

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2012**

**Hana Dvořáková**

**Univerzita Palackého v Olomouci  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Neziskové léky: Aktivita komplexu  
disulfiramů (antabusů) s mědí proti buněčné  
linii odvozené od karcinomu prsu**

**Bakalářská práce**

**Hana Dvořáková**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie  
Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2012**

**Vedoucí práce:  
Mgr. Boris Cvek, Ph.D.**

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně, pod vedením Mgr. Borise Cveka, Ph.D. a za pomoci Mgr. Jindřicha Sedláčka, s použitím níže citované literatury.

V Olomouci, dne.....

"Tato práce byla vypracována v rámci projektu OP VK CZ.1.07/2.3.00/20.0062. Levný lék antabus jako protinádorové léčivo: mechanismus účinku a klinické testy."

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala panu Mgr. Borisi Cvekovi, Ph.D. za odborné vedení při zpracování bakalářské práce a poskytnutí materiálů. Dále bych ráda poděkovala panu Mgr. Jindřichu Sedláčkovi za ochotu a pomoc při práci v laboratoři a za mnoho praktických rad.

## **Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora: Hana Dvořáková

Název práce: Neziskové léky: Aktivita komplexu disulfiramu (antabusu) s mědí proti buněčné linii odvozené od karcinomu prsu

Typ práce: Bakalářská práce

Pracoviště: Katedra genetiky a molekulární biologie, PřF UP, Olomouc

Vedoucí práce: Mgr. Boris Cvek, PhD.

Rok obhajoby práce: 2012

## **Anotace:**

Rakovina je celosvětovým tématem po mnoho let. V dnešní době již existují jisté možnosti, jak s ní bojovat. Metody léčby jsou ovšem nákladné a do zemí třetího světa se tato péče nedostává. Proto je třeba vyvíjet nová léčiva, která budou svou cenou dostupná i lidem v nejchudších zemích.

Jednou z možností je prozkoumávat staré, již patentované léky, a hledat jejich nové využití. Financování klinických testů pro látky, které již znovu nelze patentovat, je pro farmaceutické firmy nelukrativní. Finance by zde mohly být zajišťovány pomocí neziskových organizací jako je například Global Cures.

Mezi takovéto látky patří i antabus (disulfiram), lék původně určený k léčbě alkoholismu, který jak se zdá v komplexu s mědí působí proti řadě rakovinných nádorů, především pevných tumorů, jako je rakovina prsu. Komplex disulfiramu s mědí inhibuje multiproteinový komplex, proteazom, který má několik funkcí. Především likviduje, pomocí několika aktivních proteolytických míst, nepotřebné bílkoviny.

Při zastavení funkce proteazomu dochází ke zvyšování množství polyubikvitinovaných proteinů v buňce, což může způsobit zastavení buněčného cyklu a následnou apoptózu. Protože nádorové buňky se množí mnohem rychleji než buňky zdravé, jsou také mnohem více závislé na proteazomálním systému. Toto může být důvod, proč léčba bortezomibem zasahuje jen rychle se dělící nádorové buňky a nepůsobuje celkovou toxicitu.

Prvním protinádorovým lékem, který inhibičně působí na proteazom, je právě bortezomib. V dnešní době je povolený pro léčbu mnohočetného myelomu a lymfomu pláštěvých buněk.

Experimentální část bakalářské práce je zaměřena na měření cytotoxicity antabusu v komplexu s mědí u buněčných linií odvozených od rakoviny prsu. Použita byla rakovinná linie MCF-7.

**Bibliographical identification:**

Author's first name and surname: Hana Dvořáková

Title: Non-profit drugs: The activity of disulfiram-copper complex against a cell line derived from breast carcinoma

Type of thesis: Bachelor thesis

Department: Department of genetics and molecular biology, Palacky University, Olomouc

Supervisor: Mgr. Boris Cvek, PhD.

The year of presentation: 2012

**Summary:**

Cancer is an issue discussed all over the world. Nowadays, there are several possibilities how to fight it. Ways of cancer treatment are very expensive and thus they are not available in less developed countries. This is an argument for development of new drugs with low prices.

One of the solutions is finding and using old drugs for new application. However, this research is not lucrative for pharmaceutical companies because the old drugs cannot be patented again. The funding of clinical trials of these drugs could be provided by non-profit organizations – Global Cures.

Antabus (disulfiram), a drug originally used for treatment of alcoholism, is one of these drugs. Antabus in a complex with copper has an anticancer effect proved in several kinds of solid tumours, such as breast cancer. This complex of Antabus and copper inhibits proteasome, a multiprotein complex which has several functions. First of all, the proteasome degrades needless proteins using several active proteolytic parts.

The base of this anticancer treatment lies in the inhibition of the proteasome. When the proteasome function stops, the number of polyubiquitin proteins increases, which can arrest the cell cycle and cause the subsequent apoptosis. As the cancer cells proliferate faster, they are also more dependent on the proteasome system. It can be reason for selective death of rapidly dividing cancer cells.

The first treatment for cancer which inhibits the proteasome function is Bortezomib. Nowadays, this drug is used for treatment of multiple myeloma and mantle cell lymphoma.

The experimental part of this thesis focuses on measurement of cytotoxicity of antabus in complex with copper in breast cancer cells. MCF-7 cancer cell line will be used in this experiment.

# OBSAH

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>1.</b>  | <b>Úvod .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2.</b>  | <b>Výskyt rakoviny prsu v celosvětovém měřítku .....</b>               | <b>3</b>  |
| <b>3.</b>  | <b>Typy a odlišnosti u karcinomu prsu.....</b>                         | <b>4</b>  |
| 3.1.       | Časté typy karcinomu prsu .....  | 4         |
| 3.1.1.     | Duktální karcinom prsu .....   | 4         |
| 3.1.2.     | Lobulární karcinom.....  | 4         |
| 3.2.       | Neobvyklé typy karcinomu prsu .....                                    | 5         |
| 3.2.1.     | Zánětlivá rakovina prsu (IBC) .....                                    | 5         |
| 3.2.2.     | Pagetova choroba bradavky .....  | 5         |
| 3.2.3.     | Fyloidní nádor prsu .....  | 5         |
| 3.2.4.     | Karcinom prsu u mužů.....  | 5         |
| 3.3.       | Dědičné dispozice k rakovině prsu .....                                | 6         |
| 3.4.       | Fáze rozšíření nádoru prsu .....                                       | 6         |
| <b>4.</b>  | <b>Léčba a diagnostika .....</b>                                       | <b>7</b>  |
| 4.1.       | Tradiční přístup k léčbě rakoviny prsu .....                           | 7         |
| 4.2.       | Cílená terapie .....   | 7         |
| 4.3.       | Nový přístup k léčbě rakoviny.....                                     | 8         |
| <b>5.</b>  | <b>Proteazom a proteazomální degradace.....</b>                        | <b>9</b>  |
| 5.1.       | 20S proteazom .....  | 9         |
| 5.2.       | 19S proteazom .....  | 11        |
| 5.3.       | Chaperony .....  | 12        |
| <b>6.</b>  | <b>Ubikvitin - proteazomový systém .....</b>                           | <b>14</b> |
| <b>7.</b>  | <b>Nukleární faktor kappa B – NF-κB.....</b>                           | <b>16</b> |
| 7.1.       | NF-κB a rakovinné bujení.....  | 17        |
| <b>8.</b>  | <b>Bortezomib (velcade) .....</b>                                      | <b>19</b> |
| 8.1.       | Cesta k objevu protinádorových účinků bortezomibu .....                | 19        |
| 8.2.       | Klinické testy a povolení léku .....                                   | 20        |
| 8.3.       | Mechanismus účinku bortezomibu .....                                   | 22        |
| <b>9.</b>  | <b>Testování léčiv .....</b>   | <b>24</b> |
| 9.1.       | Preklinické studie.....  | 24        |
| 9.2.       | I.–III. fáze testování léčiv .....                                     | 24        |
| 9.3.       | Vstup léku na trh.....   | 25        |
| 9.4.       | Nový individuální přístup k léčbě rakoviny .....                       | 25        |
| 9.5.       | Koncept neziskových léků - problém starých léčiv pro nové využití..... | 26        |
| <b>10.</b> | <b>GlobalCures.....</b>  | <b>28</b> |
| <b>11.</b> | <b>Antabus .....</b>   | <b>29</b> |
| 11.1.      | Historie.....  | 29        |
| 11.2.      | Mechanismus účinku .....   | 30        |
| 11.3.      | Selektivita účinku .....   | 32        |
| 11.4.      | Cesta ke klinickým testům .....  | 33        |
| <b>12.</b> | <b>Cíl práce.....</b>  | <b>35</b> |
| <b>13.</b> | <b>Materiál.....</b>   | <b>36</b> |



|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 13.1.      | Nádorová linie.....   | 36        |
| 13.2.      | Chemikálie, média, roztoky .....  | 36        |
| 13.3.      | Přístrojové vybavení laboratoře .....                                     | 37        |
| 13.4.      | Plasty.....   | 38        |
| <b>14.</b> | <b>Pracovní postup.....</b>   | <b>39</b> |
| 14.1.      | Pasážování buněk.....   | 39        |
| 14.2.      | Počítání buněk.....   | 39        |
| 14.3.      | Vysazování buněk.....   | 39        |
| 14.4.      | Aplikace látek .....  | 40        |
| 14.5.      | MTT test .....  | 42        |
| 14.5.1.    | Princip MTT testu.....  | 42        |
| 14.6.      | Viabilita buněk.....  | 42        |
| 14.7.      | Rozmrazování buněk .....  | 42        |
| 14.8.      | Zamrazování buněk.....  | 43        |
| <b>15.</b> | <b>Výsledky.....</b>  | <b>44</b> |
| 15.1.      | Graficky znázorněné výsledky experimentů s látkou CuCl <sub>2</sub> ..... | 45        |
| 15.2.      | Graficky znázorněné výsledky experimentů s látkou ditiocarb.....          | 46        |
| 15.3.      | Graficky znázorněné výsledky experimentů s látkou bortezomib.....         | 47        |
| 15.4.      | Graficky znázorněné výsledky experimentů s CuEt.....                      | 48        |
| 15.5.      | Grafické srovnání hodnot IC50 pro bortezomib a CuEt.....                  | 49        |
| 15.6.      | Fotografie kultivovaných buněk .....                                      | 50        |
| <b>16.</b> | <b>Diskuse .....</b>  | <b>52</b> |
| <b>17.</b> | <b>Závěr .....</b>  | <b>55</b> |
| <b>18.</b> | <b>Literatura .....</b>   | <b>56</b> |
| <b>19.</b> | <b>Seznam použitých zkratk .....</b>                                      | <b>63</b> |

# 1. ÚVOD

Antabus (disulfiram) je látka objevená pro klinické užívání již před více než 50 lety. V té době se začala využívat jako lék nápomocný pro léčbu lidí závislých na alkoholu. Počátkem 21. století bylo zjištěno další možné využití tohoto léku, a to v onkologii.

Ve své bakalářské práci mám vytyčeny dva hlavní cíle. První z nich je cíl teoretický. S pomocí vědeckých článků se budu snažit shromáždit informace o vývoji, ale především současném stavu vědění o účincích antabusu u onkologických pacientů. Jak vyplývá z názvu mé bakalářské práce, zaměřovat se budu především na rakovinu prsu.

Aby byla dobře vysvětlena a správně pochopena problematika využití antabusu, na začátek mé práce zařadím stručné rozdělení rakovin prsu. Jelikož označení „rakovina prsu“ není konkrétním onemocněním, ale je ho třeba chápat spíše jako nadřazený pojem pro mnoho podtypů rakovin, které mají svůj původ v oblasti prsu. Dále bych ráda zmínila současně využívaný konzervativní přístup k léčbě, ale i moderní molekulární terapie, které jsou dnes již využívány.

V další části se budu zaměřovat na vysvětlení základních principů, na kterých antabus funguje, a to je inhibice proteazomální degradace a ovlivnění NF- $\kappa$ B dráhy.

Na principu proteazomální inhibice pracuje také lék velcade, což je první lék tohoto typu, který je již v klinice užíván pro některá hematoonkologická onemocnění. Právě z tohoto důvodu jej podrobněji zmíním v jedné z kapitol teoretického úseku.

Za velice důležité považuji zmínit ve své práci způsoby výzkumu a především financování nových léčiv. Proto se v několika kapitolách budu zabývat současným postupem při vývoji léčiv ale především také alternativou k tomuto tradičnímu přístupu. Touto alternativou je myšlenka, která se antabusu přímo dotýká. Objev nového vedlejšího pozitivního účinku antabusu byl náhodný. Záměrným přezkoumáváním léků by mohlo být objeveno mnohem více takovýchto neindikovaných přínosných účinků. Pozdější klinické testování takovýchto látek by bylo méně nákladné a probíhalo by mnohem rychleji.

V závěrečné nejdůležitější a nejobsáhlejší kapitole se budu snažit shrnout součastné informace o antabusu, které se týkají především výzkumu rakoviny.

Druhý stanovený cíl se týká praktické, experimentální části bakalářské práce. Zde jsem zkoumala toxickou aktivitu antabusu v komplexu s mědí na rakovinnou linii odvozenou od karcinomu prsu, konkrétně to byla linie MCF-7. Zároveň jsem zjišťovala toxicitu bortezomibu na MCF-7. Zjištěním dávkové závislosti a následným srovnáním aktivity těchto dvou inhibitorů u linie MCF-7 mohou být zjištěny souvislosti, které by mohly být přínosem pro další výzkum antabusu v komplexu s mědí. Ze zjištěných teoretických zdrojů předpokládám, že komplex antabusu s mědí by mohl být u karcinomu prsu účinnější při nižších koncentracích než bortezomib. Tento předpoklad vychází z toho, že bortezomib se zdá být účinný pouze u hematologických onemocnění, kdežto u antabusu se předpokládá účinnost u nádorů pevných.

## 2. VÝSKYT RAKOVINY PRSU V CELOSVĚTOVÉM MĚŘÍTKU

Rakovina prsu je v dnešní době druhé nejčastější nádorové onemocnění po rakovině plic. Data z roku 2002 uvádějí 1,15 miliónů nových případů za rok, z toho 400 tisíc úmrtí. Rozdíl ve výskytu mezi rozvinutými (636 000) a rozvojovými (514 000) zeměmi není příliš markantní. Výrazný rozdíl je v mortalitě, kdy v rozvinutých zemích umírá 27 % postižených, kdežto v rozvojových je to až 43 %. V tomto ohledu je potřeba se zamyslet, jakým způsobem snížit náklady na léčbu tak, aby mohla být poskytnuta i v chudých zemích bez fungující a dostupné sociální infrastruktury. Řešením tohoto problému by mohlo být využití starých léků pro nový účel.

Nejvíce nových případů karcinomu prsu je zaznamenáno v bohatých rozvinutých oblastech Severní Ameriky, západní a severní Evropy a Austrálie. Východní Evropa, kam patří také Česká republika, se řadí s 42 novými případy na 100 000 obyvatel za rok na 7 příčku z 21 světových oblastí.

Je třeba vyzvednout, že dlouhodobým trendem ve výskytu rakoviny prsu (i jiných rakovin) je snižování úmrtnosti pacientů.

Hlavní faktory pro vznik karcinomu jsou vedle genetické predispozice především reprodukční faktory, nadváha, alkohol, nedostatečná fyzická aktivita, nadměrný příjem hormonů a také strava [1,2,3].

### **3. TYPY A ODLIŠNOSTI U KARCINOMU PRSU**

#### **3.1. Časté typy karcinomu prsu**

Rakovina prsu se vyskytuje v několika typech podle lokalizace karcinomu a míry invazivity. Na základě zjištění přesné charakteristiky nádoru se stanovuje léčba.

##### **3.1.1. Duktální karcinom prsu**

Duktální karcinom in situ (DCIS) je častý typ rakoviny, který není invazivní, jinak řečeno nešíří se do okolních tkání. Napadeny jsou pouze mléčné kanálky. Nádory jsou obvykle nehmátelné, vytváří se kalcifikace, které jsou pozorovatelné na snímcích z mamografu.

V případě, že se nádorové buňky dostanou přes stěnu mléčných kanálků na její vnější stranu, jedná se o invazivní duktální karcinom. Toto nádorové onemocnění je taktéž velice časté. Projevuje se bolestivým otokem prsu, podrážděním kůže, výtokem z bradavek, zvětšením lymfatických uzlin. Nádor bývá hmatatelný.

Tento typ rakoviny má několik dalších podtypů, které nejsou příliš běžné. Tubulární karcinom prsu bývá velký do jednoho centimetru. Nádorové buňky jsou trubkovité a rostou pomalu. Medulární karcinom prsu je ve velikosti do 2 cm, abnormální buňky tvoří výrazně ohraničený solidní nádor. Další podtyp invazivního duktálního karcinomu je mucinózní karcinom prsu. Největší část tohoto nádoru je tvořena hlenem, který obklopuje nádorové buňky (hlen je produkován samotným tumorem). Rozměry nádoru jsou do 5 cm. Dále papilární karcinom či cribriformní nádor prsu, kde je napadena pojivová tkáň, tedy oblast mezi kanálky a lalůčky. V ložiscích jsou jasně pozorovatelné díry.

Všechny tyto typy se častěji vyskytují u starších žen, po menopauze. DCIS zvyšuje pravděpodobnost onemocnění jiným typem rakoviny prsu [4].

##### **3.1.2. Lobulární karcinom**

Lobulární karcinom in situ je neinvazivní forma nádoru, často není považována za pravý karcinom, ale za neoplasii (shluk abnormálních buněk). Toto nádorové onemocnění nevytváří kalcifikace, čímž se liší od ostatních typů. Abnormální nález v tomto případě nemusí být chirurgicky odstraněn, v mnoha případech nedojde k invazi do okolní tkáně.

Invazivní lobulární karcinom (ILC) je druhým nejčastějším typem karcinomu prsu, primárně je lokalizován v prsních lalůčkách (místo tvorby mateřského mléka). Nádorové buňky bývají rozšířeny v okolní prsní tkáni a napadeny bývají i axilární (podpažní) lymfatické žlázy. Buňky ILC jsou malé, vzájemně si podobné a typické je jejich pomalé šíření do tkáně v okolí lalůček. Karcinom má také několik podtypů, které se od základního typu liší tvarem abnormálních buněk nebo způsobem rozšiřování [5].

## **3.2. Neobvyklé typy karcinomu prsu**

### **3.2.1. Zánětlivá rakovina prsu (IBC)**

Zánětlivý karcinom prsu je neobvyklý agresivní typ rakoviny. Od předchozích typů, u kterých bývá rakovina zjištěna mamografem dříve, než se objeví viditelné příznaky, se IBC liší rychlým nástupem, dochází k nárazovému zarudnutí a otoku prsu. Tyto náhlé změny nastávají v důsledku ucpání lymfatických cév nádorovými buňkami [6].

### **3.2.2. Pagetova choroba bradavky**

Nádorové onemocnění bradavky je velice vzácné a bývá často spojeno s nádorovým postižením jiné části prsu. Bradavka bývá bolestivá, zarudlá a její povrch bývá změněn [7].

### **3.2.3. Fyloidní nádor prsu**

Název odvozený z řeckého slova a vystihuje listový charakteru nádoru. Je to raritní typ rakoviny, může být jak benigní tak i maligní. Typický je velice rychlý růst, rozšíření nádorových buněk mimo prs je neobvyklé [8].

### **3.2.4. Karcinom prsu u mužů**

Rakovina prsu není pouze onemocnění žen. V malém, ale stále se zvyšujícím počtu se projevuje i u mužů. Je známo několik faktorů, které přispívají k onemocnění. Stejně jako u žen to je vysoký věk, dále vysoká hladina estrogenu, která může být způsobena onemocněním jater, hormonální léčbou nebo také obezitou, genetická porucha zvaná Klinefelterův syndrom, dědičnost (především abnormální BRCA1 a BRCA2) a dřívější vystavení radiační terapii [9].

