

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2018

Kamila Nováčková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Inhibitory fosfatidylinositol 3-kinázy v terapii nádorových onemocnění

Kamila Nováčková

Bakalářská práce

2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kamila Nováčková**
Osobní číslo: **C14313**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Inhibitory fosfatidylinositol 3-kinázy v terapii nádorových onemocnění**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Charakteristiku fosfatidylinositol 3-kináz (PI3K) zahrnující strukturu a funkci jednotlivých izoforem PI3K, přehled základních signálních drah se zaměřením na jejich roli v patogenezi nádorových onemocnění.
2. Inhibitory PI3K - rozdělení, vlastnosti, mechnismus působení. Možnosti ovlivnění vzniku a průběhu nádorových onemocnění pomocí PI3K inhibitorů.
3. Zhodnocení terapeutického potenciálu inhibitorů PI3K u nádorových onemocnění.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Karel Královec, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce:

28. listopadu 2016

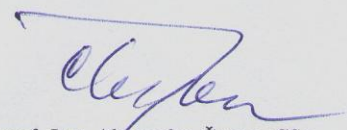
Termín odevzdání bakalářské práce:

7. července 2017



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 16. 6. 2018

Nováčková Kamila

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu RNDr. Karlu Královcovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a cenné rady při tvorbě této bakalářské práce. Dále patří poděkování celé rodině za podporu, kterou mi poskytovali během studia.

Anotace

Tato bakalářská práce se zabývá signální dráhou PI3K/Akt/mTOR a jejími inhibitory v terapii nádorových onemocnění. PI3K jsou enzymy účastníci se mnoha buněčných procesů jako je apoptóza, proliferace, buněčný růst a metabolismus. Deregulace signální dráhy PI3K prostřednictvím amplifikace nebo mutace PI3K, ale i dalších genů signální dráhy, vede ke vzniku nádorového onemocnění. Práce poskytuje informace o všech izoformách PI3K, signální dráze PI3K/Akt/mTOR a terapeutickém potenciálu PI3K inhibitorů v léčbě nádorových onemocnění. Velké množství PI3K inhibitorů je součástí preklinických studií a některé z nich byly již vybrány pro studie klinické. Práce popisuje zejména využití PI3K inhibitorů v léčbě rakoviny prsu, tlustého střeva, prostaty, glioblastomu a melanomu.

Klíčová slova

fosfatidylinositol 3-kinázy, inhibitory, karcinom prsu, kolorektální karcinom, karcinom prostaty, glioblastom, melanom

Anotation

This bachelor thesis is focused on PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and its inhibitors in cancer therapy. PI3Ks are enzymes involved in many cellular processes such as apoptosis, proliferation, cell growth and metabolism. Deregulation of PI3K signaling pathway leads to oncogenesis due to the amplification, genetic mutation of PI3K gene and the other components of the pathway. The thesis provides information about all isoforms of PI3Ks, signaling pathway and therapeutic potential of inhibitors in cancer treatment. A wide range of PI3K inhibitors have been tested in preclinical studies and some have entered clinical trials. The thesis describes especially PI3K inhibitors for treatment of breast, colorectal, prostate cancer, glioblastoma multiforme and melanomas.

Keywords

phosphatidylinositol 3-kinases, inhibitors, breast cancer, colorectal cancer, prostate cancer, glioblastoma, melanoma

Obsah

1	Úvod.....	13
2	Fosfatidylinositoly	14
3	Fosfatidylinositol 3-kinázy	14
3.1	I třída PI3K.....	15
3.1.1	IA třída PI3K	16
3.1.2	IB třída PI3K.....	16
3.2	II třída PI3K	16
3.3	III třída PI3K.....	17
4	Signální dráha PI3K/Akt/mTOR a její patogeneze při nádorovém onemocnění.....	19
4.1	Aktivace PI3K.....	19
4.2	Akt/PKB	21
4.3	mTOR.....	22
4.4	PTEN.....	24
5	Inhibitory signální dráhy PI3K/Akt/mTOR.....	26
5.1	První generace.....	26
5.1.1	Wortmannin	26
5.1.2	LY294002	27
5.2	Druhá generace.....	28
5.2.1	PI3K inhibitory	28
5.2.2	Duální inhibitory.....	30
5.2.3	Akt inhibitory.....	30
5.2.4	mTOR inhibitory.....	31
6	Karcinom prsu.....	34
6.1	Inhibitory PI3K v preklinických a klinických studiích u BC	35
7	Kolorektální karcinom (CRC)	37
7.1	Inhibitory PI3K v preklinických a klinických studiích u CRC.....	37

8	Karcinom prostaty.....	38
8.1	Inhibitory PI3K v preklinických a klinických studiích u PC	39
9	Glioblastoma multiforme	40
9.1	Inhibitory PI3K v preklinických a klinických studiích u glioblastomu.....	40
10	Melanom	42
10.1	Výzkum inhibitorů PI3K u léčby melanomu.....	42
11	Zhodnocení terapeutického potenciálu inhibitorů PI3K u nádorových onemocnění	45
12	Závěr	46
13	Seznam použité literatury	47

Seznam zkratek

Akt (PKB)	protein kináza B
AR	androgenní receptor
ATP	adenosintrifosfát
BC	rakovina prsu
CLL	chronická lymfatická leukémie
CRC	kolorektální karcinom
CRPC	kastračně-rezistentní rakovina prostaty
DNA-PK	DNA-dependentní protein kináza
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
ER	estrogenový receptor
GBM	glioblastoma multiforme
GPCRs	receptory spřažené s G proteinem
HER2	lidský epidermální receptor 2
HR	hormonální receptor
IGF-1	inzulinu podobný růstový faktor-1
IRS1	inzulin-receptorový substrát
MTD	maximální tolerovaná dávka
mTOR	savčí cíl rapamycinu
OS	celkové přežití
PC	rakovina prostaty

PDGF	destičkový růstový faktor
PDK1	fosfatidylinositol-dependentní kináza 1
PFS	přežití bez progresu onemocnění
PI-3,4,5-P ₃	fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát
PI-3,4-P ₂	fosfatidylinositol-3,4-bisfosfát
PI3K	fosfatidylinositol 3-kináza
PI-3-P	fosfatidylinositol-3-fosfát
PIKKs	fosfatidylinositol 3-kinázám-příbuzné kinázy
PR	progesteronový receptor
PSA	prostatický specifický antigen
PtdIns (PI)	fosfatidylinositol
PTEN	fosfatáza a tenzin homologu
RR	míra odpovědi
RTKs	tyrosinkinázové receptory
TNBC	triple-negativní rakovina prsu
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor

1 Úvod

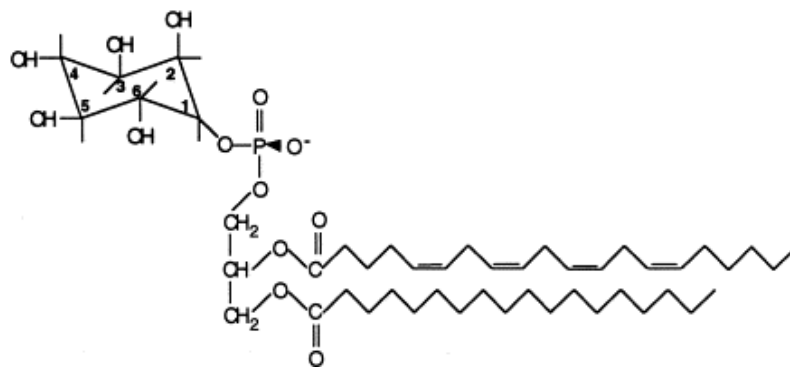
Fosfatidylinositol 3-kinázy (PI3K) jsou enzymy ze skupiny kináz, které přenáší fosfátovou skupinu z donorové molekuly (nejčastěji z ATP) na molekulu cílovou. PI3K se podílí na regulaci mnoha buněčných procesů zahrnujících apoptózu, buněčný růst, proliferaci a metabolismus.

Deregulace signální dráhy PI3K vede k rozvoji mnoha onemocnění, kam mimo nádorového onemocnění můžeme zařadit chronické záněty, autoimunitní onemocnění, alergie, aterosklerózu, kardiovaskulární a metabolické choroby. PI3K dráha je důležitá pro správnou funkci organismu a její častá deregulace vedla k výzkumu PI3K inhibitorů. Tato bakalářská práce se zabývá hlavně PI3K inhibitory pro léčbu nádorového onemocnění. V současné době je testována široká škála inhibitorů signální dráhy PI3K v preklinických a klinických studiích. Některé inhibitory byly už pro léčbu nádorového onemocnění schváleny.

Cílem této bakalářské práce je podat přehled o struktuře a funkci jednotlivých izoform PI3K, signální dráze a inhibitorech signální dráhy PI3K s jejich využitím při léčbě nádorového onemocnění. Práce je zaměřena především na karcinom prsu, tlustého střeva, prostaty, glioblastom a melanom.

2 Fosfatidylinositoly

Fosfatidylinositoly (PtdIns) jsou fosfolipidy patřící do skupiny glycerolfosfolipidů. Ve své molekule mají na fosfátové skupině navázaný cyklický alkohol inositol, na kterém dochází k fosforylaci řadou kináz a produkci různých fosfoinositidů. Nejvíce jsou zastoupeny v eukaryotických buňkách, kde hrají klíčovou roli v regulaci širokého spektra buněčných procesů. PtdIns se podílí například na regulaci vápníku, vezikulárním transportu, buněčném růstu, dělení a pohybu buněk. Fosforylované lipidy mohou také působit jako prekurzory druhých posílů. Nejvýznamnějším zástupcem této skupiny je fosfatidylinositol 3-kináza, která je také nejvíce popsána (Kimberley a Lewis 1999; Sasaki *et al.* 2009).



Obr. č. 1 Struktura fosfatidylinositolu (Kimberley a Lewis, 1999)

3 Fosfatidylinositol 3-kinázy

Fosfatidylinositol 3-kinázy jsou enzymy z rodiny lipidových kináz. PI3K byly objeveny v 80. letech 20. století. Jejich funkcí je fosforylace inositolového kruhu PtdIns na pozici 3-OH skupiny. Tyto enzymy jsou rozděleny do tří tříd (třída I, II a III) na základě jejich struktury, substrátové specifity, mechanismu aktivace a funkce. Konečnými produkty těchto tříd jsou fosfatidylinositol-3-fosfát (PI-3-P), fosfatidylinositol-3,4-bisfosfát (PI-3,4-P₂) a fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát (PI-3,4,5-P₃; Vivanco a Sawyers, 2002; Engelman *et al.*, 2006; Bader *et al.*, 2005; Okkenhaug, 2013).

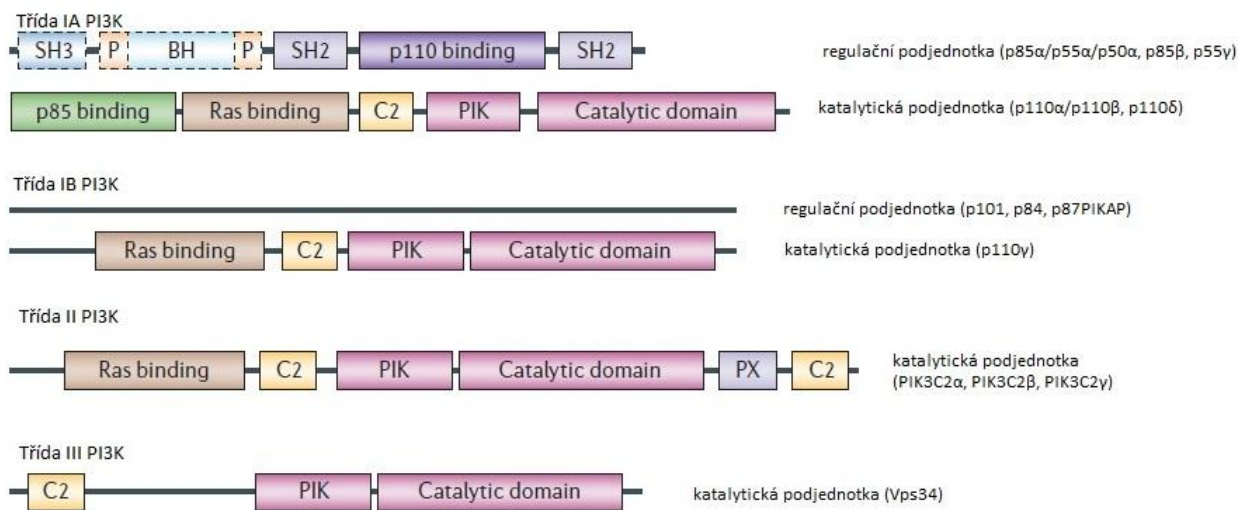
Můžeme se setkat i se IV třídou, kam se řadí enzymy strukturou podobné PI3K, s označením PIKKs (PI3K-related kinases). Sem patří například savčí cíl rapamycinu (mTOR) a DNA-dependentní proteinkináza (DNA-PK; Zhao *et al.*, 2017).

3.1 I třída PI3K

Fosfatidylinositol 3-kinázy třídy I jsou heterodimerní enzymy složené z katalytické a regulační podjednotky. Katalytická podjednotka se vyskytuje ve čtyřech izoformách značených jako p110 α , p110 β , p110 γ , p110 δ . Izoformy p110 α , p110 β a p110 δ jsou kombinovány s regulační podjednotkou p85; p110 γ se kombinuje s podjednotkou p101 (Zhao a Vogt, 2008).

Tato třída přednostně produkuje fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát (PIP3) z fosfatidylinositolu-4,5-bisfosfátu. PIP3 patří k druhým poslům, kde hrají důležitou roli v základních buněčných reakcích jako je růst buněk, jejich přežití, migrace a metabolismus (Zhao *et al.*, 2017). Dalšími produkty této třídy jsou fosfatidylinositol-3-fosfát a fosfatidylinositol-3,4-bisfosfát (Engelman *et al.*, 2006).

I třída PI3K je dále rozdělena na podtřídy IA a IB podle receptorů. Podtřída IA je aktivována pomocí tyrosinkinázových receptorů (RTKs), zatímco IB pomocí receptorů spřažených s G-proteinem (GPCRs; Engelman *et al.*, 2006).



