

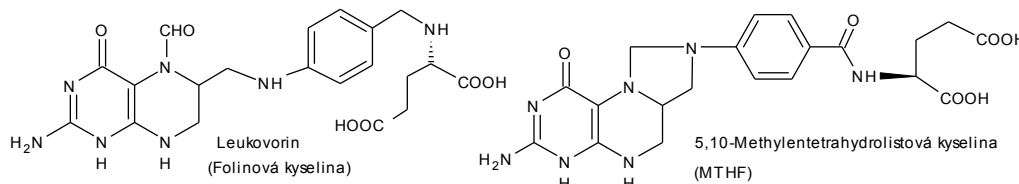
Protinádorová léčiva III – doplňkové a cílené léky

Doplňkové léky

Antidota a detoxikující látky pro antineoplastickou léčbu

Velká většina dosud zmiňovaných protinádorových léčiv působí nejen na nádorové buňky, ale i na normální tkáňové buňky. Obavy z poškození organismu toxickými účinky často nedovolují, aby cytostatika byla používána v potřebných vysokých dávkách. To snižuje účinnost terapie.

Antidotum **leukovorin**, kyselina folinová (formyltetrahydrolistová) je přirozeným metabolitem s vysokou afinitou k životně důležitému enzymu dihydrofolátreduktase. Při léčení vysokými dávkami methotrexátu nebo jiných analog kyseliny listové dochází k zablokování tohoto enzymu a tím vlastně i k otravě organismu. Podání leukovorinu za určitou dobu po methotrexátu kompetitivní inhibicí enzymu zruší a tím umožní zotavení pacienta. Je podáván ve formě vápenaté soli.



Leukovorin je zařazen do ATC skupiny V03AB mezi prostředky proti otravám drogami, kyanidy, těžkými kovy, organofosfáty atd., současně však bývá zaříděn i do skupiny V03AF Detoxikující látky pro antineoplastickou léčbu. Leukovorin má dvě asymetrická centra – jedno na zbytku kyseliny glutamové, druhé na tetrahydropteridinovém systému. Běžné preparáty obsahují racemát, v poslední době se však objevil na trhu léčiv i levoleukovorin (Fusilev, Spectrum Pharmaceuticals) s 6-(S)-konfigurací. Jak již bylo zmíněno, leukovorin potencuje účinek 5-fluoruracilu, v této široce využívané kombinaci však nepůsobí jako antidotum. Účinný přítom není samotný leukovorin, ale produkt jeho enzymatické přeměny, **5,10-methylenetetrahydrolistová kyselina** (MTHF). Enzym glukarpidasa detoxikující methotrexát byl již zmíněn (Farm-Chem10)

Chemoprotektivní látky

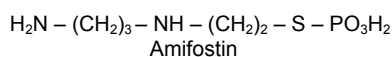
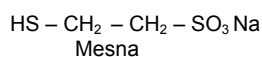
Klasická cytostatika většinou poškozují buňky, které se v organismu rychle množí. To jsou především nádorové buňky, ale i některé normální buňky, např. buňky kostní dřeně, krvinky a další krevní buňky, dále buňky sliznic, vlasové kořínky apod. Cytostatická léčba nemusí narušovat růst normálních buněk trvale, po vysazení cytostatik se mnohé funkce normálních tkání mohou obnovit. Vedlejší účinky chemoterapie však vždy snižují kvalitu pacientova života. Některé negativní účinky lze zmírnit volbou vhodného režimu léčby (např. nefrotoxicitu Pt cytostatik přisunem tekutin) nebo **podáváním detoxikujících a chemoprotektivních látek**.

Tyto látky se však musí podávat opatrně a s rozmyslem, protože mohou (podobně jako leukovorin při léčbě antifoláty) účinek cytostatik zcela eliminovat.

K potlačení toxického účinku některých cytostatik na nervovou tkáň, ledviny a močové orgány se používají **sloučeniny síry**.

Alkylující látky a platinová cytostatika přechází v organismu na meziproducty s elektronovým deficitem, které pak reagují s nukleofilními skupinami biopolymerů, např. N⁷ guaninu v molekule DNA. Tím brzdí proliferaci nádorových buněk, podobně však může být poškozena i DNA v některých zdravých tkáních. Nukleofilní thiolové sloučeniny mohou meziproducty s elektronovým deficitem inaktivovat. Velmi účinný je thiosíran sodný, ten ale neproniká do buněk. Je-li podán do krevního oběhu, pak může cytostatika zneškodnit ještě předtím, než se dostanou na místo svého účinku v nádorové buňce. Používá je proto jen výjimečně. Přirozenou ochranou látkou organismu je tripeptid **glutathion**, γ -glutamyl-cysteinyl-glycin. Platinová cytostatika mohou glutathion vázat, takže při léčbě jeho koncentrace v buňkách klesá na minimum. Glutathion ale také neprochází přes buněčnou membránu, což omezuje použití syntetického tripeptidu k doplnění jeho hladiny při detoxikaci organismu.

K ochraně buněk výstelky močového ústrojí před urotoxickým účinkem akroleinu, který v organismu vzniká z oxazafosforinových cytostatik, byla vyvinuta **mesna**, sodná sůl 2-merkaptoethan-sulfonové kyseliny (Uromitexan, Baxter).



Poměrně novým sírným chemoprotektantem je **amifostin**, S-2-[(3-aminopropyl)-amino]-ethan-thiol dihydrogenfosfát (Ethyol, Schering-Plough), který byl uveden do terapeutické praxe teprve počátkem roku 1996. Amifostin je prekurzorem aktivního produktu s thiolovou skupinou, který může vázat a zneškodňovat různá cytostatika nebo jejich toxické produkty (radikály).

Amifostin je vysoce polární fosforečný ester. Nemůže proto pronikat přes buněčné membrány. Naproti tomu thiolový derivát, který vzniká z amifostinu působením alkalické fosfatasy, se do buněk může dostávat poměrně snadno. Alkalická fosfatasa je ve větších koncentracích obsažena v bohatě prokrvených zdravých tkáních. V nádorové tkáni, v níž se nové cévy teprve vytváří, je její obsah jen malý. Aktivní forma amifostinu proto vzniká hlavně v normálních tkáních, kde pak je koncentrace thiolu až 100x vyšší než v nádorové tkáni. Cytostatika tak mohou buňky nádorové tkáně napadat, zatímco jejich účinek na normální tkáň je eliminován interakcemi s thiolem. Podobným mechanismem má amifostin chránit normální tkáň i před účinkem kyslíkatých radikálů vznikajících v organismu při radioterapii. Účinnost amifostinu je však sporná. V USA byl amifostin schválen zrychleným postupem, doplňkové testování však jeho příznivé účinky nepotvrdilo, takže povolení k prodeji bylo zrušeno.

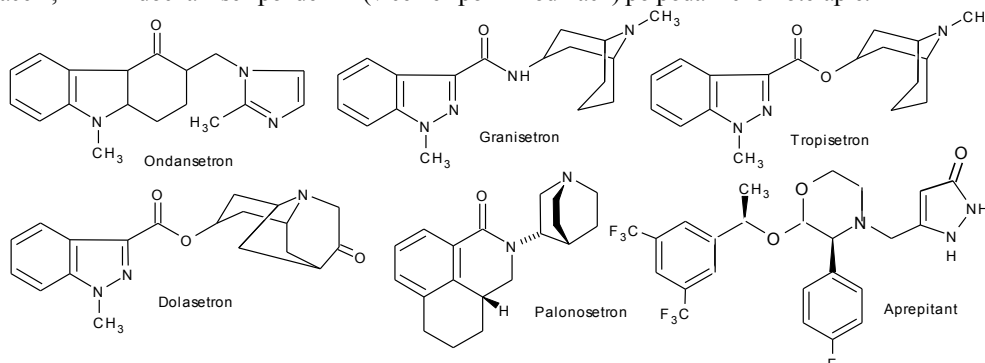
Po podání anthracyklinových antibiotik, jako je doxorubicin, vznikají v organismu reaktivní kyslíkaté radikály, které poškozují lipidy buněčných i mitochondriálních membrán. Ve většině tkání mohou radikály vznikající po podání anthracyklinů zneškodnit antioxidantně působící enzymy. V srdeční tkáni je však hladina těchto enzymů malá. Anthracyklinová antibiotika jsou proto kardiotoxická.

K potlačení kardiotoxicity mohou být použity „lapače“ („zametače“) radikálů. Těmi jsou výše zmíněné sírné deriváty nebo N-acetylcystein, které volné radikály redukuje. Mezi lapače volných radikálů dále patří tanniny, α -tokoferol (vitamin E), karnitin, flavonoidy (např. kvercetin) a řada dalších látek. K omezení kardiotoxického účinku kyslíkatých radikálů lze však zvolit i jiný přístup – zabránit vzniku radikálů místo jejich zneškodňování. Na vzniku radikálů se podílejí ionty Fe^{3+} vytvářející komplexy s anthracykliny. Při redukcí Fe^{3+} na Fe^{2+} přitom vznikají semichinonové radikály, které pak s kyslíkem poskytují kyslíkaté radikály. Některá **chelátotvorná činidla** mohou ionty železa vázat pevněji než anthracykliny a tím vznik kyslíkatých radikálů potlačovat. Z řady zkoušených látek se osvědčil **dextrazoxan**, pravotočivý enantiomer 1,2-bis-(3,5-dioxopiperazinyl)-propanu. Je profarmakem, cheláty Fe^{3+} tvoří až propylendiaminotetraoctová kyselina, která z něj v organismu vzniká. Při klinickém zkoušení se ukázalo, že chrání organismus před kardiotoxickým účinkem doxorubicinu, aniž by přitom snižoval jeho protinádorovou účinnost.

Potlačování nevolnosti, zvracení a nechutenství.

Nepříznivou komplikací chemoterapie, ale i radioterapie, bývá nevolnost a zvracení. To sice život pacienta neohrožuje, vede však ke zhoršení fyzického stavu spojeného s nutričními problémy a dehydratací. Přitom se zhoršuje i pacientův psychický stav. K potlačení se používají léky proti zvracení, **antiemetika**.

U silně emetogenních cytostatik, mezi něž patří např. cisplatina a dakarbazin, bylo potlačování nevolnosti do počátku 90. let 20. století téměř neřešitelným problémem. Klasická antiemetika, jako např. metoklopramid, bylo třeba podávat ve velmi vysokých dávkách, kdy se již projevovaly jejich nežádoucí účinky. Obrat přinesla až nová antiemetika vyvinutá v 80. letech, která působí jako antagonisté serotoninu (5-hydroxytryptaminu, 5-HT), který má významnou roli při aktivaci emetogenního centra organismu v prodloužené míše. Cytostatika, ale i záření, zvyšují jeho sekreci. Látky blokující serotoninové receptory (5-HT₃ receptory) mohou přenos emetogenních impulsů narušit a tím potlačit nevolnost a zvracení provázející chemoterapii. Z antagonistů 5-HT₃ receptorů se používají **ondansetron**, 1,2,3,9-tetrahydro-9-methyl-3-[(2-methyl-1H-imidazol-1-yl)-methyl]-4H-karbazol-4-on, **granisetron**, *endo*-1-methyl-N-(9-methyl-9-azabicyklo[3.3.1]non-3-yl)-1H-indazol-3-karboxamid, **tropisetron**, 8-methyl-8-azabicyklo[3.3.1]okt-3-yl) ester *endo*-1-H-indol-3-karboxylové kyseliny a **dolasetron**, *endo*-hexahydro-8-(3-indolylkarboxyloxy)-2,6-methano-2H-chinolin-3(4H)-on. Posledním přírůstkem do rodiny antiemetik používaných v onkologii je od r. 2008 **palonosetron**, derivát isochinolinonu. Palonosetron je neúčinnějším antiemetikem potlačujícím nevolnost a zvracení, k nimž dochází se zpožděním (více než po 24 hodinách) po podání chemoterapie.



Jinou skupinu antiemetik tvoří antagonisté receptoru pro neurokinin 1 (NK1R, také označovaný jako receptor pro tachykinin 1 nebo receptor pro substanci P), který patří mezi receptory spřažené s G-proteinem. Jeho antagonisté mají antidepresivní, anxiolytický a antiemetický účinek. Prvním léčivem z této skupiny se stal **aprepitant** (Emend, Merck), který byl vyvinut jako prostředek pro prevenci zvracení vyvolanému chemoterapií. Orální forma aprepitantu byla povolena v r. 2003, v r. 2008 bylo schváleno používání jeho profarmaka **fosaprepitantu** (Emend Injection, Ivemend), dobře rozpustného derivátu s navázaným zbytkem kyseliny fosforečné, který může být podáván injekčně. Z dalších antiemetik této skupiny je firmou GlaxoSmithKline vyvíjen **kasopitant** (Rezonic, Zunrisa) a **vestipitant**. Firma GSK v r. 2008 podala žádost o registraci kasopitantu, v r. 2009 ji ale sama stáhla s tím, že bude zapotřebí další posouzení bezpečnosti léčiva.

Nevolnost a zvracení mohou mít za následek nechutenství a nedostatečný příjem potravy, k nimž se někdy může přidat pocit pacienta, že vyživuje nádor a tím přispívá k urychlení průběhu onemocnění. Výsledkem pak je anorexie nebo dokonce celková ochablost – kachexie.

V závažných případech se nedostatečná přirozená výživa řeší podáním tekuté potravy do žaludku přes nos (nasogastrickou sondou) nebo parenterálním podáním (infuzí umělé výživy). V méně závažných případech se medikamentózně povzbuzuje chuť k jídlu podáváním **gestagenů** (medroxyprogesteron acetát a megestrol acetát) zmíněných v kapitole o endokrinních přípravcích. Podobné účinky mají i některé kanabinoidy (**nabinol** a **dronabinol**) z marihuany a jejich syntetická analoga.

