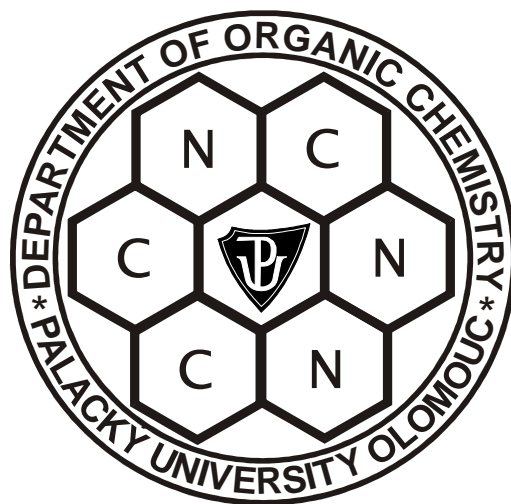


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
Katedra organické chemie



Hana VÁGNEROVÁ

**Metabolická aktivace triterpenů s protinádorovou aktivitou**

*Bakalářská práce*

Studijní obor: Bioorganická chemie B1407

Vedoucí práce: MUDr. Petr Džubák, Ph.D.

Laboratoř experimentální medicíny  
Ústav Molekulární a Translační Medicíny LF UP a FN Olomouc

Olomouc 2011

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Olomouci, 28. 4. 2011

Podpis.....

**Poděkování:**

Tímto bych chtěla poděkovat MUDr. Petru Džubákovi, Ph.D. za odbornou pomoc, cenné rady a připomínky, které mi při vypracování bakalářské práce poskytl. Dále děkuji zaměstnancům Laboratoře tkáňových kultur za vstřícnost a předané zkušenosti. Doktorce Adéle Galandákové děkuji za ochotně poskytované izolované potkaní hepatocyty. V neposlední řadě velké poděkování patří mým rodičům za jejich podporu během tvorby této práce a celého studia.

## **Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení	Hana Vágnerová
Název práce	Metabolická aktivace triterpenů s protinádorovou aktivitou
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř experimentální medicíny Ústav Molekulární a Translační MedicínyLF UP a FN Olomouc
Vedoucí práce	MUDr. Petr Džubák, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2011
Abstrakt	<p>Počet pacientů s nádorovým onemocněním se neustále zvyšuje. Proto je nutné vyvíjet a testovat nová účinnější a méně zatěžující protinádorová léčiva. Léčba rakoviny je nesmírně náročná mimo jiné i proto, že cytostatika působí na organismus mnoha nežádoucími účinky. Těmto nežádoucím účinkům je možné předejít používáním léčiv v jejich prodrug formě, kdy toxicitu limitujeme na cílové orgány a místa aktivace léčiv. Předmětem této práce je in vitro metabolizace „prodrug formy“ derivátů kyseliny betulinové a následné stanovení jejich cytotoxicity na buněčné nádorové linii CEM (lidské lymfoblastické leukemie). Kyselina betulinová se řadí mezi sloučeniny triterpenů, u kterých byla nalezena vysoká cytotoxická aktivita vůči nádorovým buňkám. Snahou zůstává vyvíjet deriváty této sloučeniny s lepšími farmakologickými vlastnostmi – biologickou dostupností a vyšším terapeutickým účinkem. Jednou z možností je právě převedení derivátů kyseliny betulinové do prodrug formy. V našich experimentech jsme se snažili o optimalizaci testů, které by nám umožnily studovat metabolizaci a následně i účinnost prodrugs. Po optimalizaci testů vykazovaly metabolizované deriváty v porovnání s nemetabolizovanými látkami vyšší cytotoxickou účinnost.</p>
Klíčová slova	Proléčiva, metabolická aktivace, rakovina
Počet stran	64
Počet příloh	0
Jazyk	český