Obr. č. 2 Struktura jednotlivých tříd PI3K (upraveno dle Engelman, 2006)

3.1.1 IA třída PI3K

PI3K této podtřídy se skládají z regulační podjednotky p85 a katalytické podjednotky p110. Izoformy regulační podjednotky označujeme jako p85 α , p85 β , p55 γ , p55 α , p50 α a jsou kódovány pomocí genů *PIK3R1*, *PIK3R2* a *PIK3R3*. P55 γ se bohatě vyskytuje v mozku a varlotech. Regulační podjednotka je složena z domény vázající p110 (p110-binding domain; inter-SH2), která je obklopena z obou stran SH2 doménami. Izoformy p85 α a p85 β mají v N-terminální oblasti sekvence bohaté na prolin, BH doménu a SH3 doménu (Engelman *et al.*, 2006).

Izoformy katalytické podjednotky p110 α , p110 β a p110 δ jsou kódovány geny *PIK3CA*, *PIK3CB*, *PIK3CD*. *PIK3CA* je jedním z nejčastějších genů vyskytujících se v souvislosti s nádorovým onemocněním (Okkenhaug, 2013). Katalytická podjednotka obsahuje vazebné místo pro Ras protein. Podjednotky P110 α a p110 β se nachází ve všech tkáních, zatímco p110 δ je přednostně exprimován v leukocytech (Engelman *et al.*, 2006; Katso *et al.*, 2001).

3.1.2 IB třída PI3K

Podtřída IB je tvořena regulační podjednotkou p101 a katalytickou podjednotkou p110. Dvě další izoformy regulační podjednotky p84 a p87PIKAP byly objeveny až později (Engelman *et al.*, 2006). Třída IB PI3K je aktivována přímo pomocí GPCR skrze podjednotku G $\beta\gamma$ (Liu *et al.*, 2009).

3.2 II třída PI3K

Třída II se skládá z jedné katalytické podjednotky p110 γ , která jako substrát využívá fosfatidylinositol (PI) a fosfatidylinositol-4-fosfát (PI-4-P). Produktem této třídy je fosfatidylinositol-3-fosfát (PI-3-P) a fosfatidylinositol-3,4-bisfosfát (PI-3,4-P₂). Pro tuto třídu jsou známy 3 izoformy, PI3KC2 α , PI3KC2 β , PI3KC2 γ , které mohou být aktivovány pomocí tyrosinkinázových receptorů (RTKs), cytokinových receptorů a integrinů (Engelman *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009).

Ještě do nedávné doby patřily izoformy třídy II mezi nejméně prozkoumané PI3K a znalosti o jejich intracelulárních rolích a mechanismech regulace byly velmi omezené. Bylo prokázáno, že PI3K této třídy se podílejí například na transportu glukózy, sekreci inzulínu, buněčné migraci a aktivaci krevních destiček (Falasca *et al.*, 2017).

3.3 III třída PI3K

III třída PI3K je tvořena pouze jedním zástupcem s katalytickou podjednotkou Vps34 (vacuolar protein sorting defective 34) a regulační podjednotkou Vps15 (vacuolar protein sorting defective 15). Vps34 byl poprvé popsán u *Saccharomyces cerevisiae*. Produktem této třídy je fosfatidylinositol-3-fosfát, který je syntetizován z fosfatidylinositolu (PI) a podílí se na regulaci membránového transportu. Vps34 je významným regulátorem autofagie, buněčné odpovědi na nedostatek živin, a je nepostradatelný pro správnou funkci srdce a jater. PI3K třídy III se také účastní syntézy proteinů cestou mTOR (Engelman *et al.*, 2006; Backer, 2008, Liu *et al.*, 2009, Jaber *et al.*, 2012).

Tab. 1 Souhrnný přehled všech tříd PI3K (Jean a Kiger, 2014; Błajecka *et al.*, 2011)

Izoforma	Kódující gen	Substrátová specifita	Buněčná funkce	Výskyt
Třída IA				
Regulační podjednotka p85 α , p55 α , p50 α	PIK3R1	PI PI-4-P PI-4,5-P2	<ul style="list-style-type: none"> - proliferace - metabolismus - migrace - přežití 	všudypřítomné
p85 β p55 γ	PIK3R2 PIK3R3			
Katalytická podjednotka p110 α p110 β p110 δ	PIK3CA PIK3CB PIK3CD		<ul style="list-style-type: none"> - imunita (p110δ) 	p110 δ především v leukocytech
Třída IB				
Regulační podjednotka p101	PIK3R5	PI PI-4-P PI-4,5-P2	<ul style="list-style-type: none"> - zánět - shlukování trombocytů (agregace) - imunita 	především v leukocytech
Katalytická podjednotka p110 γ	PIK3CG			
Třída II				
Katalytická podjednotka PI3KC2 α PI3KC2 β PI3KC2 γ	PIK3C2A PIK3C2B PIK3C2G	PI PI-4-P	<ul style="list-style-type: none"> - vezikulární transport - buněčná migrace - chemotaxe 	široká exprese, ale nejsou všudypřítomné PI3KC2 γ především v játrech
Třída III				
Katalytická podjednotka Vps34	PIK3C3	PI	<ul style="list-style-type: none"> - autofágie - vezikulární transport 	všudypřítomné
Regulační podjednotka Vps15 (p150)	PIK3R4			

4 Signální dráha PI3K/Akt/mTOR a její patogeneze při nádorovém onemocnění

Fosfatidylinositol 3-kinázy jsou součástí signální dráhy PI3K/Akt/mTOR. Dráha PI3K/Akt/mTOR se účastní mnoha buněčných procesů zahrnujících transkripci, translaci, proliferaci, růst a přežití buněk. Poruchy v jednotlivých komponentách dráhy vedou k její deregulaci a vzniku nádorového onemocnění. PI3K/Akt/mTOR je druhou nejčastěji změněnou dráhou po p53. Cílená inhibice jednotlivých složek signalizace může být stěžejní pro léčbu rakoviny (Hassan *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2009; Vara *et al.*, 2004).

PI3K signální dráha má klíčovou roli při vzniku nádorového onemocnění. Odchytky v signální dráze PI3K/Akt/mTOR se mohou objevit prostřednictvím několika mechanismů a následkem toho dochází k rozvoji mnoha typů rakoviny. Do genomových aberací, které ovlivňují signalizaci PI3K, zahrnujeme mutaci somatických buněk a buněk zárodečné linie, amplifikaci (zmnožení) genu, delecii, duplikaci, inverzi, metylaci, sníženou expresi a funkci PTEN, amplifikaci a mutaci PIK3CA nebo amplifikaci Akt. Signální dráha je aktivována pomocí RTK, ale stejně tak pomocí genetické mutace a zmnožením klíčových komponent dráhy PI3K (Hassan *et al.*, 2013; Engelman *et al.*, 2006; Engelman, 2009).

4.1 Aktivace PI3K

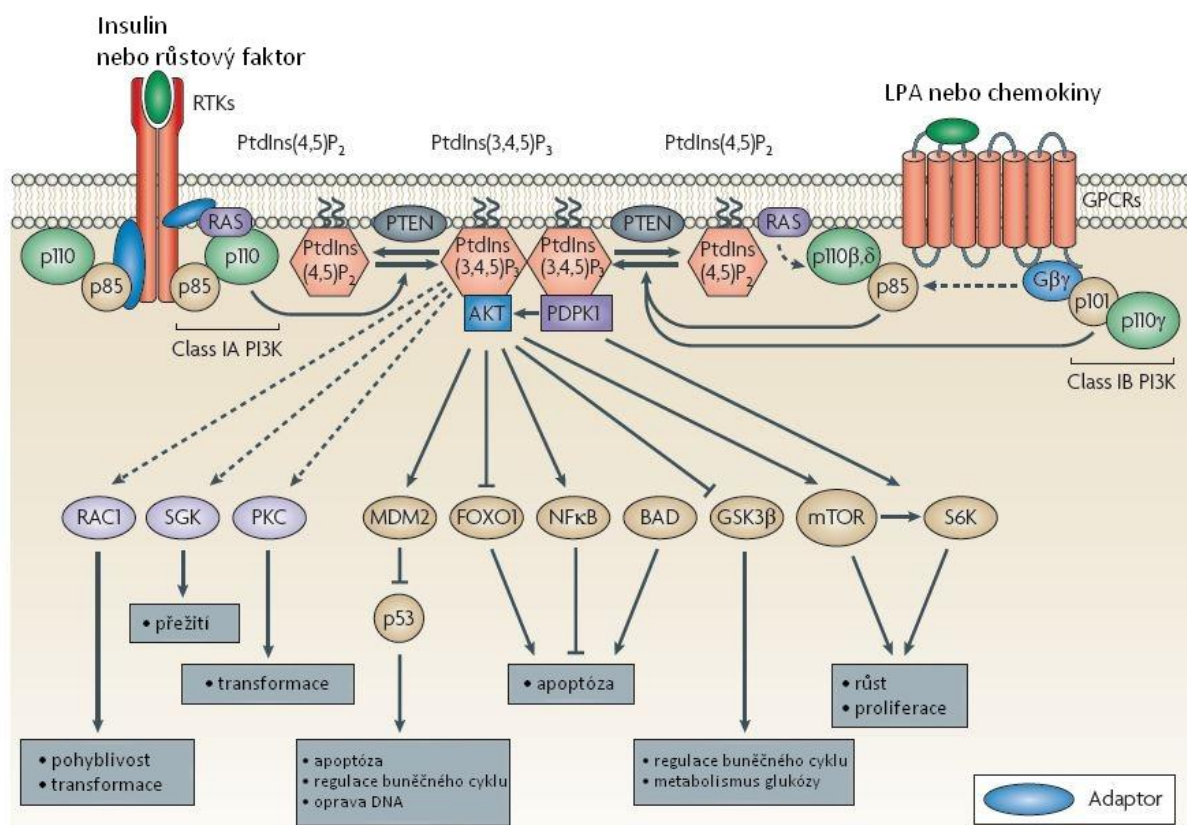
PI3K signalizace může být aktivována více cestami – tyrosinkinázovými receptory (RTK), integriny, receptory spřaženými s G proteinem (GPCR) a onkogeny (například Ras protein). Izoformy třídy IA jsou aktivovány RTK nebo Ras, IB pomocí G-proteinu a Ras. Aktivace třídy II probíhá skrze inzulinové receptory, receptory růstového faktoru a integriny. Enzymy třídy IA PI3K jsou nejdůležitější pro aktivaci signální dráhy PI3K/Akt/mTOR, protože katalyzují tvorbu fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfátu z fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (Hassan *et al.*, 2013).

Stimulací růstového faktoru a následnou aktivací RTKs jsou PI3K třídy IA navázány na membránu. Navázání na membránu probíhá přímou interakcí regulační podjednotky PI3K p85 s aktivovanými receptory (např. receptor pro destičkový růstový faktor – PDGF) nebo spojením s receptory přes adaptorové proteiny (např. inzulin-receptorový substrát – IRS1). Spojení regulační podjednotky p85 s RTKs je umožněno pomocí SH2 domén podjednotky. Aktivovaná katalytická podjednotka p110 přemění PI-4,5-P₂ na PI-3,4,5-P₃. Přeměnou se vytvoří vazebná místa pro signální proteiny, které mají PH doménu. Mezi signální proteiny

patří fosfatidylinositol-dependentní kináza 1 (PDK-1) a Akt (serin-threoninová kináza), které následně ovlivňují širokou škálu procesů (Liu *et al.*, 2009).

Při patogenezi PI3K mohou být aktivovány nadměrnou expresí proteinu nebo mutací v katalytické p110 a regulační p85 podjednotce. Gen PIK3CA, kódující katalytickou podjednotku p110 α , je často amplifikován v mnoha typech rakoviny. Jedná se o rakovinu hlavy a krku, děložního čípku, žaludku a rakovinu plic. Bodové mutace v p110 α byly identifikovány u rakoviny mozku, tlustého střeva, rakoviny plic a u hepatocelulárního karcinomu (Hassan *et al.*, 2013; Engelman *et al.*, 2006). Mezi nejčastější mutace genu PIK3CA patří E545K a H1047R. Ukázalo se, že zvyšují hladinu PIP3 a tím dochází k nadměrné aktivaci Akt (Liu *et al.*, 2009).

Na rozdíl od PIK3CA, mutace specifické pro rakovinu nebyly u genu PIK3CB nalezeny. Ale amplifikaci genu PIK3CB najdeme u primárních nádorů vaječnicků a štítné žlázy (Liu *et al.* 2009; Kok *et al.*, 2009). Gen PIK3R1, kódující regulační podjednotku p85 α třídy IA, je jedním z nejčastěji změněných genů u nejčastějšího a nej malignějšího gliomu mozku - glioblastomu (Liu *et al.*, 2009).



Obr. č. 3 Signální dráha I třídy PI3K (upraveno dle Liu *et al.*, 2009)

4.2 Akt/PKB

Akt se řadí mezi serin/threonin proteinové kinázy. Patří do třídy AGC kináz (protein kinase A/protein kinase G/protein kinase C-like) a stejně jako ostatní kinázy této třídy vyžaduje fosforylaci pro svou aktivaci. Gen AKT je buněčným homologem onkogenu V-AKT, který nalezneme u onkoviru AKT8. Rozlišujeme 3 izoformy Akt1, Akt2, Akt3, které jsou kódované geny *PKBα*, *PKBβ* a *PKBγ*. Isoformy si jsou strukturou a velikostí velmi podobné. Všechny obsahují PH doménu a jsou regulovány podobnými mechanismy (Scheid a Woodgett, 2001; Hassan *et al.*, 2013; Manning a Toker, 2017).

Po aktivaci PI3K jsou na plazmatické membráně syntetizované PtdIns. Jejich přítomnost je důležitá pro translokaci Akt z cytoplazmy na cytoplazmatickou membránu. Akt se svou PH doménou interaguje s PtdIns, čímž dojde k translokaci, konformaci Akt a odhalení aminokyselinových reziduí. V aktivační smyčce jsou fosforylována rezidua Thr308 a Ser473 pomocí kinázy PDK-1(3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1) a tím dochází k celkové aktivaci Akt (Vanhaesebroeck a Alessi, 2000; Hassan *et al.*, 2013).

Fosforylovaný a aktivovaný Akt se oddělí od cytoplazmatické membrány a translokuje se do různých částí buňky (jádra, endoplazmatického retikula, Golgiho komplexu, mitochondrií), kde se účastní buněčných procesů. Má vliv na vývoj buněčného cyklu, přežití, metabolismu a migraci buněk. Akt zvyšuje přežití buněk pomocí inhibice apoptózy prostřednictvím fosforylace FOXO, BD, MDM2, GSK3 a YAP. Podporuje buněčný růst skrze aktivaci mTOR a zvyšuje buněčnou proliferaci regulací FOXOs a p53. Akt se také podílí na metabolismu lipidů a glukózy (Piguat a Dufourt, 2011; Carnero, 2010).

