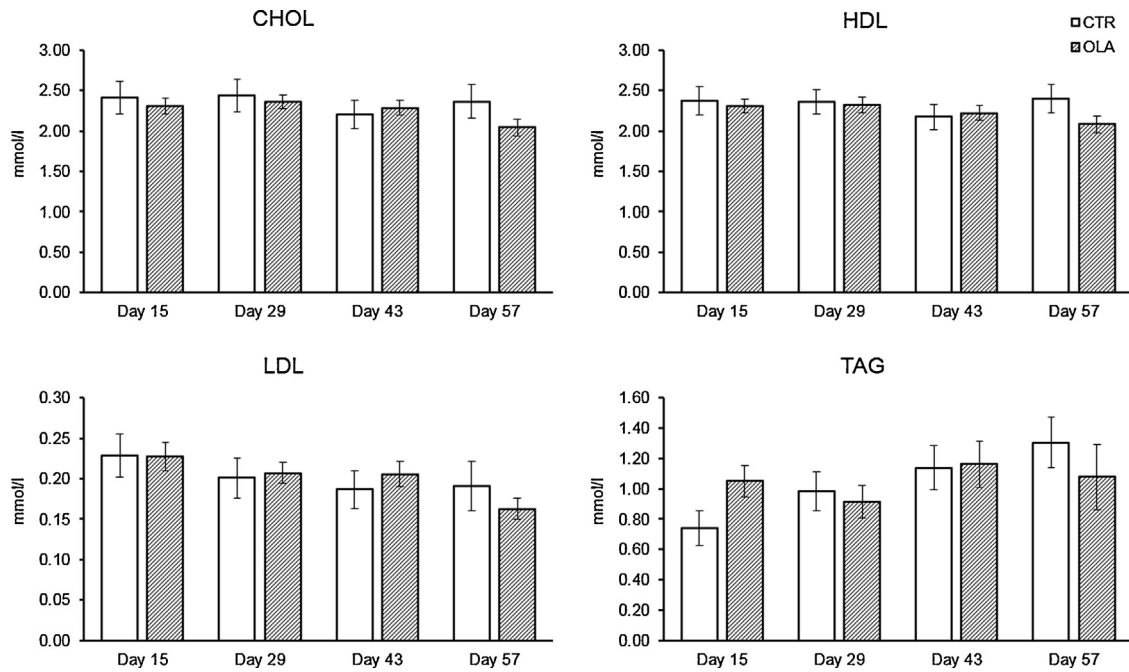


Fig. 4. blood lipid profile at days 15, 29, 43 and 57.

Repeated measures ANOVA did not reveal any significant changes in total cholesterol (CHOL), HDL, LDL or TAG levels.

