

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2015/159



ZAKLJUČNO POROČILO RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	J3-4313
Naslov projekta	Vpliv aktivnega transporta imatiniba in različnih genotipov pacientov na uspešnost terapije kronične mieloične levkemije
Vodja projekta	11122 Albin Kristl
Tip projekta	J Temeljni projekt
Obseg raziskovalnih ur	7560
Cenovni razred	C
Trajanje projekta	07.2011 - 06.2014
Nosilna raziskovalna organizacija	787 Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	312 Univerzitetni klinični center Ljubljana
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	3 MEDICINA 3.04 Onkologija
Družbeno-ekonomski cilj	07. Zdravje
Raziskovalno področje po šifrantu FOS	3 Medicinske vede 3.02 Klinična medicina

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

2. Povzetek raziskovalnega projekta¹

SLO

V sklopu tega projekta smo podrobneje raziskali nekatere vzroke za pojav farmakokinetične rezistence na imatinib pri kronični mieloični levkemiji (KML) in poskušali poiskati kazalce, s pomočjo katerih je rezistenco mogoče napovedati v zgodnji fazi zdravljenja bolezni. Na področju absorpcije imatiniba iz tankega črevesa v krvni obtok smo

ugotovili, da sta za izločanje učinkovine v lumen črevesa ključna P-glikoprotein in prenašalec izoliran pri raku dojke (BCRP) v apikalni ter organski kationski prenašalec 1 (OCT1) v bazolateralni membrani enterocitov. Pokazali smo, da tudi absorpcija imatiniba poteka v pomembnem obsegu z aktivnimi procesi, vendar identifikacija teh prenašalcev ni bila možna.

Na osnovi literaturnih virov smo na začetku našega dela predpostavljali, da je vzrok rezistence lahko tudi zmanjšana aktivnost OCT1 prenašalca, odgovornega za privzem učinkovine v celico. Izkazalo se je, da je za nedoslednosti in nasprotujoče si ugotovitve različnih avtorjev krivo dokaj nepričakovano dejstvo, da imatinib v tarčne celice prehaja s še neidentificiranim prenašalcem, medtem ko ima OCT1 morda le posredno vlogo, zelo malo verjetno pa je, da bi bil neposredno odgovoren za ta transport. Ta sum so potrdile tudi nekatere objave drugih avtorjev v zadnjem letu trajanja projekta. Aktivni privzem imatiniba smo raziskovali na nekaterih celičnih linijah ter celicah prostovoljcev in bolnikov s KML. Prvi smo razvili metodo določanja znotrajcelične koncentracije imatiniba v granulocitih, zrelih potomcih maligno spremenjene mieloične celice, da bi se tako čim bolj približali koncentraciji učinkovine na mestu delovanja. Vse postopke priprave vzorcev in dovolj občutljive LC-MS/MS analizne metode smo razvili sami.

V klinično raziskavo smo vključili 35 že zdravljenih bolnikov v kronični fazi KML, od tega 24 takih, ki so z odmerkom 400mg imatiniba v 18 mesecih dosegli glavni in globok molekularni odgovor na zdravljenje in 11 takih, ki tega odziva niso dosegli. Ugotovili smo, da se skupini bolnikov bistveno razlikujeta v aktivnem privzemu imatiniba v zrele granulocite. Z dokazom povezanosti aktivnega transporta v granulocitih periferne krvi z uspehom zdravljenja bolnikov s KML smo uvedli dodaten kriterij za napovedovanje rezistence levkemičnih celic na imatinib, ki ga je mogoče ocenjevati tudi pri bolnikih v remisiji. Razvili smo tudi metodo sočasnega določanja koncentracije treh tirozinkinaznih inhibitorjev, ki so trenutno v klinični uporabi v Sloveniji za zdravljenje KML, iz krvnega madeža, DBS (dried blood spot). Metoda ima številne prednosti in je pomembna pri spremljanju nivoja učinkovine v plazmi (TDM - therapeutic drug monitoring).

ANG

This research project was aimed to improve our understanding of reasons for the pharmacokinetic resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia (CML) and to try to detect this kind of resistance early in the therapy of the disease. Regarding the imatinib absorption from the small intestine into the blood circulation it was discovered that P-glycoprotein and breast cancer resistance protein (BCRP) mediate its efflux through the apical membrane and OCT1 mediates imatinib influx through the basolateral membrane of enterocytes. We have also shown that a significant part of imatinib absorption is a result of an active process. However, the majority of transport proteins involved in drug absorption cannot be identified at the current state of the art.

Based on the literature data we have started the work assuming that decreased activity of OCT1 (organic cation transporter 1), which should be responsible for the drug uptake into the target cells is the most likely cause for the pharmacokinetic resistance to imatinib. After the work done on this project it seems that the reason for the inconsistencies and conflicting findings in the literature can be best explained by a rather unexpected fact. This is that imatinib is absorbed into target cells by another, yet unidentified transporter, while OCT1 could have only an indirect role. This hypothesis is also in accordance

with findings of other authors published during the final year of our research project. Active imatinib uptake was investigated in several cell lines and cells obtained from volunteers and CML patients. We were the first to develop a method for determination of intracellular imatinib concentration in granulocytes, the mature descendants of the malignantly transformed myeloid cells, to obtain the best possible surrogate for the actual site of drug action. All sample preparation procedures and sufficiently sensitive LC-MS/MS methods were developed in-house.

35 patients already treated for the chronic phase of CML were included in the study. 24 of them have achieved major molecular response in 18 months after the onset of therapy with 400 mg daily dose of imatinib and 11 patients did not. We have observed that the two groups of patients differ significantly in the active uptake of imatinib into the mature granulocytes. This evidence provides a new criterion for prognosis of pharmacokinetic resistance to imatinib.

A method for concurrent determination of three tyrosine kinase inhibitors, currently in use for CML treatment in Slovenia, employing the dried blood spot (DBS) technique was also developed. This method has numerous advantages and has potential to be a significant contribution to the future of therapeutic drug monitoring of imatinib blood plasma concentrations.

3. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu²

V sklopu tega projekta smo podrobneje raziskali nekatere mehanizme aktivnega transporta imatiniba, vzroke za pojav farmakokinetične rezistence na imatinib pri kronični mieloični levkemiji (KML) in poskušali poiskati kazalce, s pomočjo katerih je to vrsto rezistence mogoče napovedati v zgodnji fazi zdravljenja bolezni. Pojem tarčnega zdravljenja namreč predvideva, da sta afiniteta učinkovine do tarčnega proteina kot tudi njena zadostna koncentracija na mestu delovanja ključni za terapevtsko učinkovitost zdravila. Zmanjšana afiniteta imatiniba do Bcr-Abl1 zaradi prisotnih mutacij v kinazni domeni je že precej dobro pojasnjena, številna vprašanja pa ostajajo odprta glede dejavnikov, ki vplivajo na koncentracijo učinkovine v tarčni celici. Osredotočili smo se predvsem na pomen aktivnih prenašalnih mehanizmov, ki vplivajo na določene farmakokinetične procese, kot so absorpcija učinkovine iz prebavnega trakta, njeno porazdeljevanje v različne tipe celic, ter izločanje v žolč, blato ali seč. Ugotoviti smo želeli, kateri prenašalci in v kolikšni meri so odgovorni za prenos imatiniba skozi celične membrane. Aktivni privzem imatiniba smo raziskovali z inkubacijo celičnih linij, kot so K-562, HEK-293 in HEK-293 s povečano ekspresijo OCT1 ter celic izoliranih iz periferne krvi prostovoljcev in bolnikov ali pa iz kostnega mozga bolnikov s KML z učinkovino in z različnimi »specifičnimi« inhibitorji aktivnega transporta. Ker primarne matične celice, ki naj bi bile izvor KML, niso dobro definirane in kot takšne niso dosegljive, je večina našega dela potekala na sorodnih celicah periferne krvi. S tem smo želeli oceniti tudi ustreznost teh celic kot modela za ugotavljanje farmakokinetične rezistence KML na imatinib. Raziskave so potekale v *in vitro* ter v *in vivo* pogojih.