Amplifikace Akt1 byla zjištěna u karcinomů žaludku, amplifikace Akt2 byla ve 12 % případů rakoviny vaječníků a 10-20 % případů karcinomu pankreatu. V případě rakoviny prsu byly nalezeny amplifikace Akt1 i Akt2, u rakoviny prostaty Akt3. Nejčastější je mutace E17K v PH doméně Akt (Hassan *et al.*, 2013).

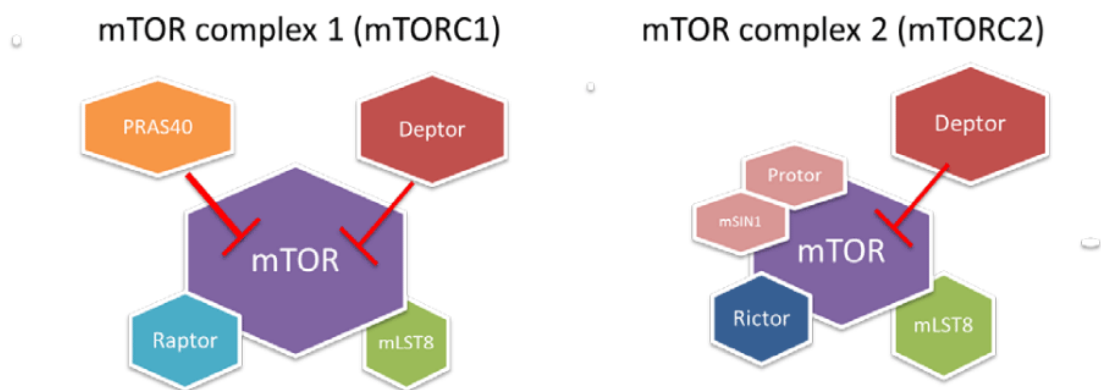
4.3 mTOR

mTOR je atypická serin/threonin proteinová kináza, které patří do IV třídy označované jako PIKKs. mTOR existuje ve dvou proteinových komplexech: mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) a mTORC2. mTORC1 je složený z mTOR proteinu, LST8 (lethal with SEC13 protein 8), PRAS40 (proline-rich Akt1 substrate of 40 kDa), Raptor (regulatory-associated protein of mTOR) a Deptor (DEP domain-containing mTOR-interacting protein). mTORC2 je tvořen podjednotkami mTOR, mSIN1 (mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1), mLST8 (mammalian lethal with SEC13 protein 8), Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR), Protor (proteins observed with rictor) a Deptor (Hassan *et al.*, 2013).

Dráha mTOR je regulována růstovými faktory, dostupností živin a energetickou zásobou buněk. mTOR je také regulována dostupností aminokyselin a studie naznačují, že se na tom podílí Vps34 (Engelman *et al.*, 2006)

Komplex mTORC1 hraje stěžejní roli při translaci mRNA pomocí faktorů 4E-BP1 (4E-binding protein 1) a S6 kinázy 1 (S6K1). Mimo jiné mTORC1 reguluje proliferaci, přežití buněk a angiogenezi. mTORC2 kontroluje podtřídu kináz AGC, kam patří Akt (Hassan *et al.*, 2013; Laplante a Sabatini, 2012).

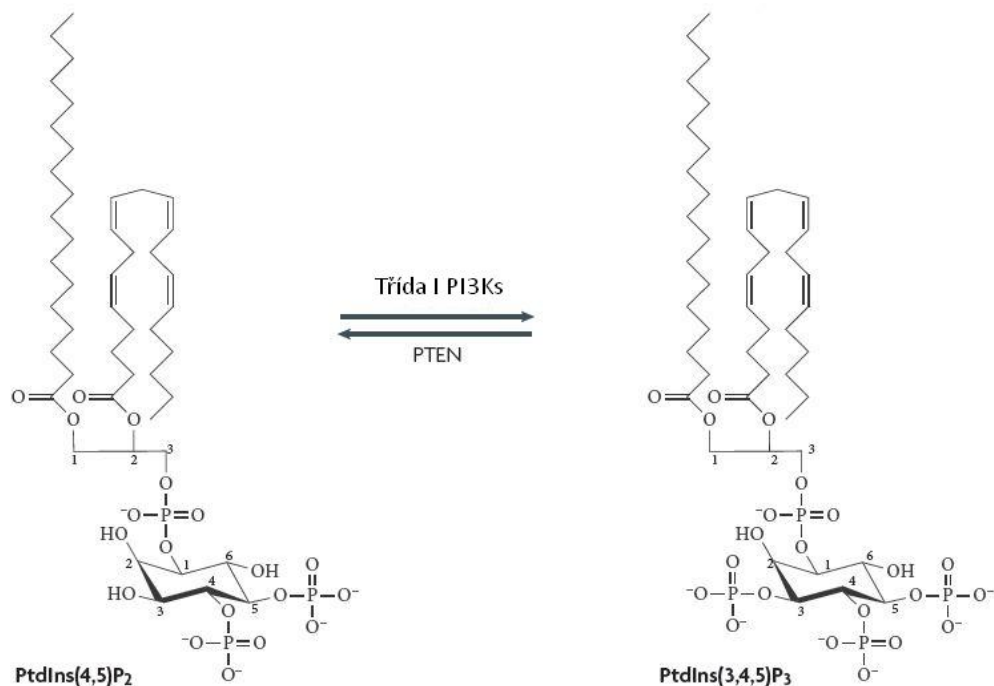
Zvýšená signalizace mTOR u nádorového onemocnění je často výsledkem mutací v signalizaci úzce související s mTOR. Jedná se například o amplifikaci genu PIK3CA, která může kontinuálně aktivovat mTOR, ztrátu nebo inaktivaci PTEN (Zaytseva *et al.*, 2012). Aktivita mTORC2 je zvýšena v gliomech a souvisí s vysokou expresí rictoru. Nadměrná exprese rictoru má za následek zvýšené shromažďování a aktivitu mTORC2 a podporuje proliferaci, migraci a invazivitu buněk gliomu (Masri *et al.*, 2007).



Obr. č. 4 Složení mTOR komplexů (Upraveno dle Coquillard *et al.*, 2015)

4.4 PTEN

Dráha PI3K/AKT je negativně regulována (inhibována) fosfatázou a homologem tenzinu PTEN (phosphatase and tensin homolog). PTEN je lipidová fosfatáza, která defosforyluje PI(3,4,5)P₃ na PI(4,5)P₂ v pozici 3-OH skupiny. Dochází k ovlivnění množství PDK1 a Akt na plazmatické membráně a výsledkem je snížení Akt aktivity. PTEN reguluje množství PIP₃ a funguje jako nádorový supresor (Piguet a Dufourt, 2011; Carracedo a Pandolfi, 2008).



Obr. č. 5 Defosforylace PIP₃ (Upraveno dle Liu *et al.*, 2009)

PTEN patří mezi hlavní regulátory signální dráhy PI3K. Jeho tumor supresivní funkce je přičítána lipidovým fosfatázám, protože ztráta funkce lipidové fosfatázy PTEN vede ke zvýšení aktivace dráhy PI3K/Akt/mTOR. Ztráta funkce a aktivity PTEN probíhá prostřednictvím mnoha mechanismů, mezi něž patří mutace, metylace, nestabilita proteinů a fosforylace.

Bylo dokázáno, že jeho delece a mutace se vyskytují u mnoha typů nádorového onemocnění. Jedná se o nádory mozku, močového měchýře, prsu, prostaty a endometria. Methylace PTEN byla pozorována v 69 % případů nemalobuněčného karcinomu plic. Methylace promotorové oblasti PTEN je patrná u rakoviny endometria a žaludku (Hassan *et al.*, 2013).

Zárodečné mutace v genu PTEN se mohou projevit dědičnými chorobami jako je Cowdenova choroba nebo Bannayan-Riley-Ruvalcabanův syndrom. Pro obě nemoci jsou typické benigní nádory a vysoké riziko vzniku rakoviny (Engelman *et al.*, 2006).

Tab. 2 Výskyt genetických změn v dráze PI3K u nádorových onemocnění ((Liu *et al.*, 2009; Bhutani *et al.*, 2013)

Kódující gen	Genetická změna	Tkáň výskytu rakoviny/ typ rakoviny
PIK3CA (p110 α)	mutace amplifikace	prso, děložní sliznice, tlusté střevo, horní trávicí trakt, žaludek, slinivka, vaječníky, játra, mozek, jícen, plíce, melanom, močové cesty, prostata, štítná žláza spinocelulární karcinom plic, adenokarcinom plic, malobuněčný karcinom plic, nemalobuněčný karcinom plic, děložní čípek, prso, hlava a krk, žaludek, štítná žláza, jícen, děložní sliznice, vaječníky, glioblastom
PIK3CB (p110 β)	amplifikace zvýšená aktivita a exprese	vaječníky, prso tlusté střevo, močový měchýř
PIK3R1 (p85 α)	mutace	glioblastom, vaječníky, tlusté střevo
AKT1	mutace amplifikace	prso, tlusté střevo, vaječníky, plíce žaludek
AKT2	amplifikace	vaječníky, slinivka, hlava a krk, prso
AKT3	mutace amplifikace	melanom glioblastom
PTEN	ztráta heterozygotnosti mutace	žaludek, prso, melanom, prostata, glioblastom děložní sliznice, mozek, kůže, prostata, tlusté střevo, vaječníky, prso, hematopoetická a lymfoidní tkáň, žaludek, játra, ledviny, močové cesty, štítná žláza, slinivka, plíce

5 Inhibitory signální dráhy PI3K/Akt/mTOR

Jak již bylo zmíněno dříve, PI3K signální dráha hraje zásadní roli v buněčném růstu, proliferaci a přežití buněk a její dysregulace vede ke vzniku nádorového onemocnění. PI3K jsou rozděleny do tří tříd na základě preferovaného substrátu, struktury, mechanismu aktivace a funkce. Třída I zahrnuje čtyři izoformy: PI3K α , β , γ a δ . Konečným produktem této třídy je PIP3, který iniciuje signální transdukcii, která vede k aktivaci serin-threonin proteinové kinázy AKT a dále aktivaci mTOR. Inhibitory jednotlivých komponent dráhy PI3K/AKT/mTOR bývají v posledních letech intenzivně zkoumány (Jin *et al.*, 2017).

Mnoho PI3K inhibitorů, které jsou v současnosti v klinickém vývoji, inhibuje všechny katalytické podjednotky izoform I třídy PI3K, p110 α , p110 β a p110 δ , zatímco jiné inhibují pouze jednotlivé izoformy. Nicméně zůstává nejasné, který typ inhibitorů bude klinicky účinnější, zda inhibitory specifické pro danou izoformu (isoform-specific inhibitors), nebo inhibitory inhibující všechny izoformy (pan-inhibitors). PI3K inhibitory můžeme tedy rozdělit na specifické a nespecifické. Specifické inhibitory umožňují podávání vyšších dávek, což vede k úplnější cílové inhibici a snížení některých toxických účinků pozorovaných u duálních inhibitorů a pan-inhibitorů. (Bauer *et al.*, 2015). Inhibitory mohou inhibovat i ostatní komponenty signální dráhy, například duální inhibitory inhibují současně PI3K a mTOR (Engelman, 2009).

5.1 První generace

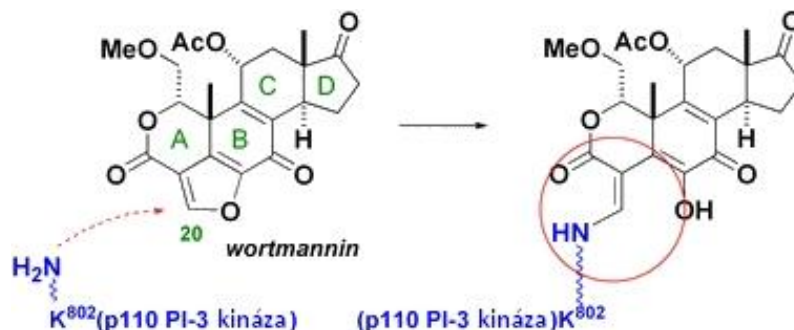
5.1.1 Wortmannin

Wortmannin je přírodní produkt, izolovaný z *Penicillium wortmanni*. Byl objevený v roce 1957 Brianem a jeho spolupracovníky (Wipf a Halter, 2005). Struktura wortmanninu byla zcela objasněna až o 15 let později. (Marone *et al.*, 2008). Původně byl popsán jako silný inhibitor respiračního vzplanutí neutrofilů a monocytů (Knight *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009).

Navzdory omezením selektivity, wortmannin se ukázal jako neocenitelný pro získání informací ohledně signální dráhy PI3K. Koncentrace, která je potřebná pro inhibici PI3K se pohybuje v rozmezí 1-100 nM. Pro svou toxicitu je však pro léčbu nevhodný.

Nevratná inhibice třídy I a III PI3K probíhá prostřednictvím kovalentních vazeb katalytických míst. Místem pro kovalentní připojení wortmanninu je lysinový zbytek, který se nachází ve vazebném místě ATP katalytické podjednotky p110. Pro inhibici II třídy PI3K je

zapotřebí vyšší koncentrace wortmanninu (více než 100 nM; Ward *et al.*, 1996). Wortmannin se mimo jiné ukázal jako účinný blokátor mTOR (Wipf a Halter, 2005).

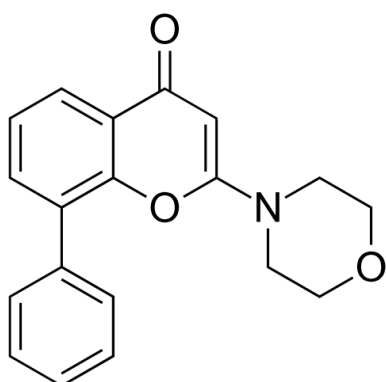


Obr. č. 6 Vazba wortmanninu a lysinového zbytku PI3K (Upraveno dle Wipf a Halter, 2005)

5.1.2 LY294002

Inhibitor LY294002, systematickým názvem 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one, je synteticky připravený derivát flavonoidu quecertinu (Gharbi *et al.*, 2007). LY294002 patří mezi kompetitivní inhibitory, kde inhibice probíhá na ATP vazebném místě PI3K. Inhibice je reverzibilní. PI3K inhibuje při koncentraci 100 μ M. Ukázal se jako inhibitor s vynikající chemickou stabilitou v roztoku (Knight *et al.*, 2007).

