

# Új stratégiák fejlesztése a gyógyszerrezisztens daganatok kezeléséhez

VAJDA FLÓRA<sup>1\*</sup>, BAJTAI ESZTER<sup>1,2\*</sup>, GOMBOS BALÁZS<sup>1</sup>, KARAI EDINA<sup>1,3</sup>, HÁMORI LILLA<sup>1</sup>, SZAKÁCS GERGELY<sup>1,4</sup>, FÜREDI ANDRÁS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Eötvös Loránd Kutatási Hálózat, Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet, <sup>2</sup>Országos Onkológiai Intézet, Kísérletes Farmakológiai Osztály, <sup>3</sup>Állatorvostudományi Egyetem, Kórélettani és Onkológiai Tanszék, Budapest; <sup>4</sup>Medical University of Vienna, Institute of Cancer Research, Bécs, Ausztria

\*Első szerző

Finanszírozás: A közleményhez kapcsolódó munkát a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal 2019-1-3-1-KK-2019-00007 Innovációs szolgáltató bázis létrehozása diagnosztikai, terápiás és kutatási célú kiberorvosi rendszerek fejlesztésére pályázata és az Együttműködés az ELKH TTK és a PTE SZKK között nemzetközileg is jelentős orvosi biológiai kutatási területeken 2969-1-KÖ-39-2020 számú pályázata támogatta.

## Levelezési cím:

Dr. Füredi András, Eötvös Loránd Kutatási Hálózat, Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet, 1117 Budapest, Magyar tudósok körútja 2., e-mail: furedi.andras@ttk.hu

## Közlésre érkezett:

2021. április 15.

## Elfogadva:

2021. május 9.

Világszerte mintegy 14 millió rákos megbetegedést és 8 millió rákkal összefüggő halálesetet regisztrálnak évente. Bár az elmúlt évtizedekben növekvő halálozási ráta stabilizálódott, a rákos megbetegedések incidenciája növekedő tendenciát mutat: mára minden második férfi és minden harmadik nő számolhat a rák diagnózisával. A korai szűrésnek és a terápiák fejlődésének köszönhetően a betegek kilátásai jelentősen javultak, a legtöbb terápia azonban előbb-utóbb hatástalanná válik a kialakuló rezisztencia miatt. A terápiarezisztencia valamennyi ráktípusban, az összes ismert gyógyszerrel szemben kialakulhat, és az okai legalább olyan komplexek, mint amennyire összetett az a folyamat, amely a ráksejt kialakulásához vezet. Kijelenthető, hogy a terápiarezisztencia a kutatások előtt álló legnagyobb kihívás. Tanulmányunkban összefoglaljuk a fontosabb rezisztenciamechanizmusokat, részletezve a terápiarezisztens tumorok hatékony kezelésére irányuló próbálkozásokat. Végül bemutatjuk a kutatócsoportunk elmúlt években született eredményeit, valamint a rezisztencia megelőzésére és leküzdésére irányuló terápiás javaslatainkat. *Magy Onkol* 65:176-187, 2021

**Kulcsszavak:** rosszindulatú daganatok, gyógyszer-rezisztencia, tumor-mikrokörnyezet, kemoterápia, állatmodellek

*There are about 14 million new cancer cases and 8 million deaths every year. Every second man and one in every three women will get cancer during their lifetimes. Following decades of steady increase, death rates have stabilized due to increased awareness and prevention, early detection, and the emergence of more effective therapy. Yet despite all the advances cancer remains a major killer. Despite improved therapies, nearly all current treatments face the same problem: for many patients, they ultimately stop working. Therapy resistance is the ultimate challenge facing cancer researchers and patients today. In this review we present an overview of the most important resistance mechanisms, discussing progress in therapies designed to prevent or overcome anticancer therapy resistance. Finally, we present recent findings from our own laboratory on the development of new experimental models and new therapeutic approaches to combat multidrug resistant cancer.*

Vajda F, Bajtai E, Gombos B, Karai E, Hámori L, Szakács G, Füredi A. Development of novel treatment strategies for drug resistant cancer. *Magy Onkol* 65:176-187, 2021

**Keywords:** neoplasms, drug resistance, tumor microenvironment, drug therapy, animal models

## BEVEZETÉS

Az elmúlt évtizedekben a rosszindulatú daganatok felismerésére szolgáló módszerek, illetve a sikeres kezelésüket célzó terápiás lehetőségek jelentős fejlődésen mentek keresztül, azonban az agresszív tumorokkal diagnosztizált betegek túlélési esélyei mind a mai napig alacsonyak. Hét fejlett ország ráktúlélési statisztikáinak elemzéséből kiderült, hogy míg a 7 legmagasabb mortalitású tumortípus (nyelőcső, gyomor, vastagbél, végbél, hasnyálmirigy, tüdő és petefészek) esetében nagyjából 5–15%-kal növekedett az ötéves túlélés a 20 évvel korábbi statisztikákhoz viszonyítva, a 7-ből 5 típusnál még mindig a betegek jóval kevesebb, mint fele van életben ekkor (1).

Feltételezések szerint a gyógyszer-rezisztencia okolható a sikertelen kezelések 90%-áért (2). A rezisztens tumorsejtek többek között lebonthatják vagy kipumpálhatják a hatóanyagokat, növelhetik a DNS-károsodások javításának mértékét, csökkenthetik a gyógyszerek célpontjával szolgáló fehérjék mennyiségét, epigenetikai módosításokkal változtathatják a túlélést biztosító jelátviteli útvonalakat vagy szabályozhatják a sejtciklus változását és az apoptotikus fehérjék egyensúlyát (1. ábra)(3). A molekuláris mechanizmusok mellett az utóbbi években megkezdődött a tumorok mikro környezetének (TME) megismerése és a rezisztenciában betöltött szerepének felmérése, ami a későbbiekben új hatóanyagok és terápiák kidolgozásához vezethet (4). Ugyancsak az elmúlt tíz év meglepő eredménye az ún. gyógyszer-toleráns perziszter sejtek felfedezése (5).

Közleményünkben összefoglaljuk a jelentősebb rezisztenciamechanizmusokat és a leküzdésük érdekében, ál-

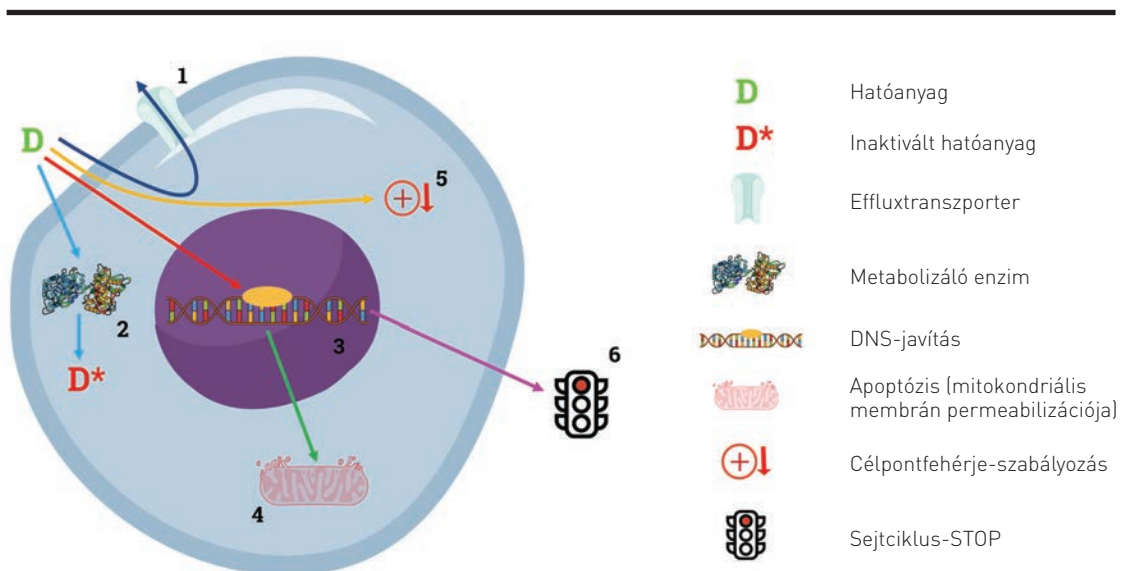
talunk és más kutatócsoportok által kidolgozott kísérleti terápiákat, illetve bemutatjuk azokat az *in vitro* és *in vivo* rendszereket, amelyekkel a gyógyszer-rezisztencia hatékonyan modellezhető.

## A GYÓGYSZER-REZISZTENCIA MECHANIZMUSAI

A citokróm P450 (CYP) enzimsalád tagjai a sejtek méregtelenítési folyamataiban játszanak fontos szerepet, képesek a hatóanyagok széles spektrumát oxidációval inaktíválni. Felmerült, hogy bizonyos daganatok sejtjei CYP enzimek fokozott kifejezésével védekeznek az alkalmazott gyógyszer ellen. Hasnyálmirigy-tumor-mintákból létrehozott *in vitro* és *in vivo* modelleken vizsgálva kiderült, hogy ezeken a tirozinkináz-gátló (TKI) terápiák nem hatásosak, amíg a CYP3A5 fehérje aktív (6). Az enzim kifejeződését siRNS-sel csendesítve a TKI-érzékenység helyreállt.

A hagyományos kemoterápia során alkalmazott vegyületek legfőképp a DNS károsításával pusztítják el a gyorsan osztódó tumorsejteket. Ezeket a sérüléseket a DNS-javításért felelős fehérjék képesek hatékonyan helyrehozni, amelyek fokozott kifejeződése a rezisztens daganatsejtekben gyakran megfigyelhető. Az elmúlt évtizedekben folytatott kutatások nyomán egyértelműen kijelenthető, hogy a DNS-javítás jelentős szerepet játszhat a terápiák széles köre, például ionizáló sugárterápia, alkilálószeres, antimetabolitok, topoisomérázgátlók és sejtosztódás-inhibitorok ellen kialakuló rezisztenciában (7).