Bisfosfonáty

Častým průvodním zjevem nádorového onemocnění jsou **kostní metastázy**. Kromě léčiv, které potlačují růst primárního nádoru se v paliativní terapii metastázujících onemocnění používají **bisfosfonáty**, léčiva primárně určená k léčbě osteoporózy. Bisfosfonáty jsou C-substituované deriváty methylenbisfosfonové kyseliny obecného vzorce $H_2O_3P-CR^1R^2-PO_3H_2$:

Generace	Generický název	R ¹	R ²	Komerční název	Výrobce
1.	klodronát	-Cl	-Cl	Bonefos	Schering
	etidronát	-OH	-CH ₃	Didronel	Procter & Gamble
2.	pamidronát	-OH	-CH ₂ CH ₂ NH ₂	Aredia	Novartis
	alendronát	-OH	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂	Fosamax	Merck & Co.
	ibandronát	-OH	-CH ₂ CH ₂ N(CH ₃)(n-C ₅ H ₁₁)	Boniva, Bondronat	Roche
	tiludronát	-OH	p-Cl-C ₆ H ₄ -S-	Skelid	Sanofi
3.	risendronát	-OH	(3-pyridyl)-methyl-	Actonel	Procter & Gamble
	zolendronát	-OH	(1-imidazolyl)-methyl-	Zometa	Novartis

Na základě poznatků o schopnosti anorganických difosforečnanů (pyrofosfátů) silně se vázat na hydroxyapatit (fosforečnan vápenatý) a inhibovat jeho rozpouštění *in vitro* byl zkoumán účinek difosforečnanu na hydroxyapatitovou složku kostí. Účinek se však *in vivo* neprojevil, protože difosforečnan byl v organismu rychle rozštěpen enzymem fosfatasou. To vedlo ke zkoušení účinku analog, které by nebyly fosfatasou štěpeny. Byly tak vyzkoušeny deriváty methylenbisfosfonové kyseliny, které byly původně připraveny při vývoji prášků na praní. Ukázalo se, že tyto látky mohou skutečně interagovat s hydroxyapatitem v kostech a tím chránit mikrostrukturu kostí a zvyšovat jejich mechanickou odolnost. Při podrobnějším zkoumání účinku bylo zjištěno, že bisfosfonáty inhibují jeden druh kostních buněk, osteoklasty. Kostní tkáň je v organismu neustále přebudována. Osteoklasty se podílejí na odbourávání kostí tím, že sekretují ionty H₃O⁺ a současně i proteolytické enzymy; další kostní buňky, osteoblasty a osteocyty kosti vytvářejí. Za fyziologického stavu je mezi vznikem a odbouráním kostní tkáně rovnováha. Při vzniku kostních metastáz je tato rovnováha narušena, převládá destrukce kostí (osteolýza). Kostí pak ztrácí mechanickou pevnost a snadno se lámou. Tím, že bisfosfonáty osteolýzu brzdí, pomáhají většímu narušení kostí předcházet. Vedle toho mají bisfosfonáty i analgetický účinek (tlumí silné bolesti, které kostní metastázy vyvolávají), blokují vznik nových cév zásobujících nádorovou tkáň, inhibují farnesylyaci produktu onkogenu *ras* a mohou snad vyvolávat i buněčnou smrt nádorových buněk. Přes poměrně malé rozdíly ve struktuře se bisfosfonáty značně liší svým účinkem. Bisfosfonáty druhé generace jsou nejméně o dva řády účinnější než bisfosfonáty 1. generace, třetí generace má účinnost ještě o řád vyšší. V onkologii se aplikují nejčastěji ve formě infuze, při léčbě osteoporózy je dávana přednost perorálnímu podání.

Ostatní doplňkové léky

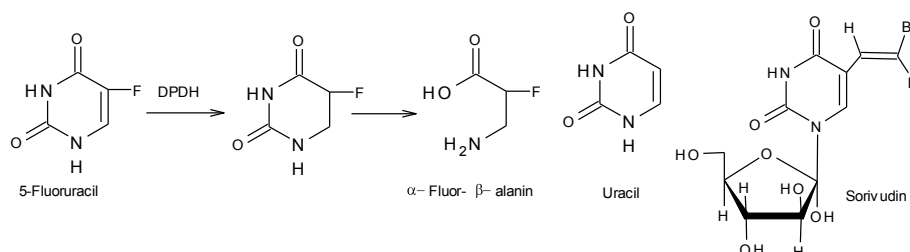
Komplikace spojené s nádorovým onemocněním pomáhají potlačovat také některé další doplňkové léky.

Nádorová onemocnění některých orgánů jsou provázána silnou bolestí. Jak již bylo zmíněno, k **potlačení bolesti** při vzniku kostních metastáz mohou být použity výše zmíněné bisfosfonáty. Ty se mohou kombinovat s dalšími léky na potlačení bolesti. Běžná analgetika nemusí při silných bolestech stačit a lékaři proto musí někdy sáhnout k podávání silných návykových analgetik, jako jsou opioidy nebo nově zkoušené kanabinoidy. Častým závažným vedlejším účinkem protinádorové léčby je narušení krvetvorby a tím i **snížení imunitní obrany organismu**. K obnovení krvetvorby a funkci imunitního systému se jako doplňkové léky používají hemopoietické růstové faktory, které byly zmíněny mezi cytokiny. Samotné růstové faktory a antianemika nemohou však zabránit všem infekcím, které snadno mohou napadat organismus pacienta, jehož imunitní systém je oslabený onemocněním i některými chemoterapeutiky. K potlačení infekcí se proto často používají různá antiinfektiva (antivirotika, antibiotika, antimykotika). Údaje o všech používaných doplňkových léčivech by však byly dosti obsáhlé a šly by nad rámec této kapitoly.

Překonávání rezistence nádorových buněk

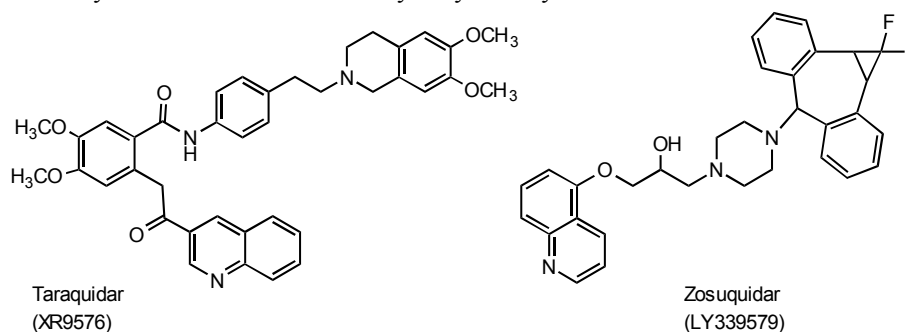
Jedním z problémů chemoterapie je **rezistence nádorových buněk** vůči používaným cytostatikům. Příčinou vzniku rezistence je více, obecnou příčinou je rychlá metabolická inaktivace cytostatik.

Protinádorový antimetabolit 5-fluoruracil nepůsobí na všechny pacienty stejně. Příčinou jsou rozdíly v aktivitě dihydropyrimidindehydrogenasy (DPD). Ta katalyzuje redukci 5-fluoruracilu na 4,5-dihydro-5-fluoruracil, který se nakonec rozloží na α -fluor- β -alanin. Při zvýšení aktivity DPD ztrácí 5-fluoruracil svoji účinnost, pro pacienty s deficiencí degradačního enzymu může být 5-fluoruracil příliš toxický. Metabolickou inaktivaci 5-fluoruracilu potlačuje přírodný substrát DPD uracil, účinným inhibitorem DPD je např. anitivirotikum **sorivudin**, (E)-5-(2-bromvinyl)-1 β -D-arabinofuranosyluracil.



Specifickou příčinou rezistence nádorových buněk vůči protinádorovým léčivům je nadměrná exprese **glykoproteinu P** (P-gp), který transportuje léčiva ven z nádorové buňky i proti koncentračnímu gradientu. P-gp nepůsobí specificky, ale může čerpat ven z buňky cytostatika s odlišnou strukturou a mechanismem účinku. Je tedy příčinou tzv. „mnohočetné“ rezistence (multidrug resistance, MDR), která se projevuje ztrátou účinnosti několika různých cytostatik.

Překonat rezistenci bakterií vůči antibiotikům typu penicilinů a cefalosporinů se do značné míry daří současným podáváním antibiotika a inhibitoru β -laktamasy, enzymu, který antibiotika inaktivuje štěpením β -laktamového kruhu. Podobné pokusy o překonání rezistence nádorových buněk vůči cytostatikům inhibicí P-gp ale přinášely v minulosti spíše zklamání. Pak se ale ukázalo, že některá léčiva, např. cyklický oligopeptid **cyklosporin A** (používaný při transplantacích k překonání odmítnutí transplantovaného orgánu příjemcem) nebo **verapamil** (blokátor vápníkového kanálu používaný k léčení onemocnění srdce), mohou aktivní transport cytostatik ven z buňky brzdit. Jejich širšímu využití v protinádorové léčbě sice bránily jejich vlastní účinky, ale poznání, že je možné mnohočetnou rezistenci na nádorová léčiva překonat, znamenalo zahájení vývoje inhibitorů P-gp. Inhibitory P-gp druhé generace, jako **PSC-833** (analog cyklosporinu) nebo **birikodar**, byly v tomto směru vhodnější. Jejich aplikaci ale brzdily nevýhodné farmakokinetické vlastnosti, ovlivnění metabolismu cytostatik prostřednictvím jejich interakcí s cytochromem P450 3A4 a malá specifická – inhibitory blokovaly i další transportní proteiny. Úspěch by však mohly přinést inhibitory P-gp třetí generace (**tarakvidar**, **zosukvidar**, **lanikvidar**, **elakvidar** a další), které se v současné době klinicky zkouší v kombinaci s některými cytostatiky



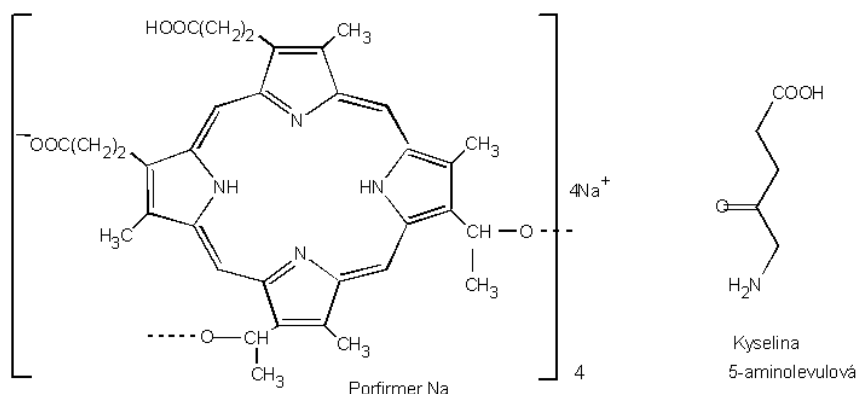
Selektivní fyzikálně-chemická protinádorová terapie

Fotodynamická terapie

Před zhruba 20 lety vzbuzovala značnou pozornost jako nový způsob léčby nádorů tzv. fotodynamická terapie (FDT). Ukázalo se, že některé fotosenzibilizující látky se koncentrují v nádorových buňkách a zůstávají v nich déle než v buňkách normálních. Molekuly fotosenzibilizátoru po ozáření světlem o vhodné vlnové délce reagují s kyslíkem za vzniku singletového kyslíku a volných radikálů. Ty ničí buňky ozáření tkáň, zatímco buňky neozáření tkáň a/nebo buňky, do nichž fotosenzibilizátor nepronikl, poškozovány nejsou. Zásah je proto vysoce selektivní. Předchozí způsob léčby chemoterapií nebo radioterapií použitím FDT nevyklučuje, stejně jako po léčbě FDT může být nasazen jiný způsob terapie.

Možnosti fotodynamické terapie jsou však omezeny na nádory na povrchu těla nebo tělních dutin, které lze ozářit. Zdrojem světla jsou speciální lasery, jimiž lze nádorovou tkáň ozařovat přímo nebo pomocí světlovodů zavedených do tělní dutiny. Světlo ale proniká jen do malé hloubky nádorové tkáně, zejména pigmentovaných melanomů. Další nevýhodou FDT je poměrně dlouho přetrvávající fotosenzitizace způsobená určitou, i když menší absorpcí fotosenzibilizátoru v buňkách zdravé pokožky. Fotosenzitizace omezuje frekvenci terapeutických zásahů a nedovoluje ošetřenému pacientovi, aby se po určitou dobu vystavoval slunečnímu záření. Fotosenzibilizátor se aplikuje 48-96 hodin před ozářením, poškozená tkáň se zahojí do 8 týdnů po ozářením. Povrchové nádory, na něž lze aplikovat FDT, jsou však většinou snadno přístupné i pro chirurgický zásah, kterému dávají onkologové přednost. Z těchto důvodů se FDT v onkologické léčbě významněji neuplatnila, přestože u kožních nádorů někdy mívá lepší kosmetický efekt.