### 3.3. Dědičné dispozice k rakovině prsu

Nejčastější dispozicí pro rakovinu prsu jsou mutace v genech BRCA1 a BRCA2. Oba geny v nepoškozené podobě fungují jako rakovinné supresorové geny. Bílkovina, kterou kódují, opravuje poškozenou DNA. Pro vývoj rakoviny je potřeba dvou poškozených alel, jedna poškozená alela ovšem také zvyšuje predispozici k této rakovině. Ženy, které mají mutaci v BRCA1 nebo BRCA2 mají až o 85% vyšší pravděpodobnost, že u nich rakovina prsu propukne. Mutace v těchto genech zvyšuje také pravděpodobnost pro rakovinu vaječníků. Tumory vzniklé na základě genetické predispozice mají větší rozměry, vykazují malou diferenciaci a vysokou proliferaci a často bývají negativní na estrogení a progesteronové receptory [10].

### 3.4. Fáze rozšíření nádoru prsu

Podle rozšíření rakovinných buněk do okolní tkáně a podle velikosti nádoru se karcinomy prsu dělí takto:

Fáze 0: Nádorové buňky jsou jen v místě původu, nešíří se do okolní zdravé tkáně.

Fáze 1: Nádorové buňky jsou rozšířeny i v tkáni kolem původního místa rozšíření (tumor není větší než 2 cm), nejsou napadeny lymfatické uzliny.

Fáze 2: IIA: Nádor není větší než 2 cm, napadeny jsou lymfatické uzliny (lu). Nádor je větší než 2 cm, lu nejsou napadeny.

IIB: Nádor je 2-5 cm velký, rozšířen do lu. Nádor je větší než 2cm, lu nepoškozeny.

Fáze 3: IIIA: Napadeny jsou pouze lymfatické uzliny v podpaží a případně uzliny blízko hrudní kosti. Nádor má velikost 5 cm (může být i větší), struktura napadených uzlin je pozměněna.

IIIB: Napadena je i hrudní stěna, dochází k zánětlivým reakcím.

IIIC: Nádor nemusí být přímo v prsu (případně může být jakkoli veliký), rozšířen může být na hrudní stěnu či kůži prsu, zasažena je oblast kolem klíční kosti, nádorové buňky mohou být i v lymfatických uzlinách v podpaží a poblíž hrudní kosti

Fáze 4: Nádor je rozšířen i do jiných orgánů, metastazuje [11,12].

## **4. LÉČBA A DIAGNOSTIKA**

### **4.1. Tradiční přístup k léčbě rakoviny prsu**

Podle předchozích (kapitola 3) a dalších charakteristik je určena léčba, ta je často invazivní a má vliv na běžný život pacienta. Hlavní faktory pro navržení léčby jsou fáze rozšíření nádoru, lymfo-vaskulární šíření, histologický stupeň rozšíření, přítomnost hormonálních receptorů, HER2/Neu overexprese, menopausální status a věk.

Pro diagnózu se využívá především mamografický screening, ultrazvuk a magnetická rezonance. Nález bývá potvrzen biopsií sledované tkáně.

Chirurgické odstranění celého prsu postiženého nádorem se nazývá masektomie. Při lumpektomii je odstraněn pouze nádor, případně nádor společně s podpažními (axilárními) lymfatickými uzlinami.

Po chirurgickém zákroku, kdy byl tumor větší než 1 cm, nebo byly abnormální buňky zachyceny v lymfatických uzlinách, jsou pacienti léčeni chemoterapií. Negativním účinkem látek užívaných k chemoterapii je, že neničí pouze nádorové buňky, ale i rychle se rozmnožující zdravé buňky, jako jsou buňky vlasových kořínků, krevní buňky a buňky trávicího traktu.

Pacient také podstupuje radioterapii. Ozařováno bývá jen postižené místo, tedy oblast vyoperovaného nádoru, nebo celý prs. V praxi se nejčastěji využívá externí ozařování, méně užívaná je interní metoda ozařování [11,12].

### **4.2. Cílená terapie**

75% všech nádorů prsu vykazuje přítomnost receptorů pro estrogen - ER pozitivní (případně také progesteron - PR pozitivní). Navázání hormonu na receptor zapříčiní expresi genů a následný buněčný růst. U ER pozitivních pacientů je možné užít selektivní modulátory estrogenních receptorů (Tamoxifen), které se váží na receptory a tím blokuje signální dráhu. Také se využívají aromatázové inhibitory zabraňující přímo tvorbě hormonu [13].

Zkoumá se také, zda je nádor pozitivní na HER2/Neu receptory (20% případů), což jsou receptory zachycující signály růstových faktorů. Zjistí-li se, že je pacient HER2-pozitivní, mohou být nasazeny monoklonální protilátky, které váží HER2/Neu



receptory (Herceptin), a tím brání navázání růstového faktoru a následnému nekontrolovatelnému růstu tumoru [14].

U agresivních trojitě-negativních rakovin (negativní na HER2/neu, estrogení i progesteronové receptory) je možné použít PARP inhibitory (PARP proteiny zprostředkovávají opravy poškozené DNA), které brání opravě poškozené DNA po chemoterapii u buněk v tumorech, což způsobí apoptózu [15].

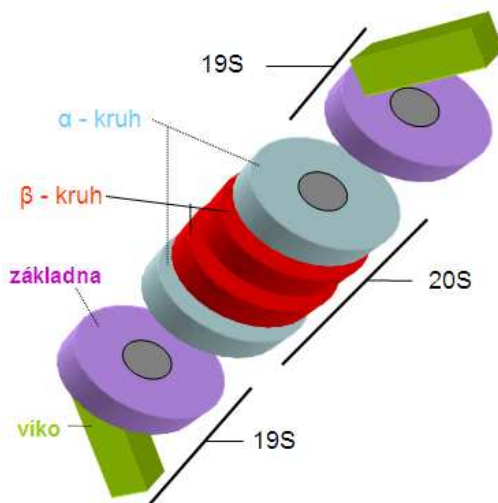
### **4.3. Nový přístup k léčbě rakoviny**

Novým úspěšným přístupem k léčbě rakoviny by mohlo být užití inhibitorů proteazomu. Prvním inhibitorem tohoto typu je bortezomib. Nezdá se, že by tento lék měl pozitivní vliv při léčbě rakoviny prsu [16]. Převratem v léčbě karcinomu prsu by se mohl stát antabus (tetraethylthiuram disulfid, disulfiram) v komplexu s kovem, který je již v 2. fázi klinických testů a předpokládá se u něj pozitivní účinek při léčbě prsních a jiných pevných nádorů [17].

## 5. PROTEAZOM A PROTEAZOMÁLNÍ DEGRADACE

26S proteazom je proteinový komplex o hmotnosti 2,5 MDa.[18] Jeho průměrná délka, v případě přítomnosti obou 19S regulačních částí, je 45 nm a šířka 20 nm. Komplex se nachází jak v cytoplazmě, tak i v nukleoplazmě. 26S proteazom je tvořen dvěma základními podjednotkami, a to 20S proteazomem, tedy centrální částí, a 19S proteazomem, což je regulační část [19]. Jak vyplývá z článku Bedford et al., 26S komplex má asymetrickou strukturu, a to v místě nasedání hexamerického Rpt-kruhu (báze) na heptamerickou  $\alpha$ -podjednotku centrální části. Hlavní jednotky proteazomu jsou popisovány pomocí Svedbergova sedimentačního koeficientu (S) [20].

Obrázek 1: Proteolytický komplex – 26S proteazom. Skládá se ze dvou částí 19S regulační část rozpoznávající ubiquitinované proteiny, které se štěpí v 20S katalytické části [24].



### 5.1. 20S proteazom

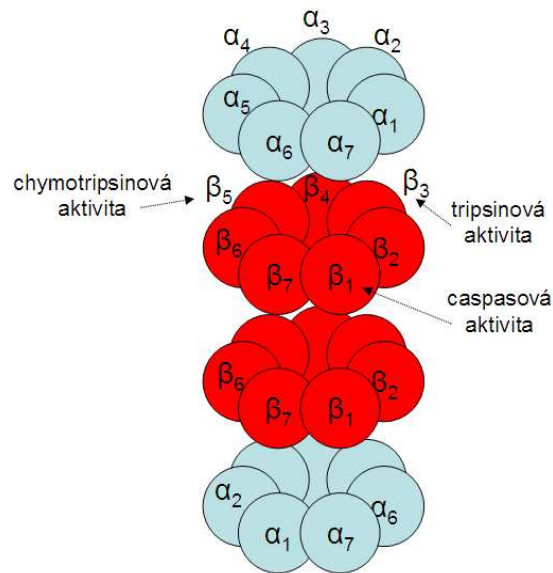
20S centrální katalytická část má na každém konci (v některých případech jen na jednom z konců) připojeno 19S regulační víko [18,21]. Molekulová hmotnost 20S proteazomu je 0,7 MDa [22], tvar se popisuje jako barelovitý či cylindrický. Tvoří jej čtyři hexamerické kruhy. Dva vnější  $\alpha$ -kruhy a dva vnitřní  $\beta$ -kruhy, které jsou dále složeny z několika vlastních podjednotek [18]. Celkem barel tvoří dvě kopie 14 různých proteinů. Strukturu  $\alpha$ -kruhu vytváří 7 proteinů,  $\alpha$ 1-7,  $\beta$ -kruh je rovněž složen ze 7 podjednotek, a to  $\beta$ 1-7 [22,23]. Podjednotky  $\alpha$  i  $\beta$  mají totožné čtyřvrstvé strukturní

složení, dva antiparalelní  $\beta$ -listy jsou z každé strany obklopeny  $\alpha$ -helixovou strukturou [24].

$\alpha$ -kruhy jsou více konzervativní než  $\beta$ -kruhy a fungují jako vstupní brána pro substrát určený k degradaci [25]. Vstup do centrální části je bráněn N-terminálními ocásky každé  $\alpha$  (1-7) podjednotky, které směřují dovnitř kruhu [24]. Vstupní kanál je 13 Å široký a substrát ve své terciární struktuře tímto úzkým pórem neprojde, proto je před vlastní degradací v katalytické jednotce rozpleten pomocí víka (19S proteazom) do jednoduššího řetězce [23].

V  $\beta$ -části 20S proteazomu probíhá vlastní degradace. Jsou zde obsažena tři různá katalyticky aktivní místa [26]. Dvě  $\beta_5$  podjednotky s chymotrypsinovou aktivitou hydrolyzují peptidovou vazbu v místě hydrofobního aminokyselinového zbytku. Dvě  $\beta_2$  podjednotky s trypsinovou aktivitou hydrolyzují peptidovou vazbu v místě kladně nabitě aminokyseliny a naposledy dvě  $\beta_1$  podjednotky s kaspasovou aktivitou degradují vazby mezi negativně nabitými aminokyselinami. Existují zde další dvě katalytická centra, první z nich štěpí rozvětvené řetězce aminokyselinových zbytků, druhé přerušuje vazbu u malých nenabitých molekul [27].

Obrázek 2: 20S proteazom, katalytická část štěpící ubiquitinované proteiny.  $\beta_1$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_5$  jsou aktivní proteolytická místa [20].



Centrální katalytická část rozštípe proteiny na oligopeptidy, které mohou být dopraveny do endoplazmatického retikula, vážou MHC I a stávají se z nich antigeny, nebo jsou využity k syntéze nových proteinů. V některých případech nedochází k úplné

degradaci, ale pouze k úpravě proteinu. Tato částečná degradace funguje například u NF- $\kappa$ B dráhy [17].

## 5.2. 19S proteazom

Součástí 19S proteazomu je báze (base), spojující víko a  $\alpha$ -kruh, a samotné víko proteazomu. 19S proteazom je část, která rozpoznává ubikvitinem (ubikvitin proteazomální systém viz kapitola 6) označené proteiny určené k degradaci [28], také stimuluje otvírání  $\alpha$ -kruhu jakožto vstupní brány, dále rozplétá terciární strukturu substrátu a napomáhá jeho translokaci [18].

Molekulová hmotnost je rovna 0,9 MDa. Podle studie Sharon M. et al. (2006) je každá 19S regulační část složena z devatenácti odlišných proteinů. Podjednotky jsou popisovány savčí (S) nebo *S.cerevisiae* (Rp) nomenklaturou.

Základnu tvoří šest podjednotek s ATPasovou aktivitou, a to S7/Rpt1, S4/Rpt2, S6/Rpt3, S10b/Rpt4, S6'/Rpt5 a S8/Rpt6, a čtyři neATPasové podjednotky S1/Rpn2, S2/Rpn1, S5a/Rpn10 a Rpn13. Každá z ATPas obsahuje AAA doménu (ATPasa asociovaná s různými aktivitami), tvoří hexamerní kruh, který slouží k rozpletení substrátů a k otevření kanálu do 20S proteazom [19,21].

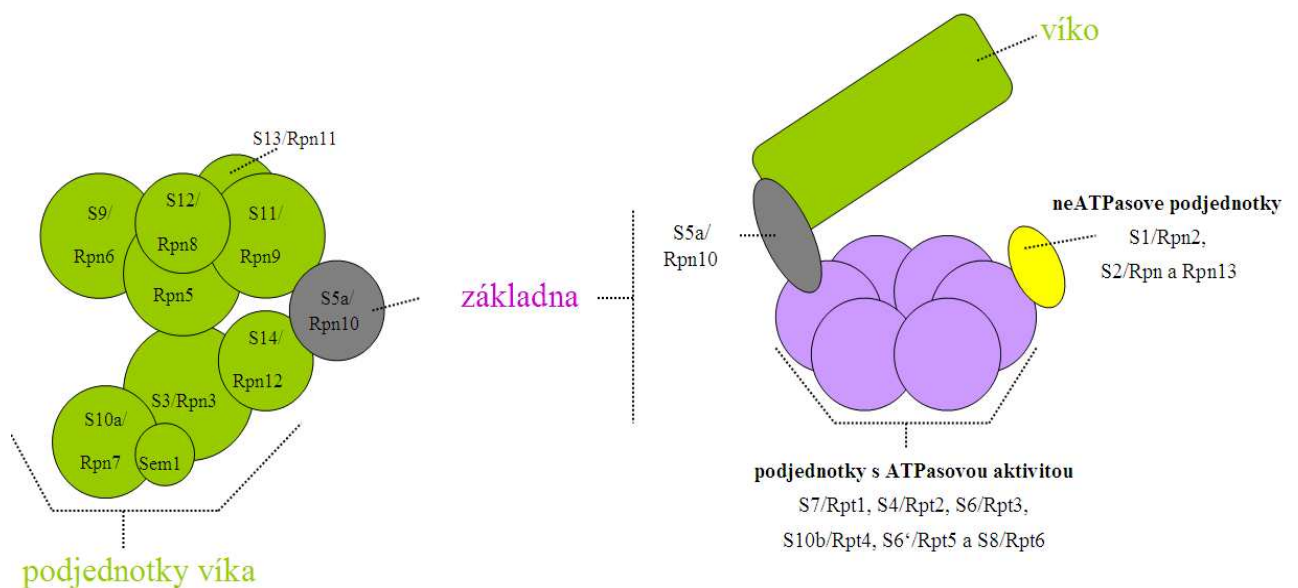
Protein S5a/Rpn10 slouží jako spojka mezi základnou a víkem. Je také pravděpodobné, že hraje roli v rozpoznávání polyubikvitinového řetězce či v jeho navázání. Podjednotka S6'/Rpt5 váže polyubikvitinový řetězec k proteazomu [29]. Část S4/Rpt2 je zodpovědná za konformaci N-terminálních ocásků (na podjednotkách  $\alpha$ -kruhu) a vstup substrátu. Svou roli v tomto procesu hrají i podjednotky S4/Rpt2, S6/Rpt3 a S6'/Rpt5, které obsahují HbYX motiv, nezbytný pro otevření brány. Jednotky S7/Rpt1, S10b/Rpt4 a S8/Rpt6 vážou chaperony (kapitola 5.3) [24].

Komplex víka vytváří devět podjednotek, S3/Rpn3, Rpn5, S9/Rpn6, S10a/Rpn7, S11/Rpn9, S12/Rpn8, S13/Rpn11/Poh1, S14/Rpn12 a Sem1 [21]. Prvních pět zmíněných podjednotek (S3/Rpn3, Rpn5, S9/Rpn6, S10a/Rpn7, S11/Rpn9) obsahují v C-terminální části doménu PINT/PCI. U proteinů S13/Rpn11/Poh1 se vyskytuje v N-terminální oblasti JAMM (JAB1/MPN/Mov34 metaloenzym) doména [30]. Přesná organizace víka byla objasněna ve studii Lander et al. publikované teprve počátkem roku 2012.[31] Na obrázku 3 uvádím strukturu uveřejněnou v roce 2006 (Sharon M. et al.)[21].

Podjednotka Rpn11, neboli Poh1, je zapojena do procesu deubikvitinace [21,29], je metaloproteinázový enzym závislý na  $Zn^{2+}$  a jak vyplývá ze studie Cvek *et al.*, (2008) mohla by být právě tato podjednotka víka cílem komplexu disulfiramu s kovem [17]. Zdá se, že podjednotka Rpn6 by mohla sloužit jako kontrolní protein, který se odděluje po navázání substrátu, aby došlo k odkrytí aktivního místa Rpn11, také pravděpodobně funguje jako kontrolní jednotka při maturaci víka, která odkrývá aktivní místa až po jeho úplném poskládání [21]. Přesné funkce zbylých podjednotek byly rovněž popsány ve studii Lander *et al.* publikované v roce 2012 [31].

Struktura popsaná výše je proteazom eukaryotických organismů. Prokaryotické buňky také obsahují proteazomy, ovšem hexametrické kruhy jsou tvořeny totožnými proteiny  $\alpha$  a  $\beta$ , tudíž specifická degradace je menší [24].

Obrázek 3: 19S proteazom, podjednotky základny a víka [21].



### 5.3. Chaperony

Celý multikomplex 26S proteazomu je poskládán nejméně z 66 proteinů. Aby došlo ke správnému složení multiproteinové jednotky, je potřeba proteinů, které tomuto procesu napomůžou [20]. Zapojené jsou maturační faktory, jako například ubikvitin maturační protein [24], a molekuly zvané chaperony. Článek Bedford *et al.* říká, že takovýchto asistenčních molekul je nejméně devět. Pro formaci centrální části je

využito pět z nich, pro 19S část pak čtyři. Jejich názvosloví je taktéž dvojí, buďto podle *Saccharomyces c.* (Pba1-4, Ump1, Hsm3, Nas2, Nas6, Rpn14) nebo nomenklatura dle *Homo sapiens* (PAC1-4, UMP1, S5b, P27, Gankirin a PAAF1) [20].

PAC1-PAC2 a PAC3-PAC4 komplexy se podílejí na poskládání  $\alpha$  části. Hsm3, Nas2, Nas6, Rpn14 proteiny jsou faktory účastnící se složení základny. Ke kompletaci víka slouží faktory (eIF)3 a (COP)9. Chaperony se uplatňují pouze u eukaryot, prokaryotické podjednotky se skládají bez pomoci [24].

## 6. UBIKVITIN - PROTEAZOMOVÝ SYSTÉM

Tento systém je hlavním buněčným mechanismem pro regulaci degradace proteinů a zároveň je nezbytný pro regulaci buněčného cyklu. Konečným akceptorem ubikvitinovaných proteinů je proteazom [20].

Ubikvitin (ub) je protein složený ze 76 aminokyselin. Je kovalentně vázán k proteinu, který má být degradován v proteazomu, tedy slouží jako signální molekula pro degradaci. Vazba je realizována mezi koncovým karboxylem glycinu na ubikvitinu a  $\epsilon$ -aminoskupinou lysinu u označovaného proteinu [25].