A nagy dózisú kemoterápiákkal történő kezelés során olyan mértékű visszafordíthatatlan DNS-károsodás keletkezhet, amely apoptotikus útvonalak aktiválásához vezet.



**1. ÁBRA.** A gyógyszer-rezisztencia leggyakoribb mechanizmusai a tumorsejtekben. Hatóanyagok (D) kipumpálása (1) vagy metabolikus inaktíválása (2), a DNS-károsodások javításának növelése (3), az apoptózis elkerülése (4), a gyógyszer-célpontok mennyiségének csökkentése (5) és a sejtciklus szabályozása (6)

Kiderült azonban, hogy a tumorsejtekben az apoptotikus fehérjék finom egyensúlya gyakran felborul, és azok a hatások, amelyek egészséges sejtekben programozott sejthalálhoz vezethetnek, a tumorokban következmény nélkül maradnak. Az apoptózis megváltozásán keresztül megvalósuló gyógyszer-rezisztencia egyik legismertebb példája a krónikus mieloid leukémia (CML) kezelését forradalmasító imatinibhez köthető. Az imatinibkezelés Bcl2-függő útvonalon indukál apoptózist a Bcr/Abl pozitív leukémiasejtekben, így a Bcl2 antiapoptotikus fehérje fokozott kifejeződése egyszerűen meggátolja ezt a folyamatot. Ebben az esetben az imatinibérzékenység csak a Bcl2 fehérje expressziójának vagy funkciójának gátlásával állítható helyre (8).

A DNS-károsodás és az apoptózis elkerülésének egy másik módja a sejtciklus megváltozása. Vegyületek *in vitro* kombinálásával kimutatható, hogy a széles körben alkalmazott kemoterápiás hatóanyagok (taxánok, antraciklinek, platinavegyületek, antimetabolitok) hatástalanok, ha nem a megfelelő sejtciklusfázisban érik el a tumorsejteket (9). Például az M-fázisban ható, tubulinstabilizáló paklitaxelkezelésnek nincs hatása a flavopiridollal G1 és G2 fázisban rögzített daganatsejtekre (10).

A rezisztencia további lehetséges mechanizmusa a gyógyszerek célpontjával szolgáló fehérjék mennyiségének csökkentése. A topoizomeráz I és II enzimeket gátló hatóanyagokkal szemben kialakuló rezisztenciában figyelték meg, hogy a sejtek a túlélés érdekében csökkentették az egyébként kifejezetten hatékony kezelések célpontjával szolgáló fehérjék szintjét (11, 12).

A gyógyszer-rezisztencia legtöbbet vizsgált okozója az ABC (ATP-binding cassette) transzporterek családjába tartozó P-glikoprotein (ABCB1/Pgp) által mediált hatóanyagefflux. Ez a széles szubsztrátspecifitású fehérje az ATP hasításával nyert energiát felhasználva juttat molekulákat a sejtek membránjából az extracelluláris térbe, ezzel csökkentve a kezelések hatékonyságát. Számtalan kísérleti eredmény ellenére a Pgp szerepéről meggyőző klinikai adatokat csak a közelmúltban sikerült szerezni. Ennek egyik példája a petefészek-daganatokban az *ABCB1* és *SLC25A40* gének fúziójának eredményeként megemelkedő Pgp-expresszió, ami rezisztenciát okoz a hagyományos kemoterápiával és a modern PARP-gátló vegyületekkel szemben (13). A több mint 40 évvel ezelőtti felfedezése óta a Pgp-t fontos gyógyszer-célpontnak tartják, kiiktatása jelentős lépés lehetne. A farmakológiai gátláson alapuló klinikai próbák azonban kudarcra végződtek, mert a transzporter nemcsak a tumorszövetekben, de fiziológiailag fontos vér-szöveti határokon is megtalálható (14). A Pgp-mediált rezisztencia modellezésére használható kísérletes rendszereket egy korábbi összefoglaló közleményünkben részletesen bemutattuk (15).

Biedler és Riehm 1970-es, áttörést jelentő tanulmánya bizonyította be először, hogy *in vitro* tenyészetekben is előidézhető a tumoros betegek esetében megfigyelhető gyógyszer-rezisztencia (16). Hörcsög-petefészeksejteket (CHO)

vizsgálva kimutatták, hogy tartós, alacsony koncentrációjú kezelésekkel rezisztencia alakítható ki aktinomycin D-vel szemben. Mi több, a kezelés keresztrezisztenciát eredményezett több, strukturálisan jelentősen eltérő hatóanyaggal szemben is, mint mitramicin, vinblasztin, vinkrisztin, puro-micin, daunomicin, demekolcin, és mitomicin C. A szenzitív és rezisztens sejtvonalpárok összehasonlító vizsgálata a rezisztenciamechanizmusok felderítésére és új hatóanyagok azonosítására bevett gyakorlat. Gyógyszerérzékeny parentális és Pgp-expresszálo tumorsejtpárok használatával korábban olyan molekulákat azonosítottunk, amelyek paradox módon, egy eddig minden részletében nem ismert mechanizmuson keresztül képesek a Pgp-t kifejező tumorsejtek célzott elpusztítására (17–19).

### A DNS-HIBAJAVÍTÁS SZEREPE A GYÓGYSZER-REZISZTENCIÁBAN

*BRCA2*-mutáns, ciszplatinrezisztens emlőtumor- és hasnyálmirigydaganat-sejtvonalakon végzett kísérletek eredményeként bizonyították, hogy a ciszplatin- és PARP-inhibitor-rezisztenciát a *BRCA2* funkciójának második mutáció révén történő helyreállása teszi lehetővé (20). Szintén sejtvonalakon végzett kísérletek alapján állapították meg, hogy a *BRCA*-funkció helyreállása nélkül is kialakulhat a drogrezisztencia *BRCA1/2*-hiányos daganatok esetében, például olyan DNS-hibajavítási mechanizmusok kiesésével, amik egyébként a sérült replikációs villa degradációjához és ezáltal a hibás sejt halálához vezetnének homológ rekombináció (HR) hiányában (21). Az elakadt replikációs villa megmentése céljából DNS-hiba tolerancia-útvonalak aktiválódnak, melyek közé tartozik a transzléziós szintézis (TLS). TLS során a DNS sérült templát esetén is átíródik a speciális DNS-polimerázoknak köszönhetően, azonban a replikáció mutációkat eredményez. Egy 2019-ben publikált tanulmányban A375 humán melanóma egér xenograftok alkalmazása révén *in vivo* is bizonyították a TLS-t célzó kismolekula hatását, ami azon túl, hogy képes védelmet biztosítani a TLS mutagenikus hatásai ellen, a tumorsejtek ciszplatinérzékenységét is növelte, így javítva a kezelés hatékonyságát (22).

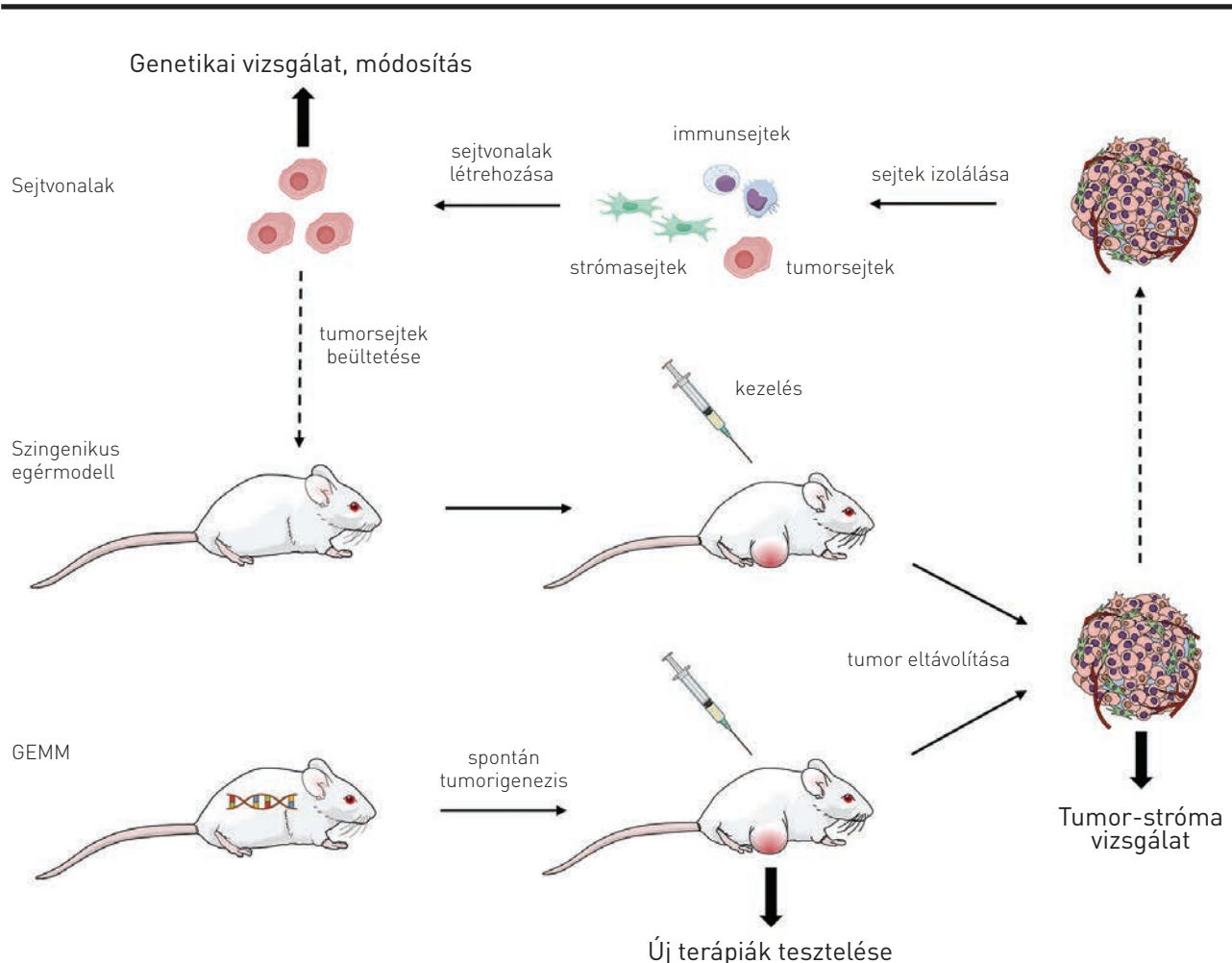
Egy 2016-os tanulmányban *BRCA1*-deficiens tripla-negatív emlőtumorból hoztak létre betegből származó xenograft (patient-derived xenograft, PDX) modelleket és vizsgálták a különböző gyógyszerek hatékonyságát, illetve a kialakuló rezisztencia mechanizmusát. Míg korábbi tanulmányokban már igazolták a *BRCA1* funkciójának helyreállása és a *BRCA1* gén promóterének metiláltsága közötti összefüggést (23), ebben az esetben hétből négy, *BRCA1*-gyel rendelkező PDX tumornál a *BRCA1*-expresszió annak ellenére detektálható volt, hogy a gén promóterének hipermetilációja megmaradt. A *BRCA1*-expresszió és a kialakuló gyógyszer-rezisztencia ez esetben *de novo* intrakromoszomális genomi átrendeződés következménye volt (24).