**Bibliographical identification:**

Author's first name and surname	Hana Vágnerová
Title	Metabolic activation of triterpenoid compounds with anticancer activity
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Experimental Medicine, Institute of Molecular and Translational Medicine Faculty of Medicine, Palacký University and Faculty Hospital in Olomouc
Supervisor	MUDr. Petr Džubák, Ph.D.
The year of presentation	2011
Abstract	<p>Number of patients with cancer is increasing. Therefore, it is necessary to develop and test new anticancer drugs. Treatment of cancer is extremely demanding with side effects of cytotoxic drugs. These side effects of chemotherapy can be avoided by using chemotherapeutic drugs in their prodrug form, which has more favorable pharmacological properties in comparison to common drugs. Aim of this work is to use in vitro metabolism "prodrug forms" derivatives of betulinic acid and subsequent determination of its cytotoxicity to the tumor cell line CEM (human lymphoblastic leukemia). Betulinic acid is one of the triterpenoid compounds with high cytotoxicity against tumor cells. Due to the pure pharmacological properties our goal is to develop derivatives of betulinic acid with improved pharmacological properties – bioavailability and better therapeutic effects. One of the possible options is to convert derivatives to prodrug form. In our experiments, we tried to optimize method to study the metabolism and possible activation of the prodrugs. Finally, the metabolised drugs were more effective than non-metabolised.</p>
Keywords	Prodrugs, metabolic activation, cancer
Number of pages	64
Number of appendices	0
Language	Czech

## Seznam použitých zkratk

PEG	polyetylglykol
ADME	adsorpce, distribuce, metabolismus, exkrece
CNS	centrální nervový systém
LAT1	neutrální aminokyselinový transporter
DNA	deoxyribonukleová kyselina
TS	thymidylát synthasa
dUMP	deoxyuridinmonofosfát
dTMP	deoxythymidinmonofosfát
CH <sub>2</sub> THF	5, 10 – methylen tetrahydrofolát
FdUMP	fluorodeoxyuridinmonofosfát
DTP	deoxynukleotid
dUTP	deoxythymidin trifosfát
dUTPasa	pyrofosfatasa
UDG	uracil-DNA-glykosylasa
ATP	adenosin trifosfát
CPT 11	irinotecan
β – GLU	β - glukuronidasa
hCE2	lidský izozym jaterní karboxylesterasy
UGT	glukuronosyltransferasa
CYP	cytochrom
CE	karboxylesterasa
EMBP	estramustin vázající protein
ADEPT	protilátkou řízená enzymatická terapie pro léčivem (Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy)
GDEPT	genově řízená enzymatická terapie pro léčivem (Gene Directed Enzyme Prodrug Therapy)
PDEPT	polymerem řízená enzymatická terapie pro léčivem (Polymer Directed Enzyme Prodrug Therapy)
NADPH	redukovaný nikotinamidinukleotidfosfát
PSA	prostatický specifický antigen
CPG2	karboxypeptidasa G2

CEA	karcinoembryonální antigen
HPMA	N-(2-hydroxypropyl)-methakrylamid
PELT	polymerem řízená enzymatická liposomální terapie (Polymer-Directed Enzyme Liposome Therapy)
LTSL	liposomy citlivé na nízkou teplotu
TTSL	liposomy citlivé na vysokou teplotu
CEM	buněčná linie lidské lymfoblastické leukemie
PBS	fosfátový pufr
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid
SDS	dodecylsulfát sodný
IC <sub>50</sub>	inhibiční koncentrace, při které zahyne 50% populace buněk
FCSI	fetální telecí sérum
HSA	lidský sérový albumin
AAG	α-kyselá glykoproteiny