Na ubikvitinaci se podílejí 3 skupiny enzymů, a to E1, E2 a E3. Savčí ubikvitinační systém zahrnuje jen několik málo E1 enzymů a okolo 50 E2 enzymů. Naproti tomu genů kódujících E3 enzymy jsou stovky. Právě toto množství rozmanitých E3 ligáz zajišťuje substrátovou specificitu UPS [27].

Ubikvitin je aktivován za pomoci molekuly ATP a E1 aktivačního enzymu [25]. Energie uvolněná hydrolyzou ATP na AMP je užita na tvorbu ubikvitin-E1 thiol esteru [19]. Enzym E2 funguje jako přenašeč aktivované molekuly ubikvitin-E1 thiol esteru na protein, který má být zničen. E3 ligáza je enzym zodpovědný za poslední krok ubikvitinace. Rozpoznává protein určený k degradaci a zajišťuje jeho specifické navázání na aktivovaný ubikvitin [25]. Poté dochází k dalšímu navázání ubikvitinových molekul, vzniká polyubikvitinový řetězec, který je tvořen nejméně čtyřmi molekulami [27]. Vazba je vytvořena mezi Gly76 jednoho ub a Lys48 druhého ub. Tento krok také vyžaduje hydrolyzu ATP. Ub obsahují i jiné lyzinové zbytky, a to Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33 a Lys63. Při navázání těchto Lys v ub řetězci, je protein určen k jinému procesu než k degradaci v proteazomu, např. k DNA reparaci [16,27].

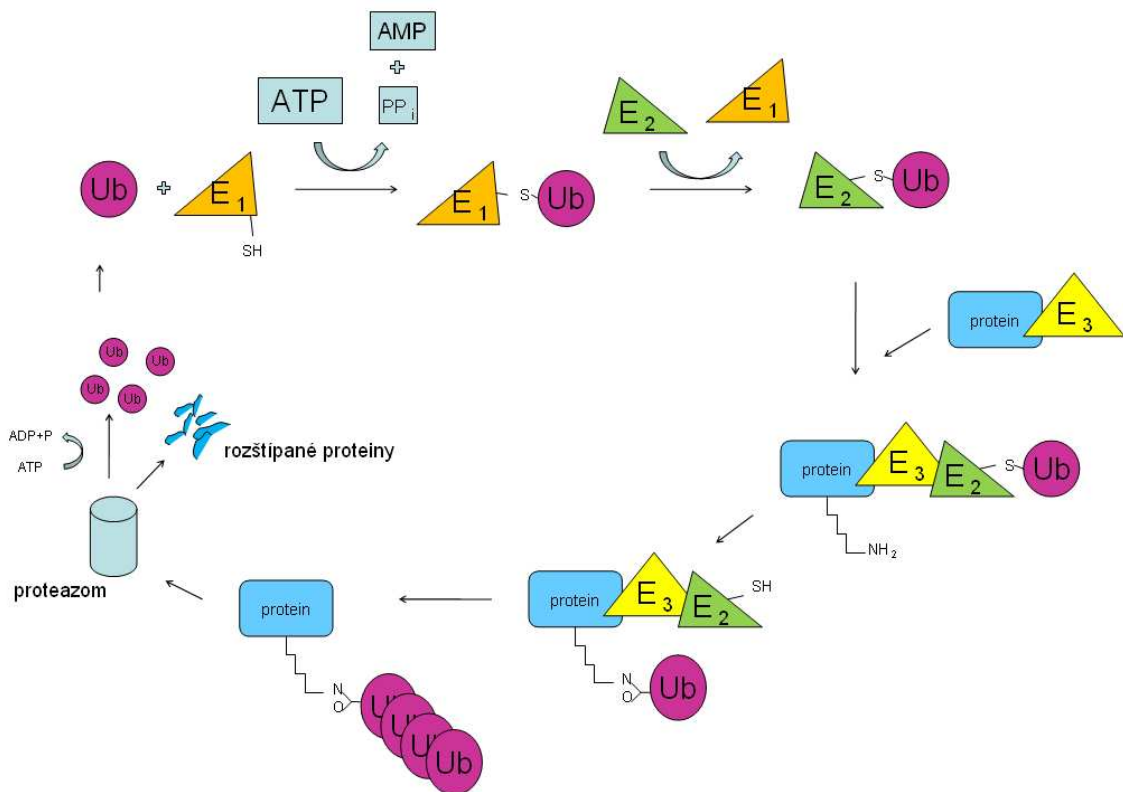
Označený protein je navázán k víku 19S jednotky. Před jeho vstupem do proteazomu je potřeba odstranit polyubikvitinové značení. To se děje pomocí metaloproteinázy (JAMM domény), která přerušuje vazbu mezi polyubikvitinovým řetězcem a substrátem a pomocí cystein proteáz, které štěpí vazby v samotném polyubikvitinovém řetězci [25]. Tyto deubikvitinázy jsou děleny do dvou skupin, UCH (ubikvitin COOH-terminální hydrolasy) a USP (nebo také UBP, ubikvitin-specifické proteasy). UCH jsou malé molekuly štěpící ubikvitiny na krátké řetězce. USP jsou enzymy, které degradují vazbu jak mezi ub a substrátem, tak i mezi přilehajícími ub. Obě tyto skupiny deubikvitinačních enzymů obsahují katalytickou triádu aminokyselin

Cys, His a Asp, UCH pak navíc Glu zbytek [27]. Za deubikvitinaci je odpovědná část víka Rpn11, známá jako Poh1 (tato podjednotka obsahuje právě JAMM doménu) [29]. Dále je potřeba, aby substrát byl rozpleten ze své terciální struktury, za tento proces zodpovídá ATPázová část základny 19S proteazom [18].

Za objev UPS byla Aaronu Ciechanoverovi, Avramu Herákovvi a Irwinu Rosovi v roce 2004 udělena Nobelova cena za chemii [32].

Jak můžeme vyvodit ze struktury proteazomu (kapitola 5) a systému UPS, při aplikaci inhibitoru proteazomu (bortezomib, ditiocarb) nedochází k degradaci proteinů. Množení ubikvitinovaných proteinů v buňce ovlivňuje buněčný cyklus a nejrůznější signální dráhy napojené na proteazom. Mezi dráhy ovlivněné proteazomální inhibicí patří také NF- $\kappa$ B dráha [33].

Obrázek 4: Schéma ubikvitin-proteazomálního systému, mechanismus označování proteinů určených k degradaci v proteazom [25].





## 7. NUKLEÁRNÍ FAKTOR KAPPA B – NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B je rodina transkripčních faktorů, které se vyskytují ve všech buňkách v mnoha organismech a zprostředkovávají transkripci více než 180 genů. Zasahují do regulace procesů imunitního systému, apoptózy a proliferace [34]. Chybný průběh dráhy vede k nejrůznějším onemocněním jako revmatická artritida, Crohnova choroba a především rakovina. Nepřiměřená regulace NF- $\kappa$ B v nádorových buňkách způsobuje jejich proliferaci, růst tumoru, rozšíření metastáz a chemorezistenci [35].

Jsou známy dva signální mechanismy, které vedou k aktivaci NF- $\kappa$ B - kanonická neboli klasická a nekanonická, alternativní dráha. Této biologické dráhy se účastní množství transkripčních faktorů (nejběžněji se vyskytující členové NF $\kappa$ B u savců jsou uvedeny v tabulce 1) [36].

Proteiny se nachází v cytoplazmě jako neaktivní dimery (nejběžnější heterodimer je RelA:p50). V klasické dráze blokuje aktivitu dimeru jejich spojení s inhibítoem NF $\kappa$ B (I $\kappa$ B) [36]. V alternativní dráze není dimer spojen s inhibítoem jako v klasické, ale nachází se zde spojený prekurzorový protein, který se stává aktivní až po úpravě v proteazomu. Často vyskytující se dimer je p100:RelB[34].

Za aktivaci NF $\kappa$ B jsou zodpovědné různé stimuly jako cytokiny TNF- $\alpha$ , IL-1, imunitní stres (bakteriální, virové infekce), růstové faktory (insulin), buněčný stres (UV záření, znečištění ovzduší) či chemoterapeutika [34,37]. Příchozí signální molekuly aktivují komplex inhibitor- $\kappa$ B kinázu (IKK), která (v kanonické dráze) fosforyluje I $\kappa$ B. Součástí IKK jsou katalytické podjednotky  $\alpha$  a  $\beta$  a dvě molekuly NEMO (NF- $\kappa$ B essential modulator). Fosforylace I $\kappa$ B indukuje jeho degradaci v proteazomu a tím i uvolnění a aktivaci dimeru [36]. V nekanonické dráze dochází přímo k fosforylaci dimeru, který putuje do proteazomu. Zde je p100 posttranskripčně upraven v oblasti C-konce, vznikající p52 protein váže např. RelB [38].

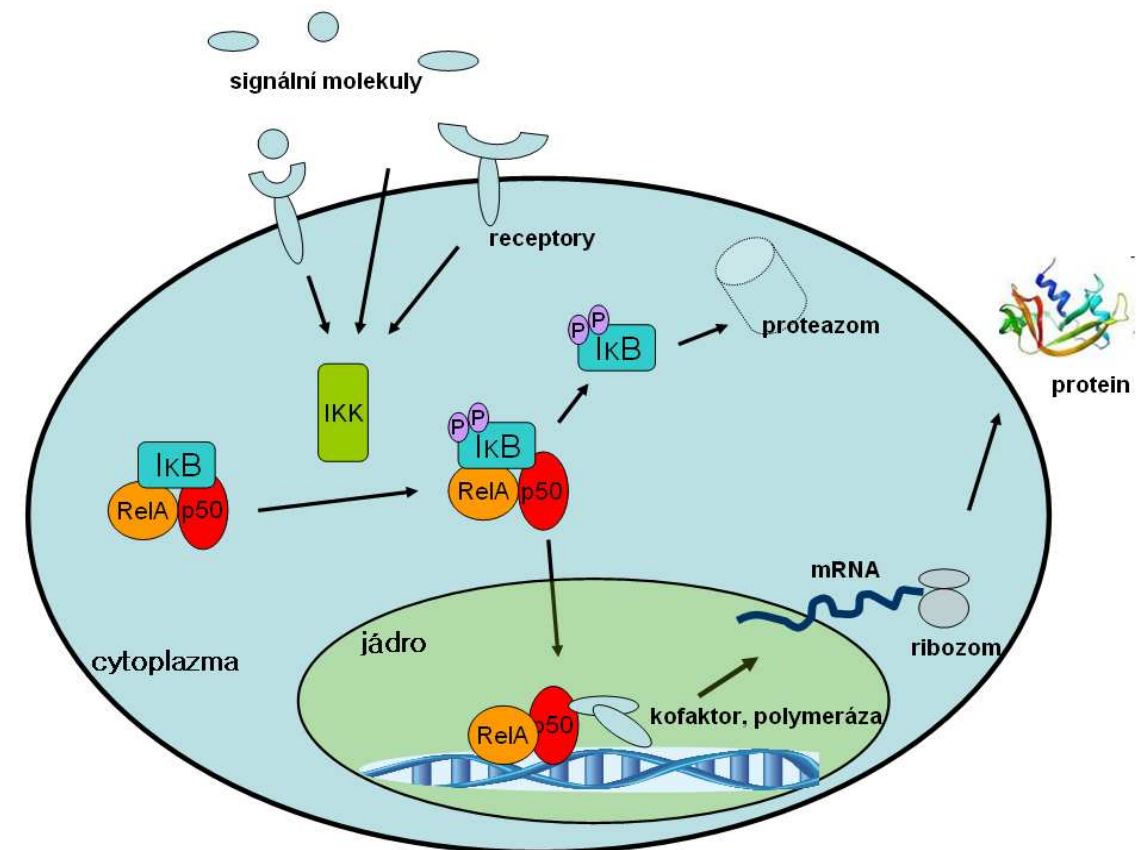
Aktivní dimer přechází do jádra a společně s dalšími transkripčními faktory se váže v místě počátku transkripce. Různé kombinace heterodimeru a homodimeru zajišťují specifitu dráhy [39].

Každý člen z rodiny NF- $\kappa$ B transkripčních faktorů obsahuje na N-konci konzervativní RHD (Rel homology domain) doménu dlouhou 300 aminokyselin [38], která zodpovídá za DNA navázání, interakci s I $\kappa$ B a dimerizaci.[36] Transaktivací

doménu (TAD) na C-konci obsahují jen jednotky RelA, RelB. Doména zprostředkovává vazebnou interakci s dalšími transkripčními faktory (př. TATA vazebný protein). Proteiny p50 a p52 tuto doménu neobsahují, proto vytvářejí heterodimery s Rel proteiny. C-terminální oblast členů Rel skupiny je delší oproti skupině NF- $\kappa$ B, obsahuje mnoho ankyrinových repetec. Tyto repetice Rel proteiny inhibují. Sestřih na C-konci protein aktivuje [39]. Homodimery (př. p52:p52) fungují jako represory genové transkripce [38].

Mezi geny, u nichž je transkripce ovlivněna NF- $\kappa$ B signální dráhou, patří například cytokiny (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6), enzymy pro stresovou odpověď (COX2, NO), anti-apoptotické proteiny (proteiny z rodiny Bcl-2) [33].

Obrázek 5: Schéma aktivace klasické NF- $\kappa$ B dráhy [36].



## 7.1. NF- $\kappa$ B a rakovinné bujení

Aktivace NF- $\kappa$ B v nádorových buňkách podporuje angiogenezi, vznik metastáz, zabraňuje apoptóze a podporuje jejich proliferaci. Nádorové linie, ve kterých je

NF- $\kappa$ B dráha stále aktivní, jsou rezistentní k mnoha chemoterapeutikům. Z těchto důvodů se považuje NF- $\kappa$ B za vhodný cíl protinádorové léčby. Expresí genů odpovídajících za angiogenezi, jako VEGF, TNF, MCP-1, jsou pod kontrolou NF- $\kappa$ B. Také proteiny napomáhající prostupu cévami, a tak i vzniku metastáz (MMP2 a MMP9), kontroluje NF- $\kappa$ B dráha. Inhibice transkripce těchto a dalších genů je možný způsob pro léčbu rakoviny [34,40].

Do dnešních dnů již bylo použito několik strategií k pozastavení aktivity NF- $\kappa$ B. Lze zabránit navázání transkripčních faktorů NF- $\kappa$ B k DNA či jejich translokaci do jádra, blokovat fosforylaci nebo proteazom [34].

U prsních nádorů byla prokázána nepřetržitá aktivace NF- $\kappa$ B v estrogenních receptorech u 89% případů. Vysoká hladina NF- $\kappa$ B proteinů v tumorech souvisí s chybnou expresí či amplifikací genů [41]. Zvýšená exprese u rakoviny prsu byla zaznamenána u genů *nfkbl* a *nfk2*, což souvisí s nálezem zvýšené hladiny proteinu p50 a p52 v transformovaných buňkách [42]. Velice vysoká aktivita NF- $\kappa$ B byla zaznamenána u nádorových buněk rezistentních k běžným chemoterapeutikům [43].

Látka disulfiram (antabus) byla identifikována jako inhibitor proteazomální aktivity, tedy ovlivňuje i průběh NF- $\kappa$ B dráhy (jak již bylo řečeno, RelA a I $\kappa$ B jsou závislé na funkčním proteazomu). Inhibicí NF- $\kappa$ B dráhy je narušena exprese genů, jejichž produkty jsou nezbytné pro přežití nádoru [44]. Zajímavým faktem je, že lék Bortezomib naopak NF- $\kappa$ B dráhu aktivuje [45,46].

Tabulka 1: Nejčastěji se vyskytující proteiny v NF- $\kappa$ B dráze [36].

| Skupina        | Protein        | Prekurzor→       | Gen   |
|----------------|----------------|------------------|-------|
| Rel            | NF $\kappa$ B1 | p105 (105kD)→p50 | NFKB1 |
|                | NF $\kappa$ B2 | p100 (100kD)→p52 | NFKB2 |
| NF- $\kappa$ B | RelA           | p65              | RELA  |
|                | RelB           |                  | RELB  |

## 8. BORTEZOMIB (VELCADE)

Bortezomib je první inhibitor proteazomu používaný v klinické praxi, povolený FDA pro léčbu mnohočetného myelomu[47] a lymfomu pláštěvých buněk [48]. Cesta k jeho objevu nebyla přímá a původní záměr se netýkal rakoviny.

### 8.1. Cesta k objevu protinádorových účinků bortezomibu

Na základě mohutného rozvoje ve výzkumu proteazomu přišel Alfred Goldberg s myšlenkou, že v onemocněních jako jsou svalová dystrofie (nejnižší stupeň regrese), AIDS či TBC, kde dochází k úbytku svalové hmoty na základě nadměrné funkce UPS, by inhibice proteazomální funkce mohla být řešením.

V roce 1993 založil Goldberg společnost MyoGenics, která měla za cíl objevit látku, jež by byla inhibitorem proteazomu a nástrojem k léčbě svalové atrofie. První inhibitor - MG132 se stal nástrojem mnoha vědců pro zkoumání funkcí proteazomu, pro léčbu ovšem nebyl vhodný z důvodu nízké specificity. Jedním z nových objevů bylo zjištění role proteazomu v prezentaci antigenů u lymfocytů, dalším klíčovým objevem se stalo spojení NF- $\kappa$ B funkce s proteazomem přes proteazomální degradaci I $\kappa$ B [49].

Myšlenka, že inhibice proteazomu inaktivuje NF- $\kappa$ B a tím i expresi mnoha genů, na kterých jsou závislé procesy jako buněčný růst, angiogeneze či apoptóza, se stal novým výzkumným cílem společnosti MyoGenics. Změna se projevila i v názvu, kdy se MyoGenics přejmenoval na ProScript (proteazom, transkripce) [50]. Tato myšlenka byla dlouho podporována. Dnes je zřejmé, že právě Bortezomib (i jiné inhibitory proteazomu) naopak aktivují NF- $\kappa$ B klasickou dráhu a inhibiční funkce se zdá být pravdivá pouze u alternativní dráhy [46].

Chemik Julian Adams, zaměstnanec ProScriptu, vyvinul v roce 1994 nový, oproti MG132 více stabilní inhibitor, Bortezomib - PS341. Po doporučení od Arvama Hershka byla aplikace PS341 zaměřena na léčbu rakoviny (NF- $\kappa$ B je u mnoha typů rakovin aktivována nepřetržitě). Tento předpoklad byl potvrzen na 60 rakovinných liniích National Cancer Institutu a několika dalšími studiemi, které prokázaly účinnost PS341 u různých typů rakovin. Testy potvrdily, že Bortezomib zprostředkovává inhibici chymotrypsinové aktivity 20S proteazom [49].

Tento výzkumný směr nebyl podpořen a ProScript byl prodán nejprve firmě LeucoSite, kterou zanedlouho odkoupila společnost Millenium Pharmaceuticals (MP) [49,50].

## 8.2. Klinické testy a povolení léku

Ještě před přechodem ProScriptu do vlastnictví MP započal Julian Adams s kolegy první test na lidské pacientce s mnohočetným myelomem (rok 2000), který probíhal na Univerzitě v Severní Karolíně. Studie neprokázala výrazné vedlejší účinky Valcadu (obchodní název Bortezomibu) a vyvrcholila vyléčením pacienta. Tento fakt inicioval počátek klinického testování, které financovalo Millenium Pharmaceuticals [49,50].

Spolupráce mnoha institucí na vývoji léku umožnila rychlé povolení Bortezomibu pro klinické užití, a to v době, kdy nebyla dokončena III. fáze klinických testů. V roce 2003 byl velcade povolen jako lék třetí volby pro mnohočetný myelom, v roce 2005 jako lék druhé volby a od roku 2008 je lékem první volby. V roce 2006 byl bortezomib povolen také pro léčbu lymfomu plášťových buněk po alespoň jedné předchozí terapii [48], rok 2009 přinesl povolení pro použití Valcadu jako prioritního léku u lymfomu plášťových buněk. Nadále probíhá testování na další typy rakoviny (viz tabulka) [16].