Tento inhibitor je hojně využíván v buněčné biologii, stejně jako wortmannin nám poskytuje informace ohledně fungování signální dráhy PI3K (Ward *et al.*, 1996). LY294002 a wortmannin nedosáhly klinických studií kvůli své toxicitě a neselektivnosti (Zhao *et al.*, 2017).

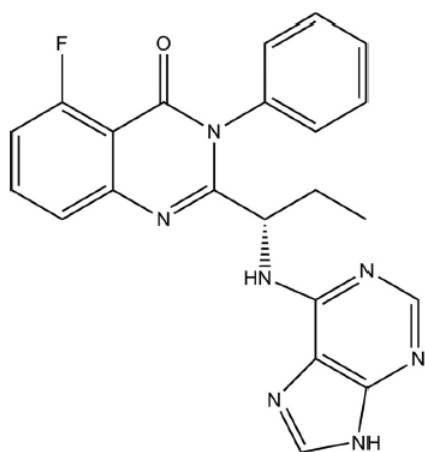


Obr. č. 7 Struktura inhibitoru LY294002 (Denny a Rewcastle, 2014)

5.2 Druhá generace

5.2.1 PI3K inhibitory

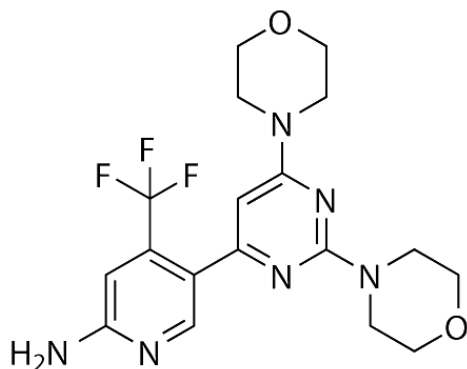
Idelalisib patří mezi nejúčinnější p110 δ -selektivní inhibitory PI3K. Můžeme jej najít také pod názvem Zydelig, CAL101 nebo GS1101. Idelalisib blokuje základní signály BCR (B-buněčné receptory), které jsou aktivovány pomocí p110 δ a jsou důležité pro leukemické B-buňky, které jsou na této aktivaci závislé (Thorpe *et al.*, 2015). Idelalisib nevykazuje žádnou cytotoxicitu vůči T lymfocytům nebo NK buňkám (Zhao *et al.*, 2017). Dosáhl pozoruhodných úspěchů v klinických studiích u pacientů s chronickou lymfatickou leukémií. Inhibitor byl proto schválen pro léčbu různých hematologických malignit, včetně zmíněné chronické lymfatické leukémie (CLL) a B-lymfomu (typ non-Hodgkinova lymfomu; Massacesi *et al.*, 2016). Idelalisib byl první inhibitor PI3K, kterému byla udělena licence pro léčbu rakoviny (Zhao *et al.*, 2017).



Obr. č. 8 Struktura idelalisibu (Somoza *et al.*, 2015)

IPI-145 byl původně vyvinut společností Intellikine se jménem INK-1197. Se strukturou podobnou Idelalisibu inhibuje PI3K δ , ve vyšších koncentracích účinně inhibuje také PI3K γ . Účinně inhibuje cytokiny indukovanou proliferaci buněk CLL bez zjevné cytotoxicity vůči normálním B- a T-lymfocytům. Klinické výsledky prokázaly účinnost inhibitoru u indolentních non-Hodgkinových lymfomů a CLL. IPI-145 se ukázal také jako slibný inhibitor pro léčbu autoimunitních a zánětlivých onemocnění (Zhao *et al.*, 2017).

BKM120 (buparlisib) firmy Novartis patří mezi pan-inhibitory, které se zaměřují na všechny čtyři izofomy I třídy. Nyní je předmětem studie pro léčbu rakoviny prsu v III fázi klinických studií. Jeví se jako slibný pro léčbu rakoviny hlavy a krku, nemalobuněčného karcinomu plic, lymfomu a glioblastomu (Zhao *et al.*, 2017).



Obr. č. 9 Struktura BKM120 (Maira *et al.*, 2012)

BYL719 je dalším inhibítorem vyvinutým firmou Novartis. Má vysokou citlivost pro gen PI3KCA. V současné době je hodnocen pro léčbu rakoviny prsu ve III fázi klinické studie a ve fázi II pro léčbu rakoviny hlavy a krku a nemalobuněčného karcinomu plic (Zhao *et al.*, 2017).

GDC-0941 byl vyvinut společností Gentech strukturální úpravou inhibítora PI-10364, u kterého bylo hlášeno, že má nepříznivé farmakokinetické vlastnosti. GDC-0941 inhibuje PI3K α , β , δ a γ . Při vysokých koncentracích dokáže inhibovat i mTOR, ale používá se jako selektivní inhibitor PI3K. Inhibitor zastavuje buněčný cyklus v G1 fázi a vyvolá apoptózu u rakovinotvorných buněk. GDC-0941 je v současnosti hodnocen pro léčbu solidních tumorů a non-Hodgkinova lymfomu v I fázi klinických studií (Zhao *et al.*, 2017).

BAY 80-6946 je vysoce selektivní pan-PI3K inhibitor od firmy Bayer. Narozdíl od ostatních nových inhibitorů se BA-80-6946 podává intravenózně. Inhibitor je součástí III fáze klinických studií pro léčbu B-buněčných lymfomů (Zhao *et al.*, 2017).

PX-866 je modifikovaná sloučenina založená na wortmanninu s lepší stabilitou a menší toxicitou. Jeho inhibice PI3K je nevratná. V současnosti je testován pro léčbu glioblastoma multiforme v II fázi klinické studie (Zhao *et al.*, 2017).

ZSTK 474 syntetizovaný firmou Zenyaku inhibuje všechny čtyři izoformy PI3K. Nyní je v klinické studii fáze I/II pro léčbu solidních tumorů (Zhao *et al.*, 2017).

5.2.2 Duální inhibitory

Duální inhibitory byly původně vyvinuty jako inhibitory pouze pro PI3K, ale následně se ukázalo, že některé účinně inhibovaly mTORC1 a mTORC2. Schopnost inhibovat PI3K a mTOR současně může znamenat inhibici celé signální dráhy. (Benjamin *et al.*, 2011).

NVP-BEZ235 firmy Novartis byl vyvinut jako inhibitor PI3K α , β , δ a γ . Řadí se mezi duální inhibitory PI3K/mTOR, protože se ukázalo, že umí inhibovat i dráhu mTOR. Jeho inhibice je reverzibilní (Jin *et al.*, 2017). NVP-BEZ235 nyní prochází hodnocením II fáze klinické studie pro léčbu rakoviny močového měchýře, slinivky a nádorů perivaskulárních epitelioidních buněk (Zhao *et al.*, 2017).

GDC-0980 patří mezi inhibitory vyvinuté firmou Genentech. Nyní se účastní fáze II klinických studií pro léčbu rakoviny ledvin, prostaty, endometria a prsu (Zhao *et al.*, 2017).

XL-765 firmy Exelixis patří mezi duální inhibitory s inhibicí PI3K α , β , δ , γ a mTOR. XL-765 zabraňuje fosforylaci Akt, p70S6K a S6K. Nyní se hodnotí ve fázi I/II klinické studie pro pacienty se zhoubnými novotvary (Zhao *et al.*, 2017).

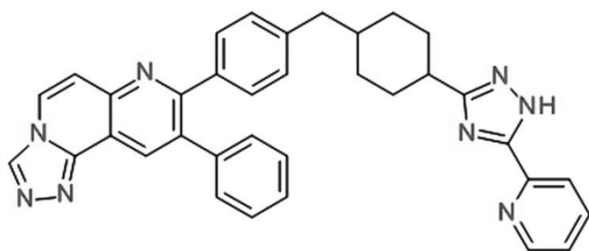
GSK2126458 vyvinutý firmou GlaxoSmithKline jako duální inhibitor PI3K/mTOR. V současnosti je ve fázi I klinické studie pro terapii solidních tumorů, idiopatické plicní fibrózy a lymfomu (Zhao *et al.*, 2017).

5.2.3 Akt inhibitory

Perifosin byl hodnocen v klinických studiích u celé řady typů nádorů. S výjimkou karcinomu ledvinových buněk, sarkomu a Waldenströmovy makroglobulinémie byly jeho výsledky při užití jako monoterapie velmi omezené (Richardson *et al.*, 2012)

AZD5363 inhibuje všechny izoformy Akt. AZD5363 významně zlepšil protinádorovou léčbu docetaxelu, lapatinibu a trastuzumabu u karcinomu prsu xenograftů. Probíhá několik klinických studií ve fázi I a II k posouzení inhibitoru pro léčbu rakoviny prsu, žaludku a prostaty (Nitulescu *et al.*, 2016).

MK-2206 je selektivní alosterický inhibitor Akt, který účinně inhibuje především izoformy Akt1 a Akt2, proti Akt3 má nižší účinnost. Indukuje zastavení buněčného cyklu v G1-fázi a zvyšuje apoptózu. Několik studií v I fázi hodnotí MK-2206 samostatně nebo v kombinaci s HER inhibitory, jako je trastuzumab nebo lapatinib, u různých typů karcinomu prsu (Nitulescu *et al.*, 2016).



Obr. č. 10 Struktura MK-2206 (Nitulescu *et al.*, 2016)

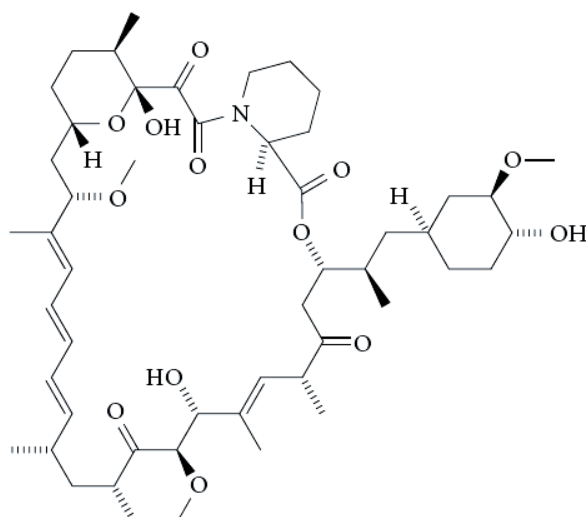
Miltefosin byl hodnocen v klinických studiích u sarkomu měkkých tkání a pokročilého kolorektálního karcinomu. Nicméně dávky potřebné k protinádorovému účinku byly příliš toxické. Miltefosin samotný i v kombinaci s jinou terapií, se ukázal jako účinný a přijatelný pro viscerální a kožní leishmaniózu (Nitulescu *et al.*, 2016).

Navzdory velkému počtu sloučenin, u kterých bylo dokázáno, že inhibují Akt *in vitro* i *in vivo*, je pouze omezený počet těch, které se dostaly do klinického hodnocení. Miltefosin je jediný Akt inhibitor schválený pro léčbu, ale nikoli pro léčbu rakoviny. Na základě buněčné funkce Akt a účinnosti inhibitorů, je hlavním směrem výzkumů kombinovaná léčba s jinými látkami (Nitulescu *et al.*, 2016).

5.2.4 mTOR inhibitory

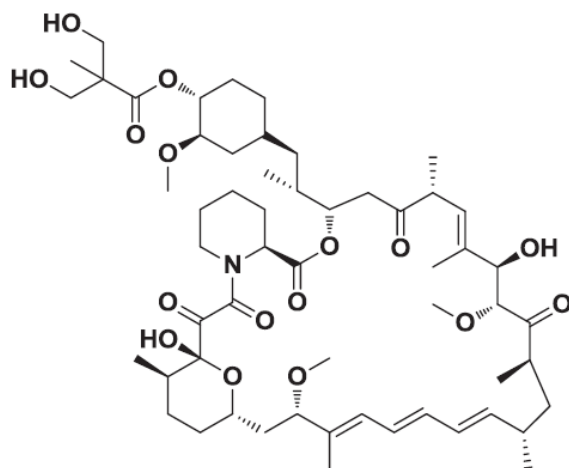
mTOR inhibitory rozdělujeme na dvě skupiny: analogy rapamycinu, které ovlivňují komplex mTORC1 a ATP kompetitivní inhibitory, které blokují aktivitu mTORC1 i mTORC2 (Guertin a Sabatini, 2009).

Rapamycin, známý také jako sirolimus, je přírodní inhibitor produkovaný bakterií *Streptomyces hygroscopicus*. Rapamycin má antifungální, imunosupresivní a protinádorové účinky. Mechanismus účinku rapamycinu není zcela objasněn, ale je známo, že v komplexu s proteinem FKBP12 se rapamycin ireverzibilně naváže na mTORC1 a inhibuje jeho kinázovou aktivitu. Mechanismus inhibice je zachován i u rapalogů (Zaytseva *et al.*, 2012). V souvislosti s rapamycinem a jeho protinádorovým účinkem se začaly komerčně vyrábět polosyntetické analogy rapamycinu, známé jako rapalogy, které mají vylepšené farmakokinetické vlastnosti (Benjamin *et al.*, 2011).



Obr. č. 11 Struktura rapamycinu (Benjamin *et al.*, 2011)

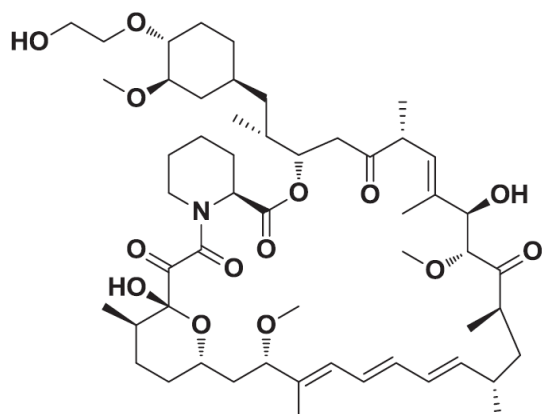
Temsirolimus, také známý jako CCI779, je ve vodě rozpustný derivát esteru rapamycinu pro perorální i intravenózní užití. Byl schválen pro léčbu karcinomu ledvin (Rini, 2008). Léčba pomocí temsirolimu vede k zastavení buněčného cyklu ve fázi G1 a inhibuje angiogenezi tumorů snížením syntézy vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF, Wan *et al.*, 2006).