A klinikumban tapasztalt drogrezisztencia megjelenése egy evolúciós folyamat eredménye. A terápia első fázisaiban

a tumor, ugyan változó mértékben, de többnyire reagál a kezelésekre, azonban ez később megváltozik, először csökken a terápiára adott válasz, majd végül kialakul a teljes rezisztencia és a kezelés hatástalanná válik. A daganatok evolúciója elsősorban genetikailag módosított egérmockelkekben tanulmányozható. Az elmúlt években csoportunkban a *Brca1*<sup>-/-</sup>; *p53*<sup>-/-</sup> kettős mutáns egerekből származó, szeriális ortotopikus átültetéssel propagálható spontán tumor modellt vizsgáltuk (25). Ebben a modellben a humán tumorok klinikai viselkedéséhez hasonlóan a rezisztencia a kezelés hatására alakul ki és a megjelenő emlődaganatok jól reprodukálják a humán megbetegedésekből ismert, invazív duktális karcinómákra jellemző molekuláris, hisztopatológiai és morfológiai tulajdonságokat (26). Rottenberg és munkatársainak eredményei bebizonyították, hogy a *BRCA1*-hiányos daganatok

elsővonalbeli gyógyszerével, az olaparibbal (PARP-inhibitor) történő kezelés hatására is kialakul a rezisztencia (27). A rezisztencia részben áttörhető volt az olaparib és platinavegyületek (ciszpaltin és karboplatin) együttes használatával (27).

A *BRCA1*-hiányos daganatok részletesebb tanulmányozása céljából a *Brca1*<sup>-/-</sup>; *p53*<sup>-/-</sup> egér emlőtumorból sejtvonalat (CST) alapítottunk, amely megőrizte az eredeti tumor tulajdonságait (tripla-negatív, bazális markereket expresszál, illetve instabil genommal rendelkezik), valamint *in vitro* érzékenységet mutat doxorubicin-, epirubicin-, paklitaxel-, etopozid-, SN38-, gemcitabin-, ciszpaltin-, olaparib-, veliparib-, rukaparib- és talazoparibkezeléssel szemben (28). A CST sejtek ortotopikus transzplantációja révén az eredeti tumor tulajdonságaival megegyező tumor indukálható, mely továbbra is megtartja ciszpaltinérzékeny-



**2. ÁBRA.** Rezisztencia vizsgálatára alkalmas modellek. Az *in vitro* körülmények között tenyésztett tumorsejtekből az egér megfelelő szövetebe ültetve tumor alakul ki, így a különböző kezelésekre hatása *in vivo* vizsgálhatóvá válik. A tumor és a tumort körülvevő stróma részletes tanulmányozása genetikailag módosított állatmodell (GEMM) alkalmazásával is lehetséges. Ez esetben a tumor kialakulása a genetikai módosítás következtében spontán, a drogrezisztencia evolúciója nyomon követhető, így a modell alkalmas új terápiák tesztelésére. Az állatmodellekben kialakult tumor strómájával együtt eltávolítható. A tumorsejtek mellett számos más sejtípust is tartalmazó komplex tumorszövetből különböző sejtípusok izolálhatók, melyek primer kultúráként vagy sejtvonalaként fenntartva genetikai vizsgálatra és akár genetikai módosításra is alkalmasak lehetnek

ségét. A CST sejtvonal alapú tumormodell alkalmasnak bizonyult a különböző kemoterápiás gyógyszerek hatásának és a velük szemben kialakuló rezisztencia vizsgálatára mind *in vitro*, mind *in vivo*. Mivel a daganatból nyert sejtek könnyen izolálhatóak és tenyésztethetők, lehetőség nyílt a tumorok genomi analizisére és genetikai módosítására. Lentivirális transzdukció révén fluoreszcensen jelölt CST sejteket hoztunk létre, melyek szintén képesek voltak tumorok indukálására, megnyitva az utat a tumor-stróma kölcsönhatások vizsgálatához (lásd később).

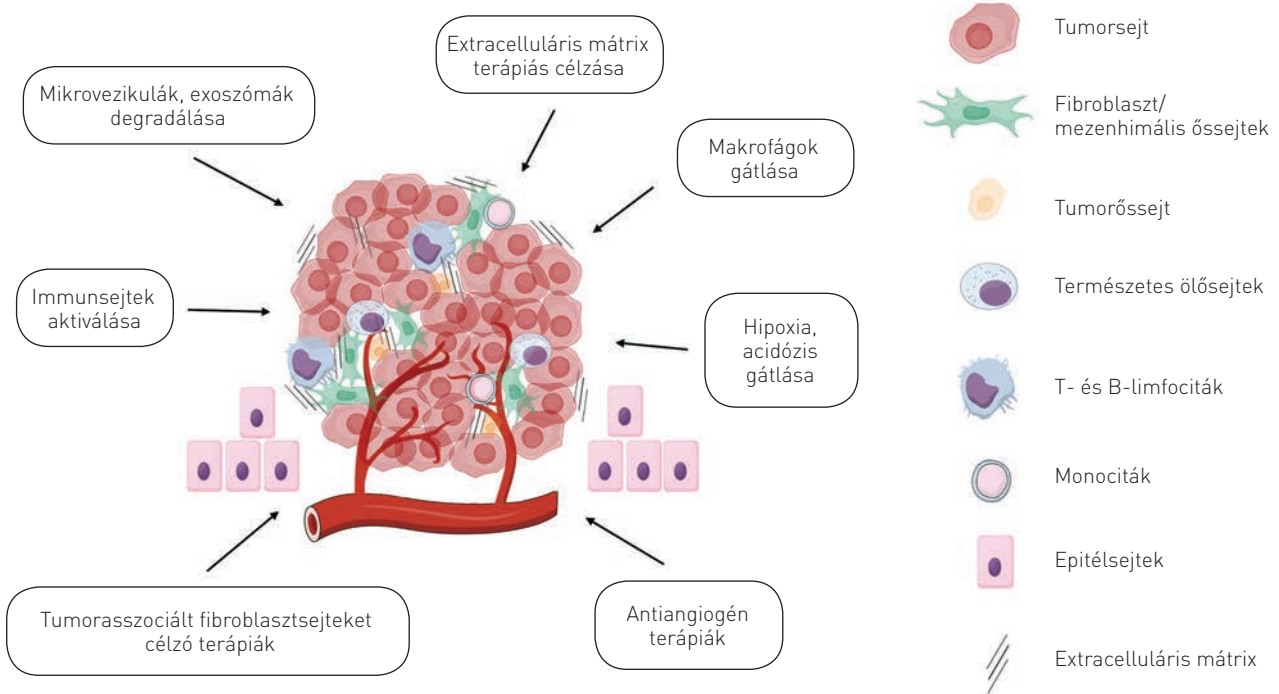
A gyógyszer-rezisztencia leküzdéséhez tehát számos preklinikai modell áll rendelkezésünkre (2. ábra), melyek lehetőséget biztosítanak a rezisztencia kialakulásának mélyebb megértésére és új terápiás stratégiák kidolgozására.

### A TUMOR MIKROKÖRNYEZETE (TME), MINT ÚJ CÉLPONT

A tumor mikrokörnyezetét (TME), más néven strómáját, a daganatsejtekkel együtt élő, nem rosszindulatú sejtek komplex hálózata alkotja. A leggyakrabban előforduló stromális sejttípusok a fibroblasztok/mezenhimális őssejtek, a makrofágok, a T-sejtek és az ereket alkotó endotélsejtek, amiket a tumorsejtekkel együtt az extracelluláris mátrix (ECM) struktúrái kötnek össze (29) (3. ábra). A tumor progressziójában szerepet játszó strómasejtek nemcsak a tumor növekedésében, áttétképzésében, metabolikus változásaiban, hanem a rezisztencia kialakulásában is fontos szerepet töltenek be.