<b>Obsah</b>	
<b>Seznam použitých zkratk</b>	6
<b>Úvod</b>	10
<b>Cíl práce</b>	11
<b>1. Teoretická část</b>	12
1.1 Proléčiva – úvod	13
1.1.1 Důvody k používání proléčiv	13
1.1.2 Hlavní způsoby aplikace proléčiv	14
1.2. Protinádorová proléčiva	15
1.2.1 Antimetabolity	16
1.2.2 Interkalační látky	17
1.2.3 Cytoskeletární jedy	17
1.2.4 Inhibitory proteosyntézy	18
1.2.5 Inhibitory topoisomeras	18
1.2.6 Mitokany	19
1.2.7 Inhibitory tyrosin kinasových receptorů	19
1.2.8 Hormonální léčiva	20
1.3 Běžně používané funkční skupiny proléčiv a jejich metabolismus	21
1.3.1 Estery	21
1.3.2 Fosfáty	23
1.3.3 Karbonáty a karbamáty	24
1.3.4 Amidy	26
1.3.5 Oximy	26
1.4 Selektivní podávání proléčiv	27
1.4.1 Hypoxie	27
1.4.2 Odlišné pH	30
1.4.3 Enzymy sdružené s nádorem	31
1.4.4 Specifické antigeny a receptory	33
1.4.5 Metody ADEPT a GDEPT	34
1.4.6 Nové metody cílení	37
1.5 Triterpeny	40
<b>2 Experimentální část</b>	43
2.1 Chemikálie, přístroje, spotřební materiál, roztoky	45



2.2 Metody	46
2.2.1 Pasážování suspenzních buněk	46
2.2.2 Izolace hepatocytů	47
2.2.3. Cytotoxický MTT test	48
2.2.4 Statistické vyhodnocení	49
2.3 Výsledky	50
2.4 Diskuse	56
<b>3 Závěr</b>	59
<b>Seznam použité literatury</b>	60

## Úvod:

Tématem této bakalářské práce jsou protinádorová proléčiva a mechanismus jejich aktivace. V teoretické části se postupně seznámíme s tím, co to jsou proléčiva a jaké jsou výhody jejich používání. Dále jsou zde popsána konvenčně používaná cytostatika a jejich dělení podle mechanismu účinku. Podrobněji se zabýváme funkčními skupinami, které se využívají ve strukturách proléčiv a jejich metabolismem v organismu. Rozsáhlá část je věnována možnostem cílení protinádorových proléčiv na nádorovou tkáň.

V experimentální části se zaměříme na testování cytotoxicity metabolicky aktivovaných derivátů triterpenů. Jedná se o látky, které jsou odvozené od struktury kyseliny betulinové, konkrétně karbonátové deriváty. Jejich syntézou se zabývá RNDr. J. Šarek a Mgr. M. Kvasnica z Přírodovědecké fakulty, Katedry Organické chemie Univerzity Palackého v Olomouci. Všechny testované deriváty jsou v této práci uvedeny pod jejich kódovým označením.

**Cíl práce:**

1. Optimalizace metodiky pro in vitro přípravu v hepatocytech metabolizovaných derivátů triterpenů.
2. Stanovení cytotoxicity metabolizovaných derivátů na nádorové buněčné linii CEM.

# 1. Teoretická část

## 1.1 Proléčiva - úvod

V roce 1958 definoval Albert proléčivo jako chemickou látku s malým nebo žádným farmakologickým účinkem, která musí projít biotransformací na terapeuticky aktivní metabolit [1]. Právě tato skutečnost odlišuje proléčiva od běžných léků. Proléčiva lze rozdělit do několika skupin podle různých hledisek. Z historického pohledu dělíme léčiva na záměrně připravená a náhodně objevená. Z pochopitelných důvodů převládají záměrně připravená proléčiva, která vznikají derivatizací nebo modifikací známé aktivní látky. Podle chemických kritérií rozlišujeme 4 hlavní třídy proléčiv:

- 1) Proléčiva spojená s nosičem – aktivní látka je spojená s nosičem, k následné aktivaci u většiny proléčiv dojde hydrolýzou
- 2) Bioprekursory – proléčiva neobsahující funkční skupinu, ale jsou aktivována oxidací nebo redukcí
- 3) Makromolekulární proléčiva – nosičem aktivní látky je makromolekulární látka, například PEG (polyetylen glykol)
- 4) Léčiva konjugovaná s protilátkou – nosičem je protilátka, která se váže na nádorové buňky

Nejpočetněji je zastoupena první skupina proléčiv, která jsou aktivována hydrolytickým odstraněním funkční skupiny. Bioprekursory představují asi ¼ proléčiv [2].