Obr. č. 12 Struktura temsirolimu (Asati *et al.*, 2016)

Everolimus, jiným jménem RAD001, se aplikuje se u léčby rakoviny pankreatu, gastrointestinálního traktu a rakoviny plic. Používá se u dospělých s neuroendokrinními nádory, které nelze chirurgicky odstranit. Byl schválen pro léčbu renálních karcinomů, neuroendokrinních nádorů pankreatu a subependymálního obrovskobuněčného astrocytomy spojeného s tuberózní sklerózou. V kombinaci s exemestanem se užívá u postmenopauzálních

žen s pokročilým karcinomem prsu HR+ a HER2-. Jako imunosupresivum byl schválen k léčbě proti odmítnutí transplantátu. (Zaytseva *et al.*, 2012; Everolimus, 2018).



Obr. č. 13 Struktura everolimu (Asati *et al.*, 2016)

6 Karcinom prsu

Rakovina prsu je nejčastější rakovinou u žen a druhou nejčastější příčinou úmrtí na rakovinu u žen po rakovině plic. Mezi příznaky patří bulka či ztluštění v části prsu nebo podpaží, vyrážka, začervenaní a změna velikosti. Rizikové faktory pro vznik onemocnění mohou být dědičné, ale roli hraje i životní styl, zejména příjem alkoholu zvyšuje pravděpodobnost výskytu. Karcinom prsu může postihnout také muže, ale je to méně časté. Léčba probíhá pomocí několika metod, do kterých je zahrnuta operace, radiační terapie a chemoterapie (Nordqvist, 2017).

PI3K/Akt/mTOR dráha je hlavní signální dráhou v patofyziologii karcinomu prsu. Změna dráhy se odhaduje až na 70 % případů rakoviny prsu (Lee *et al.*, 2015). PI3K se váže na různé RTK, včetně EGFR, IGF1R, inzulinového receptoru a HER2, což vede k jejich aktivaci a následně signalizaci. Mechanismy, které vedou k odchýlkám PI3K dráhy u nádorového onemocnění zahrnují mutace a amplifikace PI3KCA, ztrátu PTEN a mutace nebo amplifikace Akt izoform. Hyperaktivace PI3K dráhy vede k zvýšení proliferace, migrace, invaze, metabolismu, angiogenezi a rezistenci vůči chemoterapii (Karla a Nakshatri, 2017).

Typ karcinomu prsu je klasifikován na základě profilu genové exprese nebo imunohistochemického barvení. Imunohistochemické barvení používané ke klasifikaci zahrnuje estrogenový receptor (ER), progesteronový receptor (PR), lidský epidermální růstový faktor HER2 a v některých případech procento buněk s Ki67 expresí. Podle toho můžeme karcinomy rozdělit na 4 skupiny: 1) karcinomy s luminální diferenciací A (ER-a/nebo PR-pozitivní, HER2-negativní); 2) karcinomy s luminální diferenciací B (ER a/nebo PR-pozitivní, HER2-pozitivní nebo Ki67 > 14 %); 3) karcinomy s nadměrnou expresí HER2; 4) triple-negativní karcinomy (ER-, PR- a HER2-negativní; Sohn *et al.*, 2016). Každý typ karcinomu může mít specifický a proměnlivý mechanismus změny dráhy PI3K, jehož následkem jsou odlišné klinické projevy, které vyžadují určitou cílenou léčbu (Cicado a Park, 2012). PI3KCA mutace se vyskytují přibližně u 35 % HR-pozitivní rakoviny prsu, 20 %- 25 % u karcinomu s nadměrnou expresí HER2 a s nižší frekvencí u TNBC (Lee *et al.*, 2015).

6.1 Inhibitory PI3K v preklinických a klinických studiích u BC

Pro cílení na PI3K v rakovině prsu bylo vyvinuto několik inhibitorů. V klinické studii Ib fáze byl použit orální pan-inhibitor BKM120 (buparlisib) v kombinaci s letrozolem u postmenopauzálních pacientek s ER+ metastatickým karcinomem. Byl to první klinický výzkum, kde se kombinoval PI3K inhibitor a hormonální terapie. U dvou pacientek byla zaznamenána pozitivní reakce na léčbu a téměř 30 % pacientek bylo bez progresu onemocnění v průběhu 6 měsíců. V současné době BKM120 je ve dvou pokračujících studiích III fáze a je užíván v kombinaci s fulvestrantem nebo placebem u pacientek s ER+, HER2- karcinomem, jejichž léčba byla rezistentní k aromatázovým inhibitorům a aromatázovým inhibitorům v kombinaci s everolimem (Yamamoto-Ibusuki *et al.*, 2015; Bahrami *et al.*, 2018b).

Ostatní PI3K inhibitory v preklinických a klinických studiích zahrnují LY294002, GDC0032, PI3K α inhibitor alpelisib (BYL719). Ve studiích jsou zahrnuty i PI3K/mTOR inhibitory, NVP-BEZ235 a GDC0980. V preklinických studiích fulvestrant kombinovaný s GDC0980, GDC0032, a GDC0941 inhiboval růst nádorů u MCF-7 (buněčná linie rakoviny prsu). Kombinace everolimu s tamoxifenem a LY294002 zvýšila protinádorové účinky samotného tamoxifenu. Ve fázi I/II klinického výzkumu pacientů s pokročilým nebo metastatickým HER2+ karcinomem, jejichž léčba byla rezistentní na trastuzumab, se používala kombinace BKM120 a trastuzumabu. Dva pacienti (17 %) částečně zareagovali na léčbu a u sedmi pacientů (58 %) nenastala progresie nemoci po 6 týdnů. Pacientům s metastatickým karcinomem ER+/HER2- byla také podávána kombinace buparlisibu a letrozolu. Největšího účinku se dosáhlo u pacientů s mutací PI3K i MAP3K. Výsledky studie II fáze fulvestrantu samotného nebo v kombinaci s pan-PI3K inhibitorem pictilisibem pro léčbu metastatické ER+ rakoviny rezistentní na inhibitory aromatáz (AI) ukázaly, že kombinace nijak nezlepšila PFS ani u mutací PIK3CA, a ani u rakoviny prsu s nemutovaným genem (wild-type gene). Významného výsledku bylo dosaženo u PR+ pacientů bez ohledu na mutaci PIK3CA. Výsledek naznačuje, že PI3K inhibice v kombinaci s hormonovou terapií by mohla překonat rezistenci u lumenálního typu A rakoviny prsu.

U pacientů s metastazujícím karcinomem HER2+ a PIK3CA mutací byla nalezena nižší odezva a PFS na adjuvantní chemoterapii. Ve dvou rozsáhlých studiích (GeparSixto a GeparQuinto) proběhla analýza 737 pacientů, kteří užívali trastuzumab a lapatinib, anti-EGFR přípravky nebo kombinaci těchto sloučenin s chemoterapií. Ukázalo se, že téměř 20 % tumorů bylo s PIK3CA mutací. Míra patologické kompletní odpovědi byla výrazně nižší u pacientů s mutacemi PIK3CA ve srovnání s pacienty s nemutovaným genem. V souladu s těmito

studiemi II fáze výzkumů (Neo-ALTTO, Neosphere a TBCRC006) také prokázaly výrazně nižší patologickou kompletní odpověď u tumorů s PI3KCA mutacemi ve srovnání s nemutovaným typem genu. Nicméně v rozsáhlé studii III fáze byly hodnoceny ženy s HER2+ ve stádiu II/III, kde jim byla podávána adjuvantní chemoterapie s trastuzumabem. V této studii nebyly žádné rozdíly v PFS mezi pacienty s PI3KCA mutacemi a nemutovaným typem genu. V současnosti probíhá prospektivní studie II fáze (NeoPHOEBE), kde se hodnotí neoadjuvantní paclitaxel v kombinaci s trastuzumabem a BKM120 pro léčbu HER2+ karcinomu v II/III stádiu a snaží se objasnit tyto nesrovnalosti (Bahrami *et al.*, 2018b).

Klinický výzkum ISPY-2 pro neoadjuvantní léčbu hodnotící kombinaci paclitaxelu, trastuzumabu a Akt inhibitoru MK-2206 zaznamenal rychlejší odezvu na léčbu v porovnání s užitím samotného paclitaxemu a trastuzumabu u pacientů s časným stádiem karcinomu s nadměrnou expresí HER2. Orální podání MK-2206 (135 mg/ týdně) v kombinaci s paclitaxelem a trastuzumabem je dobře tolerováno a má slibné protinádorové účinky u pacientů s karcinomem s nadměrnou expresí HER2, jejichž léčba byla rezistentní vůči samotnému trastuzumabu. Ostatní Akt inhibitory, AZD5363, GDC0068, a MK2006, jsou v časně fázi klinických výzkumů. Výzkum těchto inhibitorů se zaměřil na tumory s deficiencí PTEN a mutací PIK3CA, Akt1 (Bahrami *et al.*, 2018b).

Výsledky studie BOLERO-2 třetí fáze vedly ke schválení přidání everolimu (mTOR inhibitoru) k exemestanu u léčby pacientů s ER+ metastatickým karcinomem prsu, který byl rezistentní vůči inhibitorům aromatáz. Kombinovaná léčba výrazně zlepšila přežití bez progresse onemocnění (progression free survival, PFS). Nicméně další analýza neukázala přínos v celkovém přežití (overall survival, OS). V další studii II fáze bylo hodnoceno 50 žen v II/III stádiu TBNC, které užívaly samotný paclitaxel nebo kombinaci paclitaxelu, everolimu a FEC (fluorouracilu, epirubicinu, and cyklofosfamidu). Přidání everolimu bylo dobře snášeno, nicméně to nevedlo k žádnému výraznému zlepšení z hlediska míry odpovědi (RR; 48 % oproti 30 % ve prospěch everolimu) a patologické kompletní odpovědi (30 % oproti 26 % ve prospěch everolimu).

Mezi další mTOR inhibitory patří AZD2014, který inhibuje mTORC1 i mTORC2. AZD2014 je zkoumán v několika studiích u pacientů s rakovinou prsu. Ve studiích je kombinován s fulvestrantem, inhibitory CDK 4/6 (cyklin-dependentní kinázy), palbociclibem a fulvestrantem, Akt inhibitorem AZD5363, MEK inhibitorem a dalšími (Bahrami *et al.*, 2018b).

7 Kolorektální karcinom (CRC)

Rakovina tlustého střeva patří mezi nejčastěji diagnostikovanou rakovinu, nicméně vzhledem k pokroku ve screeningových metodách a zlepšení léčby klesá úmrtnost lidí s kolorektálním karcinomem. Mezi symptomy karcinomu se řadí krev ve stolici, zácpa nebo průjem, bolest a nadýmání břicha, pocit plnosti, únava, nevolnost a nevysvětlitelná ztráta hmotnosti. Rizikovými faktory jsou starší věk, strava bohatá na živočišné bílkoviny a nasycené tuky, nedostatek příjmu vlákniny, vysoká spotřeba alkoholu, kolorektální karcinom v rodinné anamnéze, obezita, kouření a nedostatek fyzické aktivity (Nordqvist, 2018).

Nejčastější mutace u kolorektálního karcinomu jsou KRAS a BRAF. Tyto mutace vedou k signalizaci drah RAS/RAF/MEK/MAPK a PI3K/Akt, které přispívají k proliferaci buněk, inhibici apoptózy, vzniku metastáz a angiogeneze u CRC. Mimoto byla u CRC nalezena mutace genu PI3KCA. Studie uvedly, že koexistence mutace KRAS a PI3KCA vede ke špatné prognóze onemocnění (Kim *et al.*, 2013).

7.1 Inhibitory PI3K v preklinických a klinických studiích u CRC

V současnosti se dvě studie věnují inhibitoru BKM120, pan-inhibitoru třídy I, u pacientů s CRC. V jedné se kombinuje s panitumumabem a v druhé s irinotecanem. Největších výsledků inhibitoru bylo dosaženo u CRC s mutacemi PTEN nebo PIK3CA. Výskyt mutací je ale pod 20 % případů, proto je nejlepším řešením kombinovaná léčba. Dalšími pan-inhibitory PI3K, které se účastní klinických studií, jsou GDC-0941 (pictilisib) a XL147.

Velkou nevýhodou pan-inhibitorů I třídy jsou silné vedlejší účinky v podobě vyrážky, únavy a hyperglykémie a snížení dávek by mohlo vést k neúplné inhibici. Z tohoto důvodu jsou zkoumány další specifické inhibitory s menší toxicitou a lepší úplnou cílovou inhibicí. GSK2636771, inhibitor izoformy p110, má zvlášť velký význam pro karcinomy s PTEN deficitem. Je velmi dobrým kandidátem pro další výzkum inhibice u pacientů s CRC, kde je vysoká ztráta PTEN. Inhibitor BYL719 a cetumibax s LGX818 jsou v klinické studii fáze I, která je zaměřena na léčbu pacientů s metastatickým CRC s mutací BRAF (Bahrami *et al.* 2018a).

Ve studii II fáze se účastnilo 38 pacientů s metastatickým CRC. U těch, kterým byla podávána kombinace inhibitoru Akt perifosinu (KRX-0401) a capecitabinu, se dosáhlo vyšší účinnosti léčby, než když byl capecitabin podáván samostatně (medián času do progresu byl

27,5 týdne oproti 10,1; celkové přežití bylo 17,7 měsíce oproti 7,6 a celková míra odpovědi byla 20 % oproti 7 %). Dalším inhibitorem Akt, který je součástí klinických studií, je MK-2206. V klinické studii I fáze byla u inhibitoru MK-2206 nalezena přijatelná míra toxicity. V současnosti probíhají dvě studie ve II fázi pro pacienty s metastatickým CRC, kde se jim podává MK-2206 samostatně, nebo v kombinaci s MEK inhibitory (Bendell *et al.*, 2011; Bahrami *et al.*, 2018a).

Existuje několik studií, které se věnují mTOR inhibitorům temsirolimu a everolimu u pacientů s metastatickým CRC. Klinická studie ve II fázi odhalila určité klinické využití kombinace temsirolimu a irinotecanu, ale bylo navrženo další zkoumání. Účinkem temsirolimu bylo potlačení proliferace buněk adenomu, angiogeneze a snížení velikosti i počtu polypů. Everolimus byl dobře snášen a inhiboval růst u HCT116 (buněčná linie CRC) xenograftů (Bahrami *et al.*, 2018a).