A tumor környezetében tumorasszociált fibroblasztokká (TAF) alakuló sejtek kettős szerepe (tumorvédő és tumorel- lenes) hosszú ideje vita tárgyát képezi. Az utóbbi években megjelent tanulmányok egyértelműen bizonyítják a TAF-ok gyógyszer-rezisztenciában játszott szerepét. A TAF sejtek által szekretált kemokinek, növekedési faktorok, metabolitok és exoszómák hozzájárulhatnak a gyógyszer-rezisztencia és a relapszus kialakulásához. A hepatocita növekedési faktor (HGF) szekrécióján keresztül a TAF-ok vastagbél-daganat-sejtek MET útvonatát aktiválva képesek rezisztenciát kiváltani az EGFR-inhibitorokkal szemben (31). Hasonlóképpen, a kemoterápiás kezelést követően a TAF sejtek WNT16B-expressziója is megemelkedik, ami a környező prosztataráksejtek NF- $\kappa$ B útvonatának aktiválásához, és ezzel rezisztenciához vezet (32). Ugyanígy, hasnyálmirigy-tumor-sejtekben és daganatokban az interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) szekréciója és az IL-1 receptor asszociált kináz 4 (IRAK4) együttes kifejeződése a TAF-okban gemcitabinrezisztencia kialakulását eredményezi szintén az NF- $\kappa$ B útvonalon keresztül, olyan mértékben, hogy az IRAK4 gátlása a gemcitabinérzékenység helyreállításához vezet (33).

A TAF és tumorsejtek interakcióinak vizsgálatára egy új modellrendszert alakítottunk ki, mely lehetővé teszi, hogy mind *in vitro*, mind *in vivo* vizsgáljuk a stróma összetett működését (28). A korábban ismertetett *Brca1*<sup>-/-</sup>; *p53*<sup>-/-</sup> CST sejtekből lentivirális transzdukcióval piros fluoreszcens fehérjét (mCh) kifejező sejtvonalat hoztunk



3. ÁBRA. A tumor mikrokörnyezetét célzó lehetséges terápiás stratégiák (30)



létre, amit zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) expresszáló FVB egerekbe ültettünk (4.a ábra). Az így létrejövő ortotopikus emlődaganatok mCh-pozitív tumorsejteket és GFP-expresszáló TME-elemeket tartalmaznak, melyeket az állatokban *in vivo* képkalkotással és izolálást követően *in vitro* élősejt-mikroszkópiával lehet vizsgálni (4.b–d ábra). Tekintve, hogy a CST sejtek emlőszövetbe ültetve megtartják érzékenységüket a kemoterápiás kezelésekkel szemben (pl. ciszplatin), így ebben a rendszerben a tumorsejtek és a TME kompartment szerepe is egyszerűen vizsgálható a tumorformáció, a kezelésre adott reakció és a kialakuló rezisztencia szempontjából.

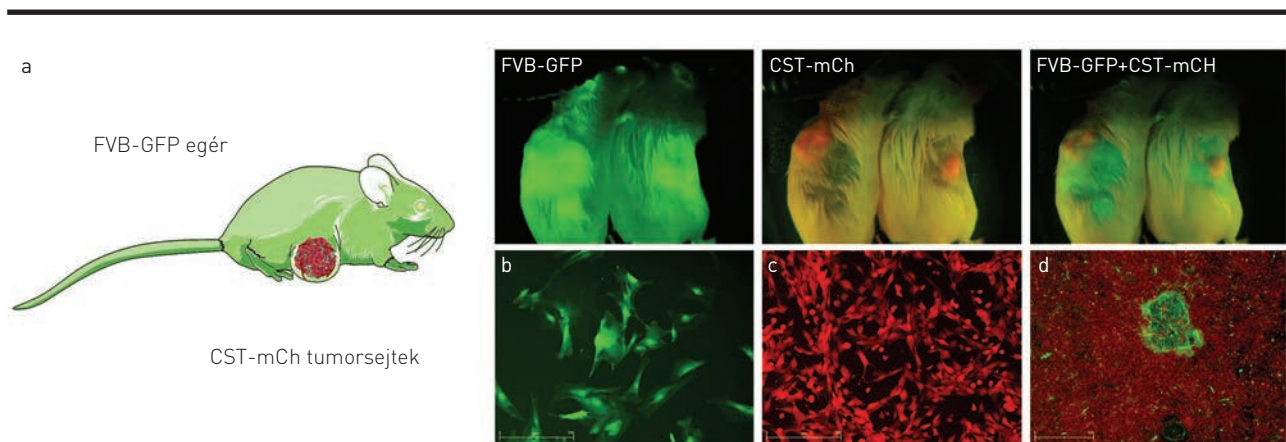
A tumorstróma legnagyobb részét (50–90%-át) a TAF-ok alkotják, ezért ígéretes terápiás célpontok lehetnek a rák kezelésében (34). A Hedgehog útvonal gátlása, a fibroblaszt növekedési faktor receptor (FGFR) és a transzformáló növekedési faktor (TGFB) ellen fejlesztett immunterápia a TAF-ok tumortámogató hatását gyengítik, azonban a legtöbb vegyület terápiás hatásának megerősítése még csak klinikai I. és II. fázisban tart (35, 36).

Az immunterápiák előretörésével a TAF-ok mellett a TME leginkább kutatott komponensévé az immunsejtek váltak. A citotoxikus CD8+ T sejtek (CTL-ek) szerepét a terápiarezisztenciában egyértelműen bizonyítja a tumorok CTL-profilja és neoadjuváns terápiára adott válasza közötti erős korreláció. Az erős limfocita-infiltrációt mutató emlődaganatok esetében a patológiás komplett válaszreakció több mint 40% volt, míg a kimutatható limfocitapopulációt nem tartalmazó tumorok összesen 7%-a mutatott hasonló reakciót taxánvegyületekkel kezelve, ami a CTL-profil független prognosztikai markerként való használatát is lehetővé teszi (37). Kiméra antigénreceptor T-sejtes (CAR-T) terápia során a T-limfociták genetikai átprogramozásával az immunsejtek képesek lesznek a tumorsejtek felismerésére és eliminálására, azonban

a terápia hatékonyságát csökkenti a mikrokörnyezet szolubilis faktorainak hatása (38).

A TME fontos része a helyi érhálózatot kialakító endotélsejtek populációja. A TME több eleme is (mezenhimális őssejtek, TAF sejtek és makrofágok) nagy mennyiségben szekretál érképződést serkentő citokineket (pl. VEGFA), melyek folyamatosan fenntartják az angiogenezist. A tumorok érzettségé általában jelentősen eltér az ép szövetekben megfigyelhetőtől: az erek tágultak, fenesztráltak és gyakrabban ágaznak el, így könnyebben átjárhatóak. Amellett, hogy a lokális keringés szabályozza a tumorsejtekbe és a mikrokörnyezetbe jutó tápanyagok és oxigén szintjét, a metabolikus melléktermékek elszállítását is biztosítja, így közvetlenül hozzájárul a TME pH-egyensúlyának és hipoxiájának szabályozásához. Tekintve, hogy mindkettő jelentős szerepet játszik a kezelésekkel szembeni ellenállás kialakulásában, az érhálózat fontos célpont lehet a rezisztencia leküzdésében. A tumorok sajátos keringésének vizsgálatakor kiderült, hogy gyakori fluktuáció van a véráramlás mértékében is, ami szintén megnehezíti a hatóanyagok célba juttatását (39). Az egyik legrégebb óta alkalmazott antiangiogén terápia a bevacizumab, de a jelenleg is zajló klinikai III. és IV. fázisú vizsgálatok alapján újabb vegyületek bevezetése várható (cediranib, ramucirumab, aflibercept, everolimusz). Az érképzést gátló monoterápiákról azonban hamar bebizonyosodott, hogy a betegek teljes túlélési esélyét nem javítja, viszont kombinált terápiák részeként hatékonyan gátolhatják a tumor növekedését (40).

Az extracelluláris mátrixot (ECM) fehérjerostok (kollagén, hialuronsav, fibrillin, elasztin, fibronektin, laminin) és víz alkotja, amelyek egy komplex, rostalapú hálózatot hoznak létre a sejtek osztódásának, kommunikációjának és adhéziójának támogatására. Az elmúlt hónapokban felfedezték, hogy a tripla-negatív emlődaganatok esetében jelentős különbség mutatkozik a gyógyszerérzékeny és -rezisztens



**4. ÁBRA.** A kutatócsoportunk által létrehozott, kettős fluoreszcencia alapú tumormodell (28). a) GFP-expresszáló FVB egerek (FVB-GFP) emlőszövetébe ültetett mCherryt kifejező tumorsejtek (CST-mCh). A tumorból izolált GFP-pozitív stróma- és mCherry-pozitív tumorsejtek az *in vitro* tenyésztés során külön (b, c) és együtt (d) tenyésztve