### 1.1.1 Důvody k používání proléčiv

Proto, aby léčivo proniklo do místa svého účinku, musí překonat v organismu některé bariéry – nečastěji biologické membrány. U mnoha léků se setkáváme s nevhodnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi (špatná rozpustnost ve vodě, polarita, chemická stabilita) a farmakologickými vlastnostmi (špatná perorální absorpce, příliš rychlý presystémový metabolismus, toxicita) a další. Z tohoto důvodu je nutné léčiva vhodně modifikovat, abychom dosáhli, co nejvýhodnějších vlastností. Při tomto procesu využíváme různých funkčních skupin – „promoiety“ k derivatizaci výchozího léčiva. V organismu jsou pak tyto skupiny chemicky nebo enzymově odbourány. Proces probíhá v jednom nebo více krocích, po kterých se uvolní aktivní látka (Schéma 1).

Z předchozího textu vyplývá, že je velmi důležité zvolit vhodné komponenty pro design nového proléčiva. Je důležité zvážit, které funkční skupiny na výchozím léčivu

je možné derivatizovat. Vybrat takové funkční skupiny, které nejsou organismu nijak nebezpečné a jsou rychle vylučovány z těla. Pokusit se dopředu odhadnout chování volné „promoiety“ v těle. Brát v úvahu vznik i dalších produktů a jejich degradaci. Komplexně porozumět farmakokinetickým vlastnostem: absorpce, distribuce, metabolismu, exkrece (ADME).

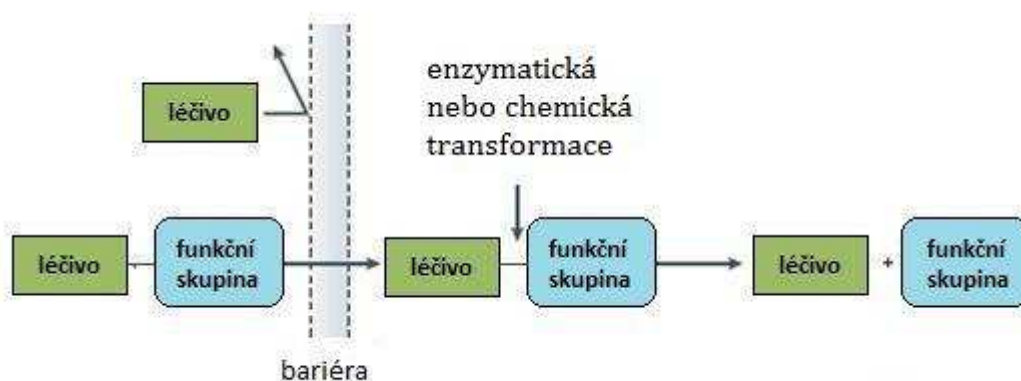


Schéma 1: Ilustrace konceptu proléčiv: Komplex léčivo – funkční skupina je farmakologicky neaktivní. Bariérou může být myšlena jakákoliv limitace výchozího léčiva k dosažení optimálních farmakologických vlastností. Léčivo a funkční skupina jsou reverzibilně spojeny kovalentní vazbou, kterou je možné chemicky nebo enzymaticky odbourat, čímž dochází k aktivaci léčiva [3].