Prvním povoleným fotosenzibilizátorem byl derivát hematoporfyrinu, **porfirmer**, (Photofrin, Photobarr). Následovala **kyselina 5-aminolevulová** (ALA), prekurzor porfyrinů, a také její estery (methylester – Metvix, n-hexylester – Hetvix). ALA a její estery se používají v dermatologii k léčbě prekanceróz, hlavně se však uplatnily v diagnostice. Po podání ALA se v nádorové tkáni zvýší obsah porfyrinů, které při ozářením fluoreskují a tím nádor prozradí. Fotosenzibilizátory 2. generace aktivuje světlo delších vlnových délek, které do nádoru proniká hlouběji. Jsou to jednak další deriváty porfyrinů, např. meso-tetra(4-sulfofenyl)porfyrin, **TPPS4** nebo i jiné planární kovové komplexy (chlorin s porfyrinovým skeletem odvozeným od chlorofylu nebo bakteriochlorofylu resp. i deriváty ftalocyaninu). Použití TPPS4 nebylo povoleno pro údajnou neurotoxicitu, lékaři z Karlovy university však ukázali, že chromatograficky vyčištěný produkt neurotoxicitkou není. Aplikace tohoto senzibilizátoru byly v ČR poměrně intenzivně studovány, přípravek však byl povolen pouze pro použití ve veterinárním lékařství. Z dalších fotosenzibilizátorů byl klinicky odzkoušen a v EU povolen ještě m-tetrahydroxyfenylchlorin, **temoporfin** (léčba nádorů hlavy a krku), v Rusku byl povolen hydroxyhlinitý komplex sulfonovaného ftalocyaninu. Ani tyto senzibilizátory 2. generace se však v protinádorové léčbě výrazněji neuplatnily. Úspěšnější byl pouze derivát benzoporfyrinu, **verteporfin** (Visudyne), který však není určen pro protinádorovou léčbu, ale pro oční lékařství – fotodynamickou léčbu tzv. „vlhké“ formy věkem podmíněné makulární degenerace, což je onemocnění očí vyvolané nadměrnou tvorbou nových cévek v sítnici, krvácením a zjizvením sítnice, které vede k oslepnutí.



Borová neutronová záchyťová terapie

Jedním ze způsobů selektivní terapie nádorových onemocnění je vedle již zmíněné fotodynamické terapie tzv. **borová neutronová záchyťová terapie** (boron neutron capture therapy, BNCT).

BNCT se využívá při léčbě glioblastomu multiforme, agresivního nádoru mozku se špatnou prognózou, zkouší se v terapii zhoubného melanomu a nádorů jater. K léčbě glioblastomu byl k dispozici jen chirurgický zákrok nebo radioterapie. Tyto zásahy byly však rizikové a šance na vyléčení malá. Buňky glioblastomu mohou kumulovat sloučeniny boru. Po aplikaci sloučeniny obsahující izotop ¹⁰B, jako je **4-boronofenylalanin** nebo **sodná sůl merkaptododekaborátu** a následném ozářením nádoru filtrovaným svazkem neutronů, zachytí atomy boru neutrony. Přitom vznikne excitovaná forma izotopu ¹¹B, která se rozpadá na lithium a částici α. Ta má vysokou energii, ale jen velmi malý dolet (5-9 μm). Ničí proto jen buňky obsahující sloučeninu boru. Díky tradici výzkumu a výroby sloučenin boru v Ústavu anorganické chemie AV ČR v Řeži patří ČR mezi několik málo zemí na světě, kde tato metoda může být aplikována. Komericializací výsledků ÚACh AV ČR se zabývá česká firma Katchem, která se stala předním světovým dodavatelem sloučenin boru pro BNCT. Předností borové neutronové záchyťové terapie je poměrně krátká doba léčení – celá terapie vyžaduje jen 3 dny hospitalizace a jedno 30minutové ozářením, zatímco konvenční radioterapie až 30 ozářením a pobyt v nemocnici trvající asi 5 týdnů. Po léčbě přežívá po 5 letech od léčby 58% pacientů, zatímco u pacientů léčených jiným způsobem to bylo pouze 1%. Nevýhodou však je omezená dostupnost zdroje neutronů – reaktoru nebo lineárního urychlovače, v němž neutrony vznikají ostřelováním Li nebo Be protony.

Cílená protinádorová terapie – nízkomolekulární léčiva

V druhé polovině minulého století se chemoterapie přiřadila k chirurgickým zásahům a radioterapii jako jeden ze základních způsobů léčby rakoviny. Byly objeveny nové účinné protinádorové léky a byly nalezeny způsoby, jak tyto léky nejlépe aplikovat a jak potlačit jejich nežádoucí toxicitu. Přes nesporné úspěchy klasické chemoterapie se však od 90. let minulého století dostává stále více do popředí její omezení. Počet nových cytostatik s osvědčenými mechanismy účinku sice ještě roste, ale hlavním směrem výzkumu a vývoje se stalo využití nových poznatků o molekulárně biologických rozdílech mezi nádorovými a normálními buňkami ke zvýšení selektivity a účinnosti nových léčiv.

Základní charakteristikou nádorových buněk je rychlý růst a nekontrolované množení. Protinádorové léky byly nazvány cytostatika, protože růst a množení buněk potlačují. Dosavadní léky působí především na rychle rostoucí nádorové buňky, ale jak bylo zmíněno výše, brání do jisté míry i růstu a množení i některých tkáňových buněk. Z toho vyplývají nežádoucí vedlejší účinky dosavadních cytostatik. K selektivnímu zásahu proti nádorům pouhé rozdíly v rychlosti růstu buněk nestačí.

Výzkum nových léčiv se proto zaměřil na hledání možností jejich zacílení pouze na nádorové buňky. Zvyšovat selektivitu protinádorové léčby umožnil zejména prudký rozvoj poznání příčin vzniku nádorů založený na poznacích molekulární biologie a genetiky. Zrodil se pojem **cílené terapie** (targeted therapy). Cílená terapie někdy je – hlavně v médiích – považována za bezpečný protiklad chemoterapie.

Při cílené terapii jsou využívány různé nízkomolekulární látky, ale ve stále rostoucí míře se však při ní uplatňují různé protilátky a oligonukleotidy. Někdy se proto hovoří o tzv. **biologické terapii** (viz Farm12).

Obecně platí, že přínosy cílené nebo biologické terapie pro protinádorovou léčbu jsou velké, ani na tuto skupinu léčiv však nelze nahlížet zcela nekriticky.

Nová „cílená“ nebo „biologická“ léčiva („biofarmaka“) jsou sice podstatně selektivnější než klasická cytostatika, **zcela selektivní však nejsou** a stále mají řadu nežádoucích vedlejších účinků. Problémem je zejména možnost poškození funkce srdce a cévního systému, což je např. problémem u inhibitorů angiogeneze. Jiná cílená léčiva narušují svými vedlejšími účinky činnost jater, vyvolávají poruchy v zažívacím traktu, svědění a další nežádoucí kožní projevy.

Antiangienní terapie

Významnou skupinu cílených léčiv představují **antiangienní látky**, které blokují vznik nových cév zásobujících nádory krví. Inhibitory angiogeneze nádor neeliminují, ale zamezí, aby byl vyživován. Nádor se pak zmenšuje a může být snáze likvidován imunitním systémem organismu, popř. radioterapií nebo chemoterapií. Antiangienní léčiva se proto často používají v kombinaci s cytostatiky.

Rostoucí nádorové buňky potřebují dostatek kyslíku a živin. Jakmile nádor naroste, přestává být zásobování nádorových buněk dostačující. Na nedostatek kyslíku reaguje buňka tvorbou hypoxií indukovaných faktorů, zejména HIF-1. Ten pak stimuluje expresi některých genů, což zajišťuje adaptaci buněk na dané podmínky. Výsledkem je mimo jiné zvýšená tvorba vaskulárního endoteliálního růstového faktoru, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). VEGF sekretovaný hypoxickými buňkami pak spouští angiogenesi, tj. předává signál buňkám cévní výstelky k tomu, aby z nich vyrostly nové krevní kapiláry, které pak zajistí zásobování nádoru živinami i kyslíkem.



Antiangienní léčiva mohou účinek HIF-1, VEGF, fibroblastových (FGF) a podobných růstových faktorů podporujících angiogenesi různým způsobem blokovat.

Jejich výhodou je, že efektivní terapie zacílená na cévy v nádoru může být jednotná u různých druhů rakoviny, protože všechny cévy vyživující nádory jsou u všech typů pevných nádorů v podstatě stejné. Další výhodou je, že podat léčivo do cév je podstatně snazší, než zajistit, aby z cév proniklo do nádorových buněk. Antiangienní léčiva by také neměla být příčinou vzniku rezistence nádorových buněk, která často vede k neúspěchu léčby konvenčními cytostatiky.

Na druhé straně mohou ale antiangiogenní látky blokovat vznik nových cév i tam, kde je jejich vznik žádoucí. Jejich podání je proto vyloučeno v těhotenství, kdy se tvoří nové cévy rostoucího embrya. Mohou však negativně působit i na dospělý organismus, např. zvyšovat riziko embolie tvorbou krevních sraženin nebo mohou brzdit hojení ran. Pro léčbu některých kardiovaskulárních onemocnění jsou dokonce vyvíjeny některé angiogenní látky, které naopak vznik nových cév podporují.

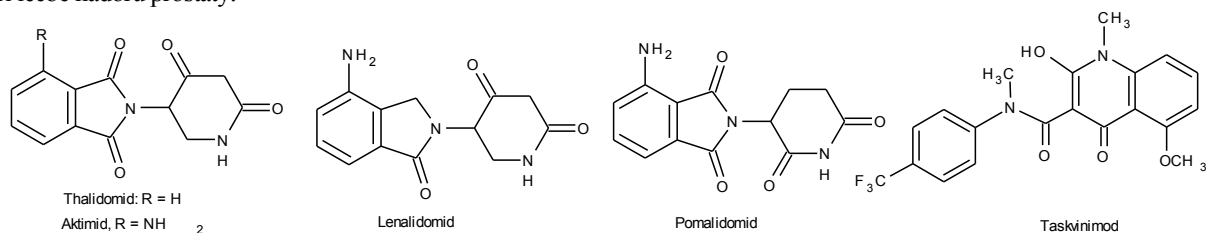
Angiogenesi inhibuje celá řada bílkovin, peptidů i nízkomolekulárních látek.

Přirozené inhibitory angiogenese byly izolovány z krevních destiček nebo z chrupavek. Největší pozornost vzbudily proteiny **angiostatin** a **endostatin**, po jejichž kombinovaném podání došlo u myši k vymizení i poměrně velkých nádorů. Klinické zkoušky u lidí ale tyto výsledky nepotvrdily. V Číně byl v r. 2005 do protinádorové terapie nemalobuněčných nádorů plic zaveden **endostar**, rekombinantní lidský endostatin doplněný o sekvenci 9 aminokyselin, který je produkován bakteriemi *Escherichia coli* s pozměněným genomem. Endostar je podáván v kombinaci s jinými protinádorovými léky. Přirozené antiangiogenní látky měly být údajně obsaženy ve žraločích chrupavkách, v nichž se nevyskytují žádné cévy. Extrakty žraločích chrupavek se proto staly populárním protinádorovým lékem, výsledky jejich klinických zkoušek u pacientů s pokročilým nádorovým onemocněním plic, prostaty a prsu však jejich protinádorovou účinnost nepotvrdily.

Z praktického hlediska bylo významné zjištění, že antiangiogenní účinky má celá řada přirozených i syntetických nízkomolekulárních látek. Z přirozených látek to je plíseňový metabolit **fumagilin** a jeho polosyntetický derivát **TNP-470** (dříve AGM-1470), zatím nejúčinnější nízkomolekulární inhibitor angiogenese, který však je v potřebné dávce neurotoxický, další plíseňový metabolit **eponemycin**, antibiotika **minocyklin** a **neomycin**, **kombretastatiny A-1** a **A-4** izolované z kůry africké keřovité vrby *Combretum caffrum* (Zuluové používali extrakt kůry jako šipový jed), **skvalamin**, metabolit estradiolu **2-methoxyestradiol**, jed hada ploskolebce **kontortrostatin** a řada dalších.

Ze syntetických inhibitorů angiogenese je snad nejzajímavější **thalidomid**, který byl v minulosti zakázán a nyní se do terapie vrací. Kromě bránění růstu nových cév může thalidomid modulovat i účinky některých cytokinů, zejména faktoru nekrózy nádorů TNF α , jehož hladina je zvýšena při zánětlivých onemocněních. Je proto řazen mezi „**imunomodulační léky**“, (immunomodulatory drugs, ImiDs).

Původně byl thalidomid vyvinut jako sedativum (Contergan), jeho používání bylo však po snad největším lékovém skandálu 20. století zastaveno. Těhotným ženám, které jej během prvních měsíců těhotenství používaly k potlačení ranní nevolnosti, se rodily "conterganové" nebo také „tuleňovité“ děti s nevyvinutými končetinami. Příčinou byl právě antiangiogenní účinek: thalidomid blokoval vznik cév v rostoucím embryu. Před několika léty se však thalidomid (Thalomid, Celgene) začal znovu používat nejprve jako lék proti malomocenství a poté byl úspěšně využit i při chemoterapii nádorových onemocnění, a to zejména v kombinaci s platinovými cytostatiky. Nově byla vyvinuta analoga thalidomidu s vyšší účinností, jako je **aktimid**, (CC 4047, Celgene) a **lenalidomid** (Revlimid, Celgene). Ten byl v kombinaci s dexamethasonem schválen jako lék „sírotek“ pro terapii mnohočetného myelomu a myelodysplastického syndromu. Nejnovějšími přírůstky do rodiny do skupiny imunomodulačních látek jsou **pomalidomid**, který je klinicky zkoušen při léčbě mnohočetného myelomu a **taskvinimid**, zkoušený při léčbě nádorů prostaty.

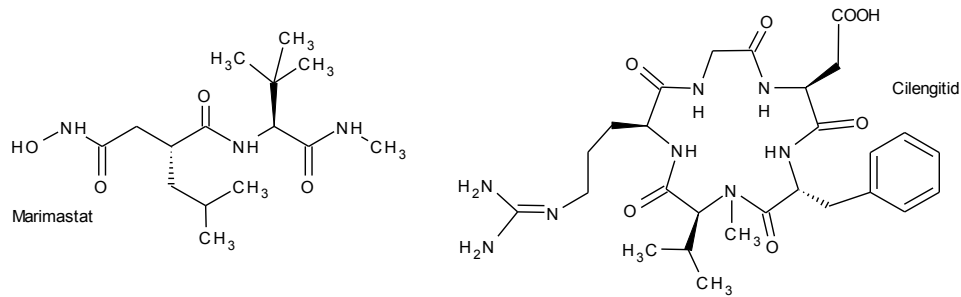


Antiangiogenní a současně antimetastatickou účinek mají **inhibitory matricových metaloproteinás**.