Duální inhibitor GSK2126458 měl příznivé účinky *in vivo* i *in vitro*. Další duální inhibitor, který byl rozsáhle studován v souvislosti s CRC, je BEZ235. Ve studiích s geneticky upravenými zvířecími modely s nemutovaným typem genu PI3KCA kolorektálního karcinomu se ukázalo, že BEZ235 způsobuje regresi tumoru, a tím je vhodným kandidátem pro léčbu CRC s nemutovaným typem genu PIK3CA. U modelu, do kterého byl vložen štěp z pacienta (patient derived xenograft) s RAS-mutací CRC inhibitor BE235 v kombinaci se selumetinibem, MEK inhibitorem, stabilizoval nemoc v 70 % případů. V kombinaci s irinotecanem způsoboval u CRC apoptózu buněk. Nicméně se stále pokračuje ve výzkumu molekulárního mechanismu BEZ235 u CRC (Bahrami *et al.*, 2018a, Foley *et al.*, 2017).

8 Karcinom prostaty

Rakovina prostaty patří mezi nejčastější typy rakoviny u mužů. Nejčastěji se vyskytuje u mužů nad 50 let, méně často u mužů mladších 45 let. Předstojná žláza (prostata) hraje roli při řízení moči a produkuje sekret, který je součástí ejakulátu. Nachází se pod močovým měchýřem a dotýká se stěny konečníku. U karcinomu v počátečním stádiu obvykle nejsou žádné příznaky. Nicméně pokud se příznaky objeví, tak se nejčastěji jedná o časté, problémové močení a krev v moči (Nordqvist, 2017). Rakovina prostaty je detekována na základě měření množství prostatického specifického antigenu (PSA) v krvi a následnou biopsií prostaty. Možností léčby je hormonální terapie, chemoterapie, radikální prostatektomie, externí radioterapie a brachyradioterapie (Majumder a Sellers, 2005).

Aberace PI3K/Akt/mTOR dráhy byly zjištěny přibližně u 40 % případů časného stádia karcinomu prostaty a u 70-100 % případů pokročilého karcinomu. Zejména ztráta PTEN vede ke konstitutivní aktivaci PI3K dráhy u 30 % primární a 60 % kastračně-rezistentní rakoviny prostaty (CRPC). Aktivace dráhy je spojena s rezistencí na androgen-deprivační terapii a s progresí onemocnění (Crumbaker *et al.*, 2017).

8.1 Inhibitory PI3K v preklinických a klinických studiích u PC

PI3K spolu s androgenními receptory (AR) jsou hlavními spouštěči karcinogeneze a progresu u rakoviny prostaty. První volbou pro léčbu karcinomu prostaty je hormonální terapie, může se však stát, že se stane vůči hormonální léčbě odolným (CRPC). Řešením pro léčbu CRPC by mohla být kombinační terapie zaměřená na PI3K dráhu a AR. Současné studie hodnotí protinádorovou aktivitu dvou orálních inhibitorů PI3K dráhy, inhibitoru PI3K AZD8186 a AKT inhibitoru AZD5363, samostatně i v kombinaci s androgen-deprivační terapií. Preklinické hodnocení AZD8186 a AZD5363 bylo provedeno ve vícenásobných PTEN-pozitivních a PTEN-negativních buněčných liniích a xenograftů různých stádií PC reagujících na androgenní léčbu a CRPC. Marques a spol. (2015) testovali 12 lidských buněčných linií s PC s inhibitory AZD5363 a AZD8186 *in vitro* spolu s kombinací kastrační terapie a inhibitorů *in vivo* u myši s PTEN-negativními a PTEN-pozitivními xenografty. Výsledkem experimentu byla citlivost 10 z 12 buněčných linií na AZD5363 s IC50 <1 mM a 7 z 12 linií na AZD8186. Největší sensitivitu na inhibitory vykazovaly PTEN-negativní buněčné linie. *In vivo* AZD5363 a AZD8186 podávané samostatně inhibovaly růst PTEN-negativních xenograftů ve srovnání s placebem o 60 až 66 %. Kombinace obou látek s kastrací vedla k dlouhodobé regresi nádoru, která po ukončení léčby přetrvávala. Zatímco u PTEN-pozitivních modelů významně nevykazovaly protinádorovou aktivitu inhibitory ani samostatně, a ani v kombinaci s kastrací. Inhibitory AZD8186 a AZD5363 jsou tedy slibnými kandidáty pro léčbu PTEN-negativních karcinomů prostaty, zejména v kombinaci s androgen-deprivační terapií (Marques *et al.*, 2015).

U studií pan-inhibitorů PI3K GDC-0941 a BKM120 bylo prokázáno, že inhibují proliferaci *in vitro* v buněčných liniích, androgenně nezávislých, PC3 a zastavují růst nádorů u myši s xenografty PC3 buněk (Bitting a Armstrong, 2013). BKM120 v I fázi klinické studie byl dobře tolerován a ukázal předběžnou aktivitu u pacientů s pokročilými tumory, zahrnujícími i karcinom prostaty. Je předmětem studií v kombinaci s aberateron acetátem a enzalutamidem pro pacienty s metastatickým CRPC (Claudio, 2016).

9 Glioblastoma multiforme

Glioblastoma multiforme (GBM, glioblastom) je nejčastější primární tumor v centrálním nervovém systému. Glioblastom (WHO gr. IV) je charakterizován rychlým agresivním růstem, rozsáhlou infiltrací do okolních tkání v mozku a angiogenezi, která přispívá ke špatné prognóze. Navzdory rozmanitosti moderní terapie, zahrnující maximální chirurgickou resekci, adjuvantní radioterapii a chemoterapii, je dvouletá relativní míra přežití pacientů s GBM přibližně 26,5 % a medián celkového přežití 14-15 měsíců (Zhao H. F. *et al.*, 2017; Hanif *et al.*, 2017).

PI3K dráha je změněna přibližně v 70 % případů glioblastomu buď delecí PTEN nebo amplifikací EGFR a VEGFR. Nadměrná exprese EGFR je jednou z nejčastějších signalizačních mutací u GBM a vede ke zvýšené aktivaci dráhy PI3K (Mao *et al.*, 2012; Yuan a Cantley, 2008). Glioblastomy se často vyskytují u Cowdenova syndromu, Bannayan-Riley-Ruvalcabanova syndromu a Lhermitte-Duclosovy nemoci, které mohou být způsobené mutací PTEN (Kanu *et al.*, 2009).

9.1 Inhibitory PI3K v preklinických a klinických studiích u glioblastomu

Standardní terapií pro léčbu GBM je záření a chemoterapeutická látka temozolomid. Předpokládá se, že cytotoxicita je způsobena alkylací DNA, což vede k poškození DNA a smrti nádorových buněk. Aktivace dráhy PI3K/Akt/mTOR však může vést k vývoji rezistence vůči terapii a ztlumení terapeutického účinku temozolomidu. Proto inhibitory zaměřené na PI3K/Akt/mTOR a EGFR se objevily jako možnost potenciální léčby pro pacienty s glioblastomem. V současné době je v preklinických a klinických studiích hodnocena řada inhibitorů, buď samostatně, nebo v kombinaci s tradiční léčbou. (Li *et al.*, 2016).

Inhibitor BKM120 (buparlisib) je slibným terapeutickým cílem pro léčbu glioblastomu. Má schopnost proniknout skrze hematoencefalickou bariéru. BKM120 indukuje zastavení buněčného cyklu v G2/M a apoptózu v GBM buňkách (Zhao, H. F. *et al.*, 2017). U buněčných linií (U87, U251, LN229, LN18, D54) a xenograftů prokázal protinádorovou aktivitu bez ohledu na aberace PTEN a EGFR. Synergická aktivita byla pozorována v kombinaci s temozolomidem u myších xenograftů s mutací PTEN^{null} (Massacesi *et al.*, 2016). Perorální BKM120 byl dobře snášen myši s U87 intracerebrálními xenografty a prodloužil jejich přežití. Ve studii Ia fáze s maximální tolerovanou dávkou (MTD, 100 mg/den) u pacientů s pokročilými solidními tumory byl BKM120 dobře snášen a vykazoval protinádorový účinek (Wen *et al.*, 2012).

V II fázi klinické studie byl testován v kombinaci s bevacizumabem (monoklonální protilátka proti VEGF) u pacientů s recidivujícím glioblastomem. Pacienti po první radiaci/chemoterapii a chirurgické resekci byli léčeni 60 mg BKM120 denně s bevacizumabem 10 mg/kg každé dva týdny čtyřtýdenního cyklu. Léčba pokračovala až do progresu onemocnění nebo netolerované toxicity. Studie se účastnilo 68 pacientů ve věkovém rozmezí 19-77 let a 13 z nich byl dříve podán bevacizumab. Medián léčby byl 16 týdnů. Progrese onemocnění (51 %) a toxicita (13 %) byly nejčastějšími důvody pro ukončení léčby. Celková míra odpovědi byla 32 %, 18 pacientů (26 %) mělo stabilní onemocnění. U pacientů, kterým byl dříve podáván bevacizumab měl 1 pacient kompletní odpověď. Medián PFS a OS byl 5,3 měsíce a 10,8 měsíců. Nejčastějšími vedlejšími nežádoucími účinky byla únava, hyperglykémie a zvýšené ALT. Celkově byla kombinace BKM120 a bevacizumabu dobře tolerována a byla pozorována klinická aktivita, včetně pacientů, kteří předtím dostávali bevacizumab. Studie u pacientů dříve léčených bevacizumabem dále pokračuje (Shih *et al.*, 2015).

PX-886 je polosyntetický derivát wortmanninu, nevratně inhibuje PI3K prostřednictvím tvorby kovalentní vazby s PI3K. V gliomových buňkách zásadně inhiboval proliferaci u různých buněčných kultur s větší citlivostí pozorovanou u PTEN-negativních buněk, kde hodnoty IC50 byly 3x nižší než v PTEN-positivních liniích. PX-866 vedl ke zvýšené autofagii a snížil invazivní a angiogenní potenciál buněk (Wen *et al.*, 2012). Ve studii fáze II byl 33 pacientům s recidivujícím GBM byl podáván orálně. Byl celkem dobře tolerován, ale míra odpovědi byla nízká. U 24 z nich nastala progresse onemocnění, u 1 byla zaznamenána částečná odpověď na léčbu a 8 pacientů dosáhlo stability onemocnění. Šestiměsíční medián PFS byl 17 % (Zhao, H. F. *et al.*, 2017).

10 Melanom

Melanom (známý také jako maligní melanom) je tumor melanocytů, buněk neuroektodermálního původu produkujících pigment melanin. Melanom je nejvíce agresivní forma rakoviny kůže, často související s chemorezistencí a horší prognózou pacienta (Meier *et al.*, 2005, Schadendorf *et al.*, 2015; Mozūraitienė *et al.*, 2015). Přestože melanomy nejčastěji postihují kůži, mohou postihnout i oči, slizniční povrchy gastrointestinálního a urogenitálního traktu a meningy. Melanomy jsou také nejčastější příčinou diagnózy metastatické rakoviny neznámého primárního původu (Chin *et al.*, 2006). Melanomy jsou vysoce metastatické a sekundární tumory jsou často pozorovány v plicích, játrech a mozku (Chan *et al.*, 2017).

Aktivace dráhy PI3K/Akt/mTOR v melanomu probíhá skrze parakrinní nebo autokrinní růstové faktory nebo ztrátou exprese či mutací negativních regulátorů dráhy (PTEN). Konkrétně IGF-1 pomáhá růstu melanomových buněk v časném stádiu právě aktivací signální dráhy PI3K/Akt/mTOR (Smalley, 2010). Mutace genu PIK3CA se objevují v méně než 5 % případů, častější jsou amplifikace AKT3 ve 40-60 % případů a delece a mutace PTEN v rozmezí 5-40 % (Dahl a Guldborg, 2007).

10.1 Výzkum inhibitorů PI3K u léčby melanomu

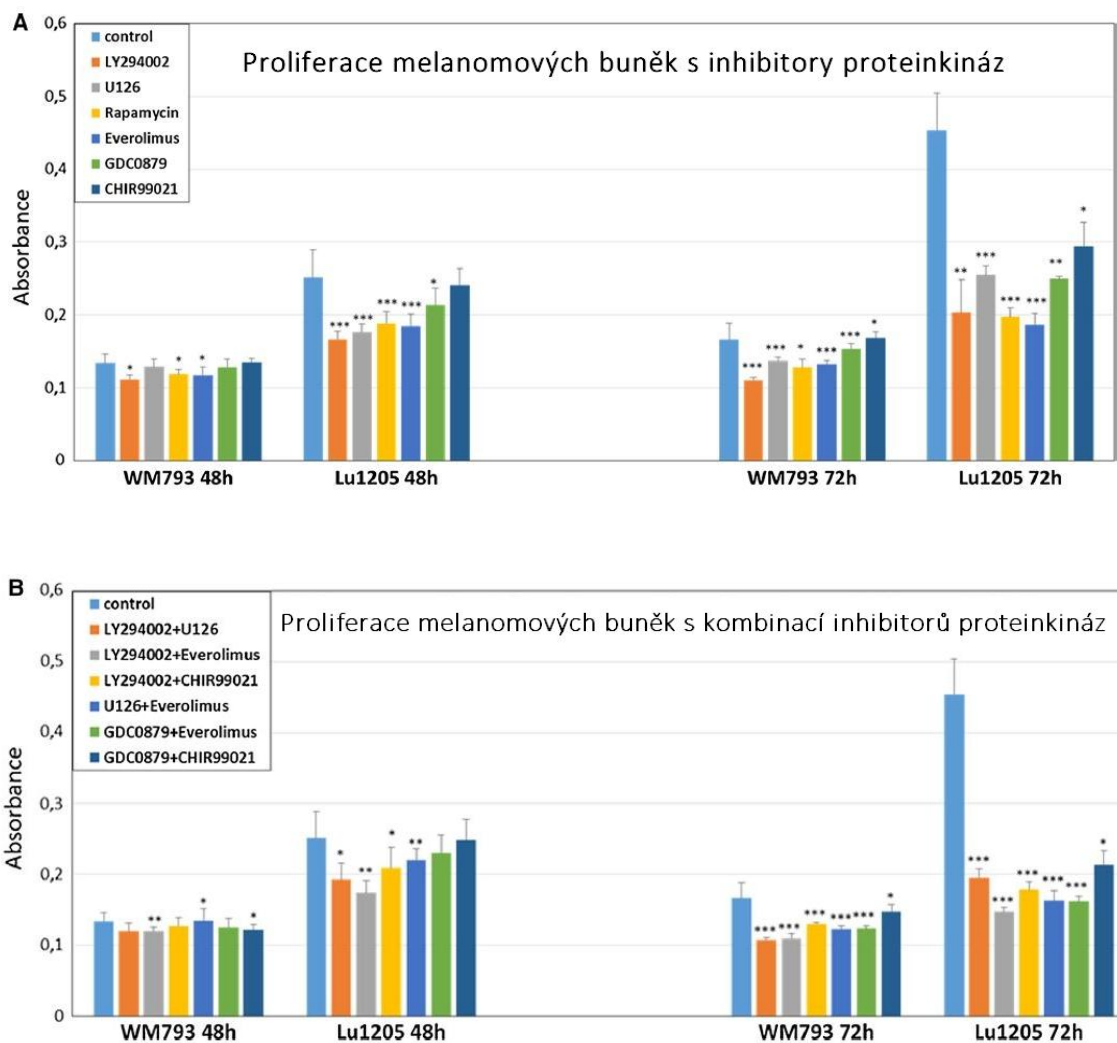
Přibližně polovina pokročilých (neresekovatelných nebo metastatických) melanomů nese mutaci BRAF genu, nejčastější je mutace V600E. Objev mutace BRAF^{V600E} vedl k vývoji vemurafenibu, selektivního inhibitoru BRAF, později schváleného pro léčbu pokročilého metastatického melanomu. Počáteční úspěch v léčbě, kdy docházelo k regresi tumoru a zlepšení kvality života, byl vystřídán rezistencí melanomu vůči terapii, což vedlo k úmrtí. Bylo zjištěno, že mechanismus rezistence může být způsoben reaktivací MAPK dráhy nebo zvýšenou regulací signální dráhy PI3K/Akt/mTOR (Cheng *et al.*, 2018; Chan *et al.*, 2017).