### 1.1.2 Hlavní způsoby aplikace proléčiv

#### 1) Perorálně

Pro orální podávání proléčiva jsou hlavními omezujícími faktory špatná rozpustnost ve vodě, nízká dostupnost přes membrány, rychlý metabolismus v játrech a následné vyloučení žlučí. Zlepšení rozpustnosti ve vodě může být zajištěno zavedením ionizované skupiny (např. fosfátu) k původnímu léčivu. Lipofilitu můžeme zvýšit maskováním polární nebo disociovatelné skupiny v molekule léčiva. Molekula pak může prostupovat přes membránu. Absorpce zprostředkovaná přenašečem je důležitá pro polární nebo nabitě látky, které nemohou procházet membránou. Promoieta těchto látek je nosič, který má takovou strukturu, aby interagoval s membránovými transportéry. V tomto směru se zdají být zajímavé peptidové transportéry, které se běžně vyskytují v tenkém střevě.

#### 2) Parenterálně (jiným způsobem než perorálně)

I tento způsob podávání je závislý na rozpustnosti proléčiva ve vodném prostředí. Tuto rozpustnost lze významně zvýšit zavedením 2x ionizované fosfátové skupiny. Zlepšení absorpce při lokálním podání řeší problém s překonáním vnějších bariér a zamezením průniku léčiva do systémové cirkulace. Zejména výhodné se jeví selektivní podávání proléčiv. Jedná se o zajímavou oblast výzkumu. Selektivně lze proléčiva podávat několika mechanismy, a to prostřednictvím transportérů, selektivní metabolickou aktivací enzymy, antigenovým značením a dalšími.

Omezené nadále zůstává dodávání proléčiv do CNS, kde je obrovským problémem překonání encefalopatické bariéry krev – mozkomíšní mok. Možností jak se s tímto problémem vypořádat, je využít transportéry encefalopatické bariéry, na které budou léčiva cílena. Například prostřednictvím neutrálního aminokyselinového transportéru LAT1 je možné transportovat protinádorovou látku melphalan (derivát yperitu), která je svojí strukturou podobná fenylalaninu [4].

Další výhodou využití proléčiv, kterou uvádíme, je možnost postupného uvolňování aktivní látky z proléčiva a tím pádem prodloužení doby účinku [3].

Design proléčiv je významnou oblastí výzkumu a stále zůstává velkou výzvou. Cílem, kterého chceme dosáhnout, je maximální využití účinku aktivní látky v organismu a minimalizace vedlejších nežádoucích účinků. Řada proléčiv je již zavedena do běžné praxe.

## **1.2 Protinádorová proléčiva**

Léčba nádorů je obtížná, prakticky k ní není možné použít pouze jedinou metodu. Léčba je založena na kombinaci více metod (chirurgické, radioterapie a chemoterapie), které se navzájem doplňují. Protinádorové proléčivo musí uspokojovat některé zásadní předpoklady:

- 1) Biomolekuly sdružené s nádorem se musí vyskytovat v nádorové tkáni ve vyšší hladině na rozdíl od zdravé tkáně. Zároveň musí být schopné generovat cytotoxickou látku.
- 2) Aktivace proléčiva v místech mimo nádor musí být minimální.
- 3) Proléčivo musí být substrátem pro enzym sdružený s nádorem s dostatečnou afinitou.
- 4) Proléčivo musí být mnohem méně toxické v porovnání s původní látkou.

- 5) Proléčivo nesmí být z těla vylučováno příliš rychle a nesmí vstupovat do buněk náhodně. Je tedy nutné zvolit správnou polaritu proléčiva [5].

Samotná chemoterapie je založena na několika mechanismech účinku. Konvenčně používaná cytostatika působí prostřednictvím těchto mechanismů:

### 1.2.1 Antimetabolity

Inhibují klíčové enzymy metabolismu, modifikují produkty katalytické reakce nebo terminují růst polymerního řetězce biomolekul. Toto vše může vést k poruše biosyntézy nukleových kyselin s následnou inhibicí buněčného dělení. V tomto případě hovoříme o **antimetabolitech** - látkách, které vznikají chemickou úpravou přirozeně se vyskytujících metabolitů. Na základě velmi podobné struktury jsou rozpoznány enzymem, který katalyzuje konkrétní reakci. Využívají se antimetabolity, které zasahují do biosyntézy prekurzorů bazí, biosyntézy/katabolismu složek nukleových kyselin nebo ovlivňují enzymy řídící buněčný cyklus [6].