Výsledky první fáze klinických testů potvrdily jasný účinek Bortezomibu na 27 pacientech s maligním hematologickým onemocněním. U devíti pacientů s mnohočetným myelomem došlo ke výraznému zlepšení, z toho jeden dosáhl kompletního uzdravení [47,51]. V jiném testu první fáze se 43 pacienty s pevnými tumory došlo jen k jedné odezvě u pacienta s rakovinou plic [51]. Maximální tolerovaná dávka byla stanovena na  $1,3 \text{ mg/m}^2$  při podávání dvakrát týdně po dva týdny (1., 4., 8., 11. den) v třítydenním cyklu (12.-21. den pauza). Optimální dávka byla stanovena mezi  $1,0 \text{ mg/m}^2$  až  $1,3 \text{ mg/m}^2$  [52].

Druhá fáze testů srovnávala dávky  $1,0 \text{ mg/m}^2$  až  $1,3 \text{ mg/m}^2$  na skupině 54 pacientů. Z výsledků byla pro další použití doporučena dávka  $1,3 \text{ mg/m}^2$ . Do jiné fáze II bylo přijato 202 pacientů s mnohočetným myelomem. 35% dobrovolníků vykazalo odezvu na léčbu, 4% z nich bylo kompletně uzdraveno, dalších 6% bylo blízko kompletní remise, 18% vykazalo částečné uzdravení a 7% alespoň minimální odpověď na léčbu [52].

Třetí fáze s 669 pacienty srovnávala bortezomib, podávaný dvakrát týdně 1,3 g/m<sup>2</sup> po dobu dvou týdnů s následnou týdenní přestávkou, se standardním lékem glukokortikoidem dexametazonem (dex). Velcade ve srovnání s dex prokázal vynikající výsledky, odpověď na léčbu byla 38% velcade : 18% dex. Doba, než došlo k dalšímu postupu nemoci, se prodloužila 6,22 velcade: 3,43 dex měsíců a průměrná doba přežití pro velcade byla 29,8 měsíců ku 23,7 měsíců pro dex. Tyto průkazné výsledky podpořily povolení Bortezomibu ještě před ukončením třetí fáze. Lék byl ke klinickému užívání povolen předčasně především proto, že na trhu nebylo dostupné jiné léčivo pro pacienty s tímto onemocněním [47]. V dnešní době klinické testování pokračuje, v tabulce uvádím výsledky z roku 2010. Jak je vidět, účinnost léku v boji proti rakovině prsu ani jiným pevným nádorům nebyla prokázána [16].

Vedlejších účinků bortezomibu je celá řada a nejsou zcela zanedbatelné. Mezi nejzávažnější vedlejší projevy patří periferní neuropatie. Velice často se vyskytuje nevolnost, únava a průjem, zácpa, dále také trombocytopenie, anorexie či anémie [33,52].

Tabulka 2: Výsledky klinických testů bortezomibu do roku 2010 [16].

| <b>Rakovina</b>                        | <b>Výsledky</b>                          |
|--|--|
| Mnohočetný myelom                      | FDA - povoleno                           |
| Lymfom plášťových buněk                | FDA - povoleno                           |
| Kožní T-buněčný lymfom                 | signifikantní aktivita ve II. fázi testů |
| MALT lymfom                            | signifikantní aktivita ve II. fázi testů |
| Chronická lymfocytická leukémie        | biologická aktivita ve II. fázi testů    |
| Dětská leukemie                        | nízká aktivita ve II. fázi testů         |
| Sarkom měkkých tkání                   | nízká aktivita ve II. fázi testů         |
| Malobuněčný, nemalobuněčný. karc. plic | nízká aktivita ve II. fázi testů         |
| Rakovina střev                         | inaktivní ve II. fázi testů              |
| Melanom                                | inaktivní ve II. fázi testů              |
| Rakovina prsu                          | inaktivní ve II. fázi testů              |
| Žaludeční adenokarcinom                | inaktivní ve II. fázi testů              |

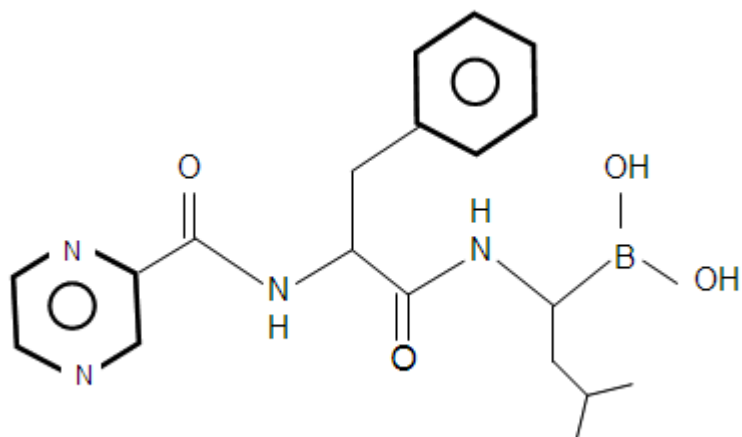
### 8.3. Mechanismus účinku bortezomibu

Po chemické stránce je bortezomib dipeptid kyseliny alkylborité [53]. Tento proteazomální inhibitor patří do skupiny peptid aldehydů. Jeho aktivita je vysoce specifická k 20S části, k jednotce  $\beta_5$  s chymotrypsinovou aktivitou [54]. Selektivní a reverzibilní inhibice proteazomu skrz bortezomib ovlivňuje intercelulární úroveň mnoha proteinů, které regulují apoptózu či buněčnou proliferaci. Bortezomib způsobuje hromadění proteinů p21 a p27 (omezení proliferace), p53, Bid a Bax (apoptóza), což ve výsledku zapříčiní zastavení buněčného cyklu a následně apoptózu. Dále léčba bortezomibem aktivuje JNK (c-Jun-NH<sub>2</sub> terminální kináza), což vede k apoptóze jakožto odpovědi na buněčný stres. V neposlední řadě zastavení proteazomální funkce zvyšuje množství caveolin-1 proteinu, což má za následek omezení migrace buněk rakovinné tkáně [53]. Bortezomibem indukovaná apoptóza zasahuje různé regulační proteiny u různých typů rakovin, mechanismy spouštění apoptózy se tedy mohou lišit [54].

Jak jsem již naznačila, původní hypotéza o funkci bortezomibu, jakožto inhibitoru klasické NF- $\kappa$ B dráhy, je dnes překonána. Poprvé, ve studii Németh et al., bylo ukázáno, že inhibitory proteazomu MG-115, MG-132 a lactacystin aktivují IKK (inhibitor- $\kappa$ B kináza), degradaci I $\kappa$ B (inhibitor  $\kappa$ B) a translokaci NF- $\kappa$ B do jádra. Degradace I $\kappa$ B v tomto případě není možná proteazomálním systémem, jako vhodná alternativa byl navržen proteolytický kapsásový systém, který je zároveň proteazomální inhibicí stimulován [45].

Další studie Hideshima et al. také potvrdila, že protinádorová aktivita bortezomibu (v případě mnohočetného myelomu) není způsobena inhibicí NF- $\kappa$ B. Bylo zjištěno, že Bortezomib spouští fosforylaci IKK, kterážto je klíčovou událostí pro degradaci podjednotky I $\kappa$ B a spuštění genové exprese. Podjednotka I $\kappa$ B je degradována neproteazomálním systémem, tato studie neprokázala degradaci I $\kappa$ B proteázami. Bylo také prokázáno, že specifický inhibitor IKK, to je MLN120B, inhibuje bortezomibem spuštěnou NF- $\kappa$ B kanonickou dráhu, což ještě navyšuje cytotoxicitu k nádorovým buňkám [46].

Obrázek 6: Chemická struktura botrezomibu, dipeptid kyseliny alkyl-borité [55]





## 9. TESTOVÁNÍ LÉČIV

Vývoj nových léků jako je bortezomib je časově i finančně náročný. Každý nově vyvíjený lék musí projít několika fázemi klinického testování a jeho povolení trvá i 15 let. Nákladnost vývoje léčiva se samozřejmě projeví i na jeho konečné ceně na trhu.

Klinické studie jsou děleny do tří, případně čtyř fází, liší se předmětem studia, jeho délkou i počtem a typem dobrovolníků zapsaných do studie [1].

### 9.1. Preklinické studie

Před I.fází klinických studií je prováděno testování na jiných subjektech než na lidských dobrovolnících. Účelem je zjistit toxicitu látky, přibližné dávkování a účinnost léků. Předběžné zkoumání se provádí nejprve in vitro, tedy ve zkumavkách, a později in vivo, na buněčných kulturách a také na zvířatech [56].

### 9.2. I.–III. fáze testování léčiv

Do první fáze je zapojena jen asi desítka dobrovolníků. Při hledání látky pro léčbu rakoviny jsou přijímáni pacienti s různými typy rakoviny.

Cílem první fáze je zjistit maximální dávku léku a frekvenci jeho podávání tak, aby se zachoval dostatečný léčebný účinek s co nejmenšími vedlejšími projevy. Zkoumána je také nejvhodnější forma podávání léku. Zařazena bývá i studie o podávání léčebné látky v závislosti na jídle, kdy jsou šetřeny podmínky, za kterých je vstřebávání léku nejvyšší. Jakmile jsou zjištěny veškeré základní bezpečnostní požadavky, přechází studium do druhé fáze testování [56].

Fáze II zahrnuje větší množství účastníků, jejich počet je ve stovkách. Klinické studie jsou tentokrát prováděny na pacientech se stejným onemocněním, konkrétně stejnými typy rakoviny. Hlavním přínosem fáze II by mělo být zjištění účinnosti léčebné látky na konkrétní onemocnění. V této fázi testování se ovšem také pokračuje v obdobném zkoumání léku jako ve fázi I, tedy nadále jsou zkoumány nežádoucí účinky a upřesňuje se dávkování. Jestliže se potvrdí účinnost léku a nezjistí se žádné závažné nežádoucí účinky, přechází klinické testování do další fáze [57].

Klinické testy fáze III jsou nejrozsáhlejší, nejdražší a časově nejnáročnější částí celého vývoje nových léků. Jsou prováděny mezinárodně v mnoha státech a na mnoha klinikách, lék je podáván souboru o řádově tisících pacientů. Úkolem je srovnat nový

lék se standardní léčbou. Pokud neexistuje žádná standardní léčba, užívá se pro srovnání placebo. Jestliže léčení novou látkou projde pozitivně i touto poslední fází a dojde ke schválení léku, přípravek může být uveden na trh [58].

### **9.3. Vstup léku na trh**

I po proniknutí léku na trh pokračuje jeho další hodnocení, což se označuje jako fáze IV. Léky jsou podávány mnohem širšímu spektru lidí, než bylo možno zahrnout do předchozích fází testování. Nadále se sledují negativní účinky u specifických skupin, jako jsou těhotné ženy, děti či staří lidé. Zaznamenávají se interakce nového léku při užívání s jinými léky a dále jsou zjišťována rizika při dlouhodobém užívání. Pokud se prokáže nevhodnost podávání látky pro určitou skupinu lidí, může dojít k omezení jeho podávání nebo až ke stažení léku z trhu [59].

Do dnešní doby byly po vstupu léku na trh zaznamenávány pouze nežádoucí vedlejší účinky. Nový přístup navrhuje sledovat a zaznamenávat také vedlejší pozitivní projevy léku na pacienta, které mohou být dále využity. V současnosti již existuje několik sociálních sítí, kde pacienti či lékaři vkládají a sdílí vlastní zkušenosti s léky. Tato data se dále hodnotí a vhodní kandidáti mohou být navrženi například na nové klinické testování [60].

### **9.4. Nový individuální přístup k léčbě rakoviny**

Výše zmíněný průběh testování je v dnešní době prakticky jediný funkční model. Jak již bylo zmíněno, vysoká cena společně s malou selekcí pacientů je jeho silnou nevýhodou. Nový model jde ruku v ruce s pokrokem molekulární biologie. Navrhuje zaměřit se na prozkoumání molekulární podstaty rakoviny a mapování rakovinného genomu a následnou identifikaci molekulárních cílů, na základě kterých se mohou vytvářet protirakovinná léčiva. Identifikace molekulárních biomarkerů u pacientů pomůže vybrat specifickou léčbu pro konkrétního pacienta. Tento model by dopomohl k selektivnějšímu výběru dobrovolníků pro klinické testy a tak snížil náklady a dobu na vývoj léčiv a zvýšil bezpečnost jejich průběhu [58].

## 9.5. Koncept neziskových léků - problém starých léčiv pro nové využití

Současná situace, kdy se ročně dostane na trh 20–30 léčiv je velice neuspokojivá. Vývoj jednoho nového léku stojí nejméně 800 miliónů USD a vývoj trvá 10-15 let. Takovéto finanční zatížení neumožňuje šíření léků do chudých zemí a ani tempo jejich vývoje není dostatečné vzhledem k počtu nově vznikajících chorob a rezistencí [61]

Nejen samotná cena vývoje jednoho léčiva, ale rovněž současný trend, který je charakteristický poklesem v počtu nově vznikajících léčiv za rok při stále narůstající ceně je výstražný. Zatímco v roce 1996 přišlo na trh 36 nových léků, v roce 2002 to bylo jen 20, přičemž cena vývoje neustále stoupá. V 80. letech byla průměrná cena vývinu jednoho léku 316 miliónů USD, v 90. letech to bylo, jak uvádím výše, víc jak 800 milionů USD [62].

Dalším problémem současného vývoje léků je doba účinnosti těchto nových substancí. Často, jakož je i příklad bortezumibu, se dostaví rezistence na lék a ten se stává pouze lékem prodlužujícím život nikoli lékem, který by pacienta uzdravil. Prodloužení života pacientovi je jistě úspěch, ale z hlediska financování vývoje je tento přístup neefektivní. Zdravotní systém se stává neúnosně drahý a léky jsou nedostupné, a to nejen pro nemocné v rozvojových zemích [63].

Testování starých léčiv na nové užití je méně finančně i časově náročné to proto, že bezpečnost látky ve fázi I klinického testování již byla ověřena při dříve provedených testech, a dá se relativně rychle přejít na testování fáze II [61].

Úspěšným příkladem neziskového léku povoleného pro nový účel je paromomycin, který je v první řadě užíván jako antibiotikum. V roce 2007 byl paromomycin povolen pro léčbu leishmaniózy, což je nemoc vyskytující se ve velké míře v asijských zemích. Díky konceptu neziskových léků je onemocnění, na které se bez podání účinného léku umírá, zdolána díky velice levné substanci, jejíž výzkum byl financován neziskovými organizacemi [63].

K lékům tohoto charakteru patří také antabus, který je primárně lékem na alkoholismus a v komplexu s mědí má protinádorové účinky. Dnes je výzkum antabusu pro tento nový účel již ve fázi klinického testování [63,64].

Jak bylo naznačeno výše, takovéto chemické látky již není možné znovu patentovat, tedy pro farmaceutické firmy financování takovýchto klinických testů, pro již patentované látky, není lukrativní. Při současné politice farmaceutických společností není možné, aby se staré léky s nově objeveným účinkem dostaly na trh [64].

Řešením tohoto problému se zdá být nezisková organizace GlobalCures, která shání prostředky pro financování klinických testů pro staré látky s novým léčebným cílem. Takto podporované klinické testy umožní prodej látek s nově objeveným účinkem za cenu starého léčiva. Tato strategie podporuje plné využití potenciálu léčiva a je přínosem jak pro stále se zdražující systém zdravotnictví tak i pro pacienty především v chudých zemích, pro které je drahá zdravotní péče nedostupná [64].

## 10. GLOBALCURES

GlobalCures je charitativní organizace založená roku 2007. Jejím sídlem je město Newton ve státě Massachusetts. Založena byla paní Vidulou Sukhatme a jejím manželem Vikasem.

Prioritním cílem organizace (program I-FUND) je získávat prostředky pro financování výzkumu látek, které již nejsou patentovatelné nebo jsou jinak finančně nezajímavé pro farmaceutické společnosti. Finance jsou získávány od vládních organizací, nadací a také od samotných pacientů. Úkolem GlobalCures je zároveň hledat tyto léky či terapie, které by byly vhodné pro jiné využití. K těmto účelům je využívána databáze I-SHARE [65].

Program I-SHARE je také zastřešován organizací GlobalCures. Lidé zařazení do tohoto unikátního programu dávají anonymně k dispozici informace o svém zdravotním stavu, o léčbě, kterou podstoupili, o tom zda byla účinná či nikoli. S tuto databází pak mohou pracovat lékaři po celém světě při léčbě vlastních pacientů. I-SHARE je tedy možnost, jak si rychle předávat vlastní poznatky o léčbě běžných ale především vzácných či nově mutovaných chorob a ty využít dále [66].

GlobalCures má jako nezaujatá instituce také snahu pomoci pacientům nalézt pro ně momentálně nejvhodnější léčbu či jim doporučit vhodné klinické studie, do kterých by se mohli zařadit. Pacienti zařazení do těchto studií musí splňovat přísné podmínky výběru. Ti, kteří je splní, mají šanci dostat se k látkám, které ještě nebyly povoleny pro užití širokou veřejností a které je mohou vyléčit či jim alespoň prodloužit život. Tento program se nazývá I-FIND [67].

## 11. ANTABUS

### 11.1. Historie

Látka tetraethylthiuram disulfid (disulfiram) se využívala v průmyslu již od počátku 19. století. V roce 1937 byl publikován dotaz pracovníka chemické společnosti, který popisoval potíže při konzumaci alkoholu u laboratorních pracovníků, kteří přišli do styku s touto chemikálií. Uváděny byly nežádoucí účinky jako nevolnost, snížení krevního tlaku, návaly a zarudnutí v obličeji či silné bušení srdce. Z těchto mužů se stali úplní abstinenti, látka byla navržena k léčbě alkoholismu [68].

Mechanismus účinku disulfiramu při léčbě alkoholismu je inhibice enzymu acetaldehyd-dehydrogenázy při odbourávání alkoholu. Nežádoucí účinky, využívané k léčbě, jsou způsobeny zvýšenou koncentrací toxického acetaldehydu v krvi, který nemůže být odbourán na neškodnou kyselinu octovou. V případě požití velké dávky látky společně s alkoholem může dojít až ke smrti. Od roku 1951 je tato látka na trhu pod názvem antabus [69].

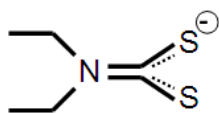
Antabus je tedy obchodní název látky disulfiram. Disulfiram neboli tetraethylthiuram disulfid je molekula, která vzniká vytvořením disulfidické vazby mezi dvěma molekulami ditiocarbu (diethylditiocarbamátu). Chemické struktury těchto sloučenin uvádím na Obrázku 7a,b [70].

Na přelomu 60. a 70. let 20. století byl zaznamenán případ ženy operované po nádoru prsu. Po několika letech u ní došlo k relapsu a rozšíření metastáz do několika dalších oblastí. Žena propadla alkoholismu a byla léčena antabusem. Bez další doplňující protinádorové léčby, došlo k vymizení metastáz. Po deseti letech žena zemřela při pádu z okna, avšak veškerá rakovinná ložiska vymizela [71].

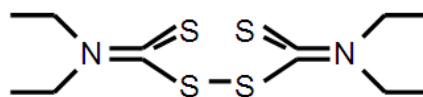
Na přelomu 80. a 90. let 20. století byla provedena studie, kdy byl testován diethylditiocarbamát sodný (obrázek 7c) jako imunoterapeutický lék pro pacienty po rakovině prsu. Do studie bylo přijato 64 pacientek po chirurgickém zákroku s různými charakteristikami nádoru, avšak všechny byly bez metastáz (primární zasažená oblast prsu nebyla uvedena). Dobrovolnice byly rozděleny na dvě skupiny. První skupina 32 pacientek byla po devět měsíců léčena ditiocarbem, druhé bylo po stejnou dobu podáváno placebo. Po 5 letech bylo v kontrolní skupině pozorováno 13 relapsů a 12 pacientek zemřelo. Skupina léčena ditiocarbem měla pouze 6 relapsů a

5 zaznamenaných úmrtí. Účinek látky byl přisuzován podpoře imunitního systému. Studie prokázala pozitivní vliv diethyldithiocarbamátu sodného na přežití pacientů s rakovinou prsu [72].