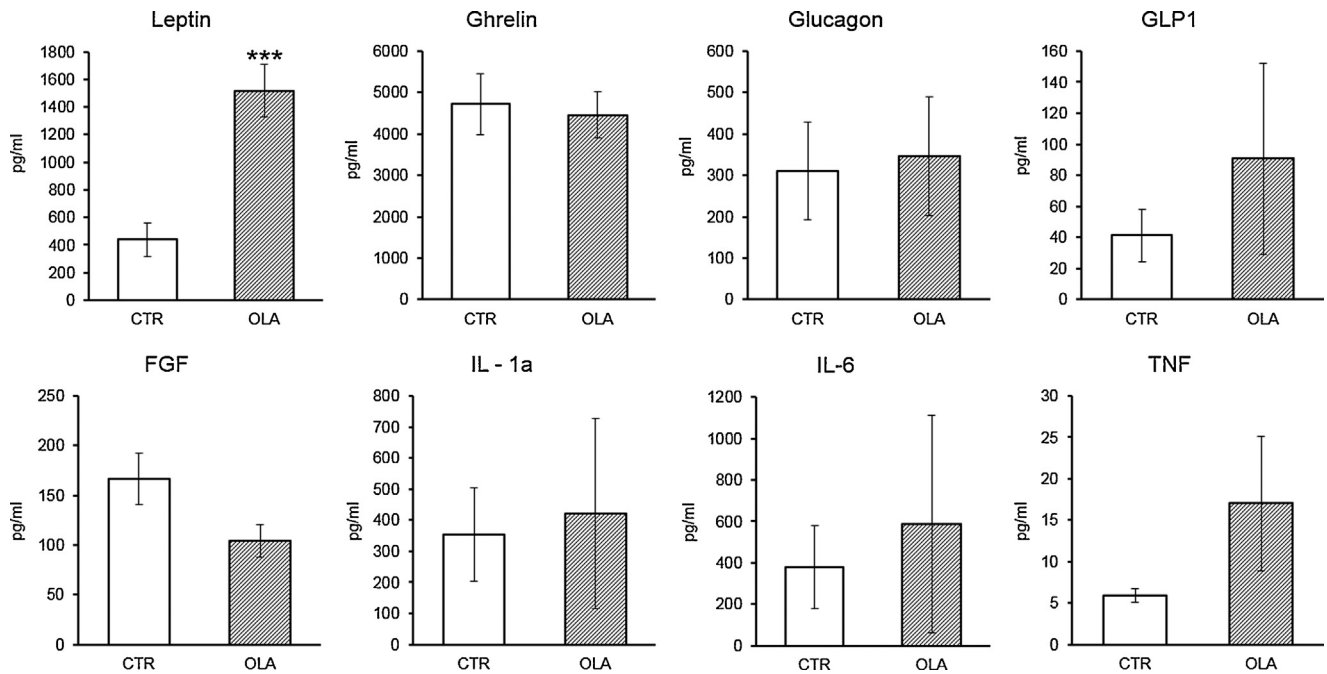


Fig. 5. blood adipokine, hormonal and cytokine levels at day 8.

Parametric *t*-test detected a highly significant increase of leptin level in the OLA-treated group. There were no other significant results. Data on the IL-1a, IL-6 and TNF- α have shown high variability but did not reveal any elevated pro-inflammatory markers.

et al., 2007). Furthermore, early morphological change of the subcutaneous adipose tissue has been described, characterized by an increase in the proliferation of undifferentiated adipocytes independent of weight gain but showing time- and dose-dependent relationship (Tan et al., 2010). Evidence and our data both support the conclusion that changes in body composition with increased adiposity are largely independent of changes in body weight or increased food intake. However, another confounding factor may be different energy expenditure in control and olanzapine treated rats. OLA is known to cause sedation in both open-field test (Zhang

et al., 2014) and home-cage locomotor profile (van der Zwaal et al., 2010, 2012). Noteworthy, it seems that chronic treatment alleviates the effect on locomotor activity (Albaugh et al., 2011).

4.2. AAP-induced changes in lipid profile

In the initial phase on the day 8 this study found lipid profile alterations characterized by an increase in triglycerides and lowered LDL-cholesterol plasma level. At later time-points, these changes did not persist.

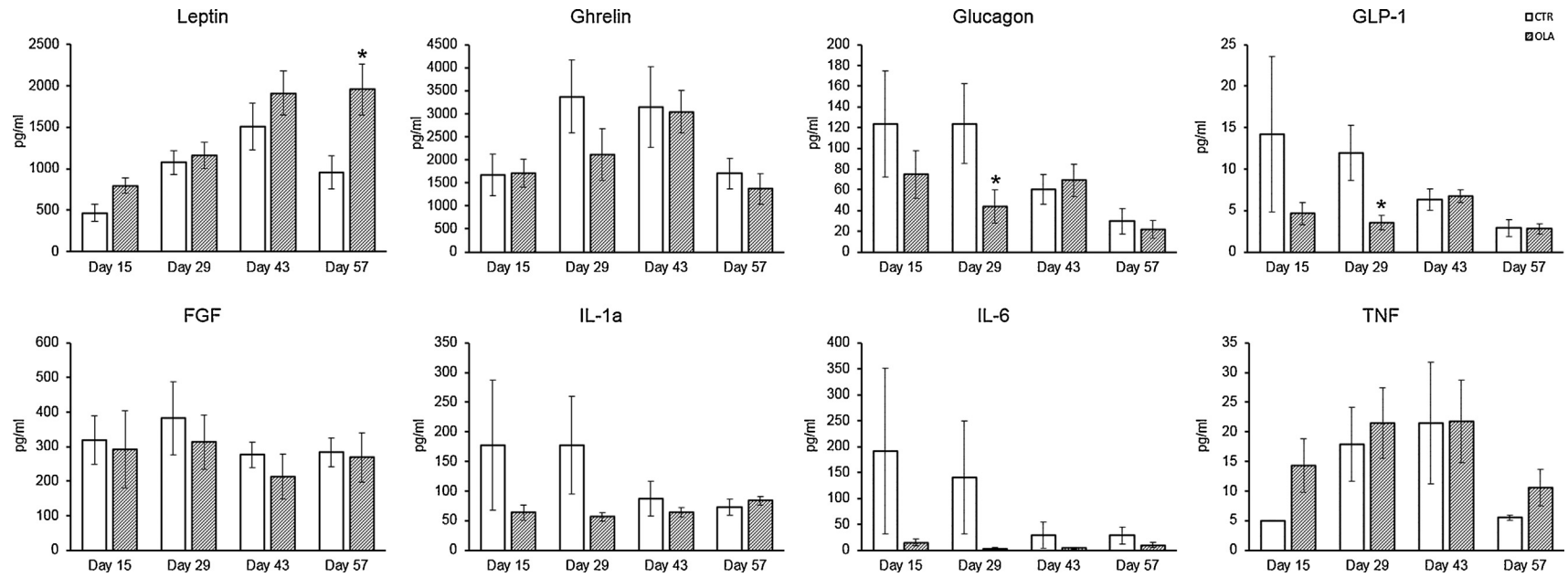


Fig. 6. adipokine, hormonal and cytokine levels at days 15, 29, 43 and 57.