Mezi dlouho známé a používané zástupce antimetabolitů patří 5-fluorouracil, analog pyrimidinových bazí, jehož prostřednictvím dochází k inhibici thymidylát syntasy (Schéma 2 a 3).

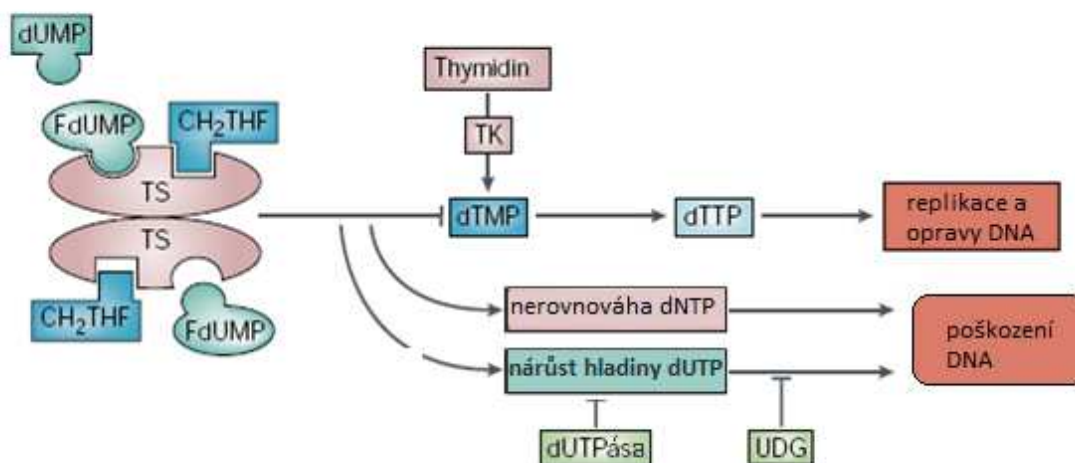


Schéma 2: Mechanismus inhibice thymidylát syntasy 5-fluorouracilem – thymidylát syntasa (TS) katalyzuje přeměnu deoxyuridinmonofosfátu (dUMP) na deoxythymidinmonofosfát (dTMP), kde 5, 10- methylen tetrahydrofolát (CH<sub>2</sub>THF) slouží jako donor methylové skupiny. Aktivní metabolit 5-fluorouracilu fluorodeoxyuridinmonofosfát (FdUMP) se váže na vazebné místo nukleotidu SH



skupiny cysteinu. Vytváří stabilní ternární komplex s thymidylát syntasou a tetrahydrofolátem, blokuje přístup dUMP k vazebnému místu a tím inhibuje syntézu dTMP. Inhibice vede k nerovnováze v hotovosti deoxynukleotidu (dTP) a zvýšené hladině deoxythymidintrifosfátu (dUTP), což jsou příčiny poškození DNA. Rozsah poškození zapříčiněný dUTP je závislý na hladině pyrofosfatasy (dUTPasy) a uracil-DNA-glykosylasy (UDG). Pyrofosfatasa omezuje intracelulární akumulaci dUTP. UDG je zodpovědná za opravy DNA, která obsahuje chybně zařazený uracil a 5-fluorouracil [7].