Absorpcijo imatiniba iz tankega črevesa v krvni obtok smo proučevali na izoliranih segmentih tankega črevesa podgane in deloma na kulturi celic raka debelega črevesa (Caco-2). Osnovno orodje, ki smo ga uporabili, so bile tako imenovane dvosmerne meritve permeabilnosti v difuzijskih celicah tipa Sweetana-Grass ob uporabi različnih »specifičnih« inhibitorjev prenašalnih proteinov. Ugotovili smo, da sta za izločanje učinkovine v lumen črevesa ključna P-glikoprotein in prenašalec izoliran pri raku dojke (BCRP) v apikalni ter organski kationski prenašalec 1 (OCT1) v bazolateralni membrani enterocitov. Na osnovi razlik v permeabilnosti učinkovine v različnih delih tankega črevesa (duodenum, jejunum, ileum) smo predpostavili, da tudi absorpcija imatiniba poteka v pomembnem delu z aktivnimi procesi, vendar trenutno še ne moremo določiti prenašalcev, vpletenih v absorpcijo učinkovine. Z izmerjeno aktivno absorpcijo in eliminacijo v sluznici črevesa smo lahko pojasnili tako visoko biološko

uporabnost imatiniba, kot tudi veliko variabilnost plazemskih koncentracij pri bolnikih. Za uspeh celotnega projekta je bil ključnega pomena razvoj metode za določanje znotrajcelične koncentracije imatiniba in nadalje aktivnega privzema imatiniba v celicah periferne krvi bolnikov s KML in v celičnih linijah. Kot prvi smo razvili metodo določanja znotrajcelične koncentracije imatiniba v granulocitih, zrelih potomcih maligno spremenjene mieloične celice, da bi se tako čim bolj približali koncentraciji učinkovine na mestu delovanja. Postopke priprave vzorcev in analizo metodo smo razvili sami, saj pred začetkom naših raziskav tovrstnih meritev ni bilo.

V našo klinično raziskavo smo vključili 35 že zdravljenih bolnikov v kronični fazi KML, od tega 24 takih, ki so z odmerkom 400 mg imatiniba v 18 mesecih dosegli glavni in globok molekularni odgovor na zdravljenje in 11 takih, ki tega odziva niso dosegli. Prva je meritve aktivnega privzema imatiniba, ki so ga takrat poimenovali »test OCT1 aktivnosti«, razvila in opisala avstralska skupina raziskovalcev (D. White) z namenom napovedovanja učinkovitosti privzema imatiniba v levkemične celice bolnikov s KML pred začetkom terapije (IUR assay-*imatinib uptake and retention assay*). Proučevali so privzem radioaktivno označenega imatiniba v celice bolnikov s KML brez ali ob prisotnosti znanega inhibitorja OCT1 prazosina. Zaradi uporabe radioaktivno označenih spojin metoda ni primerna za uporabo v večini hematoloških laboratorijev. Da bi opisano metodo lahko prenesli v klinično prakso, smo s povečanjem števila inkubiranih celic ter ekstrakcijo učinkovine iz celic in dvostopenjskim koncentriranjem vzorcev pridobili vzorce, ki so bili primerni za občutljivo LC-MS-MS analizo. S poskusom na krvnih celicah prostovoljca smo metodo primerjali z IUR testom White-a in sodelavcev in tako ovrednotili njeno ustreznost. Sposobnost meritev ne-radioaktivnega imatiniba v izoliranih celicah bolnikov nam je omogočila tudi vpogled v dejanske znotrajcelične koncentracije med terapijo. Preverili smo torej lahko tudi ujemanje aktivnosti prenašalcev z dejansko določeno znotrajcelično koncentracijo učinkovine v krvnih celicah. *In vitro* določen aktivni privzem imatiniba po drugi strani predstavlja le enega izmed dejavnikov, ki vpliva na doseganje ustrezne znotrajcelične koncentracije imatiniba v levkocite bolnikov s KML. Dejanska znotrajcelična koncentracija je posledica plazemske koncentracije učinkovine in njene vezave na plazemske proteine, kar določa prosto učinkovino na voljo za privzem. Tako smo s specifično izolacijo nevtrofilcev iz polne krvi že zdravljenih bolnikov s KML in določanjem koncentracije imatiniba v teh celicah poskušali pridobiti še bolj neposreden vpogled na mesto delovanja, kar bi še boljše napovedovalo učinkovitost terapije z imatinibom. Izkazalo se je, da znotrajcelične koncentracije imatiniba v mononuklearnih celicah in v granulocitih bolnikov med terapijo niso povezane niti z uspešnostjo terapije niti z aktivnim privzemom, so pa dosežene znotrajcelične koncentracije imatiniba močno odvisne od plazemskih koncentracij. Ker so bolniki že daljši čas pred začetkom naše raziskave prejeli odmerke imatiniba prilagojene njihovem odzivu na terapijo, je odsotnost povezave z uspešnostjo terapije pravzaprav pričakovana. Ti rezultati torej predvsem potrjujejo, da sta zagotavljanje ustreznih plazemskih koncentracij imatiniba in nadzor teh koncentracij med terapijo pomembna za uspešnost terapije. Dodatno pa pomenijo tudi, da s prilagajanjem dnevnega odmerka imatiniba lahko tudi bolnikom, ki bi se ob standardnem odmerku na terapijo odzvali suboptimalno, zagotovimo enakovredne, torej učinkovite, znotrajcelične koncentracije zdravila na mestu delovanja.

Koncentracijo imatiniba na mestu delovanja, to je v levkemični celici, torej povsem zadostno napovedujemo z merjenjem plazemske koncentracije imatiniba. V okviru projekta pa smo razvili tudi metodo za določanje koncentracije imatiniba, nilotiniba in dasatiniba iz madeža krvi (metoda DBS; ang. dried blood spot). Metoda ima številne prednosti in lahko postane pomemben prispevek pri spremljanju nivoja učinkovine v plazmi (TDM - therapeutic drug monitoring). Bistvena prednost te metode je, da omogoča zelo preprosto shranjevanje in pošiljanje vzorcev od mesta odvzema do kraja analize, s tem pa lahko večjemu številu bolnikov omogočimo kakovosten nadzor nad koncentracijo učinkovine v krvi. Z razvito metodo smo analizirali pridobljene vzorce krvi bolnikov, rezultate pa primerjali z njihovimi plazemskimi koncentracijami imatiniba. Klinično uporabnost te validirane metode smo potrdili z analizo vzorcev 24 bolnikov zdravljenih z enim od TKI in ocenili primerljivost dobljenih meritev z rezultati že prej vpeljanih metod

določanja TKI iz krvne plazme.