Matricové metaloproteinasy, MMP, jsou zinek obsahující enzymy, které degradují bílkoviny extracelulární matrice tvořící „kostru“ tkání. Tím umožňují jak vznik nových cév, tak i únik nádorových buněk z primárního nádoru, jejich šíření krevním oběhem a vznik metastáz. Inhibitory MMP by proto mohly brzdit zásobování primárního nádoru krví i vznik sekundárních nádorů v jiných tkáních. Inhibiční aktivitu mají látky, které mohou vázat zinek za vzniku chelátů. Enzym zbavený zinku je pak nefunkční. Nejčastěji jde o hydroxamáty, zkoušeny však byly i jiné látky. Výzkum inhibitorů MMP, nejčastěji hydroxamátů, byl považován za perspektivní. Klinicky byl v kombinaci s některými cytostatiky zkoušen především **marimastat**. Výsledky však byly zklamáním, příčinou byly nepříznivé vedlejší účinky na svalstvo a kosti, které se předtím u pokusných zvířat neprojevíly a které si vynutily snížení dávky inhibitoru pod terapeuticky účinnou úroveň. Neosvědčily se ani další inhibitory MMP (prinomastat, batimastat), nové specifitější inhibitory jsou stále hledány.

Jiným typem léčiv blokujících angiogenesi a metastázování jsou **inhibitory integrinů**, které snad mají lepší perspektivu uplatnění než inhibitory MMP.

Integriny jsou receptory na povrchu buněk, které se podílejí na adhezi buněk k extracelulární matici tkání a zprostředkovávají signály buňkám, aby rostly a dělily se nebo naopak růst zastavily, pokud by překročily prostor tkáně („kontaktní inhibice“). V nádorových buňkách jsou funkce integrinů narušené. To umožňuje prorůstání a metastázování nádoru. Z nově vyvíjených inhibitorů dospěl do fáze III klinických zkoušek cyklický pentapeptid **cilengitid**, cyklo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-N-methylVal).



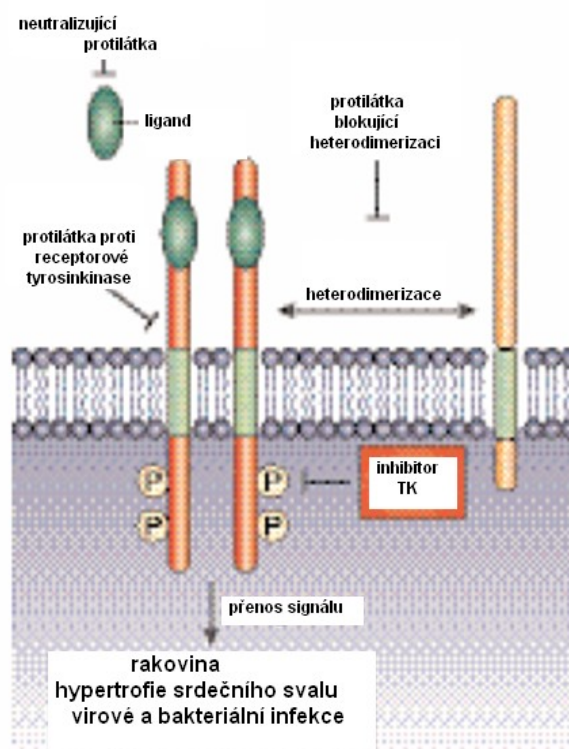
Inhibice metabolismu nádorových buněk

Hypoxické nádorové buňky na rozdíl od normálních buněk nezískávají energii aerobní respirací, ale převážně glykolýzou. Některé inhibitory glykolýzy proto mohou mít podobný účinek jako zamezení přívodu živin inhibicí angiogeneze.

Přestože Warburg spekuloval o zásahu do metabolismu nádorových buněk již před 80 lety, možnost inhibice glykolýzy jako strategie léčby nádorového onemocnění je studována až v posledních letech. Důvodem patrně je vysoká toxicita inhibitorů glykolýzy, která bránila jejich systémovému využití. Nové možnosti aplikace inhibitorů přímo do nádorů mohou tyto problémy překonat. Úspěšné např. byly zkoušky intratumorálního podání **3-brompyrohroznové kyseliny**. Zahájeny byly zkoušky jiného jednoduchého inhibitoru glykolýzy, **dichloroctové kyseliny**, které zatím přinesly rozporné výsledky. U několika pacientů došlo k regresi nádorů, pokračující zkoušky u myši s transplantovanými buňkami lidských nádorů střev však ukázaly, že dichloroctová kyselina může v některých případech růst nádorů dokonce podporovat.

Blokování přenosu signálů k buněčnému dělení

Signály k dělení, mitose, předávají buňkám různé **mitogenní látky**, zejména **růstové faktory** svými interakcemi s receptory na povrchu buňky. Uvnitř buňky je signál předáván kaskádou různých aktivačních reakcí až do buněčného jádra.



Možnosti blokování přenosu signálů k buněčnému dělení

Důležitými růstovými faktory, které podporují růst a dělení nádorových buněk, jsou vedle již zmíněného VEGF zejména epidermální růstový faktor (EGF, Epidermal Growth Factor), transformující růstové faktory (TGF- α a TGF- β , Transforming Growth Factor) a insulinu se podobající růstový faktor (IGF, Insulin-like Growth Factor). Další růstové faktory, které ovlivňují krevtvorbu, byly zmíněny mezi imunomodulačními léčivy. Ukázalo se, že na povrchu některých nádorových buněk je nadměrně zvýšeno množství receptorů pro tyto růstové faktory.

Po interakci růstových faktorů s receptory musí být signál k růstu a dělení buněk předán až do buněčného jádra. To zprostředkovávají proteinkinasy spřažené s receptory. Při interakci s receptory jsou uvnitř buňky tyto kinasy aktivovány a začnou fosforylovat hydroxylové skupiny serinu, threoninu nebo tyrosinu v různých enzymech. Přitom se mění aktivita a někdy i funkce fosforylovaných enzymů, které pak působí na jiné proteiny signalizační kaskády.

Fosforylace hydroxylové skupiny tyrosinu aktivuje kinasy, které pak fosforylují další enzymy signalizační dráhy. Fosforylace serinových nebo threoninových zbytků aktivuje spíše fosforylasy, které fosfátové skupiny odštěpují a tím aktivované bílkoviny převádějí zpět do neaktivního stavu.

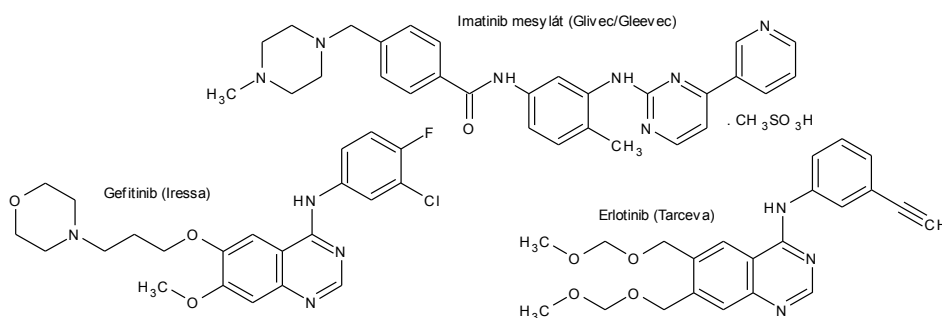
Prostřednictvím kaskády aktivačních fosforylačních reakcí a tvorby signalizačních molekul uvnitř buňky se pokyn k růstu a dělení buňky, popř. k její diferenciaci, přeneso až do buněčného jádra s jeho geny, kde jsou nakonec aktivovány enzymy, které přímo řídí replikaci DNA a další procesy provázející růst a dělení buněk.

Inhibitory proteinkinas nebo aktivátory fosforylas blokují přenos signálu k dělení od kinasy receptoru do jádra buňky. Inhibitory tyrosinových proteinkinas (koncovka –**tinib**) působí jako „cílené“ léky především na nádorové buňky, v nichž je kinasová aktivita zvýšena. Jejich toxické účinky na normální tkáňové buňky jsou podstatně menší než u standardních cytostatik. Jsou vyvíjeny od 90. let minulého století a pro onkologii představují stejný průlom, jakým bylo zavedení taxanů v 80. letech.

Prvním léčivem z této skupiny byl **imatinib** (Glivec, Gleevec, Novartis), který byl vivinut pro léčbu chronické myeloidní leukemie (CML). Toto onemocnění je způsobeno přesunem genů mezi 9. a 22. chromosomem. Přitom dojde ke spojení genů *abl* a *bcr*, které kódují bílkoviny s tyrosinkinasovou resp. serin/tyrosinkinasovou aktivitou. Produktem tohoto spojení je tyrosinkinasa, která i bez signálu od růstového faktoru trvale aktivuje bílkoviny regulující buněčný cyklus, takže buňka se spojenými geny se pak nekontrolovaně dělí. Imatinib se váže do vazebního místa kinasy pro ATP. Přitom inhibuje jen tyrosinkinasu kódovanou *abl-bcr* a dvě další kinasy, aktivitu ostatních kinas neovlivňuje.

Imatinib může sloužit za příklad moderního racionálního přístupu k hledání nových léčiv.

Výzkumníci nejprve zjišťovali, jaké látky mohou tyrosinkinasu kódovanou fúzním genem *abl-bcr* inhibovat. Vodíková látka byla nalezena v jednom derivátu, který měl v poloze 4 pyrimidinového jádra navázaný 3-pyridylovou a v poloze 2 m-aminofenylaminovou skupinu. Pak následovaly modifikace molekuly. Zavedením methylskupiny do polohy 6 benzenového cyklu byla potlačena nežádoucí inhibiční aktivita vůči proteinkinase C, acylací aminoskupiny byla zvýšena biologická dostupnost léčiva a zavedením vysoce polárního N-methylpiperazinového zbytku zlepšena rozpustnost. Imatinib byl nejprve povolen pro léčení leukemie, pak pro léčbu GIST (gastrointestinálních stromálních tumorů, nádorů zažívacího traktu vycházejících z pojivové tkáně, dnes je schválen pro celkem 10 indikací. Nedávno provedená studie ukázala, že pacienti s chronickou myeloidní leukemií léčení imatinibem, u nichž došlo ke kompletní remisi onemocnění, se dožívají stejného stáří jako ostatní populace.



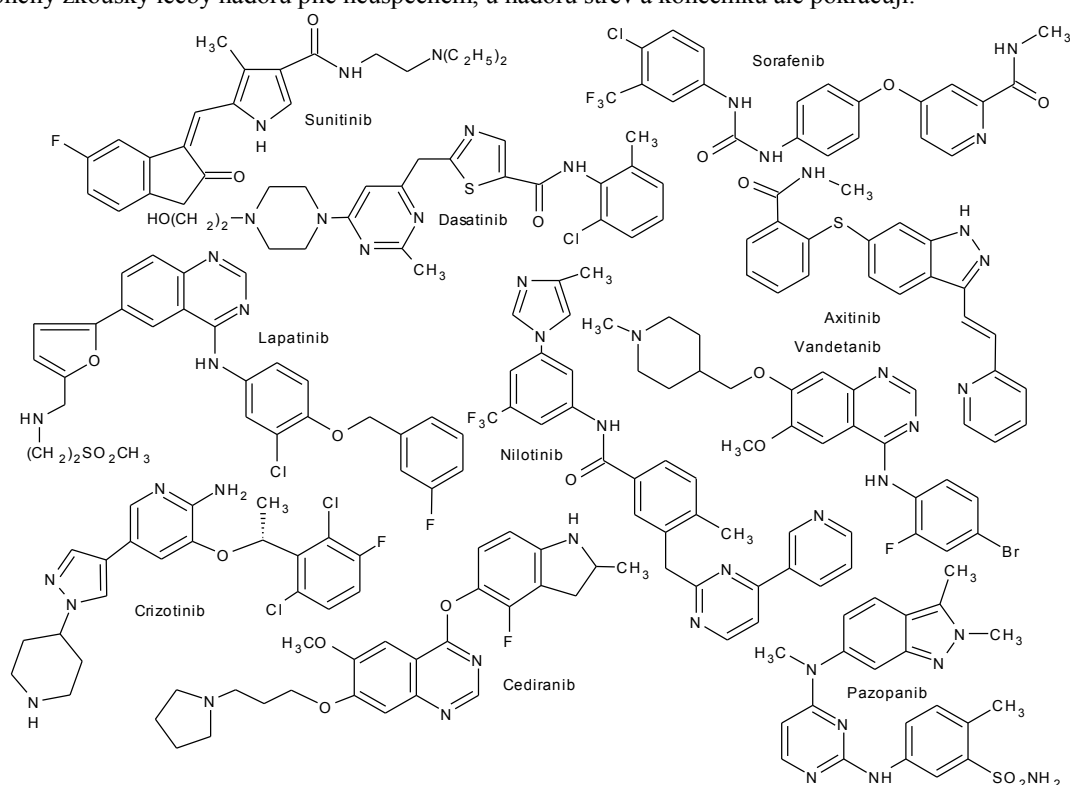
V některých nádorových buňkách je nadměrně zvýšen počet receptorů pro epidermální růstový faktor (EGF). Tyto buňky tak dostávají signály k buněčnému dělení, i když je koncentrace EGF velmi nízká.

Inhibitor tyrosinkinasy receptoru pro EGF **gefitinib** (Iressa, AstraZeneca) byl povolen pro léčbu pokročilých stadií nádorů plic. Když došlo k předčasnému úmrtí několika pacientů léčených gefitinibem, začalo být uplatnění inhibitorů tyrosinkinasy receptorů růstových faktorů široce diskutováno. Přitom se ukázalo, že ani nová cílená léčiva nejsou tak bezpečná, jak o nich tvrdila reklama. Onkologové se však stále domnívají, že přínosy „tinibů“ podstatně převyšují nevýhody a že nežádoucím vedlejším účinkům lze zabránit vhodnou volbou terapeutického režimu. Gefitinib je povolen v Japonsku a EU, v USA, Kanadě a Švýcarsku je povoleno jen omezené použití přípravku, protože při jeho klinickém zkoušení nebylo prokázáno signifikantní prodloužení doby přežití pacientů s nádory plic. Tyrosinkinasa EGFR je cílovou strukturou také pro **erlotinib** (Tarceva, OSI Pharmaceuticals) určený opět pro léčbu nádorů plic a také nádorů pankreatu (v kombinaci s gemcitabinem).