Repeated measures ANOVA revealed significant changes increase of leptin levels induced by OLA treatment at day 57 only, Tukey post-test ($*p \leq 0.05$). Other changes detected comprise decreases of glucagon and GLP-1 on the day 29 in the OLA-treated group, Tukey post-test ($*p \leq 0.05$).

Lipid profile has been characterized only in some of the earlier rodent studies mostly no increases in triglyceride and cholesterol plasma levels have been reported (Albaugh et al., 2006; Davoodi et al., 2009). Yet there are recent data demonstrating that AAP elevate plasma triglyceride levels after chronic administration in animals (Zugno et al., 2012). In female rats, increased triglyceride level has been reported as independent to weight gain after olanzapine chronic treatment (Skrede et al., 2012). Moreover, acute administration of olanzapine resulted in altered lipid parameters with increased serum free fatty acids, triglycerides, and reduced cholesterol levels followed by accumulation of lipids in the liver at the later time frame. Thus, direct dysregulation of lipid metabolism has been described prior to weight gain development (Jassim et al., 2012). Furthermore, evidence from *in vitro* experiments in three different human cell lines cultures points to direct effects of several AAP on the regulation of lipid metabolism. Inhibition of cholesterol biosynthesis was shown at several different steps and in contrast increased synthesis of triglycerides was observed. The elevation of triglycerides was suggested to be the consequence of compensatory mechanisms to inhibited cholesterol synthesis involving upregulation of gene expression (Canfran-Duque et al., 2013; Skrede et al., 2013).

The potential mechanisms of AAP induced hypertriglyceridemia have been reviewed recently, highlighting direct effects of AAP on triglyceride metabolism as well as indirect actions on central nervous system pathways regulating energy homeostasis. Indirect effects of AAP on triglyceride metabolism may be mediated by obesity associated insulin resistance leading to lipogenesis stimulated by hyperinsulinemia. Regarding direct mechanisms, it has been consistently reported that AAP upregulate expression of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) transcription factors and related target genes involved in *de novo* lipid synthesis. Furthermore it was suggested that AAP may regulate activity or plasma level of lipoprotein lipase, thus may impair triglyceride catabolism (Yan et al., 2013). Other direct effect of AAP on adipose tissue was recently proposed with regard to expression of functional dopamine receptors in human adipocytes and potential regulatory role of dopamine in adipose tissue functions, e.g. leptin inhibition (Borcherding et al., 2011; Cuevas et al., 2014).

Therefore, our data on lipid profile in the initial phase of the study correspond to the preclinical findings focused on the direct AAP effects on lipid metabolism. These alterations might be associated to dysregulation of adipokines' secretion as discussed later.

4.3. AAP-induced changes in glycemic control markers

Chronic olanzapine treatment did not demonstrate any effect on glucose level in this experiment, while decrease in GLP1 and glucagon levels was found on day 29. GLP1 is a potent insulinotropic intestinal hormone and its secretion is decreased in obesity (Anini and Brubaker, 2003).

Dysregulation in glucose metabolism has been inconsistently documented in rodent models (Albaugh et al., 2006; Boyda et al., 2010; Girault et al., 2014). Direct and acute effects of AAP on glucose homeostasis and olanzapine-induced insulin resistance in the absence of weight changes have been convincingly demonstrated (Boyda et al., 2010; Jassim et al., 2012; Kovacs et al., 2015). Also chronic olanzapine treatment resulting in unaltered glucose plasma level was reported, though it was accompanied by hyperinsulinemia and caused desensitization to its acute effects on glucose metabolism (Girault et al., 2014). Therefore, it can be assumed that AAP-induced glycemic dysregulation and insulin resistance may involve mechanisms independent of either weight gain or adiposity.