Vseskozi so nekoliko nenavadni rezultati meritev aktivnega privzema imatiniba z različnimi inhibitorji prenašalca OCT1 kazali, da procesa aktivnega privzema imatiniba v krvne celice ne razumemo popolnoma. Tako mi kot nekateri drugi raziskovalci smo ugotovili, da ni značilnih povezav med izražanjem in polimorfizmi prenašalca OCT1 z uspešnostjo terapije in z izmerjenim aktivnim privzemom imatiniba. V letu 2014 smo prišli do spoznanja, da je aktivni privzem imatiniba lahko tudi posledica delovanja kakšnega drugega, neznanega prenašalca, ki ga slučajno inhibirajo tudi inhibitorji prenašalcev OCT1. V tem času so enako ugotovitev objavili tudi raziskovalci iz Nemčije (Nies in sodelavci), mi pa smo nekatere njihove meritve še enkrat ponovili v laboratoriju, saj gre za velik miselni preskok glede na dosedanje prepričanje in rezultati dejansko še niso povsem zanesljivi. Prav zanimivo je tudi, da za tako pomemben farmakokinetični proces, kot je aktivni privzem imatiniba v tarčne celice, nimamo na voljo metod za določitev odgovornih prenašalnih proteinov. Prav na koncu projekta smo pričeli z uvajanjem metode izbivanja genov na celičnih linijah, ki bi nam v kombinaciji z meritvami aktivnega privzema imatiniba nekoč lahko omogočila identifikacijo pravega prenašalca imatiniba. Vsekakor meritev aktivnega privzema imatiniba, ki smo jih razvili, ne imenujemo več »test OCT1 aktivnosti«.

V populaciji slovenskih bolnikov s KML je vsako leto nekaj novodiagnosticiranih, večje pa je število tistih, ki se že zdravijo z imatinibom. Pri slednjih sicer v periferni krvi nezrelih mieloičnih celic ne zasledimo več, zato pa smo želeli proučiti vpliv aktivnega transporta imatiniba na uspešnost zdravljenja KML na populaciji zrelih granulocitov (neutrofilcev). Engler in sodelavci so namreč pokazali, da aktivni privzem imatiniba v mononuklearnih celicah bolnikov pred terapijo dobro sovpadla z aktivnim privzemom imatiniba v zrelih neutrofilcih, kar bi lahko pomenilo, da slednja prav tako dobro sovpadala z odgovorom na zdravljenje. Dejansko smo ugotovili, da se skupini bolnikov (dobro in slabo odzivnih) bistveno razlikujeta v aktivnem privzemu imatiniba v zrele granulocite. Z dokazom povezanosti aktivnega transporta v granulocitih periferne krvi in uspešnosti zdravljenja bolnikov s KML smo omogočili uvedbo dodatnega kriterija za napovedovanje farmakokinetične rezistence levkemičnih celic na imatinib, ki ga je mogoče ocenjevati tudi pri bolnikih, ki se z imatinibom že zdravijo.

Menimo, da bodo pridobljeno znanje in razvite metode lahko pripomogli k zgodnejši določitvi optimalnega odmerka imatiniba v terapiji KML oz. da se bodo bolnikom, ki bi od tega imeli korist, lahko hitreje predpisali inhibitorji tirozinskih kinaz druge generacije, kot sta nilotinib in dasatinib, kadar je to potrebno. Za ti dve učinkovini namreč velja, da uspešnost terapije ni odvisna od aktivnega privzema v celice, po drugi strani pa ju vedno več raziskovalcev povezuje s povečano verjetnostjo kardiovaskularnih zapletov, zaradi česar bo zelo verjetno imatinib še nekaj časa optimalna prva izbira za večino bolnikov s KML.

4. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev³

Glede na raziskovalne cilje, ki smo jih definirali v prijavi vlogi in jih podajamo tu po točkah, lahko ugotovimo, da smo program dela na raziskovalnem projektu realizirali v največji možni meri.

1. Raziskali smo procese, ki določajo koncentracijo imatiniba na mestu delovanja – to je v tarčnih celicah (mononuklearnih levkocitih) pred začetkom terapije in v najbližjem nadomestku tarčnih celic (granulocitih v periferni krvi) pri že zdravljenih bolnikih.

Na ustreznih *in vitro* modelih smo raziskali mehanizme in kinetiko prehoda učinkovine iz

prebavnega trakta v krvni obtok. Predvsem pri razporejanju učinkovine med krvno plazmo in citosolom tarčnih celic smo odkrili oz. potrdili nedvoumno povezavo z dobro napovedno vrednostjo med aktivnim transportom v granulocite periferne krvi pri že zdravljenih bolnikih in uspešnostjo zdravljenja.

2. Vzporedno smo razvili zelo občutljivo LC-MS-MS analizno metodo za direktno merjenje koncentracije imatiniba v tarčnih celicah v periferni krvi in v kostnem mozgu, kar je bilo nujno že za raziskovanje procesov, ki določajo koncentracijo imatiniba na mestu delovanja (gornja, prva točka). Ta metoda je postala osnova za individualno določanje aktivnega privzema imatiniba v tarčne celice pred začetkom terapije in med njo. Dokazali smo, da lahko aktivni privzem imatiniba in N-desmetil imatiniba v krvne celice določamo brez uporabe radioaktivno označenega imatiniba. To nam je ob uporabi novih načinov izolacije celic poleg *in vitro* meritev aktivnega privzema te učinkovine v celice periferne krvi bolnikov omogočilo tudi meritve *in vivo* znotrajceličnih koncentracij učinkovine in metabolita pri bolnikih.

3. Raziskali smo povezanost med polimorfizmi izbranih genov in plazemskimi oziroma znotrajceličnimi koncentracijami imatiniba in N-desmetil imatiniba ter nadalje – povezanost z uspešnostjo zdravljenja na populaciji slovenskih bolnikov. Klinično uporabnih povezav torej ni. Prav tako smo ugotovili, da ne obstaja povezava med izražanjem genov za prenašalce in encime za presnovo imatiniba med celicami levkocitne vrste iz kostnega mozga in iz periferne krvi z znotrajceličnimi koncentracijami učinkovine, z izmerjenim aktivnim transportom, niti z uspešnostjo terapije.

4. Najbolj presenetljiva ugotovitev celotne raziskave je razlog za odsotnost zgoraj omenjenih povezav. Naši rezultati, tako kot sočasne ugotovitve nekaterih drugih raziskovalnih skupin, kažejo, da prenašalec OCT1 sploh ni odgovoren za aktivni privzem imatiniba v tarčne celice. To po eni strani daje še večji pomen razvitim postopkom za neposredno določanje aktivnega privzema, po drugi strani pa zavezuje raziskovalno skupnost k novim naporom usmerjenim v identifikacijo mehanizmov, ki so resnično odgovorni za aktivni privzem imatiniba.