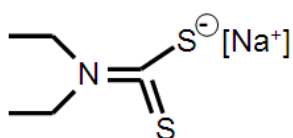
Obrázek 7: Deriváty ditiocarbu a jejich chemické struktury [70].



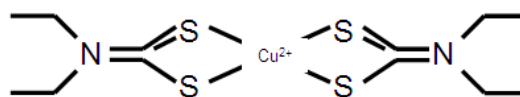
a) Diethyldithiocarbamát  
(ditiocarb)



b) Disulfiram  
(tetraethylthiuram disulfid, antabus)



c) diethyldithiocarbamát sodný



d) komplex disulfiramu s kovem

## 11.2. Mechanismus účinku

Dnes je již zjištěno, že protinádorová aktivita ditiocarbu je významná pouze v přítomnosti kovových ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) iontů v buňce [73]. Samotný ditiocarb je v těle velice reaktivní, je schopen chelatovat kovové ionty např. měď. Účinný protinádorový komplex se vytváří až v těle reakcí iontu kovu a ditiocarbu - vzniká sloučenina bis-(diethyldithiocarbamát) měďnatý (obrázek 7d) [70].

Při srovnání inhibiční aktivity komplexů tří kovů, mědi, zinku a niklu, testovaných na linii rakoviny prsu vyplynulo, že nejvyšší aktivitu vykazuje komplex se zinkem, o něco nižší aktivitu má komplex s mědí. Komplex s niklem není schopen vytvářet dimery a při inhibici proteazomu nevykazuje žádnou aktivitu [74].

Známým fenoménem ditiocarbu u některých buněčných linií je jeho bifázový cytotoxický efekt. Maximální toxicita ditiocarbu je přibližně  $1 \mu\text{M}$ , ale v koncentraci okolo  $6\text{-}10 \mu\text{M}$  viabilita buněk stoupá (linie  $\text{H630}_{\text{WT}}$ ,  $\text{HCT116}_{\text{WT}}$ ,  $\text{H603}_{\text{R10}}$ ). Mechanismus tohoto jevu není zcela objasněn [43,75,76]. Užitím komplexu disulfiramu s kovem tento bifázový efekt mizí [43].

Předpoklad, že protinádorová aktivita antabusu spočívá ve stimulaci imunitního systému (viz výše), je již překonán. Jako pravděpodobný mechanismus účinku se usuzuje inhibice proteazomu a následná apoptóza nádorových buněk [77]. Tato inhibiční aktivita byla potvrzena akumulací proteinu p27 (regulátor buněčného cyklu, závislý na UPS) a inhibicí translokace p65 (RelA) v NF-κB dráze v buňkách inkubovaných s ditiocarbem [44].

Experimentálně bylo zjištěno, že aktivní protinádorový komplex disulfiramu s mědí inhibuje také chymotrypsinovou aktivitu proteazomu in vivo v buněčné linii odvozené od rakoviny prsu, s tím souvisí nárůst polyubikvitinovaných proteinů v buňkách léčených tímto komplexem [77]. V sérii testů bylo potvrzeno, že chymotrypsinová aktivita při inkubaci s komplexem disulfiramu s mědí (CuEt) u nepoškozeného 26S proteazomu poklesla o 90%, při inkubaci purifikovaného 20S proteazomu (bez 19S části – víka a základny) s CuEt, poklesla jen o 35% [74]. Z toho vyplývá, že užití ditiocarbu v komplexu s kovem by mohlo mít v nádorech hlavní vliv na 19S část proteazomu. Přesněji řečeno, jako místo účinku ditiocarbu byla navržena JAMM doména podjednotky Poh1 proteazomálního víka [70,74]. Tato část proteazomu je enzym metaloisopeptidáza využívající  $Zn^{2+}$  jako kofaktor, která zodpovídá za deubikvitinaci proteinu [21].

Dalším možným mechanismem účinku disulfiramu u rakovinných linií může být inhibice NF-κB dráhy [44]. Zajímavou skutečností je, že bifázový efekt se odráží i v inhibici NF-κB dráhy. U některých buněčných linií je inhibice NF-κB pomocí samotného disulfiramu koncentračně závislá a dochází k ní pouze při nižších koncentracích. Při koncentraci okolo 1mM k inaktivaci dráhy již nedochází. Jak bylo řečeno, výrazný inhibiční efekt se obnovuje za přítomnosti disulfiramu a kovového iontu v buňce. Ve studii Kim HC et al. byla publikována data, která dávala do spojitosti schopnost disulfiramu inhibovat dráhu NF-κB a zároveň vliv disulfiramu na růst intracelulární úrovně  $Zn^{2+}$ , což podporuje myšlenku, že kovový iont zprostředkovává inhibiční aktivitu ditiocarbu [75].

Disulfiram tedy usnadňuje vstup iontů kovu ( $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ) do buněk a dále spouští produkci kyslíkových radikálů, čímž způsobí oxidativní stres v buňkách. Toto je další možný mechanismus účinku disulfiramu. Na druhou stranu, oxidativní stres může indukovat zároveň NF-κB dráhu, která naproti tomu spouští expresi anti-apoptotických faktorů [43,78].



Bylo prokázáno, že disulfiram přímo interaguje s enzymy MMP-2 a MMP-9 a inhibuje jejich funkci jako zinečnaté chelatační činidlo. Proteiny MMP (matrix-metaloproteinázy) jsou potřebné pro degradaci extracelulární matrix při šíření nádorových buněk a vzniku metastáz. Jsou to transmembránové  $Zn^{2+}$  endopeptidázy (zinek je důležitý pro proteolytickou funkci), které jsou běžně exprimovány v tumorech, a jejich exprese je závislá na NF- $\kappa$ B dráze. Antabus pravděpodobně zamezuje šíření nádorů, vzniku metastáz a angiogenezi skrz inhibici MMP [79].

Vysoká aktivita NF- $\kappa$ B dráhy byla zaznamenána u rezistentních nádorových buněk. Použití komplexu disulfiramu s mědí inhibuje NF- $\kappa$ B dráhu, snižuje chemorezistenci a výrazně zvyšuje cytotoxicitu běžně užívaných chemoterapeutik [43]. Antabus působí také jako inhibitor P-glykoproteinu, což je transportní protein, který je ve velkém množství exprimován na membránách nádorových buněk a který způsobuje jejich rezistenci na chemoterapeutika [70,80].

Ditiocarb je sloučenina, která může reagovat i s jinými látkami. Jak se ukázalo, přímá reakce ditiocarbu s cis-platinou chrání lidský organismus před nefrotoxicitou [70].

Jak bylo výše zmíněno antabus, lék původně určený alkoholikům, zasahuje mnoho signálních a metabolických drah a také nejrůznější proteiny. Jaký mechanismus či soubor mechanismů je nejdůležitější pro potlačení rakovinného bujení, je předmětem dalšího studia.

### **11.3. Selektivita účinku**

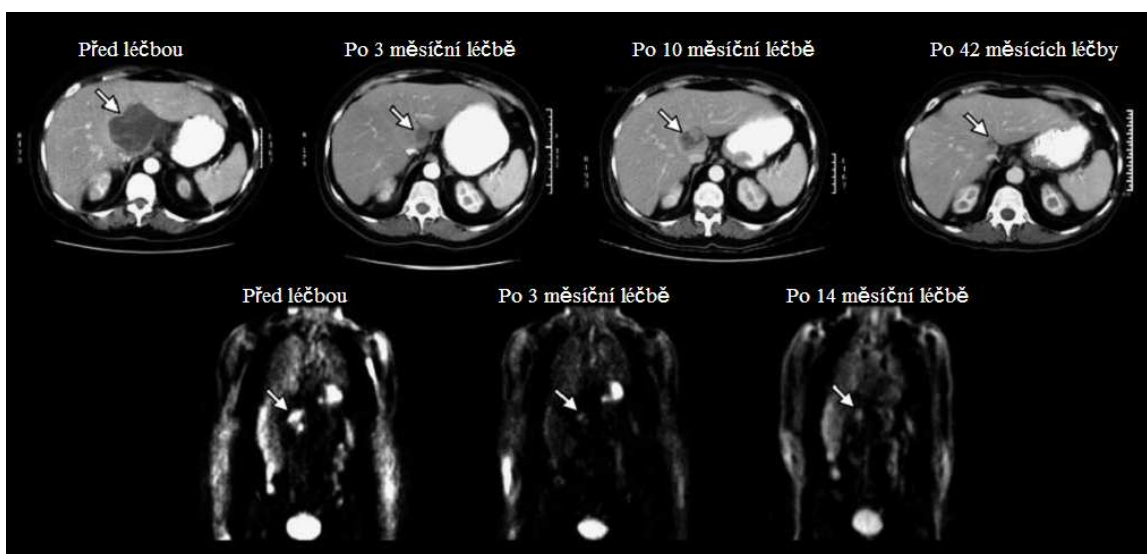
Antabus je chelatačním činidlem, reaguje s kovy například s mědí. U transformovaných buněk je koncentrace  $Cu^{2+}$  mnohem vyšší než u nenádorových. Pro růst tumoru je nezbytná angiogeneze, ta je stimulována VEGF (vascular endothelial growth factor), jehož kofaktorem je právě měď. Toto je možná příčina vysoké úrovně  $Cu^{2+}$  u mnoha typů rakovin například prsu, prostaty, plic, mozku či tlustého střeva. Antabus vyvazuje  $Cu^{2+}$  z VEGF a tím selektivně zaměřuje nádorové buňky [77].

Aktivita protezom-ubikvitinového systému a zároveň závislost nádorových buněk na UPS je rovněž vyšší než u nenádorových buněk (UPS reguluje procesy jako je buněčný cyklus či apoptóza). Tato fakta mohou také vysvětlovat, proč disulfiram působí selektivně jen v nádorech [77].

## 11.4. Cesta ke klinickým testům

Na počátku cesty ke klinickému výzkumu stála skupina výzkumníků ze Severní Karolíny (Brar et al.), která testovala antabus společně s ionty kovů in vitro i in vivo a své poznatky o protinádorové aktivitě potvrdili na pacientce s neoperovatelnou metastázou v játrech (původem melanom). Ženě byl podáván antabus a zinek ve formě glukonátu. Po tříměsíční léčbě se metastáza zmenšila o polovinu, po 12 měsících zůstal nádor velikostně nezměněn a po 42 měsících taktéž (viz obrázek 8). V čase po 53 měsících od počátku terapie žena žila a vedla běžný život. Jejich závěry o schopnostech disulfiramu se shodovaly s výše uvedenými; inhibice proteazomu, indukce apoptózy, blokáce P-glykoproteinu. Protinádorové účinky v testech in vitro a in vivo na myších, byly umocněny v kombinaci s kovovými ionty  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , ale jako funkční byly prokázány i ionty  $Au^{3+}$ ,  $Ag^{+}$  [80].

Obrázek 8: Na obrázku jsou znázorněny snímky pacientky ze studie Baar et al., kde můžeme jasně pozorovat zmenšování nádoru v játrech na základě podávaného antabusu a zinku [80].



Případ vyléčené pacientky inicioval provedení klinických testů pro antabus v komplexu s kovem, jakožto léku s protinádorovými účinky [80]. První fáze testování proběhla v Utahu, v současnosti probíhá fáze II.

Jako nejvhodnější kov v klinickém testování se ukázala měď. Klinická studie měla za úkol zjistit bezpečnost komplexu a nejvhodnější způsob jeho užívání. Závěrem bylo stanoveno optimální množství mědi na den na 8 mg podávaných ve formě glukonátu mědi - měďná sůl kyseliny D-glukonové (typická denní strava obsahuje

přibližně 1 mg mědi, optimální množství u zdravého člověka je 1,5-3 mg denně). Disulfiram se přijímá v množství 250 mg na den. Složky komplexu se užívají odděleně, glukonát mědi půl hodiny před snídaní a disulfiram společně s večeří. Takovéto užívání zabraňuje gastrointestinální toxicitě [81].

Jak ukázalo již několik studií, antabus by mohl být vhodným lékem pro pacienty s některými pevnými nádory. Jeho negativní účinky, jsou prověřovány již dlouhou léta (při podávání antabusu jako protialkoholního léku od roku 1951) a jsou minimální oproti jiným chemoterapeutikům [70].

V případě, že se účinnost antabusu v komplexu s kovem opravdu prokáže a lék projde všemi fázemi testování. Může se tento levný lék stát nadějí pro nemocné trpící právě rakovinou prsu, která patří k nejčastěji se vyskytujícím rakovinám vůbec.

## 12. CÍL PRÁCE

V praktické části jsem stanovovala cytotoxicity látek bortezomibu, komplexu disulfiramu s mědí, samotného ditiocarbu a chloridu měďnatého u buněčné linie MCF-7 odvozené od karcinomu prsu. Dále jsem srovnávala cytotoxicity bortezomibu, komplexu disulfiramu s mědí pomocí hodnoty  $IC_{50}$ .

## 13. MATERIÁL

### 13.1. Nádorová linie

V experimentální části byla použita buněčná linie MCF-7 (Michigan Cancer Foundation -7), což je linie odvozená od karcinomu prsu. Tato buněčná linie byla izolována v roce 1970. Karcinom byl původem invazivní ductální karcinom, buňky byly odebrány z pohrudnice. U těchto nádorových buněk jsou přítomny estrogení i progesteronové receptory. Gen ERBB2 amplifikován nebyl, tedy rakovinné buňky jsou Her2/neu negativní [82].

### 13.2. Chemikálie, média, roztoky

Bortezomib, Millenium Pharmaceuticals

CuCl<sub>2</sub>, 307483-100G Sigma-Aldrich

deionizovaná voda přístrojem (Aqua osmotic)

Diethyldithiokarbamát sodný trihydrát, 22,868-0 Sigma-Aldrich DMSO, P8418, Sigma-Aldrich

Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose; With 4500 mg/L glucose, sodium pyruvate, and sodium bicarbonate, without L-glutamine, liquid, sterile-filtered, cell culture tested, D6546-6X500ML Sigma-Aldrich

Fetal Bovine Serum; Heat Inactivated, sterile-filtered, cell culture tested, F9665-500ML Sigma-Aldrich

Komplex diethyldithiokarbamátu Cu(EtDTC)<sub>2</sub>, syntetizoval Boris Cvek

L-Glutamine, G6392-10VL Sigma-Aldrich

MEM Non-essential Amino Acid Solution (100×), M7145-100ML, Sigma-Aldrich

MTT roztok: 3 mg MTT/ml PBS, Sigma-Aldrich

MTT rozpouštěcí roztok: DMSO/ 1% NH<sub>3</sub>

PBS 1x (pH 7,4) NaCl 4g, KCl 0,1g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>x12 H<sub>2</sub>O 1,605g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01g Penicilinn/Streptomycin (100ml), P11-010 PAA The Cell Culture Company

Triton-X 100, 37240, Serva

Trypanová modř, T6146-256, Sigma-Aldrich

Trypsin-EDTA solution; 0.25%, 2.5 g porcine trypsin and 0.2 g EDTA . 4Na per liter of Hanks' Balanced Salt Solution with phenol red, sterile-filtered, cell culture tested, T4049-500ML Sigma-Aldrich

Zamrazovací médium: FBS/DMSO (9:1)

Zásobní roztok bortezomibu 3,5 mM (w/v) DMSO

### **13.3. Přístrojové vybavení laboratoře**

Autokláv PS20A Chirana, Česká republika

Box skříňový mrazící (-80) SAN Sanyo, Japonsko

Centrifuga spectrafuge 5415R eppendorf

Centrifuga 5810R eppendorf

Centrifuga Mini Labnet International, USA

Centrifuga MR22i Jouan, USA

Inkubátor Contherm, Nový zeland

Laminární box SafeFASTTop, faster, Italie

Membránová vývěva KNFlab, Francie

Mikroskop T2 103411 Olympus, ČR

Pipeta multi-kanálová (30-300  $\mu$ M), biohit Proline plus

Pipetovací nástavec SWIFTPET+ (Pipeta floubox), PZ HTL S.A.

Přístroj na výrobu deionizované vody, Aqua osmotic, Česká republika

Sada pipet (0,1-2,5  $\mu$ M, 0,5-10  $\mu$ M, 2-20  $\mu$ M, 10-100  $\mu$ M, 50-200  $\mu$ M, 100-1000  $\mu$ M)  
Eppendorf

Váhy Kern ABS 80-4 , Německo

Váhy AFP 210L, USA

Vodní lázeň vodní lázeň LCB 11(330 x270x380) LabTech, ČR

Výrobník ledu F100 Compact, ČR

Třepačka Reax top Heindolpoh, Německo

### **13.4. Plasty**

0,5ml mikrozkušavky (Tubes for you)

1,5ml mikrozkušavky (Tubes for you)

2 ml mikrozkušavky (Tubes for you)

15ml centrifugační zkumavky, konické (Orange Scientific)

50ml centrifugační zkumavky, konické (Orange Scientific)

epTIPS 50 - 1 000  $\mu$ l, 2 x 500 špiček (Eppendorf)

epTIPS 0,1 - 10  $\mu$ l, 2 x 500 špiček (Eppendorf)

epTIPS 2 - 200  $\mu$ l, 2 x 500 špiček (Eppendorf)

expell 10 ul (špičky nesterilní bez filtru)

expell 200 ul (špičky nesterilní bez filtru)

Kultivační destičky 96 jamkové (Orange Scientific)

Kultivační destičky 6 jamkové (Orange Scientific)

Kultivační láhev 25 cm,filter cap (Orange Scientific)

Kultivační láhev 75 cm,filter cap (Orange Scientific)

Kultivační miska 100mm, PS (Orange Scientific)

Pipette Tip, 1000, Type A Gelloading (bioplastic)

## **14. PRACOVNÍ POSTUP**

### **14.1. Pasážování buněk**

Nádorová linie byla pasážována 2-3x týdně a to po dosažení konfluence přibližně 90 % na dně kultivační nádoby.

Z kultivační lahve bylo odsáto staré médium a láhev byla propláchnuta přibližně 6 ml PBS 1x. Pro uvolnění přisedlých buněk byl aplikován 1 ml trypsinu (kultivační nádoba 75cm) a kultivační lahev byla uložena na 2 minuty do 5% CO<sub>2</sub> inkubátoru při 37°C. Po 2 minutách bylo pod mikroskopem zkontrolováno, zda se buňky pustily podkladu. Účinky trypsinu byly zastaveny 9 ml média a pomocí pipety bylo vše resuspendováno, aby došlo k rozpadu shluků buněk.

Část suspenze byla odebrána do zkumavky pro experimenty. Ke zbytku suspenze v kultivační lahvi bylo přidáno médium do celkového objemu 16 ml, která byla dále inkubována v CO<sub>2</sub> inkubátoru při 37°C. Kultivační lahve byly měněny každé tři pasáže.

### **14.2. Počítání buněk**

Suspenze odebraná do zkumavky při pasážování je použita pro experiment. Před vysazením buněk je třeba vypočítat koncentraci buněk v suspenzi. Je odebráno 10 µl suspenze, ke které je přidáno 90 µl trypanové modři. 10 µl tohoto roztoku je rovnoměrně aplikováno do obou částí Bürkerovy komůrky. Pod mikroskopem jsou počítány buňky v 10 čtvercích, z nich je vypočítán průměr (násobením 10<sup>5</sup> je určeno množství buněk v 1 ml).