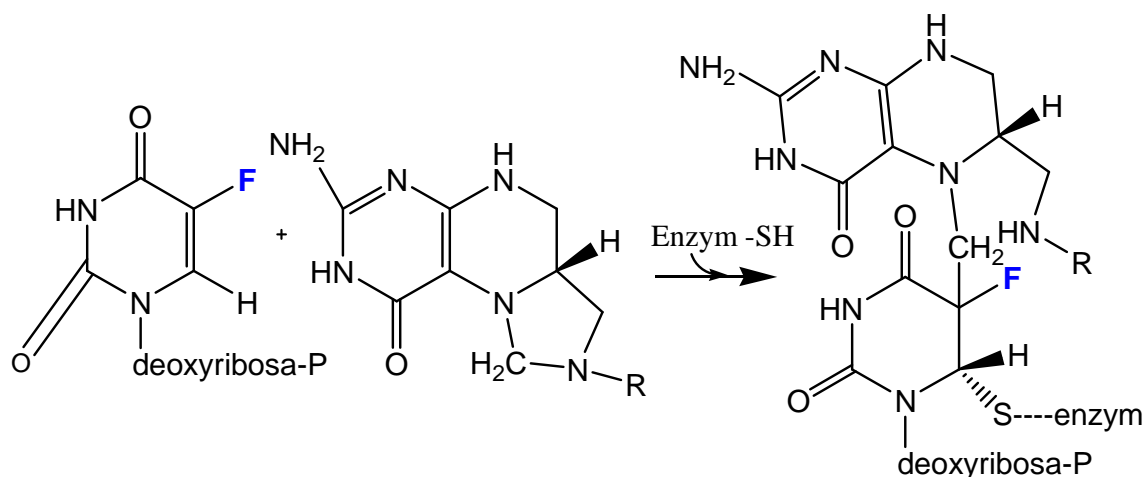


Schéma 3: Komplex fluorodeoxyuridinmonofosfátu, tetrahydrofolátu a TS. Atom fluoru na substituované molekule uracilu, není schopen odstoupit stejným způsobem jako atom vodíku, což vede k zablokování dalších reakcí metabolické dráhy [8].

### 1.2.2 Interkalační látky

Mohou přímo poškozovat struktury již hotových nukleových kyselin. Váží se na ně nekovalentní, nejčastěji vodíkovou vazbou. Dojde k poruše funkce nukleových kyselin a výsledkem je opět omezení buněčné proliferace. Konvenčně používaná jsou antracyklinová antibiotika – např. doxorubicin, daunorubicin a od nich odvozené deriváty [9].

### 1.2.3 Cytoskeletární jedy

Alternují mikrotubulární proteiny s následkem abnormálního průběhu mitózy. Např. v případě vincristinu dojde k zablokování mitózy v metafázi, kde mikrotubuly zajišťují pohyb chromosomů. Může jít o látky, které destabilizují mikrotubuly nebo naopak je před depolymerizací chrání. Nazýváme je **cytoskeletární jedy**. Mohou to být i látky

přírodního původu například vinka alkaloidy nebo jejich deriváty kolchicin, vinkristin, paklitaxel, spongistatin a další (Schéma 4) [10].