5.Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine⁴

V letu 2012 je prišlo do pomembne spremembe smernic v terapiji KML. Kot prva linija zdravljenja se je poleg imatiniba začel uporabljati tudi nilotinib. To je vplivalo na cilje našega projekta, ki smo jih zato ustrezno prilagodili. Čeprav smo imeli na voljo ustrezno metodologijo, določanje intracelularnega privzema in retencije (IUR) imatiniba pri novoodkritih bolnikih v prehodnem obdobju ni bilo smiselno, saj smo morali najprej ugotoviti, katero od zdravil bo večinoma predpisano bolnikom ob diagnozi. Po drugi strani se je z novimi smernicami pojavila možnost spremembe terapije pri tistih bolnikih, ki se že zdravijo z imatinibom in so »stabilni«, vendar je zato potreben visok odmerek imatiniba in/ali ne dosegajo optimalnega odgovora. Teh bolnikov je precej več, kot na novo odkritih, njihovega nepopolnega odziva pa ponavadi ni možno razložiti z mutacijami gena Bcr-Abl. Tako smo v letu 2012 praktično vsa sredstva usmerili v razvoj še občutljivejše metode za določanje IUR na manjšem številu levkocitov, ki je značilno za stabilne bolnike v primerjavi z na novo odkritimi. Poleg tega smo razvili tudi postopek, s katerim pred meritvijo IUR krvnim celicam odvzamemo imatinib, ki se v njih nahaja zaradi terapije same. Tako prekinitve terapije za meritve IUR ni potrebna.

Ker smo v okviru naše raziskave/študije ugotovili in je bilo potrjeno tudi v objavljeni literaturi v zadnjih letih, da moramo obravnavati vsak polimorfizem gena za OCT1 ločeno in da niso vsi polimorfizmi, ki jih je v populaciji skupno približno 10%, pomembni za delovanje prenašalca, bi potrebovali zelo veliko število prostovoljcev (več tisoč) in ne le ca 150, kolikor smo prvotno načrtovali. Takšna rešitev bi bila tudi etično nesprejemljiva. Tako smo prvotno poskušali izolirati in pomnožiti gen za OCT1 iz K562 celic ter pripraviti različno mutirane gene z enakimi mutacijami kot pri ljudeh s polimorfizmi. Z *in vitro* privzemom v te celične linije smo potem nameravali meriti vpliv polimorfizmov

brez uporabe prostovoljcev ali bolnikov. Ob tem delu v zadnjem letu projekta se je izkazalo, da imatinib zelo verjetno sploh ni substrat prenašalca OCT1. Ugotovitev je iz znanstvenega vidika seveda zanimiva, po drugi strani pa odpira vprašanje, na katerega ne bo možno kmalu in preprosto odgovoriti. Sedaj namreč ne vemo kateri prenašalec je dejansko odgovoren za aktivni privzem imatiniba v tarčne celice in tako ni možen razvoj diagnostičnih metod, ki bi na osnovi meritev izražanja genov ali pa polimorfizmov omogočale predvidevanje odzivnosti bolnikov na zdravljenje z imatinibom.

6. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁵

	Znanstveni dosežek		
1.	COBISS ID	3566705	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	In vitro absorpcija in eliminacija imatiniba skozi črevo podgane
		ANG	Absorption and elimination of imatinib through the rat intestine in vitro
	Opis	SLO	Imatinib je močan selektivni zaviralec tirozinskih kinaz, ki se uporablja za zdravljenje kronične mieloične leukemije in gastrointestinalnega stromalnega tumorja. Čeprav je dobro znano, da se učinkovina kot substrat veže na različne prenašalne proteine, ki so aktivni tudi v črevesju, mehanizem absorpcije in eliminacije imatiniba v črevesju še ni dobro proučen. S tem namenom smo segmente podganjega črevesa vpeli v Sweetana Grass difuzijske celice, izmerili permeabilnostne koeficiente imatiniba in njegovega glavnega metabolita N-desmetil imatiniba v obeh smereh z oziroma brez specifične in splošne inhibicije aktivnega transporta ter izračunali efluksno razmerje. Naši rezultati kažejo, da je visoka biološka uporabnost imatiniba zelo verjetno dosežena z aktivno absorpcijo učinkovine iz črevesa, njena aktivna eliminacija pa je posredovana s sinergističnim delovanjem organskega kationskega prenašalca 1 na bazolateralni strani membrane in dodatno aktivnostjo dveh efluksnih prenašalcev (P-glikoproteina in BCRP) na apikalni membrani enterocita podgane. Zanimivo je, da smo ugotovili, da je v prenos N-desmetil imatiniba preko membrane vpleten le P-glikoprotein.
		ANG	Imatinib is a potent selective inhibitor of tyrosine kinases and is used primarily in the treatment of chronic myeloid leukemia and the gastrointestinal stromal tumour. Although, it is well established that imatinib is a substrate of several transport proteins which are also active in the intestinal mucosa, the mechanisms of imatinib intestinal absorption and elimination were not systematically investigated yet. To do that, we used a Sweetana-Grass type of diffusion chambers with segments of rat intestine as a model of the intestinal mucosa, measured the permeability coefficients of imatinib and its major metabolite (N-desmethyl imatinib) in both directions with and without specific and general inhibition of active transport, and calculated the efflux ratios. The results show that the good bioavailability of imatinib is highly likely achieved by its active absorption from the intestine and that its active elimination through the intestinal mucosa is mediated by a synergistic activity of organic cation transporter 1 in the basolateral membrane and the added activity of two efflux proteins (P-glycoprotein and breast cancer resistant protein) in the apical membrane of enterocytes of the rat ileum. Interestingly, it was found that N-desmethyl imatinib is only transported by P-glycoprotein.
	Objavljeno v	Elsevier/North-Holland; International journal of pharmaceutics; 2014; Vol. 460, iss. 1-2; str. 144-149; Impact Factor: 3.785;Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.722; A': 1; WoS: TU; Avtorji / Authors:	