### **14.3. Vysazování buněk**

Buňky byly vysazovány do 96 jamkové desky. Do každé jamky je pipetováno 200 µl, 25 000 buněk. Každá koncentrace pro danou látku, jakož i pro pozitivní, negativní kontrola i kontroly vlivu rozpouštědel jsou pipetovány v tripletech podle schématu (obrázek 9). Destička s nasazenými buňkami je inkubována do druhého dne, aby buňky přisedly k povrchu jamek.



Obrázek 9: Schéma pipetování sledovaných látek a kontrol na 96 jamkovou desku.

|   | 1                  | 2                  | 3                  | 4    | 5    | 6    | 7                 | 8                 | 9                 | 10 | 11 | 12 |    |
|---|--------------------|--------------------|--------------------|------|------|------|-------------------|-------------------|-------------------|----|----|----|----|
| a | B                  | B                  | B                  | CuEt | CuEt | CuEt | CuCl <sub>2</sub> | CuCl <sub>2</sub> | CuCl <sub>2</sub> | Et | Et | Et | c1 |
| b | B                  | B                  | B                  | CuEt | CuEt | CuEt | CuCl <sub>2</sub> | CuCl <sub>2</sub> | CuCl <sub>2</sub> | Et | Et | Et | c2 |
| c | B                  | B                  | B                  | CuEt | CuEt | CuEt | CuCl <sub>2</sub> | CuCl <sub>2</sub> | CuCl <sub>2</sub> | Et | Et | Et | c3 |
| d | B                  | B                  | B                  | CuEt | CuEt | CuEt | CuCl <sub>2</sub> | CuCl <sub>2</sub> | CuCl <sub>2</sub> | Et | Et | Et | c4 |
| e | NK                 | NK                 | NK                 |      |      |      |                   |                   |                   | Et | Et | Et | c5 |
| f | K<br>DMSO          | K<br>DMSO          | K<br>DMSO          |      |      |      |                   |                   |                   | Et | Et | Et | c6 |
| g | K H <sub>2</sub> O | K H <sub>2</sub> O | K H <sub>2</sub> O |      |      |      |                   |                   |                   | Et | Et | Et | c7 |
| h | PK                 | PK                 | PK                 |      |      |      |                   |                   |                   | Et | Et | Et | c8 |

Legenda obr 9:

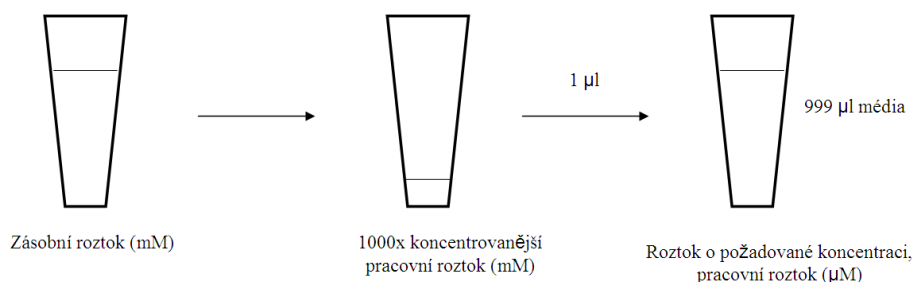
|                                    |                             |
|------------------------------------|-----------------------------|
| B                                  | bortezomib                  |
| CuEt                               | komplex disulfiramu s mědí  |
| Et                                 | diethyldithiokarbamát sodný |
| NK, K DMSO, K H <sub>2</sub> O, PK | kontroly (viz tabulka 3)    |
| c 1-8                              | koncentrace                 |

#### 14.4. Aplikace látek

Zásobní roztoky byly připraveny na základě údajů v tabulce 4. Jako rozpouštědlo pro CuEt a bortezomib bylo užito DMSO, pro CuCl<sub>2</sub> a ditiocarb byla použita destilovaná voda.

Druhý den po nasazení byly aplikovány látky. Pracovní roztoky byly připraveny těsně před experimentem (obrázek 10). Koncentrační řady pracovních roztoků společně s koncentracemi zásobních roztoků jsou uvedeny v tabulce 4. Staré médium bylo odsáto a do každé jamky bylo pipetováno 200 µl čerstvého kultivačního média se sledovanou látkou, případně kontrolou. Buňky byly inkubovány 24h.

Obrázek 10: Schéma ředění roztoků (koncentrace zásobních a pracovních roztoků- Tabulka 4).



**Popis obr 10:**

Zásobní roztok o určité mM koncentraci (Tabulka 4) je naředěn tak, abychom dostali roztok o potřebné koncentraci pracovního roztoku jen 1000x koncentrovanější, tedy místo v  $\mu\text{M}$  v  $\text{mM}$ .  $1\mu$  tohoto 1000x koncentrovanějšího pracovního roztoku přidáme do  $999\mu\text{M}$  média a tím získáme požadovanou  $\mu\text{M}$  koncentraci (tabulka 4).

Tabulka 3: Použité kontroly

| Kontrola                                     | Inkubační prostředí                | Viabilita |
|--|------------------------------------|-----------|
| Negativní kontrola                           | médium                             | 100%      |
| Kontrola vlivu rozpouštědla DMSO             | médium s DMSO (1:1000)             | 100%      |
| Kontrola vlivu rozpouštědla H <sub>2</sub> O | médium s H <sub>2</sub> O (1:1000) | 100%      |
| Pozitivní kontrola                           | médium s 20% tritonem (7:3)        | 0%        |

Kontroly vlivu rozpouštědla H<sub>2</sub>O a DMSO se přidávají do média ve stejné koncentraci jako sledované látky (1:1000).

Tabulka 4: Koncentrační řady roztoků užitých v experimentu, zásobní roztoky:

| Látka             | Molární hmotnost (g/mol) | Zásobní roztok (mmol/l) | Koncentrace aplikovaných látek, pracovní roztoky ( $\mu\text{mol/l}$ ) |      |     |     |    |    |    |    |
|-------------------|--------------------------|-------------------------|--|------|-----|-----|----|----|----|----|
|                   |                          |                         | 250  | 500  | 600 | 700 |    |    |    |    |
| CuCl <sub>2</sub> | 170.48                   | 1000                    | 250  | 500  | 600 | 700 |    |    |    |    |
| ditiocarb         | 225.2                    | 25                      | 0,5  | 1    | 2   | 5   | 10 | 15 | 20 | 30 |
| CuEt              | 360                      | 200                     | 0,1  | 0,25 | 0,5 | 1   |    |    |    |    |
| bortezomib        | -                        | 3,5                     | 0,001  | 0,01 | 0,1 | 1   |    |    |    |    |

Pozn.: Bortezomib byl dodaný, jako 3,5 mM roztok.

## 14.5. MTT test

Po 24hodinové inkubaci byl obsah destičky vyklepnut, jamky byly promyty 100 µl PBS 1x, dále bylo do každé jamky aplikováno 100 µl MTT+médium (1:9). Vše bylo inkubováno 1 hodinu při 37°C v CO<sub>2</sub> boxu. Po 1 hodině byl MTT roztok vyklepnut a přidáno 100 µl směsi DMSO+NH<sub>3</sub> (1%NH<sub>3</sub>). Absorbance fialového zbarvení byla měřena spektrofotometricky při 570 nm podle přednastaveného protokolu.

### 14.5.1. Princip MTT testu

MTT test umožňuje sledovat vliv látky (určité koncentrace látky) na buňky. Roztok žluté tetrazoliové soli (MTT, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide) je metabolizován živými buňkami na nerozpustný fialový formazan. Směs DMSO+NH<sub>3</sub> je aplikována pro rozpuštění formazanu. Míra absorbance formazanu je přímo úměrná k množství živých buněk.

## 14.6. Viabilita buněk

Viabilita byla počítána na základě hodnot naměřených spektrofotometrem při vlnové délce 570 nm. Od průměrné hodnoty počítané koncentrace byla odečtena průměrná hodnota pozitivní kontroly (buňky inkubované s tritonem). Dále byl vypočten průměr užití kontroly vlivu rozpouštědla, od kterého byla taktéž odečtena průměrná hodnota pozitivní kontroly. Tyto dva výpočty byly dány do poměru (viz vzorec 1).

Vzorec 1: Výpočet viability

$$\text{Viabilita (\%)} = \frac{\text{Průměr 3 jamek vzorku - PK}}{\text{Průměr K H}_2\text{O (K DMSO) - PK}} \times 100$$

Legenda vzorec 1:

|                    |  |
|--------------------|--|
| PK                 | Pozitivní kontrola (triton)                    |
| K H <sub>2</sub> O | Kontrola vlivu rozpouštědla - H <sub>2</sub> O |
| K DMSO             | Kontrola vlivu rozpouštědla - DMSO             |

## 14.7. Rozmrazování buněk

Do kryozkumavky bylo po 1 ml přidáváno ohřáté médium. Proplachováním byly buňky rozmrazeny a přenášeny do kultivační nádoby (doplněno médiem na 16 ml). Po jednodenní inkubaci v CO<sub>2</sub> boxu bylo médium vyměněno.

## **14.8. Zamrazování buněk**

Suspenze buněk byla nejprve centrifugována a původní médium bylo odsáto. K buňkám byl dále přidán roztok FBS/DMSO (9:1), vše bylo resuspendováno a přeneseno do kryozkumavek. Vzorby byly uchovány zamražené v -80°C.

## 15. VÝSLEDKY

Na linii MCF-7 odvozené od rakoviny prsu byly v experimentu testovány čtyři látky, a to komplex disulfiramu s mědí (CuEt) syntetizovaný v naší laboratoři a bortezomib, dále jako kontrolní látky samotná látka ditiocarb (používaný ve formě soli diethyldithiokarbamát sodný) a  $\text{CuCl}_2$ . Měření toxicity látek bylo založeno na MTT testu (kapitola 14.5., 14.5.1.). Výsledné koncentrace použité pro testování buněčné linie jsem stanovila experimentálně v laboratoři a s využitím odborné literatury.

Jak je publikováno v mnoha studiích (kapitola 11) komplex disulfiramu s mědí má protinádorové účinky (zejména u rakoviny prsu) a selektivně zabíjí nádorové buňky, proto bylo předpokládáno, že CuEt bude aktivní i u linie MCF-7.

Látky  $\text{CuCl}_2$  a ditiocarb byly použity jako kontrolní sloučeniny pro vyloučení možnosti, že by za hlavní účinek byly zodpovědné tyto látky samotné a ne jejich komplex. Předpokládalo se, že jejich toxický účinek na buněčné linie se projeví při vyšších koncentracích ve srovnání se syntetickým komplexem disulfiramu s mědí.

U  $\text{CuCl}_2$  se tento předpoklad potvrdil.  $\text{IC}_{50}$  látky  $\text{CuCl}_2$  byl roven hodnotě  $513.2 \mu\text{M}$  (SD-směrodatná odchylka 92.4). Na grafu 1 pozorujeme typickou dávkově závislostní křivku při použitých koncentracích 700, 600, 500 a  $250 \mu\text{M}$ .

U ditiocarbu jsem z naměřených dat nestanovovala hodnotu  $\text{IC}_{50}$ , a to z důvodu bifázového efektu, který se u testované linie projevil (kapitola 11). Použité koncentrace byly rozšířeny na 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20 a  $30 \mu\text{M}$  tak, aby v grafu 2 bylo možno pozorovat celý průběh tohoto efektu.

Další testovanou látkou byl bortezomib, jakožto první proteazomální inhibitor používaný v klinické léčbě. Testován byl v koncentracích 1, 0.1, 0.01,  $0.001 \mu\text{M}$  a  $\text{IC}_{50}$  byla stanovena na koncentraci  $0.757 \mu\text{M}$ , což ukazuje na mnohem vyšší toxicitu této látky vzhledem ke dvěma výše zmíněným látkám ( $\text{CuCl}_2$ , ditiocarb). Graf 3 znázorňuje průběh křivky koncentrační závislosti pro bortezomib.

Stanovené koncentrace, ve kterých byl komplex disulfiramu s mědí testován, byly 1, 0.5, 0.25 a  $0.1 \mu\text{M}$ .  $\text{IC}_{50}$  odpovídalo hodnotě  $0.413 \mu\text{M}$ . Tato koncentrace je rovněž velice nízká a můžeme říct, že komplex disulfiramu s mědí je při testech in vitro k linii MCF-7 velice toxický (graf 4).

Z grafu 5, který srovnává hodnoty  $IC_{50}$  pro bortezomib a komplex, pozorujeme, že u linie MCF-7 odvozené od rakoviny prsu je komplex CuEt toxicitější než bortezomib.

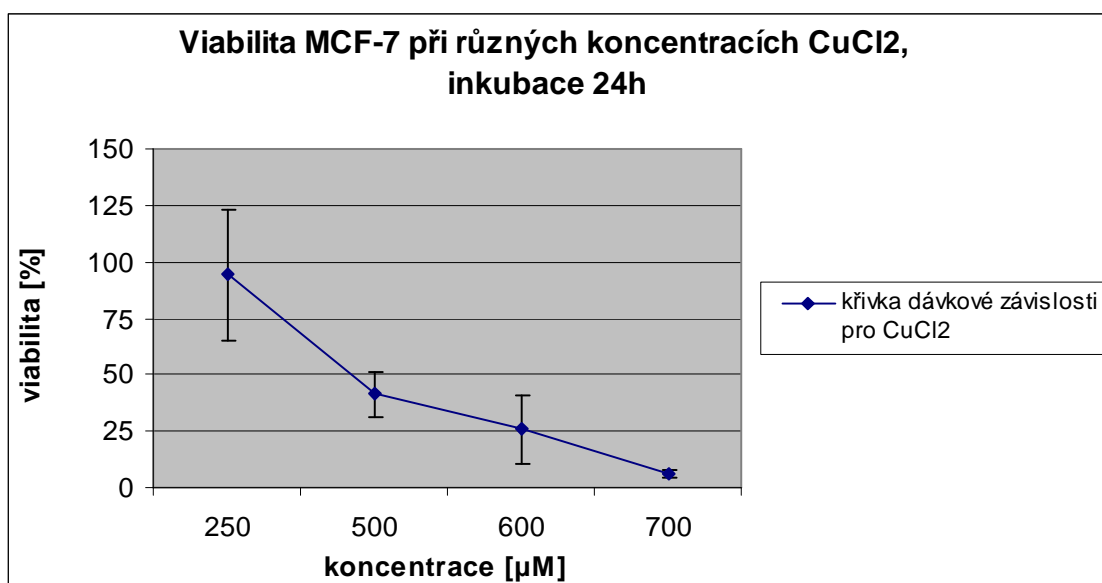
Na obrázcích 12 a 13 uvádím fotografie buněk kultivovaných v médiu obohaceném o CuEt případně bortezomib při koncentracích odpovídajících  $IC_{50}$ . Tyto buňky můžeme porovnat vzhledem ke kontrolním buňkám, které byly kultivovány pouze v médiu (obrázek 11). Toxicitu látek (CuEt, bortezomibu) zde demonstrují deformované buňky, které pozorujeme na obrázcích 12 a 13.

### 15.1. Graficky znázorněné výsledky experimentů s látkou $CuCl_2$

Tabulka 5: Použité koncentrace pro MTT test u látky  $CuCl_2$  a příslušná viabilita buněk

| Koncentrace $CuCl_2$ [ $\mu M$ ]                   | 250  | 500  | 600  | 700 |
|--|------|------|------|-----|
| Průměrná hodnota viability<br>(ze třech opakování) | 94.2 | 41.3 | 25.7 | 5.9 |
| Směrodatná odchylka                                | 29.2 | 10   | 15.1 | 1.6 |

Graf 1: Křivka dávkové závislosti při užití  $CuCl_2$  u linie MCF-7

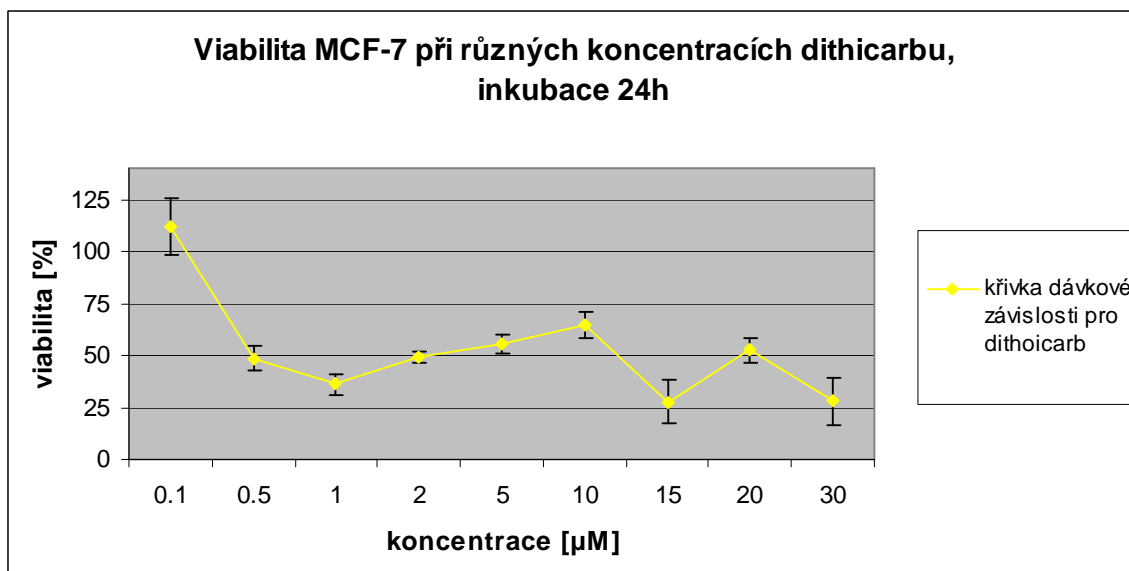


## 15.2. Graficky znázorněné výsledky experimentů s látkou ditiocarb

Tabulka 6: Použité koncentrace pro MTT test u látky ditiocarb a příslušná viabilita buněk

| Koncentrace ditiocarbu [μM]                     | 0.1   | 0.5  | 1   | 2    | 5    | 10   | 15   | 20   | 30   |
|---|-------|------|-----|------|------|------|------|------|------|
| Průměrná hodnota viability (ze třech opakování) | 111.9 | 48.5 | 36  | 48.9 | 55.3 | 64.5 | 27.4 | 52.3 | 27.8 |
| Směrodatná odchylka                             | 13.7  | 5.6  | 4.8 | 2.8  | 4.7  | 6.5  | 10.5 | 6.3  | 11   |

Graf 2: Křivka dávkové závislosti při užití ditiocarbu u linie MCF-7

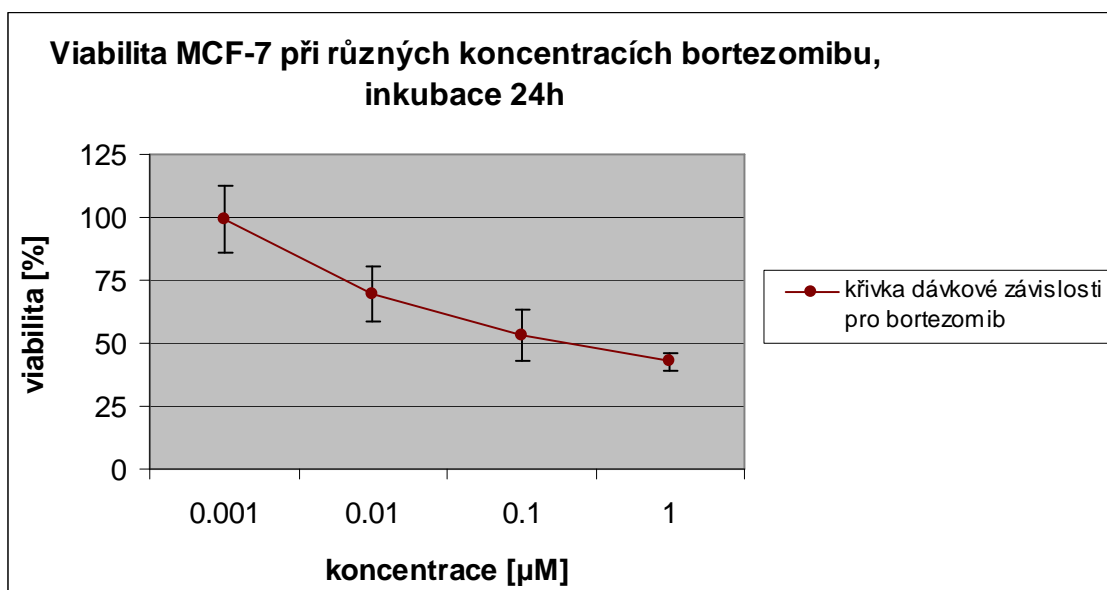


### 15.3. Graficky znázorněné výsledky experimentů s látkou bortezomib

Tabulka 7: Použité koncentrace pro MTT test u bortezomibu a příslušná viabilita buněk

| Koncentrace bortezomibu [ $\mu\text{M}$ ]       | 0.001 | 0.01 | 0.1  | 1    |
|---|-------|------|------|------|
| Průměrná hodnota viability (ze třech opakování) | 99.1  | 69.2 | 53.1 | 42.6 |
| Směrodatná odchylka                             | 13.4  | 10.9 | 10   | 3.8  |