Proteinkinasy účastnících se přenosu signálů k buněčnému dělení je řada, další kinasy plní v buňce jiné úlohy. Celkem jich má být 512. Soubor kinas v buňce je někdy nazýván **kinom**.

Kinas, které se již staly cílovými strukturami protinádorových léčiv, je zatím asi 20 a další přibývají. Jsou to kiny aktivované mutacemi, jako je zmíněná kinasa kódovaná fúzním genem *abl-bcr*, dále kiny, které se podílejí na udržování nádorového růstu a kiny s jinými rolami v nádorové transformaci. V r. 2009 bylo ve vývoji na 232 pracovištích celkem 608 inhibitorů proteinkiny jako potenciálních protinádorových léků. Zmínit zde lze jen některé inhibitory.

K prvním třem dříve povoleným inhibitorům přibyly v r. 2006 tři další. **Sunitinib** (Sutent, Pfizer) je určen pro léčbu stromálních nádorů GI traktu, zkoušen je u nádorů ledvin. **Dasatinib** (Sprycel, Bristol-Myers Squibb) je duální inhibitor, který kromě tyrosinkiny kódované fúzním genem *abl-bcr* inhibuje také kiny Src. Může být používán jak k léčbě chronické myeloidní leukemie, tak i akutní lymfoblastické leukemie. **Sorafenib** (Nexavar, Bayer) inhibuje kinasu receptorů pro VEGF i PDGF a také Raf kinasu (to odráží název), která je aktivována produktem onkogenu *Ras*. Je určen k léčbě nádorů ledvin. Novými léčivy jsou dále **Lapatinib** (Tykerb, Tyverb, GlaxoSmithKline), který byl povolen v březnu 2007 pro léčbu nádorů prsu a plic, úspěšně je zkoušen u nádorů střev. Je to duální inhibitor, jehož cílovými strukturami jsou tyrosinkiny spřažené s dvěma typy receptorů pro EGF, mimo jiné receptoru ErbB2 (HER2/neu), který se vyskytuje v nadměrném množství v buňkách nádorů prsu. **Nilotinib** (Tasigna, Novartis), který je určen pro pacienty s chronickou myeloidní leukemií, u nichž se vyvinula rezistence na imatinib, byl povolen rovněž v r. 2007. V r. 2011 byl povolen **crizotinib** (Xalkori, Pfizer) inhibující kinasu ALK, která je trvale aktivní u některých nemalobuněčných nádorů plic s fúzním genem *EML4-ALK*. Klinicky zatím zkoušenými inhibitory jsou **vandetanib** (Zactima, AstraZeneca) určený k léčbě nemalobuněčných nádorů plic a nádorů štítné žlázy, **axitinib** zkoušený pro léčbu nemalobuněčných nádorů plic a **pazopanib hydrochlorid** (Votrient, GlaxoSmithKline) se zatím nejasnou indikací. U **cediranibu** (Recentin, AstraZeneca) skončily zkoušky léčby nádorů plic neúspěchem, u nádorů střev a konečníku ale pokračují.



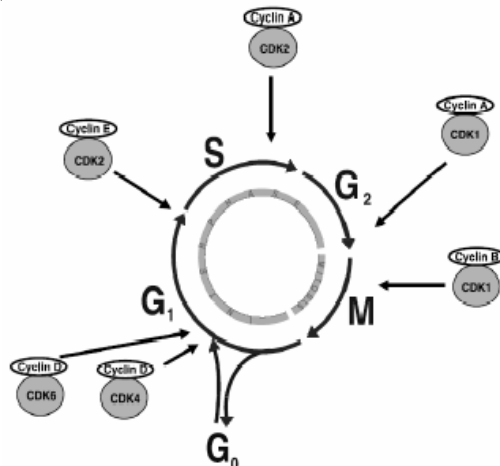
Ze zkoušených inhibitorů stojí dále za zmínku **bafetinib**, duální inhibitor blokuující kiny *bcr-abl* a *lyn*, má statut „léku sirotku“ pro léčbu rezistentních leukemií a zkoušen je u nádorů mozku. Rezistentní mutanty kiny *bcr-abl* inhibuje **ponatinib**. Jiným duálním inhibitorem je **neratinib** blokuující kiny receptorů Her2 a EGFR, zkoušený u nádorů prsu. **Bosutinib** inhibuje nejen kinasu *abl*, ale i *src*, která je nadměrně exprimována v leukemických buňkách rezistentních na imatinib, kinasu *src* blokuje i **sarakatinib**. Jako lék „sirotek“ pro léčbu myelofibrosy, vzácného, onemocnění kostní dřeně, byl v r. 2011 povolen také **ruxolitinib** (Jakafi), inhibitor kiny JAK1 a JAK2. **Telatinib** inhibující kiny VEGFR2, PDGFR a KIT receptoru má léčit metastázující nádory žaludku. **Kabozantinib** inhibující kromě kiny VEGFR2 i kinasu MET vykazoval protinádorovou účinnost u 12 ze 13 studovaných typů nádorů, úspěšný byl zejména u nádorů prostaty. **Afatinib** inhibuje mutantní kiny spřažené s EGFR, na které nepůsobí erlotinib a gefitinib. Brzdí rozvoj nádorů plic, ale neprodlužuje přežití pacientů, zkouší se u pokročilých nádorů prsu. Zmínit lze i multikinasový inhibitor **regorafenib** blokuující mj. Raf kinasu i kinasu receptoru pro neurotropní faktor (vyvolává vznik podpůrných buněk nervové tkáně). Je úspěšný i při zkouškách léčby nádorů gastrointestinálního traktu. Účinným selektivním inhibitorem kiny receptorů VEGFR1, VEGFR2 a VEGFR3 je **tivozanib** určený zejména pro léčbu nádorů ledvin. **Tivantinib**, inhibitor kiny *c-MET*, která je v nádorových buňkách trvale aktivována, je zkoušen v kombinaci s erlotinibem při léčbě nemalobuněčných nádorů plic, nádorů jater a střev. **Gamitrinib** vyvinutý v r. 2009 inhibuje protein tepelného šoku 90 (Hsp90). Tím poškozují mitochondrie nádorových buněk a stimuluje apoptické procesy. **Vemurafenib** (Zelboraf) potlačuje účinek proteinu kódovaného mutovaným onkogenem *BRAF*, zkoušen je při léčbě kožních nádorů.

Inhibitory proteinkinas regulujících buněčné dělení

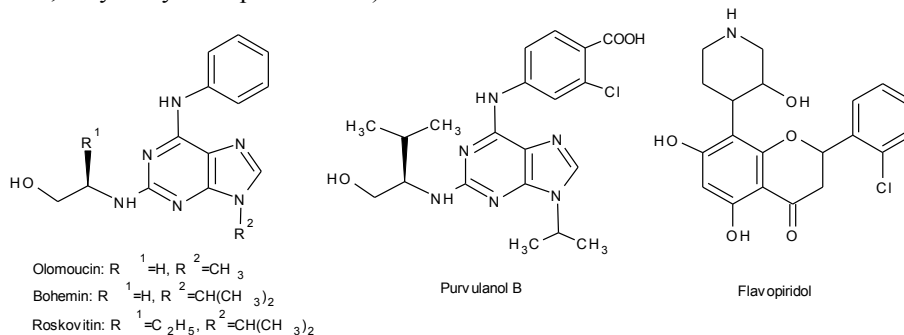
Důležitou skupinu proteinkinas tvoří cyklin-dependentní proteinkinasy (cdk), které regulují cyklus buněčného dělení. **Inhibitory cyklin-dependentních proteinkinas** mohou proces buněčného dělení zastavit nebo alespoň zpomalit. Jejich účinkem přitom nejsou nijak ovlivněny funkce nedělících se buněk v klidovém stavu. Inhibitory obvykle inhibují několik typů cdk současně.

Buněčný cyklus je souborem procesů, které vedou ke zdvojení genetického materiálu a jeho následnému rozdělení do dvou dceřiných buněk. Ke zdvojení DNA dochází v tzv. syntetické fázi označované jako S, k oddělení dceřiných buněk v mitotické fázi M. Mezi těmito fázemi jsou přestávky označované jako G₁ a G₂ (G od *gap* = mezera). Buněčný cyklus tak je opakující se sled fází G₁ – S – G₂ – M. Fáze G₁, kdy se buňky nedělí, může být velmi dlouhá (někdy se proto přestávka mezi M a S fází rozděluje na G₀ a G₁ fázi). K dělení pak dojde, až k tomu buňka dostane vhodný signál. Některé diferencované tkáňové buňky se již dále dělit vůbec nemohou a zůstávají trvale v klidovém stavu, který je někdy označován jako postmitotický stav.

U dělících se buněk řídí průběh buněčného cyklu bílkovina nazvaná **cykliny**, jejichž koncentrace v buňce se v různých fázích cyklu mění. Cykliny aktivují **cyklindependentní kinasy**, které pak fosforylují další bílkoviny a tím je rovněž aktivují. Cyklindependentních kinas je (podobně jako cyklinů), několik typů. Z devíti známých cdk, se pět účastní regulace buněčného cyklu. Důležité jsou zejména cdk2 a cdk4. Kinasa cdk2 je aktivována cyklinem E, který je buňkou syntetizován na konci fáze G₁. Aktivace zahajuje fázi S, kdy se spolu s genetickým materiálem syntetizuje i cyklin A. Ten pak vytváří s cdk2 komplex zodpovědný za průběh fáze G₂. Další cdk se účastní regulace v jiných fázích buněčného cyklu.

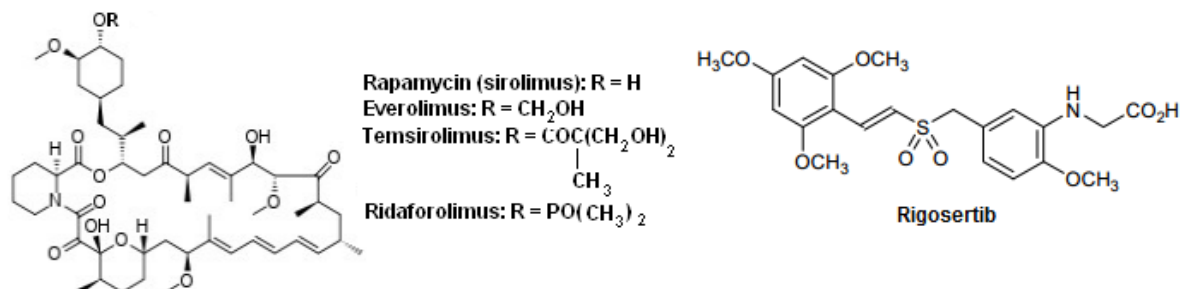


Inhibitorům cdk se dostalo značné publicity v českých médiích, protože na počátku studia jednoho typu inhibitorů s purinovým skeletem stáli vědci z olomoucké filiálky Ústavu experimentální botaniky AV ČR. Ti při studiu analogů rostlinného růstového hormonu 6-benzylaminopurinu zjistili, že některé deriváty purinu růst buněk nestimulují, ale naopak potlačují. Příčinou byla inhibice cdk. První účinná látka z této skupiny, 6-benzylamino-2-(2-hydroxy-ethyl)-9-methylpurin, byla nazvána **olomoucín**, pak byl připraven jiný inhibitor, bohemín. Při dalším studiu purinových inhibitorů cdk2 prováděném ve spolupráci s francouzskými badateli byl připraven **roskovitín** (Seliciclib, Cyclacel), který je úspěšně klinicky zkoušen. V USA pak byl s využitím postupů kombinatoriální syntézy (viz Farm03) připraven rozsáhlý soubor purinových inhibitorů cdk, z nichž **purvulanol B** měl při pokusech *in vitro* o tři řády vyšší účinnost než olomoucín. Kromě purinových derivátů jsou ve vývoji i další inhibitory cdk s odlišnou chemickou strukturou (flavonoid **flavopiridol**, 7-hydroxystauroporin a další).



Jinými regulátory buněčného cyklu jsou **kinasa mTOR** a **kinasy Plk**.