		Kralj Eva, Žakelj Simon, Trontelj Jurij, Roškar Robert, Černelč Peter, Kristl Albin	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
2.	COBISS ID	3441521	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Spremljanje privzema imatiniba v levkocite bolnikov s KML
		ANG	Monitoring of imatinib targeted delivery in human leukocytes
	Opis	SLO	Uspeh zdravljenja kronične mieloične leukemije naj bi bil po literaturnih podatkih močno pogojen z aktivnim transportom učinkovine v tarčno celico. Metode za analitsko ovrednotenje znotrajceličnih koncentracij so redke in običajno vezane na uporabo radioaktivno označenih spojin. Tako tudi metoda za določanje koncentracije imatiniba v granulocitih v literaturi še ni bila objavljena. Da bi lahko podrobneje prečili privzem imatiniba v omenjene celice, smo v pripravo vzorca za merjenje celičnih koncentracij učinkovine vpeljali dvostopenjsko koncentriranje celičnega ekstrakta, pridobljen koncentrat pa analizirali z LC-MS/MS metodo. Zanesljivost in občutljivost pridobljenih meritev je bila potrjena z uspešno validacijo vseh potrebnih parametrov metode do limite kvantifikacije 0,5 ng imatiniba/ 106 celic pri razmerju signal/šum 670. Le 6 mL krvi potrebne za obravnavo posameznega bolnika dodatno dopolnjuje uporabnost vpeljane metode. Metoda je bila za klinično uporabo preiskušena na vzorcu 13 bolnikov s KML zdravljenih z imatinibom, katerih določene znotrajcelične koncentracije so bile vse znotraj validiranega območja koncentracij. Določanje znotrajcelične koncentracije imatiniba v granulocitih in nekatere dodatne meritve nam bodo služile za nadaljne raziskave vpliva dejavnikov, ki poleg plazemske koncentracije določajo posameznikov odgovor na zdravljenje z imatinibom. Poleg tega bi opisana metoda lahko služila tudi za individualizacijo odmerjanja zdravila na osnovi dejanskega privzema imatiniba v celice.
		ANG	The success of imatinib therapy in chronic myeloid leukemia is highly influenced by its active transport into target cells. However, the methodology for analytical evaluation of intracellular drug concentration is rare and usually reliant upon the use of radioactively labeled drugs. More specifically, there is no published method available in the literature for the determination of imatinib concentration in granulocytes. To gain further insight into the intracellular drug uptake a very reliable two-stage sample concentration procedure was devised and coupled with a sensitive ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. The reliability of this sample preparation and sensitivity of the analysis was confirmed by a successful validation of all necessary method parameters to an impressive lower limit of quantification of 0.5 ng imatinib per 106 cells still at the signal to noise ratio of 670. The usefulness of the method is further improved with only 6 mL of blood being necessary for patient analysis. The method has been applied to blood samples of 13 CML patients treated with imatinib and all the measured intracellular drug concentrations were within the validated range. These and further measurements will enable the research of factors which may, besides blood plasma concentration, influence the individual's response to imatinib therapy. Furthermore, individualisation of dosing based on the directly measured targeted drug delivery could be possible.
	Objavljeno v	Elsevier; Emerging Nanopharmaceuticals for Non-parenteral Application Routes; European Journal of Pharmaceutical Sciences; 2013; Vol. 50, issue 1; str. 123-129; Impact Factor: 3.005; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.722; WoS: TU; Avtorji / Authors: Kralj Eva, Žakelj Simon, Trontelj Jurij, Pajič Tadej, Preložnik-Zupan Irena, Černelč Peter, Ostanek Barbara, Marc Janja, Kristl Albin	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	

3.	COBISS ID		3292273	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Sočasno določanje koncentracije imatiniba, nilotiniba in dasatiniba iz posušene lise krvi s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti sklopljeno s tandemsko masno spektrometrijo	
		ANG	Simultaneous measurement of imatinib, nilotinib and dasatinib in dried blood spot by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry	
	Opis	SLO	Imatinib, dasatinib in nilotinib so trije tirozinkinazni inhibitorji v uporabi pri nas za zdravljenje BCR-ABL1 pozitivne kronične mieloične leukemije. Doseganje maksimalnega uspeha zdravljenja levkemije z naštetimi učinkovinami močno pogojujeta tako ustrezno odmerjanje kot tudi jemanje zdravila. Terapevtsko spremljanje koncentracije učinkovin v krvi oz. plazmi zato predstavlja pomembno orodje pri vodenju bolnikov s to boleznijo. Članek opisuje razvoj preproste in hitre metode za sočasno določanje vseh treh tirozinkinaznih inhibitorjev iz madeža krvi (DBS- ang. dried blood spot) bolnikov s KML. DBS vzorce smo pripravili z nanosom 10 µL polne krvi na Agilent DBS kartico. Po sušenju smo celoten madež krvi izrezali in prenesli v luknjico na 96 Captiva ND Lipids filterski plošči. Po dodatku izotopsko značenega internega standarda smo spojino ekstrahirali z 0,1% formično kislino v metanolu. Zbran ekstrakt (1 µL) smo injicirali na kolono Phenomenex Kinetex 50×2.1mm C18 in ga eluirali z gradientom acetonitrila v trojni kvadropol ESI-MS/MS Agilent 6460 delujoč v pozitivnem načinu. Celoten čas analize enega vzorca na LC-MS/MS aparatu je bil 2,6 min. Metoda je bila validirana z ozirom na linearnost, selektivnost, specifičnost, točnost, natančnost, absolutni in relativni metriks efekt ter stabilnost. Linearnost meritev je bila določena v območju od 50 do 5000 µg/L za imatinib in nilotinib in v območju od 2.5 do 250 µg/L za dasatinib, s koeficientom korelacije večjim od 0,997. Limita kvantifikacije (LLOQ) je bila določena pri 50 µg/L za imatinib in nilotinib ter pri 2.5 µg/L za dasatinib. Metoda se je izkazala za točno (% bias < 13.2) in natančno (CV (%) < 10.3%) tako na dnevni kot tudi meddnevni ravni. Matriks vzorca (%ME = 94.5-106.7) in različne vrednosti hematokrita niso imele pomembnega vpliva na točnost in natančnost meritev. Stabilnost vzorcev na DBS karticah smo potrdili pri sobni temperaturi in v hladilniku, nestabilnost smo opazili le pri shranjevanju vzorcev z dasatinibom pri 40°C. Z razvito metodo smo uspešno analizirali klinične vzorce bolnikov s KML.	
		ANG	Imatinib, dasatinib and nilotinib are three tyrosine kinase inhibitors currently used to treat Bcr-Abl1 positive chronic myelogenous leukaemia (CML). However, achieving maximum benefit with these drugs may require optimal dosing and adherence to therapy. In those cases, therapeutic drug monitoring (TDM) can be a useful tool in managing patients with CML. The paper presents simple and high throughput method for simultaneous determination of all three TKIs in dried blood spot (DBS) samples from CML patients. DBS samples were prepared by applying 10 µL of spiked whole blood onto an Agilent DBS cards. Whole blood spot was punched out of the card, transferred to a well in a 96-well Captiva ND Lipids filter plate. After the addition of isotopically labelled internal standard, the drug was extracted with 0.1% formic acid in methanol. The collected extract (1 µL) was injected onto a Phenomenex Kinetex 50 mm 2.1 mm C18 column and eluted with acetonitrile gradient into a triple quadrupole ESI-MS/MS Agilent 6460 operated in positive mode. The total run time was only 2.6 min. The method was validated in terms of linearity, selectivity, specificity, accuracy, precision, absolute and relative matrix effect and stability. The effect of haematocrit (Hct) on the accurate concentration determination was also examined. The method was linear in the range of 50-5000 micro g/L for imatinib and nilotinib and in the range of 2.5- 250 micro g/L for dasatinib, with correlation coefficient values higher than 0.997. Lower limits of	