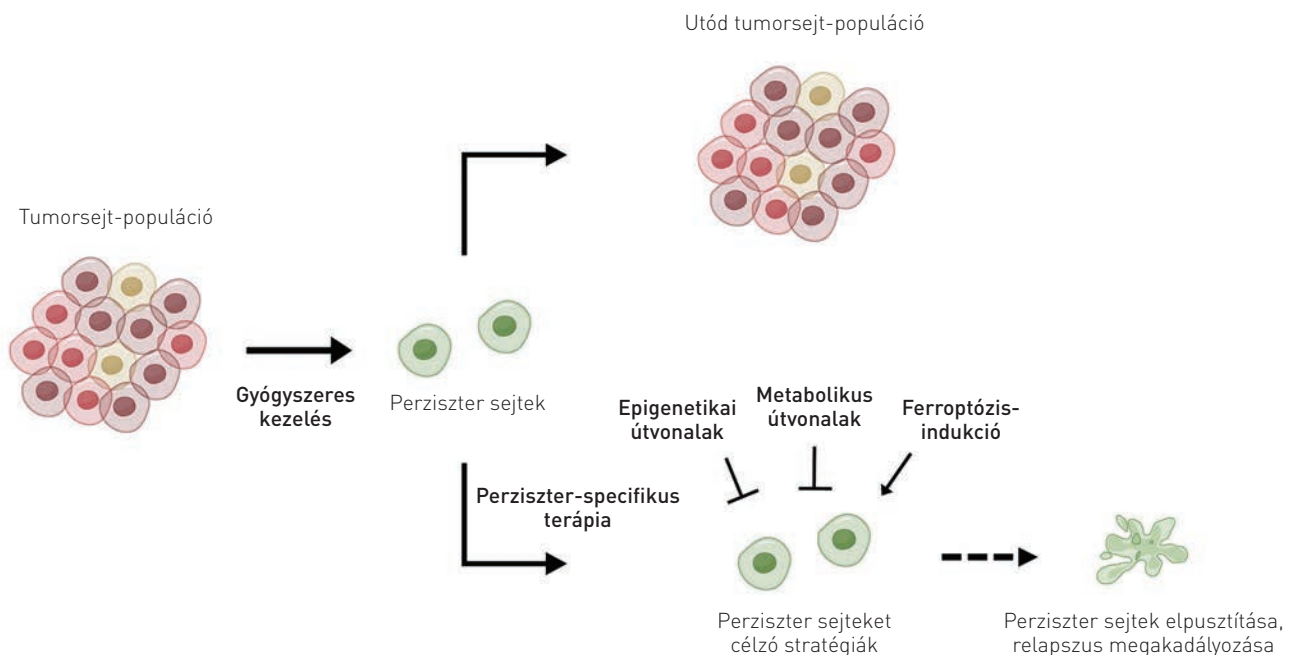
daganatok ECM-ének merevségében. A szenzitív tumorok körül „kemény”, míg a rezisztensek esetében „puha” ECM volt kimutatható biofizikai módszerekkel, ami jelentősen befolyásolta a kemoterápiával, az ionizáló sugárzással és sejthalálligandumokkal (TRAIL) szembeni érzékenységet [41]. A tumorsejtek interakciója a „kemény” ECM-mel a proapoptotikus JNK útvonal aktivitásához és azon keresztül a kezelésekkal szembeni érzékenységhez vezetett, míg a „puha” mátrixszal való kölcsönhatás az NF- $\kappa$ B jelpálya túlműködését és így rezisztenciát váltott ki. Az NF- $\kappa$ B gátlása még a „puha” ECM környezetben is helyreállította a daganatok gyógyszerérzékenységét. Az ECM makromolekuláinak lebontása segítheti a vegyületek hatékony penetrálását. Eiknes és munkatársai egér xenograft modellekben kimutatták, hogy az ECM elemeit bontó kollagenáz/hialuronidáz enzim és liposzomális doxorubicin együttes kezelésével a tumorsejtek hatékonyabban vették fel a gyógyszermolekulákat, mint az enzim nélkül [42].

### A KEMOTERÁPIÁT TÚLÉLŐ PERZISZTER SEJTEK, MINT ÚJ CÉLPONT

Az elmúlt évtized új, izgalmas felfedezése volt az ún. gyógyszerteroleráns perziszter sejtek jelentőségének felismerése a relabáló daganatokban [43]. A perziszter állapot során alig vagy egyáltalán nincs sejtosztódás, azonban a hatóanyag megvonását követően ezek a sejtek újra osztódnak indulnak és a repopuláló sejtek ismét érzékennyé válnak a gyógyszeres kezelésre [44].

A terület egyik legjelentősebb tanulmányában azokat a nem kissejtes tüdőrákban (NSCLC) szenvedő betegeket vizsgálták, akik először jól reagáltak az epidermális növekedési faktor receptor tirozinkináz-gátlókkal (EGFR TKI) történő kezelésére, de egy idő után mégis rezisztenciát mutattak a terápiával szemben, azonban egy hosszabb, kezelésmentes időszak („drug holiday”) elteltével a daganatuk ismét érzékennyé vált az EGFR-TKI vegyületekre. Miközben az EGFR-TKI-ra adott választ modellezték egy NSCLC-sejtvonalon (PC9), azt tapasztalták, hogy míg a toxikus dózissal 100-szor nagyobb kezelési koncentráció a sejtek túlnyomó részét elpusztította, addig a sejtek kis hányada képes volt túlélni a kezelést. Ez a jelenség más, eltérő kezelések (pl. ciszplatín) esetében is megfigyelhető volt. Felfedezték, hogy ezek a sejtek megváltozott kromatinállapotot mutatnak, ehhez pedig hiszton-demetiláz RBP2/KDM5A/Jarid1A, valamint IGF-1 receptor szignalizációra van szükségük. PC9 sejteken EGFR-TKI jelenlétében 4 különböző hiszton-deacetiláz- (HDAC) inhibitor (TSA, SAHA, MS-275 és Scriptaid), valamint egy IGF-1-receptorkináz szelektív inhibitor (AEW541) is megakadályozta, hogy a perziszter sejtek túléljék a kombinált kezeléseket [44].

Vinogradova és munkatársai a hiszton-lizin metilációs útvonalak jelentőségét tárták fel a perziszter állapot fenntartásában. Felfedezték, hogy a hiszton-demetilázok KDM5-családja szükséges a gyógyszerteroleráns perziszter sejtek túléléséhez, ezzel lehetőséget adva a perziszter sejtek célzott elpusztítására. A KDM5 a H3 hiszton demetilációját



5. ÁBRA. A gyógyszerteroleráns perziszter sejtek elpusztítására irányuló terápiai lehetőségek

katalizálja a 4-es lizinen (H3K4), így egy saját fejlesztésű KDM5A-gátlószerral (CPI-455) meg tudták növelni a H3K4-trimetiláció szintjét (H3K4me3), ezáltal csökkentve a perziszter sejtek számát több sejtes modellben is [45].

Eltérő megközelítés a perziszter sejtek farmakológiailag kihasználható gyengeségeinek felderítéséhez a széles körű hatóanyagszűrések végzése terápiatoleráns sejtpopulációkon. Lapatinibtoleráns perziszter emlőtumorsejtek érzékenységét vizsgálva több specifikus gátlószere kimutatták, hogy ezek kifejezetten érzékenyek a lipidperoxidációra. Feltárták, hogy a perziszter sejtek túléléséhez glutation-peroxidáz 4 (GPX4) szükséges, és annak gátlása ferroptózishoz – a sejtihalál egy oxidatív formájához – vezet. Bizonyítható volt, hogy ez a stratégia nemcsak emlőtumor-, de melanóma-, tüdő- és petefészekrák perziszter sejteken is működik [46].

Ehhez hasonlóan egy másik tanulmány is rámutatott a glutation-anyagcserével kapcsolatos útvonalak fontosságára perziszter melanómasejtekben. Olyan, *BRAF*- (V600E) mutáns, perziszter melanómasejteket találtak, amelyek annak ellenére, hogy jelen van bennük az érzékenyítő mutáció, toleránsak a *BRAF*/MEK inhibitorokkal szemben. Kiderült, hogy ezek a sejtek megváltozott metabolizmussal rendelkeznek, glikolízisről oxidatív légzésre váltanak, amihez peroxisomális zsírsav-B-oxidáció (FAO) szükséges. Az egyik legfontosabb peroxisomális FAO enzim, az acil-CoA-oxidáz 1 (ACOX1) kiütése, valamint a peroxisomális FAO-inhibitor tiordazinnal történő kezelés specifikusan elnyomta a perziszter sejtek oxidatív légzését és szignifikánsan csökkentette azok megjelenését [47].

A perziszter sejtek megismerése ugyan még csak most zajlik, de már látható a túlélési stratégiák változatossága és összetettsége. Számos mechanizmus hozzájárul fennmaradásukhoz, azonban ezek feltárása komoly lehetőségeket tartogat a tumorrezisztencia és a relapszus megelőzésére [5. ábra].

## HATÓANYAG-KOMBINÁCIÓKKAL A GYÓGYSZER-REZISZTENCIA ELLEN

Nagy érdeklődés övezte a NOTCH-aktivációt gátló kismolekulák fejlesztését, amikor felfedezték, hogy a T-sejtes akut limfoid leukémia (T-ALL) sejtek gyakran hordozzák azt a mutációt, amely folyamatosan aktivált állapotban tartja ezt az útvonalat, ezzel fokozva a sejtosztódást és a védelmet bizonyos terápiákkal szemben. A  $\gamma$ -szekretáz-inhibitorok (GSI) hatékonyan gátolják a NOTCH receptor aktiválását, azonban klinikai kipróbálásuk gyorsan bebizonyította, hogy ezekkel a vegyületekkel csak átmeneti eredmények érhetőek el, hatékonyságukat jelentősen befolyásolja a velük szemben kialakuló rezisztencia, amit egy olyan sejtpopuláció jelenléte idéz elő, ami még a NOTCH-jelpálya hiányában is képes osztódni. Mivel ez a fenotípus reverzibilisnek bizonyult, felmerült, hogy a sejtek epigenetikai módosításokon keresztül válnak érzéketlenné a GSI-terápiára, amit egy géniütés-alapú szűrés bizonyított: a rezisztens sejtek túlélése a kromatinszerkezet módosításáért felelős bromodomént tartalmazó protein 4 (BRD4) túlműködésén alapult, ami epigenetikai változta-

tásokon keresztül aktiválta a proliferációért felelős *MYC* és antiapoptotikus *BCL2* géneket. Amennyiben a BRD4 funkcióját specifikus gátlószerral (JQ1) akadályozták, a GSI-rezisztencia csökkent, a terápiatoleráns sejteket el lehetett pusztítani és a GSI+JQ1 kombinált stratégia alkalmazása jelentős túlélésbeli különbséget eredményezett betegek tumormintáiból létrehozott állatmodellekben [48].