Our findings may support the hypothesis of GLP-1 dysregulation induced by chronic olanzapine exposure, yet on day 8

no alteration in GLP-1 serum level was observed. At this time-point, high inter-individual variability in olanzapine-treated group should be noticed. Data from later time-points showed significantly decreased GLP-1 only on day 29. Similarly, decreased glucagon serum level was found on day 29 with no other significant alterations in the course of the study. Based on our data, olanzapine effects on the interrelationships of glucose homeostasis markers cannot be elucidated; however, the associations of GLP-1 with leptin and ghrelin are discussed below.

4.4. AAP-induced changes in adipokine/hormone levels

In the initial phase of treatment (day 8), a pronounced increase in leptin and differences in lipid spectrum were found without concomitant increase in abdominal adiposity. At later time-points, a significant weight gain and increase in visceral adipose tissue mass were demonstrated together with increased leptin level (day 57). Interestingly, no alterations in leptin level were found at the intermediate time-points. Leptin is an anorexigenic hormone, however in obesity its levels are elevated; therefore, the concept of leptin resistance has been established (Klok et al., 2007). Leptin transport across hematoencephalic barrier is impaired by triglycerides, which implies hypertriglyceridemia as an important cause of leptin resistance (Banks et al., 2004). An alternative concept called "leptin-insufficiency" postulates that hematoencephalic barrier limits the availability of leptin in response to its high concentration (Kalra, 2008). Consistently, this study revealed concomitant hypertriglyceridemia and hyperleptinemia as soon as on day 8.

Human data consistently demonstrate increased leptin levels in patients treated with antipsychotics (Potvin et al., 2015; Sentissi et al., 2008). However, a recent meta-analysis has revealed that leptin levels increased in schizophrenia patients, may not be associated solely with antipsychotic medication (Stubbs et al., 2016). Moreover, it was suggested that peak in leptin concentration during initial phase of clozapine treatment predicts lower weight gain in later treatment period (Monteleone et al., 2002). The findings with regard to the effect of AAP on leptin plasma levels in rodent models appear to be controversial, showing no alteration (Davey et al., 2012; Kovacs et al., 2015; Skrede et al., 2012; Zugno et al., 2012), or significant increase after chronic treatment concomitant to increased adiposity (Albaugh et al., 2006; Girault et al., 2014; Hegedus et al., 2015). Possible explanation of this inconsistency lies in different methodological approaches, especially dosing scheme and duration of treatment.

Currently, the attention has been paid to ghrelin, the gastrointestinal orexigenic hormone with central and peripheral actions, which include regulation of appetite, body weight and adiposity, lipid metabolism and glucose homeostasis (Muller et al., 2015). Similar to leptin, ghrelin is involved in regulation of broad central nervous system functions and appears to be closely linked to psychiatric disorders (Wittekind and Kluge, 2015). Moreover, dimerization of ghrelin receptors with wide spectrum of other receptors including dopaminergic and consequent modifications in signaling have been observed, e.g. oligomerization with ghrelin receptor is essential in anorexigenic actions mediated via D2 receptors (Wellman and Abizaid, 2015). Ghrelin levels in clinical studies seemed to be reduced during first several weeks of treatment with AAP and increased in long-term treatment. Also the interaction between leptin and ghrelin levels has been described as the increase in leptin and decrease in ghrelin levels both in preclinical and clinical settings (Hegedus et al., 2015; Sentissi et al., 2008). Later, tri-phasic effect of AAP on ghrelin levels has been postulated with initial acute elevation, peak in the first week of treatment, followed by a secondary decrease and re-increase as a long-term effect and a similar trend has been proposed regarding data from preclinical studies (Zhang et al., 2013). Though, dysregulation of ghrelin

secretion was not demonstrated throughout the chronic olanzapine treatment in this experiment.

Leptin and ghrelin modulate the anorexigenic effects of GLP-1 nevertheless the exact mechanisms of these interactions are not fully known (Ronveaux et al., 2015). Leptin was shown to stimulate in a dose-dependent manner secretion of GLP-1, a potent insulinotropic intestinal hormone. Consistent with the concept of leptin resistance, GLP-1 is decreased in obesity (Anini and Brubaker, 2003). From this perspective, the significant increase in leptin levels in this study leads to the assumption of reduced serum GLP-1 concentration. However, this was not confirmed concomitantly to elevated leptin concentration neither in the initial phase, nor after 57 days of chronic exposure. Decrease in GLP-1 level was observed in the intermediate time-point of the study; nonetheless, it might indicate possible interaction and time-dependent changes in GLP-1 secretion during chronic olanzapine treatment.