Graf 3: Křivka dávkové závislosti při užití bortezomibu u linie MCF-7



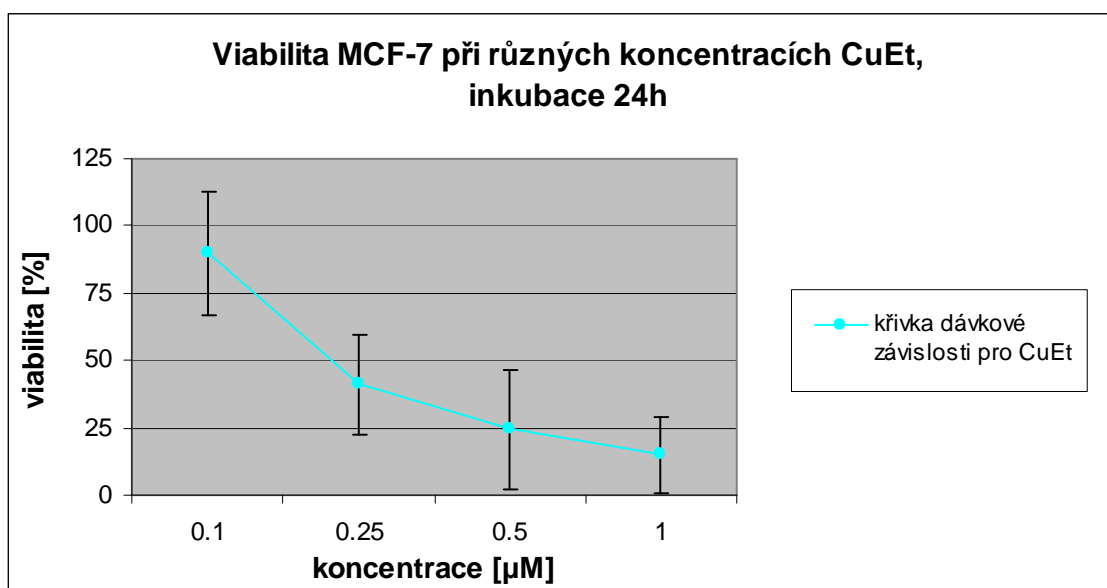


## 15.4. Graficky znázorněné výsledky experimentů s CuEt

Tabulka 8: Použité koncentrace pro MTT test u komplexu disulfiramů (CuEt) s mědí a příslušná viabilita buněk

| Koncentrace komplexu [ $\mu\text{M}$ ]          | 0.1  | 0.25 | 0.5  | 1    |
|---|------|------|------|------|
| Průměrná hodnota viability (ze třech opakování) | 90.1 | 41.2 | 24.4 | 15   |
| Směrodatná odchylka                             | 22.9 | 18.3 | 21.8 | 14.3 |

Graf 4: Křivka dávkové závislosti při užití komplexu CuEt u linie MCF-7

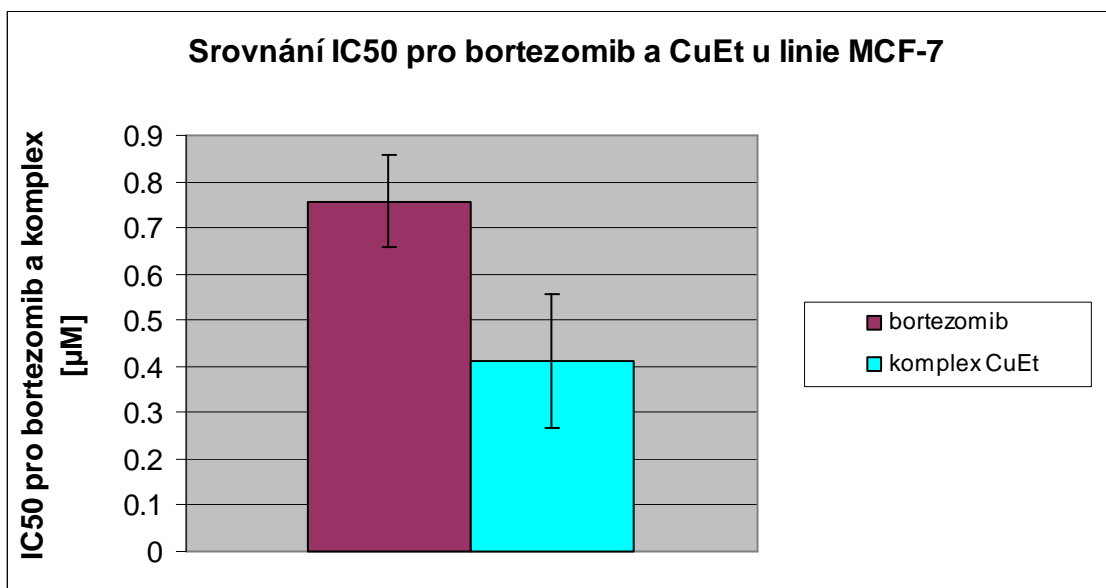


## 15.5. Grafické srovnání hodnot IC<sub>50</sub> pro bortezomib a CuEt

Tabulka 9: Srovnání hodnot IC<sub>50</sub> pro komplex disulfiramu s mědí a bortezomib

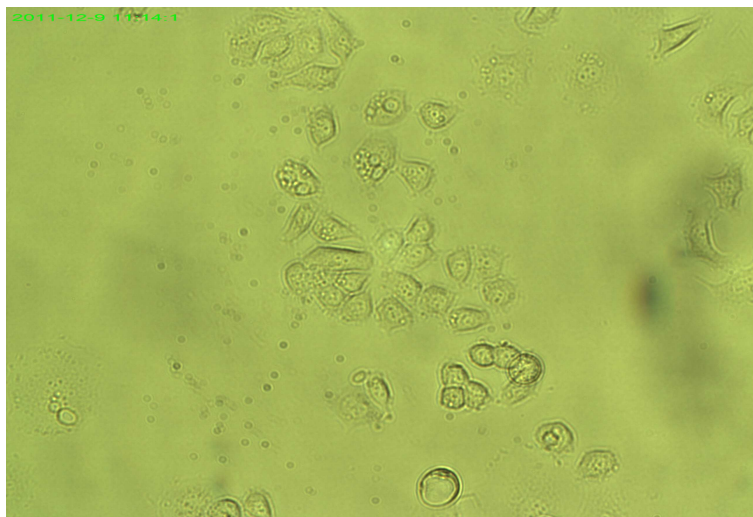
| Látka          | Průměr IC <sub>50</sub> [μM] | Směrodatná odchylka |
|----------------|------------------------------|---------------------|
| bortezomib     | 0.757                        | 0.098               |
| CuEt (komplex) | 0.413                        | 0.145               |

Graf 5: Hodnoty IC<sub>50</sub> pro komplex disulfiramu s mědí a bortezomib

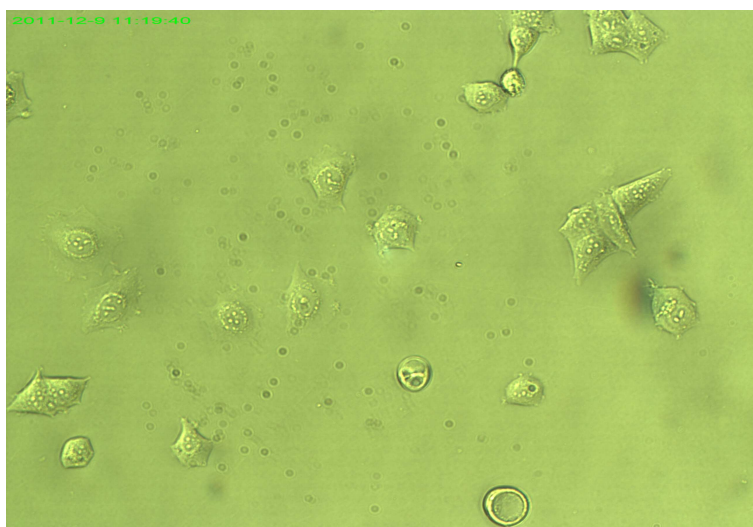


## 15.6. Fotografie kultivovaných buněk

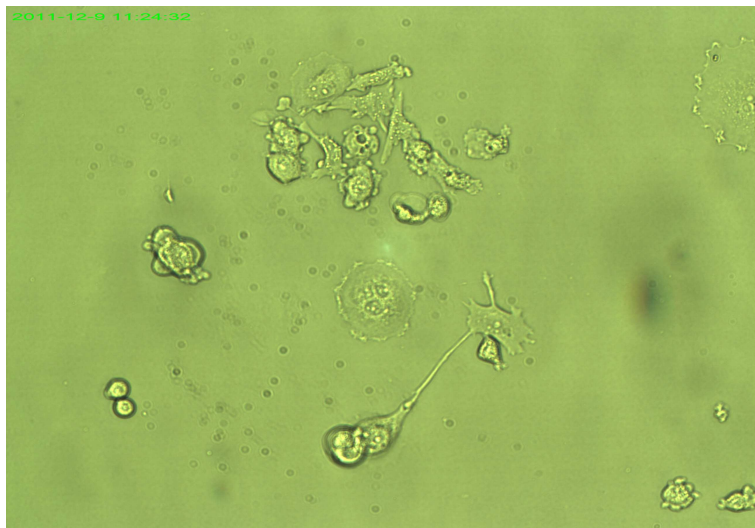
Obrázek 11: Kontrolní buňky kultivované 24 hodin pouze v médiu. Zvětšení 10x20.



Obrázek 12: Buňky kultivované 24 hodin v médiu s bortezomibem o koncentraci odpovídající  $IC_{50}$ , tedy  $0.757 \mu M$ . Pozorujeme deformované, umírající buňky. Zvětšení 10x20.



Obrázek 13: Buňky kultivované v médiu s komplexem disulfiramu s mědí (CuEt) o koncentraci odpovídající  $IC_{50}$ , tedy  $0.413 \mu M$ . Pozorujeme deformované, umírající buňky. Zvětšení 10x20.



## 16. DISKUSE

Teoretická část bakalářské práce je souhrnem informací týkajících se témat rakoviny prsu, proteazomu, proteazomálního inhibitoru bortezomibu, dále konceptu neziskových léků, ale především jsem se snažila shrnout současný stav vědění o komplexu disulfiramu (antabusu) s mědí a jeho použití v onkologické léčbě. V praktické části jsem testovala aktivitu léku antabusu v komplexu s mědí proti buněčné linii MCF-7 odvozené od karcinomu prsu.

Pro kontrolu jsem na linii MCF-7 testovala i samotné prekurzory komplexu, a to ditiocarb a  $\text{CuCl}_2$ . Na základě teoretických znalostí jsem očekávala, že tyto prekurzorové sloučeniny budou k linii MCF-7 mnohem méně toxické než jejich komplex. U látky  $\text{CuCl}_2$  se předpoklad potvrdil, toxicita byla až 1000x nižší než u komplexu disulfiramu s mědí (komplex:  $\text{IC}_{50}=0.413\mu\text{M}$ ,  $\text{CuCl}_2$ :  $\text{IC}_{50}=513\mu\text{M}$ ). O měďnatých iontech tedy můžeme říci, že toxicitu komplexu nezpůsobují. Případnou hypotézou, proč nejsou měďnaté ionty toxické, také může být, že nejsou schopny se transportovat do buněk bez přenašeče, na který by se navázaly (ditiocarb), a tedy působit toxicky v intracelulárním prostoru [78].

Hodnotu  $\text{IC}_{50}$  jsem u látky ditiocarbu z naměřených dat nestanovovala, a to z důvodu bifázového efektu, který se u linie MCF-7 projevil. Tento fenomén ditiocarbu byl již mnohokrát popsán, mechanismus jevu nebyl prozatím zcela objasněn. Jak můžeme vyčíst z grafu 2, maximální toxicita ditiocarbu byla přibližně v koncentraci  $1\mu\text{M}$  a okolo  $10\mu\text{M}$  viabilita buněk stoupá, což odpovídá publikovaným datům [43,75,76]. V mých výsledcích (graf 2) se objevil ještě druhý vrchol v koncentraci  $20\mu\text{M}$ , který již ve studiích publikován nebyl. Tuto odlišnost přisuzuji rozlišným buněčným liniím, které byly užity v publikacích a v mém vlastním experimentu.

Jak jsem již zmínila v teoretické části, ditiocarb je chelatačním činidlem a vyvazuje některé ionty kovů, například  $\text{Cu}^{2+}$  či  $\text{Zn}^{2+}$ . Tyto ionty jsou často kofaktory enzymů, v těle se nacházejí relativně často ve spojení s nejrůznějšími proteiny. Z toho můžeme usoudit, že ditiocarb by mohl interagovat nejen s enzymy uvedenými v kapitole 11 (Antabus), ale i s množstvím dalších proteinů.

Při pohledu na graf 2, který znázorňuje průběh koncentračně závislostní křivky pro ditiocarb u linie MCF-7, bychom mohli jeho neobvyklý průběh vysvětlit právě touto

vysokou reaktivitou ditiocarb. Možným vysvětlením by byla hypotéza, že za určitých koncentrací aktivuje ditiocarb protein či proteiny, které přispívají k přežití buňky. Konkrétně v mém experimentu by to byly koncentrace 10  $\mu\text{M}$  a 20  $\mu\text{M}$ , za kterých viabilita buněk stoupá. Naopak určité koncentrace by mohly degradovat enzymy, na nichž jsou nádorové buňky závislé a které ke svému přežití vyžadují. Tyto koncentrace by v mém experimentu odpovídaly 15  $\mu\text{M}$  případně 30  $\mu\text{M}$ . S jakými proteiny ve skutečnosti ditiocarb opravdu interaguje a co je podstatou bifázového efektu, by mohlo být předmětem budoucího studia.

Hlavní sledovanou látkou v experimentu byl syntetický komplex disulfiramu s mědí, u kterého byly protinádorové účinky popisovány již dříve v několika studiích [74]. Mé výsledky rovněž potvrzují protinádorovou aktivitu CuEt. Hodnota  $\text{IC}_{50}$  u CuEt pro linii MCF-7 byla rovna 0.413  $\mu\text{M}$ . Na základě tohoto výsledku můžeme říct, že látka CuEt je k buněčné linii MCF-7 odvozené od rakoviny prsu vysoce toxická a viabilitu buněk zásadně ovlivňuje. Pro další zkoumání by bylo jistě zajímavé testovat látku CuEt in vitro na jiné buněčné linie odvozené od karcinomu prsu a výsledky srovnávat.

Dále by bylo jistě přínosné testovat CuEt na subjektech in vivo. Takovýto postup by mohl být obdobný jako ve studii Brar et al., zde byla použita buněčná linie odvozena od melanomu. Vědci nejprve aplikovali CuEt a ZnEt na nádorové buňky, přičemž potvrdili inhibiční účinky in vitro na tyto nádorové buňky. Zde již můžeme říci, že inhibiční účinky in vitro byly u buněčné linie MCF-7 experimentálně potvrzeny. Následně byly ve studii Brar et al. buňky melanomu transplantovány do myší a komplexy testovány in vivo. V této fázi vědci dokázali inhibiční funkce komplexů na růst tumoru a angiogenezi. Veškeré výsledky byly s úspěchem potvrzeny na pacientce s metastází v játrech (viz kapitola 11.4., Obrázek 8) [80]. V případě, že by se povedlo obdobně postupovat a testování by bylo úspěšně ukončeno, byly by závěry velkým přínosem pro pacienty trpící rakovinou prsu. Případů vyléčených pacientů s rakovinou prsu pomocí disulfiramu již máme několik. Vyléčení pacientky s rakovinou prsu dokumentuje například případová studie Lewison z roku 1977 [71] nebo také studie Dufour et al. z roku 1993 [72].

Ze získaných výsledků je rovněž velice zajímavé srovnání grafu pro CuEt (graf 4) s první fází křivky u grafu pro ditiocarb (graf 2, koncentrace 0.1, 0.5, 1  $\mu\text{M}$ ). Zde přes odlišná očekávání můžeme tvrdit, že hodnota  $\text{IC}_{50}$  pro CuEt (0.413  $\mu\text{M}$ ) je srovnatelná

s hodnotou  $IC_{50}$ , kterou bychom mohli odečíst z první fáze křivky u ditiocarbu (přibližně je hodnota  $IC_{50}$  okolo  $0.5 \mu M$ ). Tento nečekaný výsledek, by mohl být vysvětlen vysokou hladinou měďnatých iontů u buněk linie MCF-7. Toto by znamenalo, že u nádorových linií s vysokou hladinou měďnatých iontů by nebyla potřeba dodávat při léčbě vedle antabusu zároveň i měď.

Na závěr bych ráda poukázala na graf 5, který srovnává hodnotu  $IC_{50}$  pro CuEt společně s hodnotou  $IC_{50}$  pro bortezomib, proteazomální inhibitor používaný v klinické léčbě. O bortezomibu je známo, že u pacientů s pevnými nádory (včetně rakoviny prsu) vysokou účinnost nevykazuje [16], přesto k buněčné linie MCF-7 i k jiným buněčným liniím (kapitola 11) je při testech in vitro vysoce toxický. V živých subjektech jsou buňky formovány do tkání, fungují jako celek, interagují společně ostatními buňkami a nejrůznějšími proteiny. Proto úspěch při testech in vitro není vždy převeden do úspěchu v klinické praxi. V teoretické části (kapitola 11) uvádím několik případů, kdy je ditiocarb případně komplex antabus s kovem u onkologických pacientů (nejen u trpících rakovinou prsu) opravdu účinný. Ve srovnávacím grafu 5 pozorujeme, že toxicita CuEt byla vedle bortezomibu ještě vyšší, což jenom podporuje fakt, že antabus by mohl být při dalším testování u rakoviny prsu opravdu účinný. Zároveň je zde nutné podotknout, že rozdíl v účinnosti může být způsoben pravděpodobným rozlišným mechanismem účinku bortezomibu a antabusu. Zatímco bortezomib nejspíše inhibuje část 20S proteazomu, u disulfiramu se zdá, že cílem by mohla být podjednotka části 19S proteazomu, konkrétně Pohl.