CML-ben szenvedő betegek az ABL1-tirozinkináz-gátlók (TKI) állandó használatára szorulnak, mert a leukémia-összejtek egy TKI-toleráns szubpopulációja folyamatosan újratermeli a betegséget fenntartó, tirozinkináz fokozottan kifejező blaszt-sejteket. A TKI-toleráns sejtek részletes vizsgálata feltárta, hogy ezek nagy mennyiségben fejezik ki az ún. integrin-kapcsolt kináz (ILK) fehérjét, ami jelentősen visszazabályozza a mitokondriumok oxidatív metabolizmusát, ezzel rezisztenciát kialakítva a TKI vegyületekkel szemben. Kimutatták, hogy az ILK genetikai vagy farmakológiai gátlása a TKI használatával kombinálva segít eliminálni a TKI-toleráns leukémia-összejteket és drasztikusan megnöveli a túlélés hosszát [49].

Emlőráksejtvonalak taxán- és antraciklinkezelését követően figyelték meg, hogy kialakul egy korábban nem detektálható, CD44 sejtfelszíni fehérjét erősen kifejező szubpopuláció, amelyre jellemző volt a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (G6PD) enzim által vezényelt emelkedett glükózfelvitel és az ehhez kapcsolódó, megváltozott glükózmetabolizmus. Ezt kihasználva a hagyományos kemoterápiás vegyületeket megfelelő sorrendben adva (taxán, majd antraciklin) és a terápiát egy G6PD-gátlószerral kombinálva a kezelés hatékonysága nagyságrendekkel növelhető volt *in vitro* és *in vivo* körülmények között is [50].

Csoportunk limfómás állatonkológiai esetek vizsgálata során figyelte meg, hogy a hagyományos kemoterápiás protokoll szerint kezelt kutyák tumorsejtjeiben folyamatosan emelkedik a Pgp kifejeződésének szintje és ezzel fordítva arányosan csökken a kezelés hatékonysága. Azonban, meglepő módon, a kezelésben bekövetkező váratlan 30 napos szünet nemcsak megállította a növekvő tendenciát, de vissza is fordította azt, csökkentve a Pgp funkciójának mértékét és ezzel időben kitolva a rezisztencia megjelenését. Ahhoz, hogy feltárjuk, vajon ez a csökkenés gyógyszer-kombinációkkal is kiváltható-e, a hagyományos kemoterápiát különböző, állat- és humán onkológiai kezelésekből használt epigenetikai és COX-2-inhibitorokkal egészítettük ki és egy *in vitro* szűrőrendszerben vizsgáltuk a rezisztencia megjelenésének idejét. Meglepő módon a COX-2-gátló celecoxib doxorubicinnal együtt alkalmazva minimum 100 napig teljesen meggátolta a Pgp-mediált rezisztencia kialakulását [51]. Jelenleg ez a terápiás megközelítésünk klinikai kipróbálás alatt van, biztató kezdeti eredményekkel.

## FEJLETT GYÓGYSZERHORDOZÓ RENDSZEREK A GYÓGYSZERREZISZTENS DAGANATOK ELLEN

A nano-gyógyszerhordozók első képviselői a liposzómába csomagolt hatóanyagok voltak. Először 1995-ben engedélyezték klinikumban is alkalmazható nano-formulációt, a pegilált



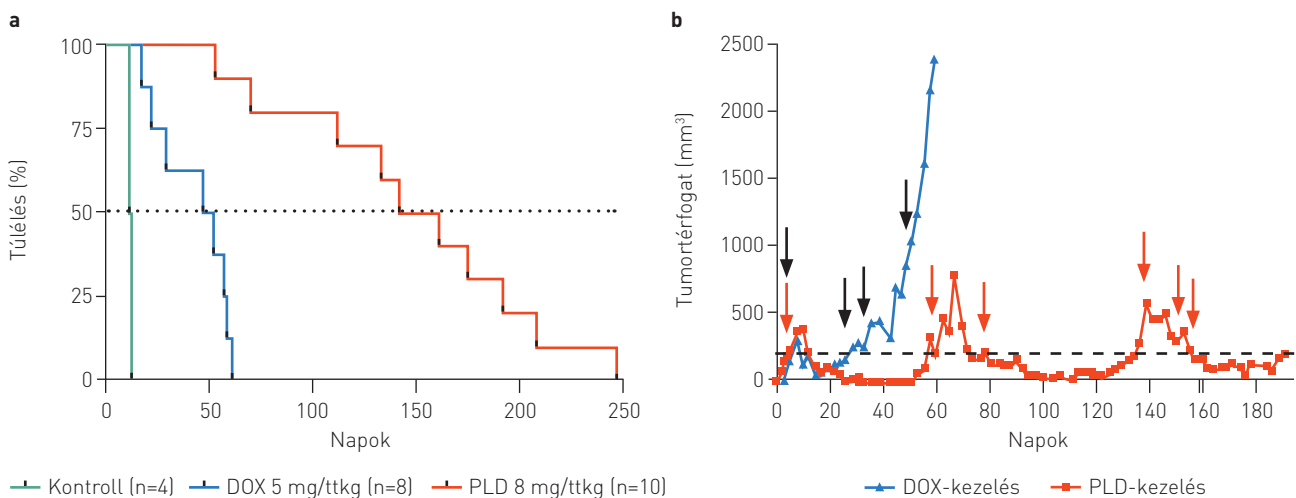
liposzomális doxorubicint (PLD) [52]. A PLD kifejlesztését 3 fő cél motiválta: csökkenteni kívánták a doxorubicin (DOX) közismerten magas kardiotoxicitását, meghosszabbítani a hatóanyag keringésben töltött idejét és indirekt módon növelni a tumor és egészséges szövetek közti DOX-koncentráció-megoszlást. Napjainkra a liposzómába csomagolt kemoterapeutikumok széles skálája érhető el, mint DaunoXome, Marqibo, Mepact vagy Onivyde [53].

Kutatócsoportunk kimutatta, hogy a DOX-rezisztens sejtek *in vitro* és *in vivo* körülmények között is keresztrezisztensek a PLD-vel szemben, a Pgp-t kifejező sejtvonalak akár 10 000-szer nagyobb koncentrációt elviselnek, mint a parentális párjaik [25]. Ennek ellenére a DOX-kezeléssel szemben a PLD meglepően hatékony volt a genetikailag módosított, *Brca1*<sup>-/-</sup>; *p53*<sup>-/-</sup> emlődaganatot hordozó egérmodell esetében, mind a relapszusmentes, mind a teljes túlélés tekintetében (6. ábra). Tekintve, hogy a Pgp-pozitív sejtekből létrehozott tumorok magas rezisztenciát mutattak a DOX- és PLD-kezeléssel szemben is, a megnövekedett túlélés a Pgp-mediált gyógyszer-rezisztencia késleltetett megjelenésével, illetve a PLD magasabb toxicitásával volt magyarázható. Bizonyítottuk, hogy a PLD-kezelés nagyobb tumorális doxorubicinkoncentrációt biztosít, amit csak jelentősen megemelkedett Pgp-szintek képesek kompenzálni. A megnövekedett keringési idő, intratumorális koncentráció és a rezisztencia megjelenésének kitolódása 6-szor magasabb relapszusmentes és 3-szor hosszabb teljes túlélést eredményezett a konvencionális DOX-kezeléshez képest [25].

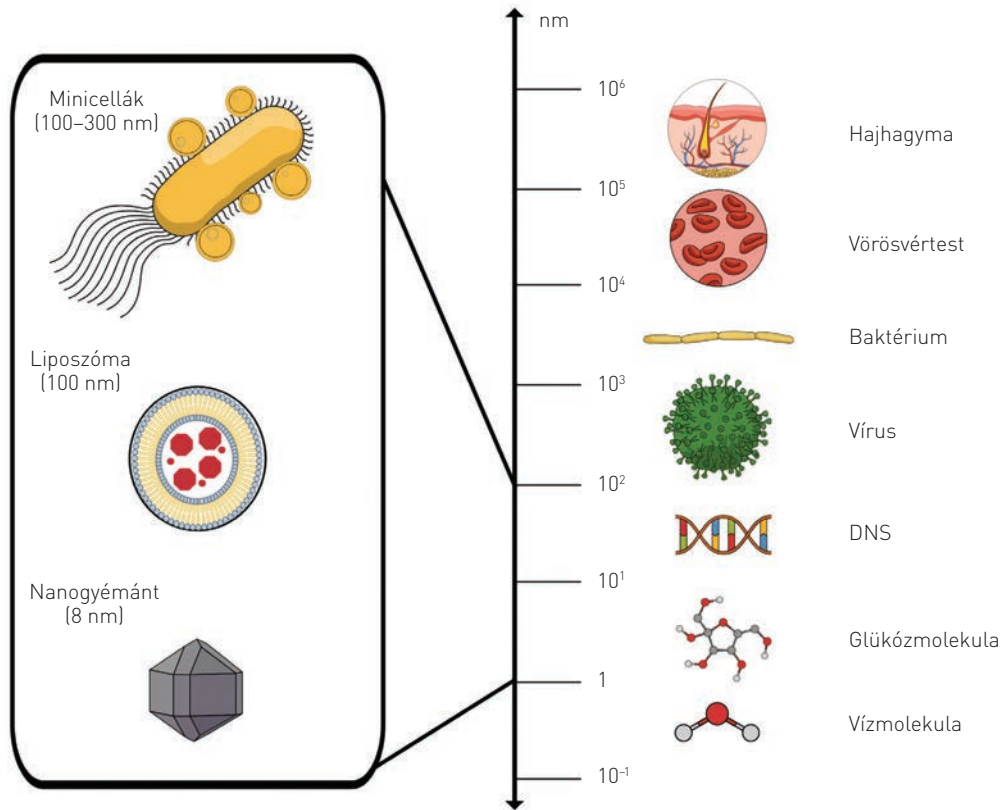
A proapoptotikus rezveratrol (Res) és a mikrotubulugátló paklitaxel együttes célba juttatása egy közös pegilált