Deuker a spol. (2015) pomocí geneticky upravených modelů myší (GEM) prokázali, že tlumený PTEN nebo mutačně aktivovaný PIK3CA, konkrétně část H4107R, se podílí spolu s BRAF^{V600E} na vzniku metastatického melanomu. Melanomy u myší s mutacemi BRAF^{V600E}/PIK3CA^{H1047R} rostly pomaleji než melanomy s BRAF^{V600E}/PTEN^{null}. Rozdíly v rychlosti růstu jsou pravděpodobně způsobené rozdílným rozsahem aktivace signální dráhy PI3K. Při experimentu se používaly inhibitory proti PI3K podjednotkám p110 α , β , γ , δ : pictilisib, taselisib, alpelisib, GSK2636771, AZD6482, IPI145, inhibitor BRAF LGX818 a

MEK inhibitor GDC0973. Deuker a spol. zjistili, že použití inhibitorů izoform α , β , γ , δ podjednotky p110 v kombinaci s BRAF inhibitory vedlo nejen k větší rychlosti regrese nádorů v melanomových buňkách, ale také že kombinovaná léčba předešla nástupu rezistence vůči inhibitorům MEK.

Ciołczyk-Wierzbicka a kol. (2018) se věnovali výzkumu inhibitorů proteinkináz u maligního melanomu, konkrétně LY294002 (PI3K), rapamycinu (mTOR), everolimu (mTOR). Součástí výzkumu byly i inhibitory U0126 (ERK1/2), GDC-0879 (B-RAF) a CHIR-99021 (GSK3beta), které nejsou předmětem bakalářské práce. Účinek inhibitorů byl zkoumán u buněčných kultur WM793 (buňky melanomu, které se rozšířily z epidermis do dermis) a Lu1205 (metastazované buňky melanomu do plic), od stejného dárce. Inhibitory se používaly v těchto koncentracích: LY294002 – 20 μ M, rapamycin – 5 nM a everolimus – 5 nM. Vliv inhibitorů na proliferaci byl hodnocen pomocí testu BrdU ELISA PO 48-72 h. Jejich účinek na expresi regulačních proteinů buněčného cyklu: cyklin D1, D3, cyklin-dependentní kinázy CDK4 a CDK6, a na inhibitory buněčného cyklu: p16, p21 a p27 byl studován pomocí Western blotu.

Při výzkumu nepozorovala Ciołczyk-Wierzbicka a kol. (2018) žádný cytotoxický účinek z testovaných inhibitorů proteinkináz, aktivita LDH v médiu buněk nepřesáhla 3 %. Metastatická buněčná linie melanomu Lu1205 vykazovala větší snížení proliferace než u WM793. Léčba buněk Lu1205 s inhibitory po dobu 48 hodin vedla ke snížení jejich proliferace v rozsahu 12-34 %. Prodloužení doby léčby na 72 h u buněčné kultury Lu1205 everolimem, rapamycinem a LY294002 vedlo ke snížení proliferace až o 50 %. Nicméně největší inhibice se dosáhlo kombinací mTOR inhibitoru everolimu a inhibitoru PI3K LY294002, které snížily proliferaci metastatických melanomových buněk Lu1205 o 62 %. Buňky WM793 v experimentu nereagovaly stejně účinně jako metastatické, 48 hodinová inkubace neměla téměř žádný účinek na jejich proliferaci, prodloužení doby na 72 hodin vedlo ke snížení proliferace o 25-30 % u everolimu, rapamycinu i LY294002. Použití různých kombinací studovaných inhibitorů vedlo k vyšší redukci proliferace buněk WM793, nicméně nebyla tak vysoká jako u buněk Lu1205. V případě kombinace everolimu a LY294002 byl pokles proliferace o 36 %.



Obr. č. 14 Účinek inhibitorů na proliferaci buněk melanomu (**A**). Účinek kombinace inhibitorů na proliferaci buněk melanomu (**B**). Proliferace byla vyhodnocována pomocí testu BrdU ELISA po 48 a 72 hodinách (Ciołczyk-Wierzbicka *et al.*, 2018).

Pro individuální použití inhibitoru z výzkumu Ciołczyk-Wierzbické a spol. (2018) nejlépe vyšly inhibitory mTOR (everolimus i rapamycin). Přesto nejlepších výsledků u léčby melanomu bylo dosaženo při kombinaci inhibitorů everolimu a LY294002.

11 Zhodnocení terapeutického potenciálu inhibitorů PI3K u nádorových onemocnění

Terapeutický potenciál PI3K inhibitorů pro použití v léčbě nádorového onemocnění je velký. Signální dráha PI3K/mTOR/Akt se totiž stala důležitým protinádorovým cílem a v současnosti je vývoj PI3K inhibitorů velkým zájmem pro farmaceutický průmysl. Studie používající tyto inhibitory dokázaly, že inhibice dráhy *in vivo* a *in vitro* způsobuje supresi buněčné proliferace a apoptózu rakovinotvorných buněk. V klinických studiích se hodnotí desítky inhibitorů a jsou prováděny studie, kde se inhibitory používají samostatně nebo v kombinaci s jinými terapeutiky (Zhao et al., 2017; Osaki et al., 2004).

Některé inhibitory byly už schváleny pro klinické využití. Temsirolimus k léčbě pokročilého karcinomu ledvin a everolimus pro pokročilé karcinomy prsu, ledvin, neuroendokrinní nádory pankreatu a subependymální obrovskobuněčný astrocytom spojený s tuberózní sklerózou (Janku, 2017). Idelalisib, specifický inhibitor PI3K δ , byl schválen k léčbě chronické lymfatické leukémie a B-lymfomu (Zhao et al., 2017).

Inhibitory zaměřené na signální dráhu PI3K/Akt/mTOR v terapii nádorového onemocnění mohou být účinnější, když se zkombinují s jinými cílenými inhibitory, např. signální dráhy Ras/Raf/MEK/ERK (Engelman, 2009).

12 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo shrnutí poznatků týkajících se PI3K v souvislosti s nádorovým onemocněním. Je zde podán přehled o struktuře, funkci a výskytu jednotlivých izoform PI3K. Dále se práce zabývá signální dráhou PI3K/Akt/mTOR, která je klíčová pro mnoho buněčných procesů a jejíž deregulace vede ke vzniku nádorového onemocnění mnoha typů. Pozornost je věnována především inhibitorům PI3K, jejich rozdělení, strukturou a vlastnostmi.

Práce je zaměřena především na inhibitory signální dráhy PI3K/Akt/mTOR v klinických a preklinických studiích u karcinomu prsu, kolorektálního karcinomu, karcinomu prostaty, glioblastomu a melanomu. V závěru práce je zhodnocen terapeutický potenciál inhibitorů PI3K v léčbě nádorových onemocnění.

13 Seznam použité literatury

ASATI, V., MAHAPATRA, D.K a BHARTI, S. K. PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives. *European journal of medicinal chemistry*. 2016, 109, 314-341.

BACKER, J. M. The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochemical Journal*. 2008, 410(1), 1–17.

BADER, A. G., KANG, S., ZHAO, L. a VOGT, P. K. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nature Reviews Cancer*. 2005, 5(12), 921–929.

BAHRAMI, A., KHAZAEI, M., HASANZADEH, M., SHAHIDSALES, S., MASHHAD, M. J., FARAZESTANIAN, M., SADEGHNIA, H. R., REZAYI, M., MAFTOUH, M., HASSANIAN, S. M. a AVAN, A.. Therapeutic Potential of Targeting PI3K/AKT Pathway in Treatment of Colorectal Cancer: Rational and Progress. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2018a, 119(3), 2460-2469.

BAHRAMI, A., KHAZAEI, M., SHAHIDSALES, S., HASSANIAN, S. M., HASANZADEH, M., MAFTOUH, M., FERNS, G. A. a AVAN, A. The Therapeutic Potential of PI3K/Akt/mTOR Inhibitors in Breast Cancer: Rational and Progress. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2018b, 119(1), 213-222.

BAUER, T. M., PATEL, M. R. a INFANTE, J. R. Targeting PI3 kinase in cancer. *Pharmacology and Therapeutics*. 2015, 146, 53–60.

BENDELL, J. C., NEMUNAITIS, J., VUKELJA, S. J., HAGENSTAD, C., CAMPOS, L. T., HERMANN, R. C., SPORTELLI P., GARDNER, L., RICHARDS, D. A. Randomized placebo-controlled phase II trial of perifosine plus capecitabine as second- or third-line therapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology*. 2011, 29(33), 4394-4400.

BENJAMIN, D., COLOMBI, M., MORONI, CH. a HALL, M. N. Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nature reviews. Drug discovery*. 2011, 10(11), 868–880.

BHUTANI, J., SHEIKH, A. a NIAZI, A. K. Akt inhibitors: mechanism of action and implications for anticancer therapeutics. *Infectious Agents and cancer*. 2013, 8(1), 49.

- BITTING, R. L. a ARMSTRONG, A. J. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in castration-resistant prostate cancer. *Endocrine-related cancer*. 2013, 20(3).
- BŁAJECKA, K., BORGSTRM, A. a ARCARO, A. Phosphatidylinositol 3-kinase isoforms as novel drug targets. *Current Drug Targets*. 2011, 12(7), 1056–1081.
- CARNERO, A. The PKB/AKT Pathway in Cancer. *Current Pharmaceutical Design*. 2010, 16(1), 34–44.
- CARRACEDO, A. a PANDOLFI, P. P. The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene*. 2008, 27(41), 5527–5541.
- CICADO, J. a PARK, B. H. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway for breast cancer therapy. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2012, 17(3-4), 205-216.
- CIOŁCZYK-WIERZBICKA, D. GIL, D. a LAIDLER, P. Treatment of melanoma with selected inhibitors of signaling kinases effectively reduces proliferation and induces expression of cell cycle inhibitors. *Medical Oncology*. 2018, 35(1).
- CLAUDIO, F. Targeting the PI3K/AKT/mTOR Pathway in Prostate Cancer Development and Progression: Insight to Therapy. *Clinical Cancer Drugs*. 2016, 3(1), 36-62.
- COQUILLARD, C., VILCHEZ, V., MARTI, F. a GEDALY, R. mTOR Signaling in Regulatory T Cell Differentiation and Expansion. *SOJ Immunology*. 2015, 3(1), 1–10.
- CRUMBAKER, M., KHOJA, L. a JOSHUA, A. M. Ar Signaling and the PI3K Pathway in Prostate Cancer. *Cancers*. 2017, 9(4).
- DAHL, C. a GULDBERG, P. The genome and epigenome of malignant melanoma. *AMPIS*. 2007, 115(10), 1161-1176.
- DENNY, W. A. a REWCASTLE, G. W. Chapter 15 – Inhibitors of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway. *Cancer Drug Design and Discovery*. 2014, 449–478.
- DEUKER, M. M., DURBAN, M., PHILLIPS, W. A. a MCMAHON, M. PI3'-kinase inhibition forestall the onset of MEK ½ inhibitor resistance in BRAF-mutated melanoma. *Cancer discovery*. 2015, 5(2), 143-153.
- ENGELMAN, J. A. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nature Reviews Cancer*. 2009, 9(8), 550–562.

ENGELMAN, J. A., LUO, J. a CANTLEY, L. C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics*. 2006, 7(8), 606–619.

Everolimus. In: *National Cancer Institute* [online]. 2009. Poslední úpravy 2018-03-08 [cit. 2018-04-01]. Dostupné z: <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/everolimus>

FALASCA, M., HAMILTON, J. R., SELVADURAI, M., SUNDARAM, K., ADAMSKA, A. a THOMPSON, P. E. Class II Phosphoinositide 3-Kinases as Novel Drug Targets. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2017, 60(1), 47–65.

FOLEY, M. R., PAYNE, S. N., PASCH, C. A., YUEH, A. E., VAN DE HEY, D. R., KORKOS, D. P., CLIPSON, L., MAHER, M. E., MATKOWSKYJ, K. A., NEWTON, M. A. a DEMING, D. A. Dual PI3K/mTOR Inhibition in Colorectal Cancers with APC and PIK3CA Mutations. *Molecular Cancer Research*. 2017, 15(3), 317-327.

FRESNO VARA, J. Á., CASADO, E., DE CASTRO, J., CEJAS, P., BELDA-INIESTA, C. a GONZÁLEZ-BARÓN, M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2004, 30(2), 193–204.

GHARBI, S. I., ZVELEBIL, M. J., SHUTTLEWORTH, S. J., HANCOX, T., SAGHIR, N., TIMMS, J. F. a WATERFIELD, M. D. Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. *Biochemical Journal*. 2007, 404(1), 15–21.

GUERTIN, D. A. a SABATINI, D. M. The Pharmacology of mTOR Inhibition. *Science Signaling*. 2009, 2(67).

HANIF, F., MUZAFFAR, K., PERVEEN, K., MALHI, S. M. a SIMJEE, S. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pacific journal of cancer prevention*. 2017, 18(1), 3-9.