Also our results do not indicate any changes in **FGF-21** serum level, despite elevated serum FGF-21 levels reported in obesity which was independently associated to adverse lipid profile (*i.e.* increased levels of TAG), visceral adipose tissue deposits and metabolic syndrome in humans (Zhang et al., 2008). To the best of our knowledge, alterations in FGF-21 secretion were not addressed in preclinical or clinical studies focused on AAP-induced adverse metabolic effects. This parameter could also show time-dependent changes. However, there are insufficient data to explain its putative interactions and role in the complex mechanisms of AAP-induced metabolic dysregulation.

4.5. AAP-induced changes in pro-inflammatory cytokine levels

In our study, no significant alteration in IL-1 α , IL-6 and TNF- α secretion was observed at any time-point. In contrast to our results, previous report indicates that increased adiposity and low-grade inflammatory state follows chronic olanzapine treatment in rats, with increased TNF- α expression in adipose tissue and slightly elevated plasma levels of TNF- α and IL-1 (Victoriano et al., 2010). Though the immunomodulatory effects of AAP may contribute to the pro-inflammatory state, which is associated to schizophrenia *per se* (Kucerova et al., 2015), the long-term AAP treatment may enhance anti-inflammatory cytokine signaling (Meyer et al., 2011). The current evidence in this matter remains inconclusive in clinical studies, and there is a lack of data in preclinical research.

5. Conclusions

The key finding of this study was concomitant with hyperleptinemia and altered lipid profile characterized by hypertriglyceridemia and lowered LDL levels in the initial phase of olanzapine treatment. The early dysregulation of leptin occurred prior to significant changes in adiposity. Since leptin decreases triglyceride levels and hypertriglyceridemia inhibits leptin transport across hematoencephalic barrier resulting in leptin resistance, this feedback loop represents a mechanism of olanzapine induced adverse metabolic effect of interest. Leptin serum level was also increased after 8 weeks of olanzapine treatment, thus our data showed clear bi-phasic time-dependent effect of olanzapine on leptin serum concentration. Hyperphagia was not observed in this study, but increased feed efficiency was noted in the course of the study, resulting in weight gain and increased visceral fat deposits after 8 weeks of olanzapine exposure. Therefore, it can be assumed that altered adipose tissue endocrine function contributes to mechanisms underlying metabolic adverse effects of antipsychotics. However, a better understanding of interrelationships in neurohumoral regulation and the mechanisms involved is essential for identification of suitable biomarkers as predictors of metabolic

adverse effects of AAP, and ultimately for the development of new antipsychotics with a lower propensity to induce adverse metabolic effects or adjuvant treatment strategies.

Conflict of interest disclosure

All authors declare no conflict of interest. Michal Karpisek works in the company Biovendor-Laboratorni medicina, which provided ELISA kits for laboratory measurements.

Role of the funding source

This study was supported by the project of Internal Grant Agency (IGA) VFU Brno (IGA VFU 312/2016/FaF) with co-financing of the project "Experimental pharmacological development in neuropsychopharmacology and oncology" number MUNI/A/1284/2015 with the support of the Specific University Research Grant at Masaryk University, as provided by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic in the year 2016 and funds from the Faculty of Medicine MU to junior researcher Jana Ruda-Kucerova.

Authors' contributions

Katerina Horska developed the original idea, designed the study, contributed to the statistical analysis and wrote a substantial part of the introduction, methods, results and discussion sections of the manuscript.

Jana Ruda-Kucerova managed the experimental work, collected biological samples and the data and processed them for analysis, performed the statistical analysis and wrote a substantial part of the introduction, methods, results and discussion sections of the manuscript.

Zuzana Babinska was responsible for the practical experimental work and contributed to writing the methods and results sections of the manuscript.

Michal Karpisek was responsible for ELISA assays and contributed to the final version of the manuscript.

Regina Demlova contributed to the final version of the manuscript.

Radka Opatrilova contributed to the final version of the manuscript.

Pavel Suchy contributed to the final version of the manuscript.

Hana Kotolova developed the original idea, contributed to experimental work, cross-checked the materials and methods section of the manuscript and contributed to the final version of the manuscript.

Acknowledgements

The authors are grateful to Amy Chen (Toronto, ON, Canada) for her kind help with English proof reading and to Jaroslav Nadenicek for excellent animal care and support.