		quantification (LLOQ) were 50 micro g/L for imatinib and and 2.5 microg/L for dasatinib. The method proved to be accurate (% bias < 13.20 and precise (CV < 10.3%) on intra- as well as on inter-day basis. Sample matrix (% ME = 94.5-106.7) and different Hct values had no significant effect on the accuracy of measured concentrations. Samples proved to be stable whilst stored on DBS cards at room temperature or in the refrigerator; however,at 40 °C the stability of dasatinib was compromised. The method presented was successfully applied to clinical samples.	
	Objavljeno v	Elsevier; Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences; 2012; Vol. 903; str. 150-156; Impact Factor: 2.487;Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.187; WoS: CO, EA; Avtorji / Authors: Kralj Eva, Trontelj Jurij, Pajič Tadej, Kristl Albin	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
4.	COBISS ID	2978417	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Koncentracija imatiniba v plazmi - nov laboratorijski podatek pri spremljanju zdravljenja slovenskih bolnikov s kronično mieloično levkemijo
		ANG	Imatinib plasma concentration - new information from the lab at monitoring the treatment of slovenian KML patients
	Opis	SLO	Izhodišča: V zadnjih desetih letih je imatinib (IM) močno izboljšal napoved izida bolezni pri bolnikih s kronično mieloično levkemijo (KML). Toda 30 % bolnikov še vedno ne doseže zelenih ciljev zdravljenja ali pa se po določenem času od njih ponovno oddalji. V zadnjih treh letih v literaturi kot možni dejavnik uspešnosti oz. neuspešnost zdravljenja KML omenjajo koncentracijo IM v plazmi (KIP). Zato smo prvič v Sloveniji analizirali povezavo KIP z uspešnostjo zdravljenja KML in jo opredelili kot glavni molekularni odgovor (MMR) do 18. meseca zdravljenja. Bolniki in metode: Vključili smo 75 bolnikov s KML, ki so se v proučevanem obdobju zdravili z IM in so imeli ob diagnozi kronično oziroma pospešeno obdobje KML. Vzorce krvi za določanje KIP smo pošiljali v referenčni laboratorij v Bordeauxu. Vzpostavili smo metodo določanja KIP v Sloveniji. Rezultati: KIP pri bolnikih, ki so prejeli 400 mgIM ni bila statistično značilno povezana z doseganjem MMR do 18. meseca zdravljenja (p = 0,30). Starost in čas od predzadnjega odmerka IM nista bila statistično značilno povezana s plazemsko koncentracijo IM (p = 0,47 oz. 0,80). Spol in odmerek sta bila statistično značilno povezana s koncentracijo (za oba p < 0,01). Zaključki: Jasne povezave med KIP in doseganjem MMR do 18. meseca zdravljenja nismo dokazali.Menimo, da bi bilo določanje koncentracije smiselno pri bolnikih, ki ne dosegajo splošno sprejetih meril za uspešen potek zdravljenja, pri bolnikih, ki imajo močno izražene stranske učinke IM in pri bolnikih, ki ob jemanju IM prejema druga zdravila s klinično pomembnimi farmakokinetičnimi interakcijami.
		ANG	Background: In past ten years imatinib (IM) has greatly improved the prognosis of patients with chronic myeloid leukemia (CML). However, 30 % of patients still fail to achieve treatment goals or cannot maintain them later. In the last three years, Imatinib plasma concentration (IPC) has been mentioned as a possible influence on treatment success. Therefore, for the first time in Slovenia, we searched for possible connection between IPC and treatment success defined as a major molecular response (MMR) until 18 months of treatement. Patients and methods: We included 75 patients with CML who had been receiving IM at that time of the study and were diagnosed in a chronic or accelerated phase of CML. Blood samples for IPC determination were sent to areference laboratory in Bordeaux. We set up a method of IPC determination in Slovenia. Results: Association between IPC and MMR achievement until 18 months of tretment was not statistically significant in patients receiving 400 mg of imatinib (p = 0.30). Age and

		time from the second to last dose of IM were not associated with IPC (p = 0.47 and 0.80, respectively), while gender and dose were (p for both < 0.01). Conclusions: There was no clear correlation between IPC and MMR achievement until 18months of treatment. We conclude that IPC determination would be rational in patents who fail to meet the generally accepted criteria for treatment success, in patients who experience severe side effects of IM, or patients receiving drugs that cause a pharmacokinetic interference with IM.
	Objavljeno v	[Slovensko zdravniško društvo]; Zdravniški vestnik; 2011; Letn. 80, št. 3; str. 163-170; Impact Factor: 0.155;Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.53; WoS: PY; Avtorji / Authors: Mlakar Jernej, Preložnik-Zupan Irena, Kralj Eva, Trontelj Jurij, Lusa Lara, Grat Mateja, Fikfak Nataša, Umek-Bricman Irena, Čeh Marija, Petrič Vlasta, Pajič Tadej
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
5.	COBISS ID	3414641Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Določanje privzema imatiniba v levkocite kot napovedni dejavnik uspešnosti zdravljenja KML ANG Determination of imatinib intracellular uptake in leukocytes as a prognostic factor in CML therapy
	Opis	SLO Izhodišča: Imatinib je prvo usmerjeno zdravilo pri zdravljenju kronične mieloične levkemije (KML). Odziv bolnikov na zdravljenje z imatinibom je odvisen tudi od vstopa učinkovine v tarčno celico z organskim kationskim prenašalcem 1 (OCT1). Na osnovi privzema radioaktivno označenega imatiniba v mononuklearne (MNC) celi - ce bolnikov pred začetkom zdravljenja je že bila dokazana povezava med aktivnostjo OCT1 prenašalcev in uspešnostjo zdravljenja. Domneva se, da bi določanje aktivnosti OCT1 pri bolnikih s KML lahko prispevalo k napovedi uspešnosti zdravljenja z imatinibom. Metode: MNC in granulocite (Gran) zdravega prostovoljca smo pred ali po ločevanju na Ficoll-u inkubirali v raztopini imatiniba s prazosinom oz. brez. Celice smolizirali s tekočim dušikom, nato pa iz lizata z mešanico organskih topil ekstrahirali imatinib. Vsebnost učinkovine v eks - traktu smo določili z metodo LC-MS/MS. Rezultati: Največji privzem imatiniba smo izmerili v predhodno ločenih Gran, v katerih je bila znotrajcelična koncentracija imatiniba skoraj 10-krat večja kot v ostalih vrstah celic. Ob dodatku prazosina (inhibitor OCT1) so bile znotrajcelične koncentracije imatiniba statistično značilno nižje tako v MNC (1,49 ± 0,11 vs. 17,8 ± 1,6 mg/L) kot tudi v Gran (96,2 ± 2,2 vs. 191,2 ± 7,7 mg/L), inkubiranih z učinkovino po ločevanju na Ficoll - -u. Absolutna aktivnost OCT1 je bila največja v Gran (6,27 ± 0,66 ng imatiniba/200000 celic). Zaključki: Razvili smo postopek za določanje privzema imatiniba v levkocite, ki ne temelji na uporabi radioaktivno označenih spojin. Z njim želimo preveriti povezanost aktivnosti OCT1 z uspehom zdravljenja z imatinibom tudi na slovenski populaciji bolnikov s KML. ANG Background: Imatinib is the first target therapy for chronic myelogenous leukemia (CML). Response to imatinib treatment also depends on the uptake of the drug into the target cell by organic cation transporter 1 (OCT1). OCT1 activity determined by the uptake of 14C-imatinib (IUR) in isolated mononuclear cells (MNC) has already been linked with treatment response. It has been proposed that the OCT1 activity determination could provide a valuable tool for the prediction of treatment success in patients with CML. Methods: MNC and granulocytes (Gran) of a healthy volunteer were incubated with imatinib in the presence or absence of prazosin before and after Ficoll cell sorting. The cells were lysed with liquid nitrogen and extracted with organic solvents. The intracellular concentration (c i) of imatinib wasdetermined by LC-MS/MS method. Results: We measured the highest IUR in Granisolated prior to incubation with imatinib. There the c i