HASSAN, B., AKCAKANAT, A., HOLDER, A. M. a MERIC-BERNSTAM, F. Targeting the PI3-kinase/Akt/mTOR Signaling Pathway. *Surgical Oncology Clinics of North America*. 2013, 22(4), 641–664.

CHAN, X. Y., SINGH, A., OSMAN, N. a PIVA, T. J. Role Played by Signalling Pathways in Overcoming BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma. *International journal of molecular sciences*. 2017, 18(7).

- CHAN, X. Y., SINGH, A., OSMAN, N., PIVA, T. J. Role Played by Signalling Pathways in Overcoming BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma. *International journal of molecular sciences*. 2017, 18(7).
- CHENG, L., LOPEZ-BELTRAN, A., MASSARI, F., MACLENNAN, G. T. a MANTIRONI, R. Molecular testing for BRAF mutations to inform melanoma treatment decisions: a move toward precision medicine. *Modern Pathology*. 2018, 31(1), 24-38.
- CHIN, L., GARRAWAY, L. A., FISHER, D. E. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes & development*. 2006, 20(16), 2149-2182.
- JABER, N., DOU, Z., CHEN, J., CATANZARO J., JIANG, Y., BALLOU, L. M., SELINGER, E., OUYANG, X., LIN, R. Z., ZHANG, J. a ZONG, W. Class III PI3K Vps34 plays an essential role in autophagy and in heart and liver function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012, 109(6), 2003–2008.
- JANKU, F. Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway inhibitors in solid tumors: From laboratory to patients. *Cancer Treatment Reviews*. 2017, 59, 93-101.
- JEAN, S. a KIGER, A. A. Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. *Journal of Cell Science*. 2014, 127, 923–928.
- JIN, R., TANG, T., ZENG, CH., FENG, H., YU, L. a SI, H. The research progress of Phosphatidylinositol 3-kinase PI3K inhibitors. *Journal of Computational Science and Engineering*. 2017, 29, 825–827.
- KALRA, M. a NAKSHATRI, H. Will PI3K-targeted therapies for cancer become a reality? *Translational Cancer Research*. 2017, 6, 371-375.
- KANU, O. O., MEHTA, A., DI, C., LIN, N., BORTOFF, K., BIGNER, D. D., YAN H. a ADAMSON, D. C. Glioblastoma multiforme: a review of therapeutic targets. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2009, 13(6), 701-718.
- KATSO, R., OKKENHAUG, K., AHMADI, K., WHITE, S., TIMMS, J. a WATERFIELD, M. D. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: Implications for development, immunity, homeostasis, and cancer. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2001, 17, 615–675.
- KIM, A., LEE, J., LEE, S., KIM, CH., LEE, S., JANG, W. a PARK, S. Coexistent mutations of *KRAS* and *PIK3CA* affect the efficacy of NVP-BEZ235, a dual PI3K/MTOR inhibitor, in

- regulating the PI3K/MTOR pathway in colorectal cancer. *International Journal of Cancer*. 2013, 133(4), 984-996.
- KIMBERLEY, T. F. a LEWIS, C. C. Pathways for phosphoinositide synthesis. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1999, 98(1-2), 69–77.
- KNIGHT, Z. A. a SHOKAT, K. M. Chemically targeting the PI3K family. *Biochemical Society Transactions*. 2007, 35, 245–249.
- KOK, K., GEERING, B. a VANHAESEBROECK, B. Regulation of phosphoinositide 3-kinase expression in health and disease. *Trends in Biochemical Science*. 2009, 34(3), 115–127.
- LAPLANTE, M. a SABATINI, D. M. mTOR Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2012, 4(2).
- LEE, J. J. X., LOH, K. a YAP, Y. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in breast cancer. *Cancer Biology and Medicine*. 2015, 12, 342-354.
- LI, X., WU, C., CHEN, N., GU, H., YEN, A., CAO, L., WANG, E. a WANG, L. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. *Oncotarget*. 2016, 7(22), 33440-33450.
- LIU, P., CHENG, H., ROBERTS, T. M. a ZHAO, J. J. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2009, 8(8), 627–644.
- MAIRA, S. M., PECCHI, S., HUANG, A., BURGER, M., KNAPP, M., STERKER, D., SCHNELL, C., GUTHY, D., NAGEL, T., WIESMANN, M., BRACHMANN, S., FRITSCH, C., DORSCH, M., CHÉNE, P., SHOEMAKER, K., DE POVER, A., MENEZES, D., MARTINY, G., FABBRO, D., WILSON, C. J., SCHLEGEL, R., HOFMANN F., GARCIA-ECHEVERRIA, C., SELLERS, W. R. a VOLIVA, C. F. Identification and characterization of NVP-BKM120, an orally available pan-class I PI3-kinase inhibitor. *Molecular cancer therapeutics*. 2012, 11(2), 317-328.
- MAJUMDER, P. K. a SELLERS, W. R. Akt-regulated pathways in prostate cancer. *Oncogene*. 2005, 24(50), 7465-7474.
- MANNING, B. D. a TOKER, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*. 2017, 169(3), 381–405.

- MAO, H., LEBRUN, D. G., YANG, J., ZHU, V. F. a LI, M. Deregulated signaling pathways in glioblastoma multiforme: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Cancer Investigations*. 2012, 30(1), 48-56.
- MARONE, R., CMILJANOVIC, V., GIESE, B. a WYMANN, M. P. Targeting phosphoinositide 3-kinase – Moving towards therapy. *Biochimica et Biophysica Acta-proteins and Proteomics*. 2008, 1784(1), 159-185.
- MARQUES, R. B., AGHAI, A., RIDDER, C. M. A., STUURMAN, D., HOEBEN, S., BOER, A., ELLSTON, R. P., BARRY, S. T., DAVIES, B. R., TRAPMAN, J. a WEERDEN, W. M. High Efficacy of Combination Therapy Using PI3K/AKT Inhibitors with Androgen Deprivation in Prostate Cancer Preclinical Models. *European Urology*. 2015, 67(6), 1177-1185.
- MASRI, J., BERNATH A., MARTIN, J., JO, O. D., VARTANIAN, R., FUNK, A. a GERA, J. mTORC2 activity is elevated in gliomas and promotes growth and cell motility via overexpression of rictor. *Cancer Research*. 2007, 67(24), 11712–11720.
- MASSACESI, C., DI TOMASO, E., URBAN, P., GERMA, C., QUADT, C., TRANDAFIR, L., AIMONE, P., FRETAULT, N., DHARAN, B., TAVORATH, R. a HIRAWAT, S. PI3K inhibitors as new cancer therapeutics: implications for clinical trial design. *OncoTargets and Therapy*. 2016, 9, 203–210.
- MEIER, F., SCHITTEK, B., BUSCH, S., GARBE, C., SMALLEY, K., SATYAMOORTHY, K., LI, G. a HERLYN, M. The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 2005, 10, 2986-3001.
- MOZŪRAITIENĖ, J., BIELSKIENĖ, B., ATKOČIUS, V. a LABEIKYTĖ, D. Molecular alterations in signal pathways of melanoma and new personalised treatment strategies: Targeting of Notch. *Medicina*. 2015, 51(3), 133-145.
- NITULESCU, G. M., MARGINA, D., JUZENAS, P., PENG, Q., OLARU, O. T., SALOUSTROS, E., FENGA, C., SPANDIDOS, D. A., LIBRA, M. a TSATSAKIS, A. M. Akt inhibitors in cancer treatment: The long journey from drug discovery to clinical use. *International journal of oncology*. 2016, 48(3), 869-885.

- NORDQVIST, Ch. Colorectal cancer: What you need to know. In: *Medical News Today* [online]. 2018 [cit. 2018-03-25]. Dostupné z <http://www.medicalnewstoday.com/articles/155598.php>
- NORDQVIST, Ch. Prostate cancer in detail. In: *Medical News Today* [online]. 2017 [cit. 2018-04-22]. Dostupné z: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/150086.php>
- NORDQVIST, Ch. What you need to know about breast cancer. In: *Medical News Today* [online]. 2017 [cit. 2018-03-25]. Dostupné z: <http://www.medicalnewstoday.com/articles/37136.php>
- OKKENHAUG, K. Signalling by the phosphoinositide 3-kinase family in immune cells. *Annual Review of Immunology*. 2013, 31, 675–704.
- OSAKI, M., OSHIMURA, M. a ITO, H. PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*. 2004, 9(6), 667-676.
- PAPLOMATA, E. a O'REGAN, R. The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: targets, trials and biomarkers. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. 2014, 6(4), 154-166.
- PIGUET, A. a DUFOUR, J. PI(3)K/ PTEN/ AKT pathway. *Journal of Hepatology*. 2011, 54(6), 1317–1319.
- RICHARDSON, P. G., ENG, C., KOLESAR, J., HIDESHIMA, T. a ANDERSON, K. C. Perifosine, an oral, anti-cancer agent and inhibitor of the Akt pathway: mechanistic actions, pharmacodynamics, pharmacokinetics, and clinical activity. *Expert opinion on drug metabolism and toxicology*. 2012, 8(5), 623-633.
- RINI, B. I. Temsirolimus, an Inhibitor of Mammalian Target of Rapamycin. *Clinical Cancer Research*. 2008, 14(5), 1286–1290.
- RIVERA, V. M., SQUILLACE, R. M., MILLER, D., BERK, L., WARDWELL, S. D., NING, Y., POLLOCK, R., NARAMSIHAN, N. I., IULIUCCI, J. D., WANG, F. a CLACKSON, T. Ridaforolimus (AP23573; MK-8669), a Potent mTOR Inhibitor, Has Broad Antitumor Activity and Can Be Optimally Administered Using Intermittent Dosing Regimens. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2011, 10(6), 1059-1071.
- SASAKI, T., TAKASUGA, S., SASAKI, J., KOFUJI, S., EGUCHI, S., YAMAZAKI, M. a SUZUKI, A. Mammalian phosphoinositide kinases and phosphatases. *Progress in Lipid Research*. 2009, 48(6), 307–343.

- SHIH, K. C., SAJEEL, A. CH., BECKER, K. P., BAEHRING, J. M., LIGGETT, W. H., BURRIS, H. A. a HAINSWORTH, J. D. A phase II study of the combination of BKM120 (buparlisib) and bevacizumab in patients with relapsed/refractory glioblastoma multiforme (GBM). *Journal of Clinical Oncology*. 2015, 33(15), 2065.
- SCHADENDORF, D., FISHER, D. E., GARBE, C., GERSHENWALD, J. E., GROB, J. J., HALPERN, A., HERLYN, M., MARCHETTI, M. A., MCARTHUR, G., RIBAS, A. a ROESCH, A. Melanoma. *Nature reviews. Disease primers*. 2015, 1.
- SCHEID, M. P. a WOODGETT, J. R. PKB/AKT: Functional insights from genetic models. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2001, 2(10), 760–768.
- SMALLEY, K. Understanding Melanoma Signaling Networks as the Basis for Molecular Targeted Therapy. *Journal of Investigative Dermatology*. 2010, 130(1), 28-37.
- SOHN, Y., HAN, K. a SEO, M. Immunohistochemical Subtypes of Breast Cancer: Correlation with Clinicopathological and Radiological Factors. *Iranian Journal if Radiology*. 2016, 13(4).
- SOMOZA, J. R., KODITEK, D., VILLASEÑOR, A. G., NOVIKOV, N., WONG, M. H., LICLICAN, A., XING, W., LAGPACAN, L., WANG, R., SCHULTZ, B. E., PAPALIA, G. A., SAMUEL, D., LAD, L. a MCGRATH, M. E. Structural, biochemical, and biophysical characterization of idelalisib binding to phosphoinositide 3-kinase δ . *The Journal of Biological Chemistry*. 2015, 290(13), 8439-8446.
- STEELMAN, L. S., MARTELLI, A. M., COCCO, L., LIBRA, M., NICOLETTI, F., ABRAMS, S. L. a MCCUBREY, J. A. The therapeutic potential of mTOR inhibitors in breast cancer. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2016, 82(5), 1189-1212.
- THORPE, L. M., YUZUGULLU, H. a ZHAO, J. J. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nature Reviews Cancer*. 2015, 15(1), 7–24.
- VANHAESEBROECK, B. a ALESSI, D. R. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochemical Journal*. 2000, 346, 561–576.
- VIVANCO, I. a SAWYERS, CH. L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2002, 2(7), 489–501.

- WAN, X., SHEN, N., MENDOZA, A., KHANNA, CH. a HELMAN, L. J. CCI-779 Inhibits Rhabdomyosarcoma Xenograft Growth by an Antiangiogenic Mechanism Linked to the Targeting of mTOR/Hif-1 α /VEGF Signaling. *Neoplasia*. 2006, 8(5), 394–401.
- WARD, S. G., JUNE, C. H. a OLIVE, D. PI 3-kinase: A pivotal pathway in T-cell activation?. *Immunology Today*. 1996, 17(4), 187–197.
- WEN, P. Y., LEE, E. Q., REARDON, D. A., LIGON, K. L. a YUNG, A. Current clinical development of PI3K pathway inhibitors in glioblastoma. *Neuro-oncology*. 2012, 14(7), 819-829.
- WIPF, P. a HALTER, R. J. Chemistry and biology of wortmannin. *Organic and Biomolecular Chemistry*. 2005, 3(11), 2053–2061.
- YAMAMOTO-IBUSUKI, M., ARNEDOS, M. a ANDRÉ, F. Targeted therapies for ER+/HER2- metastatic breast cancer. *BMC Med*. 2015, 13.
- YUAN, H., BARNES, K. R., WEISSLEDER, R., CANTLEY, L. a JOSEPHSON, L. Covalent Reactions of Wortmannin under Physiological Conditions. *Chemistry and Biology*. 2007, 14(3), 321–328.
- YUAN, T. L. a CANTLEY, L. C. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*. 2008, 27(41), 5497-5510.
- ZAYTSEVA, Y. Y., VALENTINO, J. D., GULHATI, P. a EVERS, M. mTOR inhibitors in cancer therapy. *Cancer Letters*. 2012, 319(1), 1–7.
- ZHAO, H. F., WANG J., SHAO, W., WU, C. P, CHEN, Z. P., TO, S. T. a LI, W. P. Recent advances in the use of PI3K inhibitors for glioblastoma multiforme: current preclinical and clinical development. *Molecular cancer*. 2017, 16(1).
- ZHAO, L. a VOGT, P. K. Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene*. 2008, 27(41), 5486–96.
- ZHAO, W., QIU, Y. a KONG, D. Class I phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2017, 7(1), 27–37.