liposzómában jelentős tumorelles hatást váltott ki a külön beadott vegyületekkel szemben, ami nemcsak a paklitaxel-szenzitív MCF7, de a rezisztens MCF7/ADR sejtekből képzett daganatok esetében is megfigyelhető volt. A megnövekedett hatékonyság a Res által kiváltott proapoptotikus szignálokkal magyarázható, ami a paklitaxellel szinergizált, anélkül, hogy a szisztémás terápia toxicitása jelentősen növekedett volna [54]. Hasonló módon, egy másik tanulmány kimutatta, hogy a mikrotubulusstabilizáló vinkrisztin és az antiproliferatív polifenol kvercetin közös liposzómába csomagolva szinergikus kombinációt alkotnak. A két hatóanyag 2:1-es (vinkrisztin/kvercetin) aránya erős szinergizmust mutatott a hormon- és trasztuzumabérzéketlen JIMT-1 sejtekben mind *in vitro*, mind *in vivo* körülmények között. A xenograft tumorokon végzett vizsgálatok bebizonyították, hogy a 60 napos vizsgálati periódus alatt csak a liposzómába együtt csomagolt vinkrisztin-kvercetin készítmény okozott jelentős tumortérfogat-csökkenést [55].

A nano-gyógyszerhordozó rendszerek egyik újabb különleges csoportját az úgynevezett nanogyémántok (nanodiamond, ND) alkotják. Ezek a 8 nm-nél kisebb szénrészecskék számos egyedülálló tulajdonsággal rendelkeznek, beleértve a nagyfokú biokompatibilitást, toxicitás hiányát és a biomolekulák irányába mutatott nagy affinitást [56]. Az ND-eket a 2010-es évek eleje óta használják különféle gyógyszerek célba juttatásához, úgy, mint doxorubicin, purvalanol A, tamoxifen, dexametazon vagy inzulin [57]. A gyógyszerrezisztens tumorsejtekkel szemben történő alkalmazásuk azonban csak az utóbbi évek eredménye. Chan és kollégái olyan nanogyémántokat készítettek, melyek felszínéhez két célzó ligandumot, a mitokondriális lokalizációs szekvenciát



**6. ÁBRA.** A PLD hatékonyabb, mint a DOX az emlődaganat egyik klinikailag releváns állatmodelljében. a) A teljes túlélés ábrázolása DOX (5 mg/ttkg iv.) és PLD (8 mg/ttkg iv.) kezelt állatcsoportokban. b) Reprezentatív ábra a DOX- és PLD-kezelt tumorok növekedési kinetikájáról. A fekete (DOX) és piros (PLD) nyilak a kezelések időpontjait mutatják [25]



7. ÁBRA. A gyakran alkalmazott nano-gyógyszerhordozó rendszerek mérete ismert biológiai struktúrákhoz hasonlítva

és folsavat egyidejűleg csatoltak, majd ezekhez az ND-khez sikeresen a DOX-ot is kikötötték. Az így létrehozott nanohordozó a vegyületet célzottan tumorsejtek mitokondriumába szállítva indukál apoptózist. Az ND-k hatását DOX-szenzitív és -rezisztens MCF-7 sejteken vizsgálva rájöttek, hogy a rezisztens MCF-7 sejtek esetében jelentősen megnőtt a DOX felvétele, amely a Pgp általi rezisztencia megkerülésére utal. Azt is megállapították, hogy ekvimoláris DOX-koncentráció esetén az ND hatásosabb volt, mint a szabad molekula [56].

Egy teljesen eltérő technológia a hatóanyagok bejuttatására a baktériumokból származtatott minicellák használata. Ezek a 100–300 nm átmérőjű, nem élő, nem osztódó részecskék a normális baktériumok osztódásában szerepet játszó *MinC* és *MinD* gének mutációjának eredményeként jönnek létre. A minicellák az eredeti baktériumsejtekhez hasonlóan peptidoglikánt, riboszómákat, fehérjét, RNS-t és plazmidokat is tartalmaznak, de hiányzik belőlük a kromoszomális DNS. A rájuk jellemző nagyfokú biokompatibilitás, a csökkent immunogenitás és toxicitás, valamint a megnövekedett gyógyszerterhelési kapacitás teszi a minicellákat az egyik legalkalmasabb gyógyszerhordozó eszközzé [58]. Ebből fakadóan a felhasználásnak egyik területe a kemoterápiás szerek becsomagolása és tumorsejtekbe juttatása. A minicellák

felszínét daganatsejtek membránján található sejt felszíni receptorokat felismerő bispecifikus antitestekkel megjelölve, azok célzott endocitózissal a sejtekbe juttathatók, ennek köszönhetően a hatóanyag csak intracellulárisan szabadul fel. Ezzel a megközelítéssel emlőtumor-xenograftokon demonstrálható volt, hogy az EGF-receptor-specifikus peptiddel konjugált minicellák a doxorubicint a pegilált liposzómás doxorubicinhez képest százszoros hatékonysággal juttatták a sejtekbe [59]. A nanohordozók méretbeli különbségeit a 7. ábra mutatja be.

A minicellákat sikerrel alkalmazták Pgp-t kifejező, gyógyszerrezisztens sejtek és daganatok ellen is. EGFR-specifikus antitesttel irányítva, egymás után két minicellát juttattak a tumorokba: az első si- vagy shRNS-eket kódoló plazmidokat tartalmazott, amelyek célzottan csendesítették a gyógyszer-rezisztenciát okozó Pgp fehérje expresszióját, míg a második minicella citotoxikus vegyületeket bejuttatva pusztította el a korábban rezisztens tumorokat. A MES-SA/Dx5 rezisztens sejtvonalból létrehozott daganatokban a Pgp kiütése nagymértékben segítette a DOX-szal feltöltött specifikus minicellák általi terápia sikerességét, sőt Pgp hiányában a nem specifikus (EGFR-antitestet nem hordozó) DOX-minicellák is hatásosak voltak [60].

## ÖSSZEFOGLALÁS

A gyógyszer-rezisztencia egy komplex folyamat, ami akár több eltérő mechanizmus együttműködésének eredményeként is kialakulhat. A klinikai onkológia egyik legjelentősebb kihívása a rezisztenciához vezető mechanizmusok megismerése és gátlása. Számos bonyolult strukturális (érhálózat, extracelluláris mátrix szerkezet), celluláris (perziszter sejtek, tumorheterogenitás) és molekuláris (effluxtranszporterek, DNS-hibajavítás, gyógyszer-metabolizáló enzimek) mechanizmus képes a tumorok és tumorsejtek védelmét ellátni a terápia alatt. Megfelelő *in vitro* és *in vivo* modellek használatával e bonyolult mechanizmusokat nemcsak megért-hetjük, de olyan stratégiákat is kidolgozhatunk, amelyekkel

a rezisztens sejtek leküzdhetők. Kutatócsoportunk a hazai és nemzetközi törekvésekhez csatlakozva több olyan kísérleti terápia fejlesztésén és tesztelésén dolgozik, amely a jövőben hozzájárulhat a gyógyszerrezisztens daganatok hatékonyabb ellátásához.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők szeretnék megköszönni a kézirat végleges formájának kialakításához nyújtott segítséget Dr. Szabó Katalinnak (University of Cambridge), Dr. Szeder Bálintnak (University of Dundee), Dr. Póti Ádámnak (Természettudományi Kutatóközpont) és Dr. Cserepes Mihálynak (Országos Onkológiai Intézet).