References

- Albaugh, V.L., Henry, C.R., Bello, N.T., Hajnal, A., Lynch, S.L., Halle, B., Lynch, C.J., 2006. [Hormonal and metabolic effects of olanzapine and clozapine related to body weight in rodents. *Obesity \(Silver Spring\)* 14, 36–51.](#)
- Albaugh, V.L., Judson, J.G., She, P., Lang, C.H., Maresca, K.P., Joyal, J.L., Lynch, C.J., 2011. [Olanzapine promotes fat accumulation in male rats by decreasing physical activity, repartitioning energy and increasing adipose tissue lipogenesis while impairing lipolysis. *Mol. Psychiatry* 16, 569–581.](#)
- Anini, Y., Brubaker, P.L., 2003. [Role of leptin in the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *Diabetes* 52, 252–259.](#)
- Banks, W.A., Coon, A.B., Robinson, S.M., Moinuddin, A., Shultz, J.M., Nakaoka, R., Morley, J.E., 2004. [Triglycerides induce leptin resistance at the blood-brain barrier. *Diabetes* 53, 1253–1260.](#)

- Borcherding, D.C., Hugo, E.R., Idelman, G., De Silva, A., Richtand, N.W., Loftus, J., Ben-Jonathan, N., 2011. Dopamine receptors in human adipocytes: expression and functions. *PLoS One* 6, e25537.
- Boyd, H.N., Tse, L., Procyshyn, R.M., Honer, W.G., Barr, A.M., 2010. Preclinical models of antipsychotic drug-induced metabolic side effects. *Trends Pharmacol. Sci.* 31, 484–497.
- Canfran-Duque, A., Casado, M.E., Pastor, O., Sanchez-Wandelmer, J., de la Pena, G., Lerma, M., Mariscal, P., Bracher, F., Lasuncion, M.A., Busto, R., 2013. Atypical antipsychotics alter cholesterol and fatty acid metabolism in vitro. *J. Lipid Res.* 54, 310–324.
- Correll, C.U., Lencz, T., Malhotra, A.K., 2010. Antipsychotic drugs and obesity. *Trends Mol. Med.* 17, 97–107.
- Cuevas, S., Yang, Y., Upadhyay, K., Armando, I., Jose, P., 2014. Dopamine D2 receptors regulate leptin and IL-6 in 3T3 L1 adipocytes (1107.5). *FASEB J.* 28, 1.
- Davey, K.J., O'Mahony, S.M., Schellekens, H., O'Sullivan, O., Bienenstock, J., Cotter, P.D., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2012. Gender-dependent consequences of chronic olanzapine in the rat: effects on body weight, inflammatory, metabolic and microbiota parameters. *Psychopharmacology (Berl.)* 221, 155–169.
- Davoodi, N., Kalinichev, M., Korneev, S.A., Clifton, P.G., 2009. Hyperphagia and increased meal size are responsible for weight gain in rats treated sub-chronically with olanzapine. *Psychopharmacology (Berl.)* 203, 693–702.
- De Hert, M., Detraux, J., van Winkel, R., Yu, W., Correll, C.U., 2012. Metabolic and cardiovascular adverse effects associated with antipsychotic drugs. *Nat. Rev. Endocrinol.* 8, 114–126.
- Girault, E.M., Guigas, B., Alkemade, A., Foppen, E., Ackermans, M.T., la Fleur, S.E., Fliers, E., Kalsbeek, A., 2014. Chronic treatment with olanzapine increases adiposity by changing fuel substrate and causes desensitization of the acute metabolic side effects. *Naunyn. Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 387, 185–195.
- Hegedus, C., Kovacs, D., Kiss, R., Sari, R., Nemeth, J., Szilvassy, Z., Peitl, B., 2015. Effect of long-term olanzapine treatment on meal-induced insulin sensitization and on gastrointestinal peptides in female Sprague-Dawley rats. *J. Psychopharmacol.* 29, 1271–1279.
- Jassim, G., Skrede, S., Vazquez, M.J., Wergedal, H., Vik-Mo, A.O., Lunder, N., Dieguez, C., Vidal-Puig, A., Berge, R.K., Lopez, M., Steen, V.M., Ferno, J., 2012. Acute effects of orexigenic antipsychotic drugs on lipid and carbohydrate metabolism in rat. *Psychopharmacology (Berl.)* 219, 783–794.
- Kalra, S.P., 2008. Central leptin insufficiency syndrome: an interactive etiology for obesity, metabolic and neural diseases and for designing new therapeutic interventions. *Peptides* 29, 127–138.
- Kane, J.M., Detke, H.C., Naber, D., Sethuraman, G., Lin, D.Y., Bergstrom, R.F., McDonnell, D., 2010. Olanzapine long-acting injection: a 24-week, randomized, double-blind trial of maintenance treatment in patients with schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 167, 181–189.