Kinasa mTOR (nazvaná podle toho, že je cílovou strukturou pro léčivo rapamycin – mTOR = mammalian Target Of Rapamycin) ovlivňuje produkci cyklinu D1 a tím i aktivitu cyklinindependtních kinas cdk4 a cdk6. Role mTOR v regulaci buněčného dělení je však širší. Kromě regulace buněčného cyklu kontroluje přísun živin do buněk a řídí tvorbu podjednotek faktoru indukovaného nedostatkem kyslíku HIF-1 α a HIF-1 β . V buňkách normálních prokrvených tkání jsou tyto podjednotky HIF rychle inaktivovány VHL proteinem, který však v některých hypoxických nádorových tkání chybí. HIF se tam pak kumuluje a stimuluje tvorbu vaskulárního růstového faktoru a dalších faktorů řídících vznik nových krevních a lymfatických cév. Inhibitory mTOR tedy jednak brzdí buněčné dělení nádorových buněk, jednak mají i antiangiogenní vlastnosti. Zvyšují účinek jiných léčiv i radioterapie. Prvním léčivem z této skupiny bylo makrolidové antibiotikum **rapamycin (sirolimus)**. Ten sice byl úspěšně zkoušen i v protinádorové terapii, avšak používá se především při transplantacích jako imunosupresant. Uplatnění v onkologii ale našly ethery a estery rapamycinu: **everolimus** (Afinitor, Novartis) a **temsirolimus** (Torisel, Pierre Fabre/Wyeth) při léčbě pokročilých stadií nádorů ledvin, v 5 onkologických indikacích je zkoušen **ridaforolimus** (dříve deforolimus, Ariad a Merck)



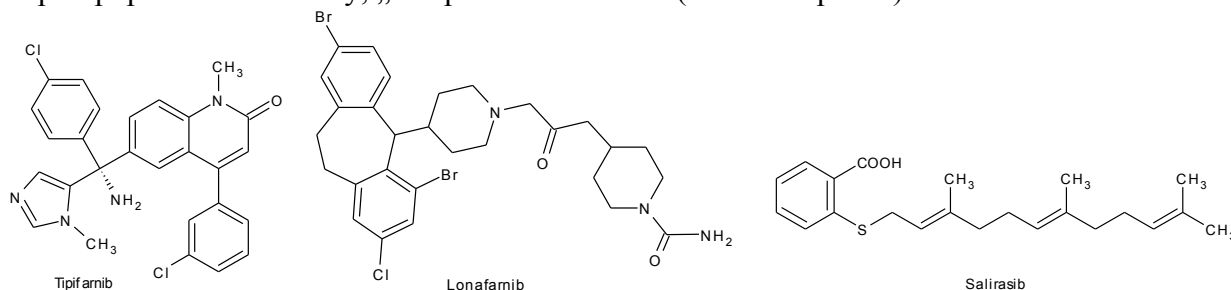
Kinasy Plk (Polo-like kinase) jsou serin/threoninové kinasy podobné kinase mušky octomilky Polo. Plk jsou exprimovány v rostoucích a dělicích se buňkách embryonálních tkání a nádorů, v buňkách zdravých dospělých tkání nejsou až na výjimky (buňky kostní dřeně, vaječníky, varlata) aktivní. Regulují přechod z fáze buněčného cyklu G2 do mitotické fáze a její průběh. Inhibitorem Plk je **rigosertib**, který je úspěšně zkoušen při léčbě myelodysplastického syndromu – poškození buněk kostní dřeně, které se projevuje mimo jiné poruchou tvaru a funkčnosti krvinek, anemií a leukemií.

Inhibitory prenylace

Řada bílkovin regulujících buněčný růst, diferenciaci a dělení obsahuje v aktivním stavu GTP, neaktivní forma GDP. Při regulaci buněčného dělení hrají významnou roli tři protoonkogeny *ras*. Produkty jejich transkripce, proteiny *ras*, jsou malé enzymy hydrolyzující GTP. Působí tak jako spínače mezi aktivním a neaktivním stavem regulačních bílkovin. Mutací genů *ras* vznikají onkogeny, jejichž transkriptem je protein, který už nemůže GTP hydrolyzovat. Signalizační kaskáda tak zůstává trvale zapnutá.

Protein *ras* sám není aktivní. Není však aktivován fosforylací jako jiné bílkoviny signalizační kaskády, ale prenylací, navázáním nenasyceného alifatického řetězce s isoprenoidní strukturou. Může jít buď o farnesylyaci, kdy se na protein *ras* navazuje řetězec C₁₅ nebo geranylaci, kdy se váží řetězec C₂₀ tvořený 4 isoprenoidními jednotkami.

Inhibitory farnesyltransferasy blokují aktivaci nativního i mutovaného proteinu *ras* a tím brání přenosu signálu pro buněčnou proliferaci. Nezávisle na mutacích genů *ras* mohou tyto inhibitory zvyšovat náchylnost nádorových buněk k buněčné smrti, apoptóze, tím, že ovlivňují tvorbu důležité proapoptické bílkoviny, „receptoru smrti“ DR5 (death receptor 5).



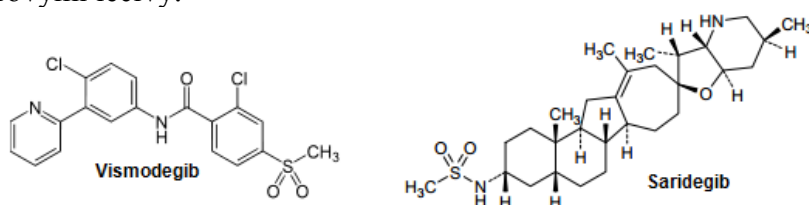
Farnesyltransferasu inhibují některá léčiva používaná v terapii jiných onemocnění, např. lovastatin, látka sloužící ke snižování hladiny cholesterolu, nesteroidní protizánětlivé léčivo sulindak sulfid a některé přírodní látky, jako je limonen. Cíleně pro léčbu rakoviny bylo připraveno několik účinných selektivních syntetických inhibitorů, které se klinicky zkoušejí. Nejdále přitom pokročilo zkoušení **tipifarnibu** (Zamestra, Johnson & Johnson), který se osvědčil při léčbě mnohočetného myelomu. Zkoušení **lonafarnibu** (Sarasar, Schering-Plough) při léčbě nemalobuněčných nádorů plic bylo zastaveno jako málo nadějně, avšak klinické zkoušky při léčbě jiných nádorů a leukemie pokračují. Účinek onkogenů *ras* blokuje také nově zkušební inhibitor **salirasib**, derivát thiosalicilové kyseliny, ten však působí jiným mechanismem než zábranou prenylace

Ovlivnění signalizační kaskády „ježek“

Lipoproteiny kódované geny **hedgehog** (hh, česky ježek, nazvány byly podle abnormálního vzhledu larvy mušky octomilky s mutovaným genem) jsou odpovědné za diferenciaci tkání v rostoucím embryu obratlovců i bezobratlých. Působí tak, že se váží na receptor spřažený s G-proteinem nazvaný Patched (Ptch, česky záplatovaný), který blokuje jiný transmembránový protein Smoothened (Smo, česky vyhlazený). Navázáním agonisty na Ptch je Smo odblokován a může tedy v buňce nastartovat biochemické reakce **signalizační dráhy hedgehog**. Signály přenesené do buněčného jádra pak určují, které geny mají být transkribovány a tím řídí vývoj embrya. Signalizace hh má ale velký význam i pro dospělý organismus, kde řídí proliferaci kmenových buněk různých tkání.

Přitom může jít o normální procesy v organismu, jako je aktivace vlasových kořínků, ale i o transformaci kmenových buněk na nádorové. Mutace vedoucí ke ztrátě funkčnosti Ptch nebo trvalé aktivaci Smo se mohou podílet na vývoji nádorů různých orgánů, zejména na basaliomu, kožního nádoru vycházejícího z bazálních buněk pokožky.

Vzhledem k významu signalizační kaskády hh pro nádorové bujení, mohou být látky, které ji blokují, protinádorovými léčivy.



Prvním léčivem této skupiny je **vismodegib** (Erivedge), který byl povolen v lednu 2012 FDA k léčbě metastázujícího nebo relapsujícího basaliomu, nebo který nelze chirurgicky odstranit. Zkoušen je ale při celé řadě dalších onkologických indikací, jako jsou metastázující nádory střev a konečníku, pokročilé nádory žaludku, pankreatu a další. Ve fázi II klinického zkoušení u různých nádorů je jiný inhibitor Smo **saridegib** s podstatně složitější strukturou.

Inhibitory telomerasy

Normální buňky mají omezený potenciál růstu, po určitém počtu dělení zestárnou a odumírají. Naproti tomu nádorové buňky se mohou dělit trvale, lze je tedy považovat za nesmrtelné. Při regulaci délky života normálních diferencovaných buněk hraje důležitou roli postupné **zkracování telomerů** – specifických struktur na koncích chromosomů, k němuž dochází při dělení buněk.

Telomery obsahují opakující se hexanukleotidovou sekvenci TTAGGG tvořenou (u člověka) 8-14 tisíci páry nukleotidů. Při buněčném dělení ztrácejí chromosomy určitou část telomerů, v normálních buňkách to je 100 - 150 párů bází za rok. Zkrácení telomerů na kritickou hodnotu dává signál k zastavení dalšího buněčného dělení zestárlé buňky.

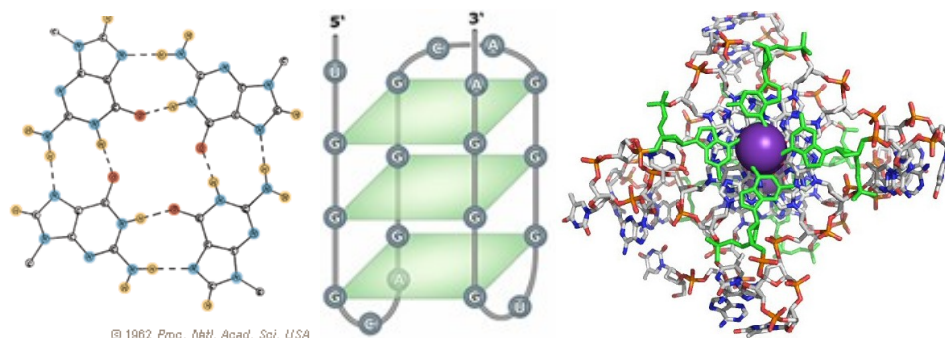
V buňkách embrya, ale i „nesmrtelných“ rakovinných buňkách je ztráta délky telomerů při buněčném dělení kompenzována opětovným připojením nukleotidů, které katalyzuje enzym **telomerasa**. Je to ribonukleoprotein obsahující RNA, která je templátem pro syntézu telomerických nukleotidových sekvencí.

V normálních tkáňových buňkách dospělého organismu není telomerasa aktivní, její aktivita však byla prokázána u 86% typů nádorových buněk. Aktivace telomerasy je zřejmě důležitým krokem nádorové transformace, kdy buňky získávají schopnost neomezeného dělení. Naopak, **inhibice telomerasy** by mohla nádorové bujení zastavit. Inhibice telomerasy je proto často uváděna mezi perspektivními směry protinádorové terapie, ale dosud ani nebylo jednoznačně prokázáno, že může skutečně zastavit růst a množení nádorových buněk.

Na koncích telomerů je DNA uspořádaná do zvláštních struktur zvaných G-kvadruplexy tvořených čtyřmi molekulami guaninu propojených vodíkovými můstky. Jsou tvořeny 4 individuálními úseky DNA poskládanými z jednořetězcové DNA. Koncovou strukturu telomeru si lze představit jako skelet několikapatrového domu, kde podlahy tvoří propojené molekuly guaninu.

Aby telomerasa mohla zajistit prodloužení, musí být koncová DNA telomeru lineární a neposkládaná. Podmínkou jejího účinku proto je rozvolnění kvadruplexů. Sloučeniny, které se na G-kvadruplexy mohou selektivně vázat a tím stabilizovat jejich strukturu, mohou telomerasu vyřadit z činnosti a tím omezit dělení buňky. Americký nositel Nobelovy ceny s českými předky T.T. Cech zjistil, že některé kovové ionty mohou kvadruplexy stabilizovat, jiný tým zjistil, že kvadruplexy stabilizuje i 2,6-diaminoantrachinon. Zajímavým inhibitorem byl telomestatin, přirozená látka produkovaná bakteriemi. Žádná z těchto látek nebyla vhodná pro další vývoj.

Hledány proto byly další sloučeniny s podobným účinkem. Pomocí počítačového modelování interakcí různých látek s kvadruplexy bylo zjištěno, že kromě aminoantrachinonů mohou mít stabilizační účinek i některé porfyriny, deriváty perylenu, cyaninová barviva a některé další látky s planární strukturou, které se překvapivě váží vně, nikoliv mezi kvadruplexy. Na zjištění, že telomerasy inhibují fluorované chinolony navázal vývoj nyní zkoušeného léčiva CX-3543 (Cylene Pharmaceuticals).



© 1962 Proc. Natl. Acad. Sci. USA

Odlišným mechanismem inhibuje telomerasy **AS1411** (Antisoma), na guanin bohatý oligonukleotid s 26 bázemi, který sám vytváří kvadruplexy. Byl náhodně objeven při studiu oligonukleotidů vytvářejících strukturu trojitě spirály. Výsledky prvních klinických zkoušek AS1411 na malém souboru pacientů s nádory ledvin (fáze I) byly ale rozporné: AS1411 nevykazoval žádnou přílišnou toxicitu, u jednoho pacienta došlo ke kompletní a u druhého k téměř úplné remisi, u 5 pacientů se stav nezměnil, u 2 zhoršil. Nadějnější výsledky by mohly přinést zkoušky **imetelstatu** (v r. 2010 byla zahájena fáze II klinického zkoušení), oligonukleotidu s 13 bázemi, modifikovanou cukernou složkou (3'-amino-3'-deoxyribosa) propojené thiofosfátovými skupinami a s amidovou vazbou navázanou kyselinou palmitovou. Díky přítomnosti vyšší mastné kyseliny může imetelstat překonávat hematoencefalickou bariéru a být tak využit i k léčení zhoubných nádorů mozku.

Studium inhibitorů telomerasy je perspektivní i z jiného hlediska. Stabilizátory kvadrupletů by se potenciálně mohly uplatnit i při řízení exprese některých genů a možná i při léčení některých dědičných nemocí způsobených chromozomálními aberacemi.

Na regulaci délky telomerů se kromě telomerasy podílejí proteiny TRF1 a TRF2. Rozvolnění koncových struktur telomerů katalyzuje enzym nazvaný tankyrasa 1, který interaguje s TRF1. Při zablokování tankyrasy 1 se zastaví buněčný cyklus. Spolu s inhibitory cdk a dalších enzymů podílejících se na regulaci buněčného cyklu by se proto mohly inhibitory tankyrasy 1 stát dalšími kandidáty na nová protinádorová léčiva.

Induktory apoptózy a látky narušující reparační mechanismy buňky

Pro správnou funkci organismu je důležitý nejen růst a dělení buněk, ale i jejich zánik. K tomu dochází jednak při poškození buňky různými vnějšími fyzikálními i chemickými faktory, jednak při předem naprogramované likvidaci nepotřebných buněk nebo buněk, u nichž došlo k určitým změnám nezaručujícím správnou funkci. V prvním případě jde o **nekrózu**, ve druhém o **apoptózu** (z řečtiny, *apo-* = od a *ptein* = padat), programovanou buněčnou smrt. Oba procesy se liší mj. v tom, že při nekróze zůstává buněčné jádro s DNA určitou dobu intaktní, zatímco proces apoptických změn na úrovni DNA začíná.