		was 10-fold higher than in other cells. With prazosin, significantly lower imatinib c i were ob - served in MNC (1.49 $\pm$ 0.11 vs. 17.8 $\pm$ 1.6 mg/L) and Gran (96.2 $\pm$ 2.2vs. 191.2 $\pm$ 7.7 mg/L) incubated after cell sorting. We measured the highest absolute OCT1 activity in Gran (6.27 $\pm$ 0.66 ng imatinib/200000 cells).Conclusions: We developed a procedure for the measurement of imatinib uptake into the white blood cells, which is not based on the use of radi - oactively labelled compounds. By means of this test, we also hope to determinethe correlation of OCT1 activity with treatment success in the population of Slovenian CML patients.
	Objavljeno v	Slovensko zdravniško društvo; 4. kongres hematologov in transfuziologov Slovenije; Zdravniški vestnik; 2012; Letn. 81, suppl.; str. II-188-II-196; Impact Factor: 0.167;Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.548; WoS: PY; Avtorji / Authors: Kralj Eva, Žakelj Simon, Trontelj Jurij, Berginc Katja, Pajič Tadej, Preložnik-Zupan Irena, Černelč Peter, Ostanek Barbara, Podgornik Helena, Marc Janja, Kristl Albin
	Tipologija	1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci

7.Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine⁶

	Družbeno-ekonomski dosežek		
1.	COBISS ID	271092224	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Vpliv aktivnega transporta imatiniba na uspešnost zdravljenja kronične mieloične levkemije
		ANG	The influence of imatinib active transport on the therapeutic outcome of chronic myeloid leukemia
	Opis	SLO	Mentorstvo doktorandom, mladim raziskovalcem. Mlada raziskovalka Eva Kralj je uspešno zaključila podiplomski (doktorski) študij v rednem roku.
		ANG	Supervisorship (mentorship) of PhD candidates, young researchers. Young researcher Eva Kralj has successfully finished her postgraduate (doctoral) studies within time.
	Šifra	D.09 Mentorstvo doktorandom	
	Objavljeno v	[E. Kralj]; 2013; XII, 172 str.; Avtorji / Authors: Kralj Eva	
	Tipologija	2.08 Doktorska disertacija	
2.	COBISS ID	3536497	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Intracelularni privzem imatiniba v levkocite: metoda določanja in korelacija z uspehom zdravljenja
		ANG	Imatinib intracellular uptake in leukocytes: method for determination and correlation with treatment success
	Opis	SLO	Da bi lahko podrobneje proučili privzem imatiniba v granulocite, smo v pripravo vzorca za merjenje celičnih koncentracij učinkovine vpeljali dvostopenjsko koncentriranje celičnega ekstrakta, pridobljen koncentrat pa analizirali z LC-MS/MS metodo. Metoda je bila za klinično uporabo preizkušena na vzorcu 13 bolnikov s KML zdravljenih z imatinibom, katerih znotrajcelične koncentracije so bile vse znotraj validiranega območja koncentracij.
		ANG	To gain the insight into the intracellular imatinib uptake in granulocytes a very reliable two-stage sample concentration procedure was devised and coupled with a sensitive ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. The method has been applied to blood samples of 13 CML patients treated with imatinib and all the measured intracellular drug concentrations were within the validated range.

	Šifra	B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci	
	Objavljeno v	s. n.]; 5th International BBBB Conference, 26-28 September 2013, Athens, Greece; 2013; Str. 30; Avtorji / Authors: Žakelj Simon, Kralj Eva, Trontelj Jurij, Kristl Albin	
	Tipologija	1.10 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci (vabljen predavanje)	
3.	COBISS ID	3460465	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Prenašalci učinkovin in farmakogenomika imatiniba
		ANG	Drug transporters and imatinib pharmacogenomics
	Opis	SLO	Visoka biološka uporabnost imatiniba je zelo verjetno posledica aktivne absorpcije učinkovine iz črevesa, njena aktivna eliminacija pa je povezana s sinergističnim delovanjem organskega kationskega prenašalca 1 na bazolateralni strani membrane in dodatno aktivnostjo dveh efluksnih prenašalcev (P-glikoproteina in BCRP) na apikalni membrani enterocita.
		ANG	The good bioavailability of imatinib is highly likely achieved by its active absorption from the intestine and its active elimination through the intestinal mucosa is mediated by a synergistic activity of organic cation transporter 1 in the basolateral membrane and the activity of two efflux proteins (P-glycoprotein and breast cancer resistant protein) in the apical membrane of enterocytes.
	Šifra	B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci	
	Objavljeno v	de Gruyter; Post-Congress Satellite Meeting, Pharmacogenomics and theranostics in practice, Florence, Italy, 24 May, 2013, in cooperation with the European Society of Pharmacogenomics and Theranostics; Drug metabolism and drug interactions; 2013; Str. A3-A4; Avtorji / Authors: Marc Janja, Žakelj Simon	
4.	Tipologija	1.10 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci (vabljen predavanje)	
	COBISS ID	3315057	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Farmakogenomika inhibitorjev tirozinske kinaze v terapiji kronične mielonične levkemije
		ANG	Pharmacogenomics of tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia terapija
	Opis	SLO	Imatinib, dasatinib in nilotinib so učinkovine, ki inhibirajo tirozin kinazo in se uporabljajo za zdravljenje pozitivne kronične mielonične levkemije (KML). Pri bolnikih s KML lahko pridobljene mutacije v kinazni domeni proteina BCR-ABL1 prispevajo k neučinkovitemu zdravljenju z zaviralci tirozinske kinaze.
		ANG	Imatinib, dasatinib and nilotinib are three tyrosine kinase inhibitors currently used to treat positive chronic myeloid leukemia (CML). The acquired mutations in the BCR-ABL1 kinase domain may contribute to resistance to tyrosine kinase inhibitors in CML patients.
	Šifra	B.04 Vabljen predavanje	
	Objavljeno v	[s.n.]; 1st ESPT Summer School, August 21st - August 26th 2012, University of Ljubljana, Faculty of Pharmacy, Ljubljana, Slovenia; 2012; Str. 68-71; Avtorji / Authors: Žakelj Simon	
	Tipologija	1.10 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci (vabljen predavanje)	

8. Drugi pomembni rezultati projektne skupine²

--

9. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁸

9.1. Pomen za razvoj znanosti⁹

SLO

Raziskali in proučili smo mehanizme prehoda imatiniba skozi mukozno bariero v GIT kot tudi v krvne celice (privzem imatiniba). Tako smo lahko z aktivno absorpcijo in eliminacijo pojasnili visoko biološko uporabnost velike in bazične molekule imatiniba ter veliko variabilnost plazemskih koncentracij med bolniki.