- Kapur, S., VanderSpek, S.C., Brownlee, B.A., Nobrega, J.N., 2003. Antipsychotic dosing in preclinical models is often unrepresentative of the clinical condition: a suggested solution based on in vivo occupancy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305, 625–631.
- Kharitonov, A., 2009. FGFs and metabolism. *Curr. Opin. Pharmacol.* 9, 805–810.
- Klok, M.D., Jakobsdottir, S., Drent, M.L., 2007. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obes. Rev.* 8, 21–34.
- Kovacs, D., Hegedus, C., Kiss, R., Sari, R., Nemeth, J., Szilvassy, Z., Peitl, B., 2015. Meal-induced insulin sensitization is preserved after acute olanzapine administration in female Sprague-Dawley rats. *Naunyn. Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 388, 525–530.
- Kucerova, J., Babinska, Z., Horska, K., Kotolova, H., 2015. The common pathophysiology underlying the metabolic syndrome, schizophrenia and depression. A review. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 159, 208–214.
- Leucht, S., Burkard, T., Henderson, J., Maj, M., Sartorius, N., 2007. Physical illness and schizophrenia: a review of the literature. *Acta Psychiatr. Scand.* 116, 317–333.
- Leucht, S., Cipriani, A., Spineli, L., Mavridis, D., Orey, D., Richter, F., Samara, M., Barbui, C., Engel, R.R., Geddes, J.R., Kissling, W., Stapf, M.P., Lassig, B., Salanti, G., Davis, J.M., 2013. Comparative efficacy and tolerability of 15 antipsychotic drugs in schizophrenia: a multiple-treatments meta-analysis. *Lancet* 382, 951–962.
- Meyer, U., Schwarz, M.J., Muller, N., 2011. Inflammatory processes in schizophrenia: a promising neuroimmunological target for the treatment of negative/cognitive symptoms and beyond. *Pharmacol. Ther.* 132, 96–110.
- Minet-Ringuet, J., Even, P.C., Valet, P., Carpenne, C., Visentin, V., Prevot, D., Daviaud, D., Quignard-Boulangue, A., Tome, D., de Beaupreire, R., 2007. Alterations of lipid metabolism and gene expression in rat adipocytes during chronic olanzapine treatment. *Mol. Psychiatry* 12, 562–571.
- Mitchell, A.J., Vancampfort, D., Sweers, K., van Winkel, R., Yu, W., De Hert, M., 2013. Prevalence of metabolic syndrome and metabolic abnormalities in schizophrenia and related disorders—a systematic review and meta-analysis. *Schizophr. Bull.* 39, 306–318.
- Monteleone, P., Fabrazzo, M., Tortorella, A., La Pia, S., Maj, M., 2002. Pronounced early increase in circulating leptin predicts a lower weight gain during clozapine treatment. *J. Clin. Psychopharmacol.* 22, 424–426.
- Muller, T.D., Nogueiras, R., Andermann, M.L., Andrews, Z.B., Anker, S.D., Argente, J., Batterham, R.L., Benoit, S.C., Bowers, C.Y., Broglio, F., Casanueva, F.F., D'Alessio, D., Depoortere, I., Geliebter, A., Ghigo, E., Cole, P.A., Cowley, M., Cummings, D.E., Dagher, A., Diano, S., Dickson, S.L., Dieguez, C., Granata, R., Grill, H.J., Grove, K., Habegger, K.M., Heppner, K., Himan, M.L., Holsen, L., Holst, B., Inui, A., Jansson, J.O., Kirchner, H., Korbonits, M., Laferrere, B., LeRoux, C.W., Lopez, M., Morin, S., Nakazato, M., Nass, R., Perez-Tilve, D., Pfluger, P.T., Schwartz, T.W., Seeley, R.J., Sleeman, M., Sun, Y., Sussel, L., Tong, J., Thorner, M.O., van der Lely, A.J., van der Ploeg, L.H., Zigman, J.M., Kojima, M., Kangawa, K., Smith, R.G., Horvath, T., Tschop, M.H., 2015. Ghrelin. *Mol. Metab.* 4, 437–460.
- Nasrallah, H.A., 2008. Atypical antipsychotic-induced metabolic side effects: insights from receptor-binding profiles. *Mol. Psychiatry* 13, 27–35.
- Newcomer, J.W., 2007. Metabolic considerations in the use of antipsychotic medications: a review of recent evidence. *J. Clin. Psychiatry* 68 (Suppl. 1), 20–27.
- Perry, B., Wang, Y., 2012. Appetite regulation and weight control: the role of gut hormones. *Nutr. Diabetes* 2, e26.
- Potvin, S., Zornitsky, S., Stip, E., 2015. Antipsychotic-induced changes in blood levels of leptin in schizophrenia: a meta-analysis. *Can. J. Psychiatry* 60, S26–34.
- Ronveaux, C.C., Tome, D., Raybould, H.E., 2015. Glucagon-like peptide 1 interacts with ghrelin and leptin to regulate glucose metabolism and food intake through vagal afferent neuron signaling. *J. Nutr.* 145, 672–680.