Mechanismy apoptózy jsou poměrně složité a podílí se na nich celá řada enzymových reakcí. Signály k apoptóze dostává buňka ze svého vnitřního prostředí, mohou však přicházet i zvenčí. Signály k apoptóze vyvolané různými podněty se mohou v buňce spojit do jedné signální dráhy.

Jedním ze signálů k apoptóze je zkrácení telomerů na kritickou délku. Jiným je poškození DNA. Přitom je aktivován protein p53 kódovaný tumorsupresorovým genem *p53*. Protein p53 tak vlastně chrání buňku před nežádoucími dědičnými změnami genomu. Nastartovat apoptózu může také aktivace dalších produktů tumorsupresorových genů, ale i různé signální molekuly z vnějšího prostředí. V tomto případě hrají důležitou úlohu tzv. receptory smrti na povrchu buněk. Při interakcích těchto receptorů s cytokiny nebo jinými ligandy dochází v cytoplasmě ke vzniku (buněčnou) smrt indukujícího enzymového komplexu DISC. Cytoplasmatická část aktivovaného receptoru přitom aktivuje caspasu 8 (v české literatuře se píše o kaspasách, jde však o zkratku výrazu **cysteinyl-aspartát specifická proteasa**, takže správně by mělo být na začátku písmeno c), která pak aktivuje další enzymy apoptické dráhy. Existují i jiné mechanismy buněčné smrti, které jsou na aktivaci caspas nezávislé. Apoptotické procesy lze zpočátku ještě zastavit, po určité fázi se však stávají nevratnými. Produkty onkogenů mohou kroky vedoucí k apoptóze zablokovat.

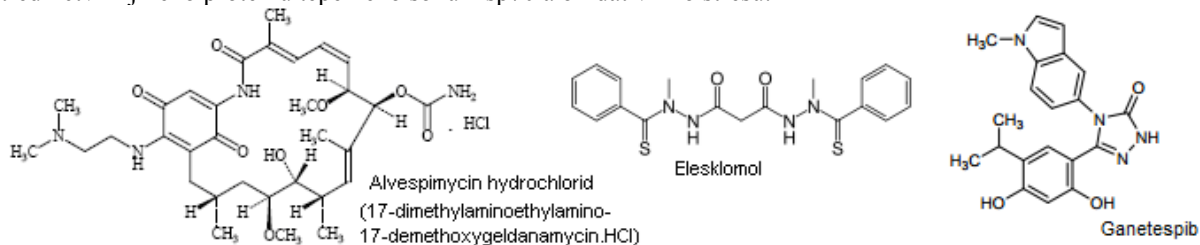
Některé induktory apoptózy jsou zkoušeny jako protinádorová léčiva. Přírodním induktorem je např. faktor „nekrózy“ nádorů, TNF, studovány jsou však i některé další bílkovinné molekuly.

Faktor nekrózy nádorů indukuje apoptózu jako agonista „receptoru smrti“. Jinými agonisty jsou s TNF příbuzný TRAIL (TNF Related Apoptosis Inducing Ligand) i další cytokiny. Umělým agonistou receptorů je monoklonální protilátka mapatumumab (TRAIL-R1 Mab, Cambridge Antibody), která postoupila do fáze II klinických zkoušek při léčbě nádorů konečníku a střev, lymfomů a některých dalších nádorů. Ve fázi I klinických zkoušek je rekombinantní TRAIL AMG-951 (Amgen). Indukce apoptózy funkčními tumorsupresorovými geny nebo ligandy receptorů smrti je také cílem některých zkoušených přípravků pro genovou terapii (viz dále).

Apoptotické procesy mohou nastartovat i různá nízkomolekulární léčiva.

Indukce apoptózy je patrně hlavním mechanismem účinku u oxidu arsenitého, u některých cytostatik (např. paklitaxelu), antagonistů pohlavních hormonů a kortikoidů je doprovodným účinkem. Z různých nízkomolekulárních látek mohou apoptózu indukovat např. i sildenafil (Viagra) nebo kanabinoidy z marihuany.

Za induktory apoptózy lze považovat i benzochinonové antibiotikum geldanamycin a jeho deriváty s lepšími farmakologickými vlastnostmi **tanespimycin** a zejména **alvespimycin**, který je ve fázi II klinického zkoušení. Tyto látky indukují degradaci některých proteinů kódovaných mutovanými geny, mimo jiné i mutovaného proteinu p53 (gen *p53* je tumorsupresorový gen, bílkovinné transkripty jeho mutované formy mají pozměněnou konformaci a působí onkogenně). Účinek je zprostředkován vazbou benzochinonových derivátů na protein tepelného šoku Hsp90, který má významnou roli v procesech buněčného dělení, buněčné transformace, apoptózy a angiogeneze. Inhibitorem Hsp90 je i **ganetespi** zkoušený při léčbě nemalobuněčných nádorů plic. Jiný induktor, **elesklomol**, vyvolává apoptózu prostřednictvím jiného proteinu tepelného šoku Hsp70 a oxidativního stresu.

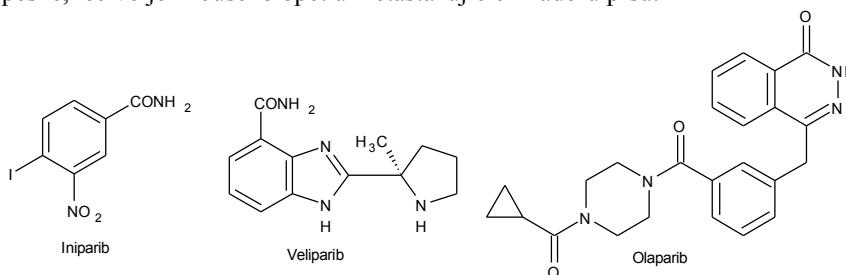


Zásahy do mechanismu opravy DNA

DNA v organismu je neustále poškozována mutacemi. K zajištění integrity genomu a přežívání buněk disponuje buňka několika reparačními mechanismy, které se navzájem doplňují. Dojde-li k poškození jednoho řetězce opraví DNA **poly(adenosindifosforiboso)polymerasa (PARP)** vystřížením nesprávné báze. Je-li PARP inhibována kumulují se zlomy jednoho řetězce DNA, což při replikaci vede ke vzniku zlomů dvouřetězových.

Ty normálně pomáhají opravit produkty exprese tumorsupresorových genů *BRCA1* a *BRCA2*. Jsou-li však tyto tumorsupresorové geny poškozeny mutací – což je případ řady buněk nádorů prsu, vaječníků a některých dalších – dochází při inhibici PARP k neopravitelnému poškození DNA, které vyvolá procesy buněčné smrti.

Léčiva jako je **olaparib**, **iniparib** nebo **veliparib** inhibují PARP a tím vyvolávají „syntetickou letalitu“ – selektivně usmrcují nádorové buňky s poškozenými geny *BRCA1* a *BRCA2*. Iniparib s jednoduchou chemickou strukturou (4-jod-3-nitrobenzamid) po slibných výsledcích fáze II klinických zkoušek selhal ve fázi III, když neprodlužoval ani dobu přežití pacientek, ani dobu do progresu metastázujících nádorů prsu. Pokračují však jeho zkoušky u nemalobuněčných nádorů plic. Jednoduchou strukturu má i veliparib, který byl úspěšně zkoušen (fáze II) u metastázujících nádorů plic v kombinaci s temozolomidem. Zkoušky olaparibu s nejsložitější molekulou ze všech inhibitorů PARP (fáze II) zatím probíhají úspěšně, léčivo je zkoušeno opět u metastázujících nádorů prsu.



Inhibitory proteasomu

Jako nové léky se do protinádorové terapie prosazují také **inhibitory proteasomu**, buněčné struktury, která má důležitou úlohu při recyklaci bílkovin v buňce.

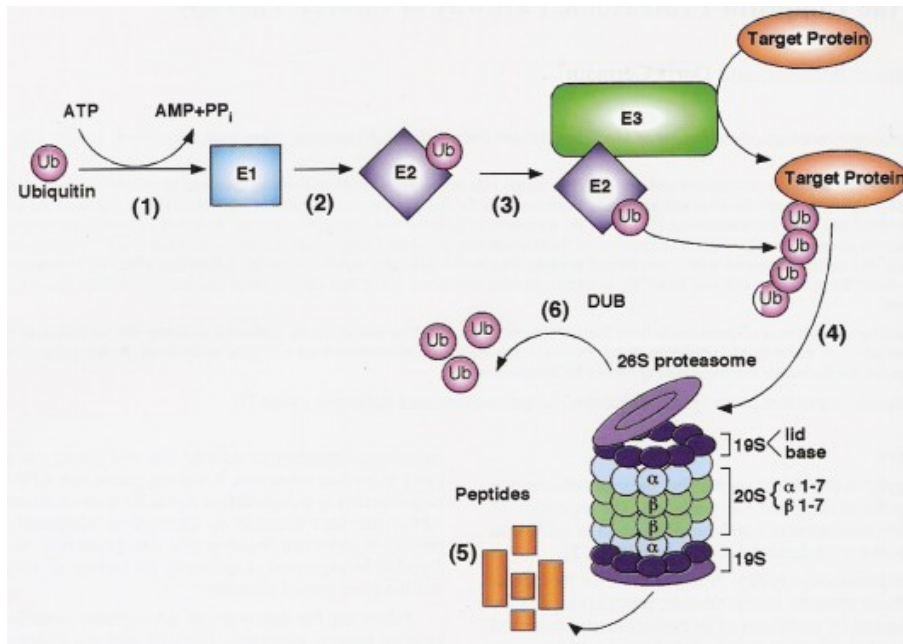
Většina bílkovin je v buňkách pravidelně obměňována za nové, a to i v buňkách, které se už nedělí, jako jsou nervové buňky. Průměrná životnost buněčných bílkovin je několik dní, některé však mají biologický poločas pouhých několik desítek minut, jiné naopak několik týdnů. Kromě bílkovin, které splnily svůj úkol a jsou pro buňku nadále zbytečné nebo i nežádoucí, se musí organismus zbavovat poškozených nebo cizorodých bílkovin.

K likvidaci zbytečných, poškozených nebo cizorodých bílkovin slouží proteasomy.

Proteasomy jsou buněčné struktury obsahující několik proteolytických enzymů, které postupně rozloží bílkoviny až na peptidy, které pak rozštěpí aminopeptidasa na aminokyseliny. Ty pak buňka využije ke stavbě nových bílkovin.

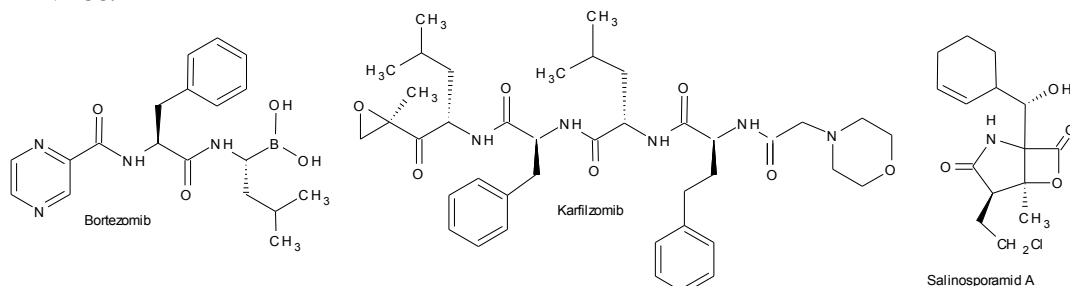
Aby proteasomy poznaly, co mají rozštěpit, musí být nepotřebná nebo poškozená bílkovina označena. K označení slouží navázání několika molekul polypeptidu **ubikvitinu**, který obsahuje 76 aminokyselin.

Ubikvitinace je pro bílkoviny „polibkem smrti“. Je katalyzována třemi enzymy, které vlastně zprostředkovaně řídí chod buňky a jak se později ukázalo, mohou se pořídit na nádorové transformaci.



V každé buňce vyšších organismů je až 30.000 proteasomů, které se účastní recyklace bílkovin. Velký význam mají proteasomy pro likvidaci proteinkinás, které již splnily svoji úlohu v kaskádě nitrobuněčných procesů řídících dělení buněk. Proteasomy přitom fungují jako jakési biologické hodiny, které určují časový průběh koncentrace důležitých enzymů a tím řídí jednotlivé fáze buněčného cyklu. Některé látky mohou ubikvitinaci nebo činnost proteasomu selektivně inhibovat, aniž by interagovaly s ostatními buněčnými strukturami. Inhibice zastavuje recyklaci bílkovin a tím i buněčné dělení a vnáší do buňky chaos, který může vést k buněčné smrti, apoptóze. Inhibitory proteasomu proto mají protinádorový účinek. Chemicky to jsou analoga oligopeptidů, která mají koncový karboxyl nahrazen zbytkem kyseliny borité nebo ketoepoxidickým seskupením.

Jako první inhibitor proteasomu se do protinádorové terapie dostal **bortezomib** (Velcade, Millenium a Janssen-Cilag), který byl nedávno schválen jako lék pro léčbu mnohočetného myelomu. V brzké době by však jeho indikace mohly být rozšířeny na další nádorová i jiná onemocnění. Bortezomib je aplikován injekčně, ve vývoji jsou další boronátová analoga peptidů **CEP-18770** a **MLN9708**, která mohou být podávána orálně. MLN9708 je profarmakum, ve vodném prostředí přechází na účinný **MLN2238**.