## IRODALOM

1. Arnold M, Rutherford MJ, Bardot A, et al. Progress in cancer survival, mortality, and incidence in seven high-income countries 1995-2014 (ICBP SURVMARK-2): a population-based study. *Lancet Oncol* 20:1493-1505, 2019
2. Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol* 205:275-292, 2005
3. Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med* 53:615-627, 2002
4. Fiedler EC, Hemann MT. Aiding and abetting: How the tumor micro-environment protects cancer from chemotherapy. *Annu Rev Cancer Biol* 3:409-428, 2019
5. Boumahdi S, de Sauvage FJ. The great escape: tumour cell plasticity in resistance to targeted therapy. *Nat Rev Drug Discov* 19:39-56, 2020
6. Noll EM, Eisen C, Stenzinger A, et al. CYP3A5 mediates basal and acquired therapy resistance in different subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Med* 22:278-287, 2016
7. Helleday T, Petermann E, Lundin C, et al. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 8:193-204, 2008
8. Kuroda J, Puthalakath H, Cragg MS, et al. Bim and Bad mediate imatinib-induced killing of Bcr/Abl+ leukemic cells, and resistance due to their loss is overcome by a BH3 mimetic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:14907-14912, 2006
9. Shah MA, Schwartz GK. Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 7:2168-2181, 2001
10. Motwani M, Delohery TM, Schwartz GK. Sequential dependent enhancement of caspase activation and apoptosis by flavopiridol on paclitaxel-treated human gastric and breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 5:1876-1883, 1999
11. Sugimoto Y, Tsukahara S, Oh-hara T, et al. Decreased expression of DNA topoisomerase I in camptothecin-resistant tumor cell lines as determined by a monoclonal antibody. *Cancer Res* 50:6925-6930, 1990
12. Eijdemans EW, de Haas M, Timmerman AJ, et al. Reduced topoisomerase II activity in multidrug-resistant human non-small cell lung cancer cell lines. *Br J Cancer* 71:40-47, 1995
13. Christie EL, Pattnaik S, Beach J, et al. Multiple ABCB1 transcriptional fusions in drug resistant high-grade serous ovarian and breast cancer. *Nat Commun* 10:1295, 2019
14. Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, et al. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 5:219-234, 2006
15. Füredi A, Tóth Sz, Hámosi L, et al. Állatmodellek szerepe a multidrog-rezisztens tumorokat célzó kemoterápia fejlesztésében. *Magy Onkol* 59:338-345, 2015
16. Biedler JL, Riehm H. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res* 30:1174-1184, 1970
17. Szakács G, Annereau JP, Lababidi S, et al. Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells. *Cancer Cell* 6:129-137, 2004
18. Füredi A, Tóth S, Szabó K, et al. Identification and validation of compounds selectively killing resistant cancer: delineating cell line-specific effects from P-glycoprotein-induced toxicity. *Mol Cancer Ther* 16:45-56, 2017
19. Cserepes M, Türk D, Tóth S, et al. Unshielding multidrug resistant cancer through selective iron depletion of P-glycoprotein-expressing cells. *Cancer Res* 80:663-674, 2020
20. Sakai W, Swisher EM, Karlan BY, et al. Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature* 451:1116-1120, 2008
21. Ray Chaudhuri A, Callen E, Ding X, et al. Replication fork stability confers chemoresistance in BRCA-deficient cells. *Nature* 535:382-387, 2016
22. Wojtaszek JL, Chatterjee N, Najeeb J, et al. A small molecule targeting mutagenic translesion synthesis improves chemotherapy. *Cell* 178:152-159, 2019
23. Veeck J, Ropero S, Setien F, et al. BRCA1 CpG island hypermethylation predicts sensitivity to poly(adenosine diphosphate)-ribose polymerase inhibitors. *J Clin Oncol* 28:e563-e564, 2010
24. Ter Brugge P, Kristel P, van der Burg E, et al. Mechanisms of therapy resistance in patient-derived xenograft models of BRCA1-deficient breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 108:djw148, 2016
25. Füredi A, Szabó K, Tóth S, et al. Pegylated liposomal formulation of doxorubicin overcomes drug resistance in a genetically engineered mouse model of breast cancer. *J Control Release* 261:287-296, 2017
26. Liu X, Holstege H, van der Gulden H, et al. Somatic loss of Brca1 and p53 in mice induces mammary tumors with features of human BRCA1-mutated basal-like breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:12111-12116, 2007
27. Rottenberg S, Jaspers JE, Kersbergen A, et al. High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:17079-17084, 2008
28. Hámosi L, Kudlik G, Szabó K, et al. Establishment and characterization of a Brca1(-/-), p53(-/-) mouse mammary tumor cell line. *Int J Mol Sci* 21:1185, 2020
29. Lau AN, Heiden MG. Metabolism in the tumor microenvironment. *Annu Rev Cancer Biol* 4:17-40, 2020
30. Roma-Rodrigues C, Mendes R, Baptista PV, Fernandes AR. Targeting tumor microenvironment for cancer therapy. *Int J Mol Sci* 20:840, 2019
31. Luraghi P, Reato G, Cipriano E, et al. MET signaling in colon cancer stem-like cells blunts the therapeutic response to EGFR inhibitors. *Cancer Res* 74:1857-1869, 2014
32. Sun Y, Campisi J, Higano C, et al. Treatment-induced damage to the tumor microenvironment promotes prostate cancer therapy resistance through WNT16B. *Nat Med* 18:1359-1368, 2012
33. Zhang D, Li L, Jiang H, et al. Tumor-stroma IL1beta-IRAK4 feedforward circuitry drives tumor fibrosis, chemoresistance, and poor prognosis in pancreatic cancer. *Cancer Res* 78:1700-1712, 2018
34. Louault K, Bonneaud TL, Seveno C, et al. Interactions between cancer-associated fibroblasts and tumor cells promote MCL-1 dependency in estrogen receptor-positive breast cancers. *Oncogene* 38:3261-3273, 2019
35. Wang Y, Liu J, Ma X, et al. Real-time imaging of senescence in tumors with DNA damage. *Sci Rep* 9:2102, 2019
36. Zhang HR, Wang XD, Yang X, et al. An FGFR inhibitor converts the tumor promoting effect of TGF-beta by the induction of fibroblast-associated genes of hepatoma cells. *Oncogene* 36:3831-3841, 2017

37. Denkert C, Loibl S, Noske A, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 28:105–113, 2010
38. Chen PH, Lipschitz M, Weirather JL, et al. Activation of CAR and non-CAR T cells within the tumor microenvironment following CAR T cell therapy. *JCI Insight* 5:e134612, 2020
39. Durand RE. Intermittent blood flow in solid tumours--an under-appreciated source of 'drug resistance'. *Cancer Metastasis Rev* 20:57–61, 2001
40. Tewari KS, Burger RA, Enserro D, et al. Final overall survival of a randomized trial of bevacizumab for primary treatment of ovarian cancer. *J Clin Oncol* 37:2317–2328, 2019
41. Drain AP, Zahir N, Northey JJ, et al. Matrix compliance permits NF- $\kappa$ pB activation to drive therapy resistance in breast cancer. *J Exp Med* 218:e20191360, 2021
42. Eikenes L, Tari M, Tufto I, et al. Hyaluronidase induces a transcapillary pressure gradient and improves the distribution and uptake of liposomal doxorubicin (Caelyx) in human osteosarcoma xenografts. *Br J Cancer* 93:81–88, 2005
43. Ramirez M, Rajaram S, Steininger RJ, et al. Diverse drug-resistance mechanisms can emerge from drug-tolerant cancer persister cells. *Nat Commun* 7:10690, 2016
44. Sharma SV, Lee DY, Li B, et al. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell* 141:69–80, 2010
45. Vinogradova M, Gehling VS, Gustafson A, et al. An inhibitor of KDM5 demethylases reduces survival of drug-tolerant cancer cells. *Nat Chem Biol* 12:531–538, 2016
46. Hangauer MJ, Viswanathan VS, Ryan MJ, et al. Drug-tolerant persister cancer cells are vulnerable to GPX4 inhibition. *Nature* 551:247–250, 2017
47. Shen S, Faouzi S, Souquere S, et al. Melanoma persister cells are tolerant to BRAF/MEK inhibitors via ACOX1-mediated fatty acid oxidation. *Cell Rep* 33:108421, 2020
48. Knoechel B, Roderick JE, Williamson KE, et al. An epigenetic mechanism of resistance to targeted therapy in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 46:364–370, 2014
49. Rothe K, Babaian A, Nakamichi N, et al. Integrin-linked kinase mediates therapeutic resistance of quiescent CML stem cells to tyrosine kinase inhibitors. *Cell Stem Cell* 27:110–124, 2020
50. Goldman A, Khiste S, Freinkman E, et al. Targeting tumor phenotypic plasticity and metabolic remodeling in adaptive cross-drug tolerance. *Sci Signal* 12: eaas8779, 2019
51. Karai E, Szabó K, Windt T, et al. Celecoxib prevents doxorubicin-induced multidrug resistance in canine and mouse lymphoma cell lines. *Cancers (Basel)* 12:1117, 2020
52. Barenholz Y. Doxil(R)--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J Control Release* 160:117–134, 2012
53. Anselmo AC, Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic: An update. *Bioeng Transl Med* 4:e10143, 2019
54. Meng J, Guo F, Xu H, et al. Combination therapy using co-encapsulated resveratrol and paclitaxel in liposomes for drug resistance reversal in breast cancer cells in vivo. *Sci Rep* 6:22390, 2016
55. Wong MY, Chiu GN. Liposome formulation of co-encapsulated vincristine and quercetin enhanced antitumor activity in a trastuzumab-insensitive breast tumor xenograft model. *Nanomedicine* 7:834–840, 2011
56. Chan MS, Liu LS, Leung HM, et al. Cancer-cell-specific mitochondria-targeted drug delivery by dual-ligand-functionalized nanodiamonds circumvent drug resistance. *ACS Appl Mater Interfaces* 9:11780–11789, 2017
57. Zhu Y, Li J, Li W, et al. The biocompatibility of nanodiamonds and their application in drug delivery systems. *Theranostics* 2:302–312, 2012
58. Ali MK, Liu Q, Liang K, et al. Bacteria-derived minicells for cancer therapy. *Cancer Lett* 491:11–21, 2020
59. MacDiarmid JA, Mugridge NB, Weiss JC, et al. Bacterially derived 400 nm particles for encapsulation and cancer cell targeting of chemotherapeutics. *Cancer Cell* 11:431–445, 2007
60. MacDiarmid JA, Amaro-Mugridge NB, Madrid-Weiss J, et al. Sequential treatment of drug-resistant tumors with targeted minicells containing siRNA or a cytotoxic drug. *Nat Biotechnol* 27:643–651, 2009