Na základě získaných dat je jistě oprávněně tvrdit, že antabus by se skutečně mohl stát lékem pro onkologické pacienty, který by byl přínosem nejen pro ně, ale po finanční stránce také pro zdravotní systém po celém světě. Z dávkovacího rozvrhu pro bortezomib (kapitola 8) a z průměrné ceny bortezomibu ([www.pharmacychecker.com](http://www.pharmacychecker.com): cca 1500 USD za 3,5 mg látky) můžeme vypočítat, že pro průměrného pacienta (70 kg, 170 cm;  $1,8m^2$ ) by byla cena za jeden cyklus léčby (21 dní) přibližně 3000 USD. Naproti tomu za pacienta léčeného antabusem dle rozvrhu uvedeného v kapitole 11 po stejnou dobu 21 dní bude zapláceno pouze 11 USD ([www.pharmacychecker.com](http://www.pharmacychecker.com): 1 tabletky 500mg cca 1 USD). Tento cenový rozdíl poskytované léčby je markantní a v zájmu celosvětového zdravotního systému by jistě měla být podpora výzkumu takovýchto neziskových léků jako je například antabus.

## 17. ZÁVĚR

V bakalářské práci byly vytýčeny dva cíle, které se tematicky prolínají, a to vypracování teoretické literární rešerše a provedení experimentální práce. Teoreticky jsem se snažila pojmout do práce veškeré zásadní informace o léku antabus, který se v klinické praxi používá již od 50. let 20. století v protialkoholní léčbě a u kterého se počátkem 21. století započaly zkoumat jeho protinádorové účinky. S tímto tématem úzce souvisí i pojem neziskové léky, jímž se v práci rovněž zabývám, jelikož antabus jako již dříve patentovaná látka nemá možnost být znovu patentována pro nový účel v onkologii. Koncept neziskových léků navrhuje financování nových klinických testů pro staré léky pomocí neziskových organizací. Tímto způsobem je možné prozkoumat dříve patentované látky s potenciálním novým účinkem a za původní cenu starého léčiva je prodávat na trhu.

V experimentální práci jsem potvrdila protinádorové účinky syntetického komplexu antabusu s mědí (CuEt) a také protinádorové účinky bortezomibu in vitro u nádorové linie MCF-7 odvozené od karcinomu prsu. Hodnota  $IC_{50}$  u CuEt byla stanovena na  $0.413 \mu\text{M}$ , u bortezomibu  $0.757 \mu\text{M}$ . Při srovnání těchto dvou proteazomálních inhibitorů se u linie MCF-7 ukázal jako toxičtější CuEt. O látce ditiocarb je možné říci, že v nízkých koncentracích (do  $1\text{M}$ ) má u linie MCF-7 srovnatelnou toxicitu jako CuEt, a to pravděpodobně z důvodu vysoké koncentrace mědi v nádorových buňkách.

Na základě dosažených závěrů teoretické i experimentální části mé bakalářské práce na téma ‚Neziskové léky: Aktivita komplexu disulfiramu (antabusu) s mědí proti buněčné linii odvozené od karcinomu prsu‘ je oprávněné tvrdit, že antabus v komplexu s kovem má potenciální protinádorové účinky u rakoviny prsu a zároveň by měl být hlouběji prozkoumáván a dále testován na subjektech in vitro, případně na lidských dobrovolnících.



## **18. LITERATURA**

- 1** Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005, 55: 74–108.
- 2** Verdecchia A, Francisci S, Brenner H, Gatta G, Micheli A, Mangone L, Kunkler I; EUROCARE-4 Working Group. Recent cancer survival in Europe: a 2000-02 period analysis of EUROCARE-4 data. *Lancet Oncol.* 2007, 8:784-96.
- 3** Levi F, Lucchini F, Negri E, Zatonski W, Boyle P, La Vecchia C. Trends in cancer mortality in the European Union and accession countries, 1980-2000. *Ann Oncol.* 2004, 15: 1425-31.
- 4** Pinder SE. Ductal carcinoma in situ (DCIS): pathological features, differential diagnosis, prognostic factors and specimen evaluation. *Mod Pathol.* 2010, 23: 8-13.
- 5** O'Malley FP. Lobular neoplasia: morphology, biological potential and management in core biopsies. *Mod Pathol.* 2010, 2: 14-25.
- 6** <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Sites-Types/IBC>, duben 2010.
- 7** <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Sites-Types/paget-breast>, duben 2010.
- 8** Souza JA, Marques EF, Guatelli C, Girão DS, Queroz T, Graziano L, Macedo M, Iyeyasu H, Chojniak R. Malignant phyllodes tumor of the breast: case report. *Rev Assoc Med Bras.* 2011, 57: 495-7.
- 9** <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/malebreast/Patient>, duben 2010.
- 10** Stein QP, Flanagan JD. Genetic and familial factors influencing breast, colon, prostate and lung cancers. *S D Med.* 2010, Spec No: 16-22.
- 11** Maughan KL, Lutterbie MA, Ham PS. Treatment of breast cancer. *Am Fam Physician.* 2010, 81: 1339-46.
- 12** Sainsbury JR, Anderson TJ, Morgan DA. ABC of breast diseases: breast cancer. *BMJ.* 2000, 32: 745-50.

- 13** Cleator SJ, Ahamed E, Coombes RC, Palmieri C. A 2009 update on the treatment of patients with hormone receptor-positive breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2009, 9: 6-17.
- 14** Gajria D, Chandarlapaty S. HER2-amplified breast cancer: mechanisms of trastuzumab resistance and novel targeted therapies. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2011, 11: 263-75.
- 15** de Ruijter TC, Veeck J, de Hoon JP, van Engeland M, Tjan-Heijnen VC. Characteristics of triple-negative breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011, 137: 183-92.
- 16** Cvek B, Dvorak Z. The ubiquitin-proteasome system (UPS) and the mechanism of action of bortezomib. *Curr Pharm Des*. 2011, 17: 1483-99.
- 17** Cvek B, Dvorak Z. The value of proteasome inhibition in cancer. Can the old drug, disulfiram, have a bright new future as a novel proteasome inhibitor? *Drug Discov Today*. 2008, 13: 716-22.
- 18** Xie Y. Structure, assembly and homeostatic regulation of the 26S proteasome. *J Mol Cell Biol*. 2010, 2: 308–17.
- 19** Zwickl P, Voges D, Baumeister W. The proteasome: a macromolecular assembly designed for controlled proteolysis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1999, 354: 1501-11.
- 20** Bedford L, Paine S, Sheppard PW, Mayer RJ, Roelofs J. Assembly, structure, and function of the 26S proteasome. *Trends Cell Biol*. 2010, 20: 391–401.
- 21** Sharon M, Taverner T, Ambroggio XI, Deshaies RJ, Robinson CV. Structural organization of the 19S proteasome lid: Insights from MS of intact complexes. *PLoS Biol*. 2006, 4: 1314-23.
- 22** Borissenko L, Groll M. 20S proteasome and its inhibitors: crystallographic knowledge for drug development. *Chem Rev*. 2007, 107: 687-717.
- 23** Demartino GN, Gillette TG. Proteasomes: machines for all reasons. *Cell* 2007, 129: 659-62.

- 24** Gallastegui N, Groll M. The 26S proteasome: assembly and function of a destructive machine. *Trends in Biochem. Sci.* 2010, 35: 634-42.
- 25** Nandi D, Tahiliani P, Kumar A, Chandu D. The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci.* 2006, 31: 137–55.
- 26** Wang J, Maldonado MA. The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. *Cell Mol Immunol.* 2006, 3: 255-61.
- 27** Sorokin AV, Kim ER, Ovchinnikov LP. Proteasome system of protein degradation and processing. *Biochemistry.* 2009, 13: 1411-42.
- 28** Cvek B. Antabuse repurposing: we need more knowledge and wide international support. *Int J Cancer.* 2011, in press.
- 29** Pickart CM, Cohen RE. Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004, 5: 177-87.
- 30** JAMM: a metalloprotease-like zinc site in the proteasome and signalosome. Ambroggio XI, Rees DC, Deshaies RJ. *PLoS Biol.* 2004, 2: 113-19.
- 31** Lander GC, Estrin E, Matyskiela ME, Bashore C, Nogales E, Martin A. Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature.* 2012, 482: 186-91.
- 32** Hershko A. The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell division cycle. *Cell Death Differ.* 2005, 12: 1191-97.
- 33** Adams J. Development of proteasome inhibitor PS-341. *Oncologist.* 2002, 7: 9-16.
- 34** Garg A, Aggarwal BB. Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development. *Leukemia.* 2002, 16: 1053–68.
- 35** O'Dea E, Hoffmann A. Nuclear factor-kappaB signaling. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2009, 1: 107-15.
- 36** Gilmore TD. Introduction to nuclear factor-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene.* 2006, 25: 6680-84.
- 37** Baldwin AS. Series introduction: the transcription nuclear factor-kappaB and human disease. *J Clin Invest.* 2001, 107: 3-6.

- 38** Graham B, Gibson SB. The two faces of nuclear factor-kappaB in cell survival responses. *Cell Cycle*. 2005, 4: 1342-45.
- 39** Gilmor TD. The Rel/nuclear factor-kappaB signal transduction pathway: introduction. *Oncogene*. 1999, 18: 6842-44.
- 40** Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*. 2006, 44: 431-6.
- 41** Sovak MA, Bellas RE, Kim DW, Zanieski GJ, Rogers AE, Traish AM, Sonenshein GE. Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J. Clin. Invest.* 1997, 100: 2952-60.
- 42** Rayet B, Gélinas C. Abberant rel/nuclear factor-kappaB aktiviti in human cancer. *Oncogene*. 1999, 18: 6938-47.
- 43** Guo X, Xu B, Pandey S, Goessl E, Brown J, Armesilla AL, Darling JL, Wang W. Disulfiram/copper complex inhibiting nuclear factor-kappaB activity and potentiating cytotoxic effect of gemcitabine on colon and breast cancer cell lines. *Cancer Lett*. 2010, 290: 104-13.
- 44** Lövborg H,  oberg F, Rickardson L, Gullbo J, Nygren P, Larsson R. Inhibition of proteasome activity, nuclear factor-kappaB translocation and cell survival by the antialcoholism drug disulfiram. *Int J Cancer*. 2006, 118: 1577–80.
- 45** Németh ZH, et al. Proteasome inhibitors induce inhibitory kappaB (I B) kinase activation, I B  degradation, and nuclear factor -kappaB activation in HT-29 Cells. *Mol Pharmacol*. 2004, 65: 342–49.
- 46** Hideshima T, Ikeda H, Chauhan D, Okawa Y, Raje N, Podar K, Mitsiades C, Munshi NC, Richardson PG, Carrasco RD, Anderson KC. Bortezomib induces canonical nuclear factor-kappaB activation in multiple myeloma cells. *Blood*. 2009, 114: 1046-52.
- 47** Chari A, Mazumder A, Jagannath S. Proteasome inhibition and its therapeutic potential in multiple myeloma. *Biologics*. 2010, 4: 273–87.
- 48** Kane RC, Dagher R, Farrell A, Ko CW, Sridhara R, Justice R, Pazdur R. Bortezomib for the treatment of mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2007, 13: 5291-4.

- 49** <http://scienceprogress.hms.harvard.edu/velcade.html>, červen 2011.
- 50** [http://www.boston.com/business/healthcare/articles/2007/05/06/the\\_velcade\\_story/](http://www.boston.com/business/healthcare/articles/2007/05/06/the_velcade_story/), červen 2011.
- 51** Adams J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer*. 2004, 4: 349-60.
- 52** Bross PF, et al. Approval summary for bortezomib for injection in the treatment of multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2004, 10: 3954-64.
- 53** Boccadoro M, Morgan G, Cavenagh J. Preclinical evaluation of the proteasome inhibitor bortezomib in cancer therapy. *Cancer Cell Int*. 2005, 5: 18.
- 54** Adams J. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer cell*. 2004, 5: 417-21.
- 55** Matteson DS.  $\alpha$ -amido boronic acids: a synthetic challenge and their properties as serine protease inhibitors. *Med Res. Rev*. 2008, 28: 233-46.
- 56** Ivy SP, Siu LL, Garrett-Mayer E, Rubinstein L. Approaches to phase 1 clinical trial design focused on safety, efficiency, and selected patient populations: A report from the clinical Trial design task force of the National Cancer Institute Investigational Drug Steering Committee. *Clin Cancer Res*. 2010, 16: 1726-36.
- 57** Seymour L, Ivy SP, Sargent D, Spriggs D, Baker L, Rubinstein L, Ratain MJ, Le Blanc M, Stewart D, Crowley J, Groshen S, Humphrey JS, West P, Berry D. The design of phase II clinical trials testing cancer therapeutics: Consensus recommendations from the clinical trial design task force of the National Cancer Institute Investigational Drug Steering Committee. *Clin Cancer Res*. 2010, 16: 1764-9.
- 58** de Bono JS, Ashworth A. Translating cancer research into targeted therapeutics. *Nature*. 2010, 467: 543-9.
- 59** Aronson JK. Old drugs – new uses. *Br J Clin Pharmacol*. 2007, 64: 563–5.
- 60** Boguski MS, Mandl KD, Sukhatme VP. Drug discovery. Repurposing with a difference. *Science* 2009, 324: 1394-5.
- 61** Chong CR, Sullivan. DJ Jr. New uses for old drugs. *Nature*. 2007, 448: 645-6.

- 62** Grabowski H. Are the economics of pharmaceutical research and development changing?: productivity, patents and political pressures. *Pharmacoeconomics*. 2004, 22: 15-24.
- 63** Cvek B. Nonprofit drugs as the salvation of the world's healthcare systems: the case of antabus (disulfiram). *Drug Discov Today*. 2011, in press.
- 64** Cvek B. Antabuse (disulfiram) as a pilot case of nonprofit drug. *Int J Cancer*. 2010, 127: 2486.
- 65** <http://www.global-cures.org/ifund>, březem 2011.
- 66** <http://www.global-cures.org/itoo>, březem 2011.
- 67** <http://www.global-cures.org/ifindprogram>, březem 2011.
- 68** Williams E. E. Effects of alcohol on workers with carbon disulfide. *JAMA*. 1937, 109: 1472-3.
- 69** Suh JJ, Pettinati HM, Kampman KM, O'Brien CP. The status of disulfiram: a half of a century later. *J. Clin. Psychopharmacol*. 2006, 26: 290-302.
- 70** Cvek B. Targeting malignancies with disulfiram (antabuse): multidrug resistance, angiogenesis, and proteasome. *Curr Cancer Drug Targets*. 2011, 11: 332-7.
- 71** Lewison E F. Spontaneous regression of breast cancer. *Progr Clin Biol Res*. 1977, 12: 47-53.
- 72** Dufour P, Lang JM, Giron C, Duclos B, Haehnel P, Jaeck D, Jung JM, Oberling F. Sodium dithiocarbamate as adjuvant immunotherapy for high risk breast cancer: a randomized study. *Biotherapy*. 1993, 6: 9-12
- 73** Cvek B, Dvorak Z. Targeting of nuclear factor-kappaB and proteasome by dithiocarbamate complexes with metals. *Curr Pharm Des*. 2007, 13: 3155-67.
- 74** Cvek B, Milacic V, Taraba J. Ni(II), Cu(II), and Zn(II) diethyldithiocarbamate complexes show various activities against the proteasome in breast cancer cells. *J Med Chem*. 2008, 51: 6256-8.

**75** Kim CH, Kim JH, Moon SJ, Hsu CY, Seo JT, Ahn YS. Biphasic effects of dithiocarbamates on the activity of nuclear factor-kappaB. *Eur J Pharmacol.* 2000, 392: 133-6.

**76** Wickström M, Danielsson K, Rickardson L, Gullbo J, Nygren P, Isaksson A, Larsson R, Lövborg H. Pharmacological profiling of disulfiram using human tumor cell lines and human tumor cells from patients. *Biochem Pharmacol.* 2007, 73: 25-33.

**77** Chen D, Cui QC, Yang H, Dou QP. Disulfiram, a clinically used anti-alcoholism drug and copper-binding agent, induces apoptotic cell death in breast cancer cultures and xenografts via inhibition of the proteasome activity. *Cancer Res.* 2006, 66: 10425-33.

**78** Cen D, Brayton D, Shahandeh B, Meyskens FL Jr, Farmer PJ. Disulfiram facilitates intracellular Cu uptake and induces apoptosis in human melanoma cells. *J Med Chem.* 2004, 47: 6914-20.

**79** Shiah SG, Kao YR, Wu FY, Wu CW. Inhibition of invasion and angiogenesis by zinc-chelating agent disulfiram. *Mol Pharmacol.* 2003, 64: 1076–84.

**80** Brar SS, Grigg C, Wilson KS, Holder WD, Dreau D, Austin C, Foster M, Ghio AJ, Whorton AR, Stowell GW, Whittall LB, Wittle RR, White DP, Kennedy TP. Disulfiram inhibits activating transcription factor/cyclic AMP-responsive element binding protein and human melanoma growth in a metal-dependent manner in vitro, in mice and in a patient with metastatic disease. *Mol Cancer Ther.* 2004, 3: 1049-60.

**81**[http://www.cancer.gov/clinicaltrials/search/view?cdrid=614004&version=HealthProfessional&protocolsearchid=9092902#Objectives\\_CDR0000614004](http://www.cancer.gov/clinicaltrials/search/view?cdrid=614004&version=HealthProfessional&protocolsearchid=9092902#Objectives_CDR0000614004), květen 2011.

**82** Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1973, 51: 1409-16.

## 19. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

|              |   |
|--------------|---|
| AMP          | Adenosinmonofosfát  |
| ATP          | Adenosintrifosfát   |
| BRCA1        | breast cancer type 1  |
| BRCA2        | breast cancer type 2  |
| CuEt         | Syntetický komplex disulfiramu s mědí   |
| DCIS         | Ductal carcinoma in situ, duktální karcinom in situ                                 |
| DMSO         | Dimethylsulfoxid  |
| DNA          | Deoxyribonukleová kyselina  |
| ER           | Estrogenní receptor   |
| FBS          | Fetální bovinní sérum   |
| FDA          | Food and Drug Administration  |
| HER-2/neu    | Human epidermal growth factor receptor 2, receptor pro epidermální růstový faktor 2 |
| IBC          | Inflammatory breast cancer, zánětlivý karcinom prsu                                 |
| IC50         | inhibition concentration at 50 %, koncentrace 50% inhibice                          |
| IL           | Interleukin   |
| ILC          | Invasive lobular carcinoma, invazivní lobulární karcinom                            |
| I $\kappa$ B | Inhibitor jaderného transkripčního faktoru kappa B                                  |
| IKK          | Inhibitor kappa-B kináza  |
| JAB1         | Jun activating binding protein  |
| JAMM         | JAB1/MPN/Mov34 metaloenzym  |
| MCF-7        | Michigan Cancer Foundation -7   |
| MHC          | major histocompatibility komplex, hlavní histokompatibilní komplex                  |
| MMP          | matrix-metaloproteinázy   |
| MPN          | Mpr1p Pad1p N-terminal domain metalloenzyme motif                                   |



|                |  |
|----------------|--|
| MTT            | 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid                |
| NEMO           | NF- $\kappa$ B essential modulator, regulační podjednotka IKK kinázy       |
| NF- $\kappa$ B | Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells             |
| PARP           | polyADPribóza polymeráza   |
| PBS            | Fosfátový fyziologický roztok  |
| P-glycoprotein | Permeability glykoprotein  |
| Poh1           | Pad one homolog 1, deubikvitináza  |
| PR             | Progesteronový receptor  |
| RHD            | Rel homology domain  |
| Rpn11          | Proteasome regulatory subunit, regulační podjednotka proteazomu            |
| S              | Svedbergův sedimentační koeficient   |
| TAD            | Transaktivační doména  |
| TNF $\alpha$   | Tumor necrosis factor $\alpha$ , tumor nekrotizující faktor $\alpha$       |
| UPS            | Ubikvitin proteazomální systém   |
| UCH            | Ubiquitin c-terminal hydrolasa, ubikvitin c-koncová hydroláza              |
| USP            | Ubikvitin-specifické proteasy  |
| VEGF           | Vascular endothelial growth factor, vaskulární endoteliální růstový faktor |
| ZnEt           | Komplex disulfiramu se zinkem  |