Při léčbě mnohočetného myelomu a a některých metastázujících nádorů je klinicky zkoušen inhibitor proteasomu 2. generace neobsahující bor, ale oxiranový kruh v sousedství ketoskupiny, **karfilzomib** (PR-171, Proteolix), zkoušen je i další inhibitor **ONX 0912** (dříve PR-047), jehož předností by měla být možnost orálního podání. Přírodním inhibitorem proteasomu je **salinosporamid A (marizomib)** se čtyřčlenným β -laktamovým kruhem, který je produkován bakteriemi *Salinispora tropica* získanými z mořských usazenin. Salinosporamid A začal být klinicky zkoušen při léčbě mnohočetného myelomu pouhé 3 roky po svém objevu. Proteasom inhibuje odlišným způsobem než bortezomib.

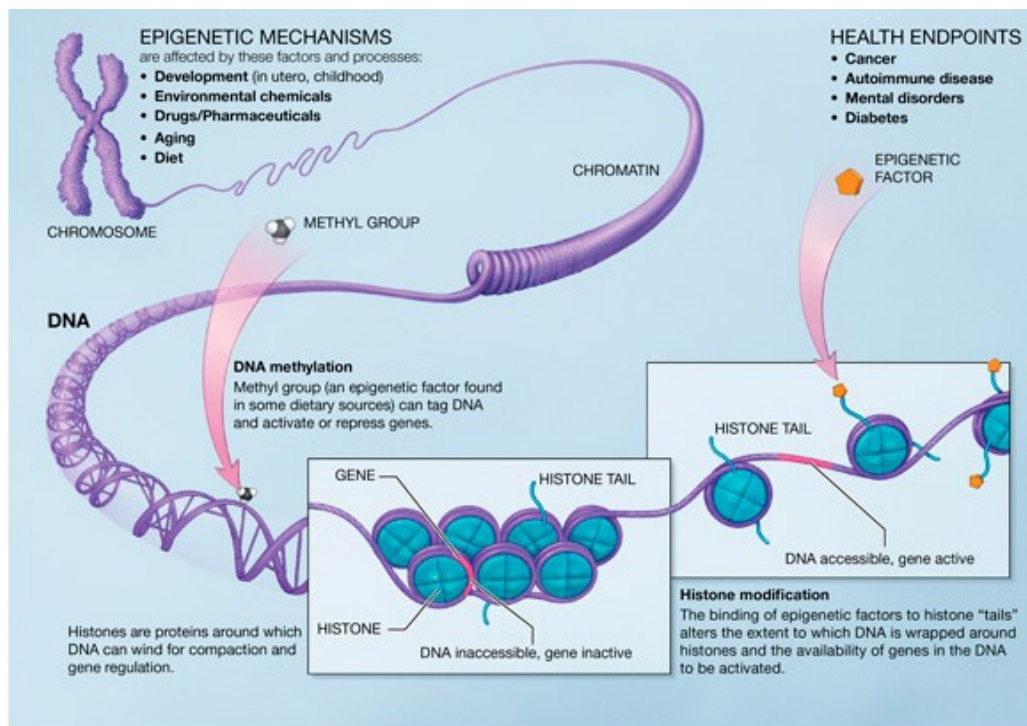
Při recyklaci bílkovin je třeba, aby peptidy produkované proteasomem byly dále rozštěpeny na aminokyseliny. Jestliže se tomu zabrání inhibicí aminopeptidasy, nedostávají se buňce stavební kameny pro biosyntézu nových bílkovin, buňka nemůže růst a dělit se. Inhibitory aminopeptidasy proto jsou potenciálními protinádorovými léčivy. Z nich se zkouší jako protinádorové léčivo **tosedostat**, hydroxamová kyselina charakteru dipeptidu esterifikovaného cyklopentanolem. Tosedostat je profarmakem, jehož esterová skupina je odolná vůči v krevní plasmě, po proniknutí do buněk je však hydrolyzován karboxyesterasami na účinnou látku.

Možnosti ovlivnění epigenetických změn podílejících se na regulaci exprese genů

Expresi genů ovlivňují **epigenetické změny**. Při nich se DNA nemění, ale mění se její přístupnost pro enzymy podílející se na transkripci. Nemohou-li se transkripční faktory k DNA dostat, k přepisu dojít nemůže, gen je „umlčen“. Epigenetické změny mohou probíhat v samotné DNA nebo v histonech, bázičických bílkovinech, které DNA v jádře buňky doprovázejí. Změny jsou reverzibilní, což umožňuje opravy pozmeněných DNA nebo bílkovin a obnovení jejich původní struktury a funkce. Na úrovni DNA ovlivňuje transkripci metylace cytosinu. Je-li methylován větší počet cytosinových zbytků v DNA, je přepis genu znesnadněn. Ten je znesnadněn i v případě, že DNA je vázána na histony příliš pevně.

V buněčném jádře se vytváří složka chromosomů chromatin, komplex DNA a histonů, kolem nichž jsou úseky vláknů DNA ovinuty. Přitom ovíjejí vždy dva závitky dvoušroubicové DNA komplex tvořený dvojicemi 4 histonů. Přitom vznikají nukleosomy, strukturální podjednotky chromatinových vláken, které jsou propojeny komplexem DNA s jedním histonem. Histony jsou bázičké, protože v jejich molekulách je mnoho lysinových zbytků s volnými koncovými aminoskupinami. Tyto aminoskupiny mohou být postranslačně modifikovány acetylací, metylací, fosforylací, ubikvitinací apod. Aby translace mohla v nukleosomu proběhnout musí být kyselá DNA vázána na histony volně. K tomu je třeba, aby byla vysoká bazicita histonů snížena potranslační acylací nebo podobnou modifikací. Nejsou-li histony acetylovány, je DNA na histony pevně přichycena a možnosti transkripce jsou tím zhoršeny nebo i znemožněny

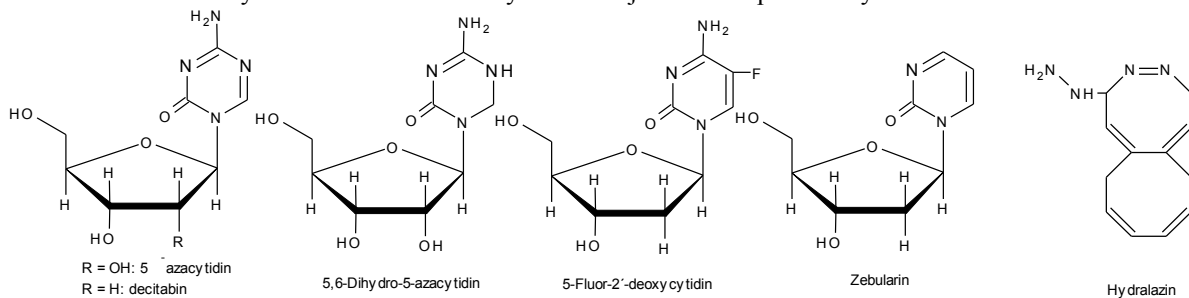
Studium nádorových buněk ukázalo, že je v nich vyšší zastoupení 5-methylcytosinu v DNA než v normální tkáni a naopak stupeň acetylace histonů v chromatinu nádorových buněk je nižší.



Source: National Institute of Health

DNA je methylována DNA-methyltransferasami. Inhibice DNA-methyltransferas může methylační DNA zvrátit, inhibitory proto mohou být využity k léčbě onemocnění zapříčiněných umlčením tumorsupresorových a některých dalších genů.

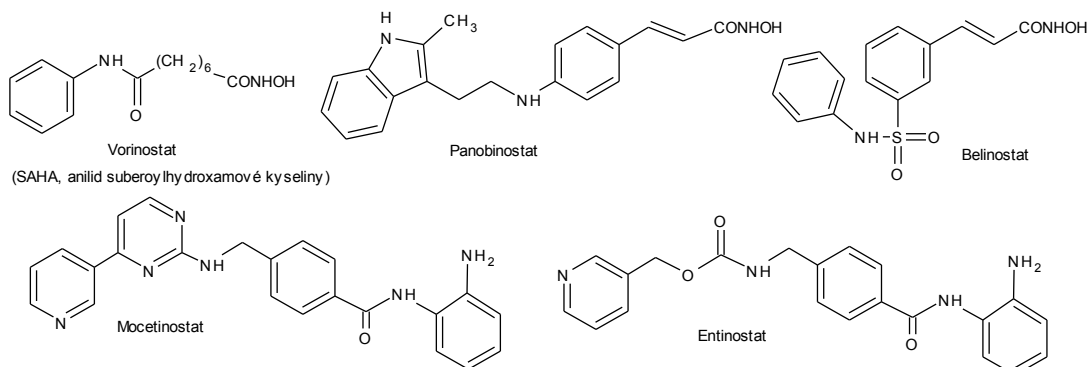
K methylační DNA dochází téměř výlučně v sekvencích CpG, které se často vyskytují v promotorových oblastech. Methylovaná sekvence vytváří vazebnou doménu pro některé chromosomální proteiny (MBD, methylated CpG binding domain). Tím je potlačována transkripce. Methylová skupina se přitom váže do polohy 5 cytosinového zbytku, vznikající 5-methylcytosin je deaminován snáze než nemethylovaná báze. To má za následek mutaci, protože produktem deaminace je thymin. Nadměrná methylační DNA tak vnáší do genomu i chaos a nestabilitu. Účinnými inhibitory DNA-methyltransferas jsou **5-azacytidin** a jeho 2'-deoxyderivát, **decitabin**, které byly zmíněny mezi antimetabolity pyrimidinových složek nukleových kyselin. Obě látky se používají k léčbě myelodysplastického syndromu, hematologického onemocnění, které často předchází leukemii, v několika dalších indikacích jsou zkoušeny v kombinaci s jinými protinádorovými léky. Klinicky jsou zkoušeny i **5,6-dihydro-5-azacytidin**, **5-fluor-2'-deoxycytidin**, **zebularin** a chemicky zcela odlišný **hydralazin**. Několik dalších nenukleosidických inhibitorů DNA-methyltransferas je testováno preklinicky.



Modifikací volných aminoskupin lysinu jsou ovlivňovány interakce histonů s DNA, ale i s faktory regulujícími replikaci a transkripci DNA a patrně i s enzymy podílejícími se na opravách a metabolismu DNA. Modifikace histonů ovlivňují také jejich stabilitu, protože na acylované aminoskupiny se nemůže navázat ubikvitin a tím je zablokována degradace histonů v proteasomech. Acetylace histonů nebo naopak odštěpením acetyl skupiny může tak být regulována řada buněčných procesů.

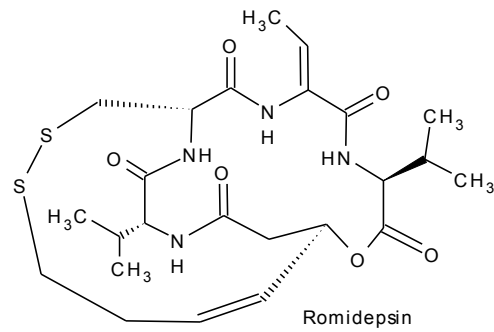
Odštěpení acetyl skupiny katalyzuje enzym histondeacetylasa (HDAC). HDAC je metaloprotein, který pro svoji aktivitu potřebuje zinek. Proto je inhibován látkami schopnými vytvářet cheláty, které mohou zinek vázat, především hydroxamovými kyselinami. Při některých nádorových onemocněních, zejména hematologických malignitách, je aktivita HDAC v nádorových buňkách zvýšena.

Inhibitory HDAC mohou růst nádorů brzdít a být tak využity v protinádorové terapii. Používají se především v kombinaci s jinými protinádorovými léčivy, jejichž účinek potencují. Jako první léčivo ze skupiny inhibitorů HDAC byl v říjnu 2006 povolen **vorinostat** (suberoylanilidhydroxamová kyselina, SAHA – Zolinza, Merck), a to pro terapii jednoho typu lymfomu. Jako další inhibitory HDAC jsou klinicky zkoušeny některé další hydroxamové kyseliny, jako je **panobinostat** a **belinostat**, 2-aminoanilidy substituovaných benzoových kyselin **mocetinostat** a **entinostat** a některé jiné chelatující látky. Entinostat je zkoušen mimo jiné i v kombinaci s 5-azacytidinem. Při léčbě nádorů plic měla tato kombinace dvou typů epigenetických léčiv přinést dokonce některá „dramatická zlepšení“ stavu pacientů.



HDAC lze však inhibovat i jinými mechanismy a zajímavé je, že účinnými inhibitory tohoto enzymu jsou i jednoduché mastné kyseliny – klinicky jsou zkoušeny **soli kyseliny máslé** a **valproové** (2-propylvalerová kyselina, valproát sodný se používá zejména k potlačování epileptických záchvatů).

Velmi účinným inhibitorem HDAC je depsipeptid **romidepsin** (Istodax, Fujisawa), produkt půdní bakterie *Chromobacterium violaceum*, který byl v listopadu 2009 povolen pro léčbu kožních lymfomů vycházejících z T-lymfocytů a je dále zkoušen v jiných onkologických indikacích.



Kontrolní otázky pro zopakování

1. Co to jsou antidota a detoxikující látky a proč se používají. Uveďte příklady.
2. Jaké podpůrné a pomocné léky se používají v protinádorové terapii a proč? Uveďte příklady.
3. Co to je mnohočetná léková rezistence a jak ji lze překonávat?
4. Co si představíte pod pojmem cílená terapie?
5. Co to jsou antiangiogenní látky?
6. Jak lze zablokovat přenos signálů k růstu a dělení buněk?
7. Jakou mají v buňce úlohu proteinkinasy a proč se jako protinádorové léky používají/zkouší jejich inhibitory?
8. Jakými léčivy lze regulovat buněčný cyklus?
9. Co to jsou telomery a jaký význam má jejich délka?
10. Co je telomerasa, jakou má úlohu v nádorových buňkách a jak ji lze inhibovat
11. Co je to apoptóza a čím je spouštěna?
12. Co je proteasom a proč mohou být inhibitory proteasomu protinádorovými léčivy?
13. Jak lze využít mechanismy opravy DNA k protinádorové léčbě?
14. Co jsou epigenetické změny, jaký význam mají pro růst nádorů a jak je možné jim zabránit?