- Sentissi, O., Epelbaum, J., Olie, J.P., Poirier, M.F., 2008. Leptin and ghrelin levels in patients with schizophrenia during different antipsychotics treatment: a review. *Schizophr. Bull.* 34, 1189–1199.
- Simon, V., van Winkel, R., De Hert, M., 2009. Are weight gain and metabolic side effects of atypical antipsychotics dose dependent? A literature review. *J. Clin. Psychiatry* 70, 1041–1050.
- Skrede, S., Ferno, J., Vazquez, M.J., Fjaer, S., Pavlin, T., Lunder, N., Vidal-Puig, A., Dieguez, C., Berge, R.K., Lopez, M., Steen, V.M., 2012. Olanzapine, but not aripiprazole, weight-independently elevates serum triglycerides and activates lipogenic gene expression in female rats. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 15, 163–179.
- Skrede, S., Steen, V.M., Ferno, J., 2013. Antipsychotic-induced increase in lipid biosynthesis: activation through inhibition. *J. Lipid Res.* 54, 307–309.
- Skrede, S., Martins, L., Berge, R.K., Steen, V.M., Lopez, M., Ferno, J., 2014. Olanzapine depot formulation in rat: a step forward in modelling antipsychotic-induced metabolic adverse effects. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 17, 91–104.
- Stubbs, B., Wang, A.K., Vancampfort, D., Miller, B.J., 2016. Are leptin levels increased among people with schizophrenia versus controls? A systematic review and comparative meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* 63, 144–154.
- Tan, W., Fan, H., Yu, P.H., 2010. Induction of subcutaneous adipose proliferation by olanzapine in rodents. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 34, 1098–1103.
- van der Zwaal, E.M., Luijendijk, M.C., Evers, S.S., la Fleur, S.E., Adan, R.A., 2010. Olanzapine affects locomotor activity and meal size in male rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 97, 130–137.
- van der Zwaal, E.M., Merkesteyn, M., Lam, Y.K., Brans, M.A., Luijendijk, M.C., Bok, L.I., Verheij, E.R., la Fleur, S.E., Adan, R.A., 2012. The acute effects of olanzapine on ghrelin secretion, CCK sensitivity, meal size, locomotor activity and body temperature. *Int. J. Obes. (Lond.)* 36, 254–261.
- van der Zwaal, E.M., Janhunen, S.K., la Fleur, S.E., Adan, R.A., 2014. Modelling olanzapine-induced weight gain in rats. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 17, 169–186.
- Victoriano, M., de Beaupreire, R., Naour, N., Guerre-Millo, M., Quignard-Boulangue, A., Huneau, J.F., Mathe, V., Tome, D., Hermier, D., 2010. Olanzapine-induced accumulation of adipose tissue is associated with an inflammatory state. *Brain Res.* 1350, 167–175.
- Wellman, M., Abizaid, A., 2015. Growth hormone secretagogue receptor dimers: a new pharmacological target (1,2,3). *eNeuro* 2.
- Weston-Green, K., Huang, X.F., Deng, C., 2011. Olanzapine treatment and metabolic dysfunction: a dose response study in female Sprague Dawley rats. *Behav. Brain Res.* 217, 337–346.
- Wittekind, D.A., Kluge, M., 2015. Ghrelin in psychiatric disorders – a review. *Psychoneuroendocrinology* 52, 176–194.
- Yan, H., Chen, J.D., Zheng, X.Y., 2013. Potential mechanisms of atypical antipsychotic-induced hypertriglyceridemia. *Psychopharmacology (Berl.)* 229, 1–7.
- Zhang, X., Yeung, D.C., Karpisek, M., Stejskal, D., Zhou, Z.G., Liu, F., Wong, R.L., Chow, W.S., Tso, A.W., Lam, K.S., Xu, A., 2008. Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes* 57, 1246–1253.
- Zhang, Q., Deng, C., Huang, X.F., 2013. The role of ghrelin signalling in second-generation antipsychotic-induced weight gain. *Psychoneuroendocrinology* 38, 2423–2438.
- Zhang, Q., Lian, J., He, M., Deng, C., Wang, H., Huang, X.F., 2014. Olanzapine reduced brown adipose tissue thermogenesis and locomotor activity in female rats. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 51, 172–180.
- Zugno, A.I., Barcelos, M., Oliveira, L., Canever, L., Luca, R.D., Fraga, D.B., Matos, M.P., Rezin, G.T., Scaini, G., Burigo, M., Streck, E.L., Quevedo, J., 2012. Energy metabolism, leptin, and biochemical parameters are altered in rats subjected to the chronic administration of olanzapine. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 34, 168–175.