Metode za analitsko ovrednotenje znotrajceličnih koncentracij so redke in običajno vezane na uporabo radioaktivno označenih spojin. V okviru tega projekta smo razvili ustrezno LC-MS analitsko metodo za določanje imatiniba tako v plazmi kot v krvnih celicah. Metoda za določanje koncentracije imatiniba v granulocitih v literaturi še ni bila objavljena.

Poleg tega smo razvili tudi analitsko metodo za sočasno določanje koncentracije imatiniba, nilotiniba in dasatiniba iz posušene lise krvi s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti sklopljeno s tandemsko masno spektrometrijo, ki v literaturi tudi še ni znana.

ANG

Imatinib transport mechanisms through mucosal barrier in GIT as well as into blood cells (imatinib uptake) were explored and investigated. We were so able to explain high bioavailability of large and basic imatinib molecule and its high variability of plasma concentrations among patients with active absorption and elimination.

The methodology for analytical evaluation of intracellular drug concentration is rare and usually reliant upon the use of radioactively labeled drugs. For the purpose of this project we developed an appropriate LC-MS analytical method for imatinib determination in plasma and in blood cells. The method for the determination of imatinib concentration in granulocytes has not yet been published in the literature.

Besides, (in the literature not yet known) analytical method for the simultaneous measurement of imatinib, nilotinib and dasatinib in dried blood spot by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry was developed.

9.2. Pomen za razvoj Slovenije¹⁰

SLO

Smatramo, da bodo pridobljeno znanje in razvite metode pripomogli k zgodnejši določitvi optimalnega odmerka imatiniba v terapiji KML oz. da se bodo, v kolikor bo to potrebno, bolniku čim prej predpisale novejšie učinkovine, kot sta nilotinib in dasatinib. Za ti dve učinkovini namreč velja, da uspešnost terapije ni odvisna od aktivnosti OCT1.

ANG

We believe that the knowledge gained and the methods developed in this project will contribute to the early determination of the optimum imatinib dose, or when necessary, the patient can be prescribed the second line agents such as nilotinib and dasatinib, which are independent of OCT1 activity, to achieve the treatment effectiveness as early as possible.

10. Samo za aplikativne projekte in podoktorske projekte iz gospodarstva!

Označite, katerega od navedenih ciljev ste si zastavili pri projektu, katere konkretne rezultate ste dosegli in v kakšni meri so doseženi rezultati uporabljeni

Cilj		
F.01	Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE

	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.06	Razvoj novega izdelka	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.08	Razvoj in izdelava prototipa	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.11	Razvoj nove storitve	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	

	Uporaba rezultatov	
F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	

F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.28	Priprava/organizacija razstave	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.29	Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.30	Strokovna ocena stanja	

	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.31	Razvoj standardov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.33	Patent v Sloveniji	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.35	Drugo	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	

Komentar

--

11.Samo za aplikativne projekte in podoktorske projekte iz gospodarstva!
Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visokošolskega izobraževanja					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	☐	☐	☐	☐	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	☐	☐	☐	☐	
G.01.03.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	☐	☐	☐	☐	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	☐	☐	☐	☐	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	☐	☐	☐	☐	

G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	☐	☐	☐	☐	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	☐	☐	☐	☐	
G.02.07.	Večji delež izvoza	☐	☐	☐	☐	
G.02.08.	Povečanje dobička	☐	☐	☐	☐	
G.02.09.	Nova delovna mesta	☐	☐	☐	☐	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	☐	☐	☐	☐	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	☐	☐	☐	☐	
G.02.12.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	☐	☐	☐	☐	
G.03.04.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	☐	☐	☐	☐	
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	☐	☐	☐	☐	
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave	☐	☐	☐	☐	
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	☐	☐	☐	☐	
G.04.06.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete	☐	☐	☐	☐	
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj	☐	☐	☐	☐	
G.07	Razvoj družbene infrastrukture					
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura	☐	☐	☐	☐	
G.07.02.	Prometna infrastruktura	☐	☐	☐	☐	
G.07.03.	Energetska infrastruktura	☐	☐	☐	☐	
G.07.04.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva	☐	☐	☐	☐	
G.09.	Drugo: 	☐	☐	☐	☐	

Komentar

12.Pomen raziskovanja za sofinancerje¹¹

--	--

	Sofinancer			
1.	Naziv			
	Naslov			
	Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:		EUR	
	Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:		%	
	Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja	Šifra		
		1.		
		2.		
		3.		
		4.		
5.				
Komentar				
Ocena				

13. Izjemni dosežek v letu 2014¹²**13.1. Izjemni znanstveni dosežek**

--

13.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

--

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja ter obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta

Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba
raziskovalne organizacije:*

in

vodja raziskovalnega projekta:

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za
farmacijo

Albin Kristl

ŽIG

Kraj in datum:

Ljubljana

13.3.2015

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2015/159

¹ Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku) [Nazaj](#)

² Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

³ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikost pisave 11) [Nazaj](#)

⁴ V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta, napišite obrazložitev. V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

⁵ Navedite znanstvene dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A" ali A'. [Nazaj](#)

⁶ Navedite družbeno-ekonomske dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Družbeno-ekonomski rezultat iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A" ali A'.

Družbeno-ekonomski dosežek je po svoji strukturi drugačen kot znanstveni dosežek. Povzetek znanstvenega dosežka je praviloma povzetek bibliografske enote (članka, knjige), v kateri je dosežek objavljen.

Povzetek družbeno-ekonomskega dosežka praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen, izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. prehod mlajših sodelavcev v gospodarstvo na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovitev podjetja kot rezultat projekta ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)

⁷ Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 6 in 7 (npr. ni voden v sistemu COBISS). Največ 2.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

⁸ Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja [Nazaj](#)

⁹ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki [Nazaj](#)

¹⁰ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki [Nazaj](#)

¹¹ Rubrike izpolnite / prepišite skladno z obrazcem "izjava sofinancerja" <http://www.arrs.gov.si/sl/progproj/rproj/gradivo/>, ki ga mora izpolniti sofinancer. Podpisan obrazec "Izjava sofinancerja" pridobi in hrani nosilna raziskovalna organizacija – izvajalka projekta. [Nazaj](#)

¹² Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega projekta v letu 2014 (največ 1000 znakov, vključno s presledki). Za dosežek pripravite diapozitiv, ki vsebuje sliko ali drugo slikovno gradivo v zvezi z izjemnim dosežkom (velikost pisave najmanj 16, približno pol strani) in opis izjemnega dosežka (velikost pisave 12, približno pol strani). Diapozitiv/-a priložite kot priponko/-i k temu poročilu. Vzorec diapozitiva je objavljen na spletni strani ARRS <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/>, predstavitev dosežkov za pretekla leta pa so objavljena na spletni strani <http://www.arrs.gov.si/sl/analize/dosez/>. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-RPROJ-ZP/2015 v1.00a

50-8C-20-A3-EA-70-9E-7D-73-26-56-8D-0F-E4-AA-39-1C-F0-B2-6F