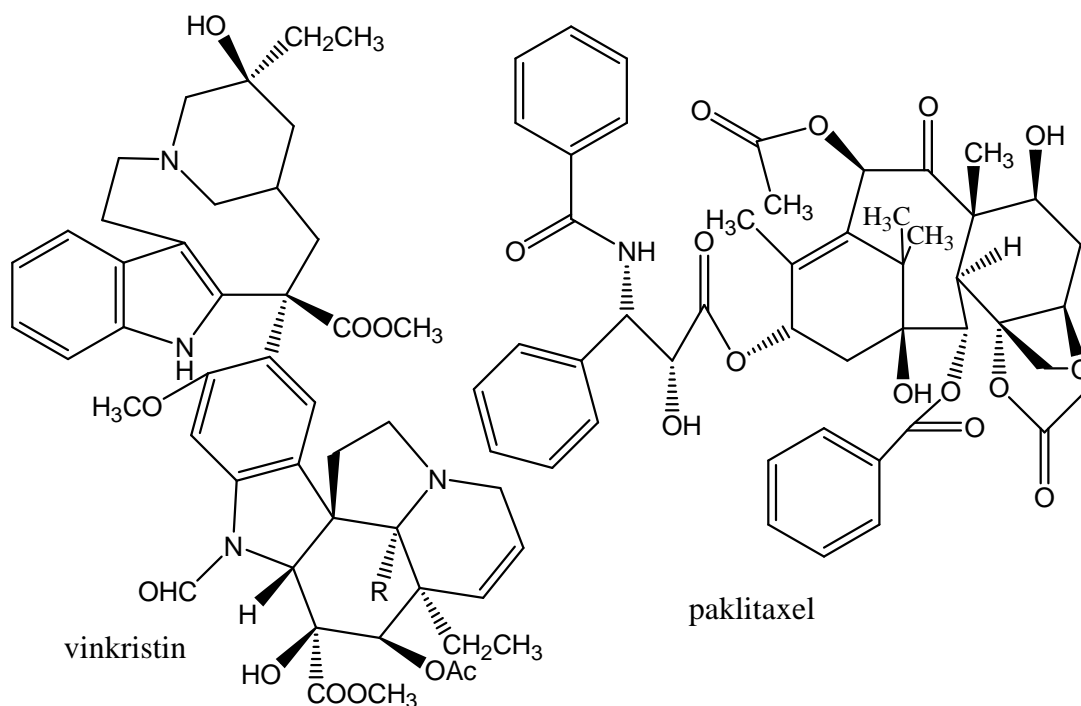


Schéma 4: Zástupci látek interagujících s tubulinem [10].

#### 1.2.4 Inhibitory proteosyntézy

Způsobují poruchy syntézy proteinů – **inhibitory proteosyntézy**. Využití tohoto mechanismu je nejméně časté pro protinádorovou chemoterapii. Je využíván spíše při antibiotické léčbě.

#### 1.2.5 Inhibitory topoisomerasy

**Inhibují topoisomerasy**, které jsou důležité při opravných procesech DNA a podílejí se na kondenzaci a dekonenzaci chromosomů při mitóze. Podle toho, se kterou topoisomerasou interagují se inhibitory dělí na inhibitory topoisomerasy I a topoisomerasy II (Schéma 5) [6].

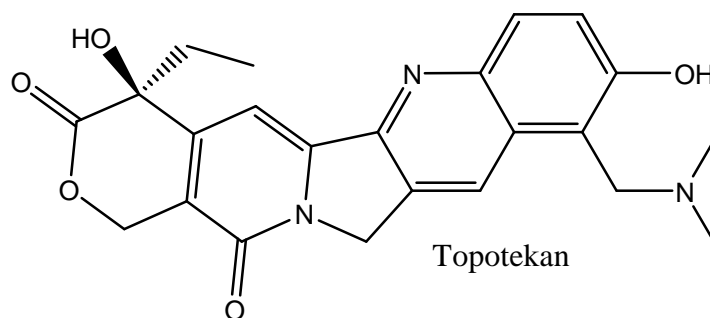


Schéma 5: Topotecan – inhibitor topoisomerasy I [11]. Využívá se k léčbě karcinomu kolorekta, nemalobuněčného karcinomu plic, karcinomu ovária a jícnu [6].

### 1.2.6 Mitokany

Látky, které zasahují do funkce mitochondrií označujeme jako **mitokany**. Jedná se o malé molekuly, které selektivně indukují apoptózu interferencí s mitochondriemi. Například analoga vitamínu E jsou cílena na elektron-transportní řetězec. Konkrétní zástupce  $\alpha$ -tokopherylsukcinát je zaměřen na komplex II dýchacího řetězce [12].

### 1.2.7 Inhibitory tyrosin kinasových receptorů

Ovlivňují tyrosin kinasovou signální dráhu – **inhibitory tyrosin kinasových receptorů**. Jedná se o malé molekuly, které inhibují tyrosin kinasovou doménu receptoru a tím zasahují do intracelulární signalizace vedoucí k regulaci mitózy, transkripci genů a diferenciaci buněk (např Imatinib, Sorafenib). Nevýhodou je, že tyto látky působí neselektivně a kompetitivní inhibicí s ATP inhibují více typů tyrosin kinas. V současné době byly objeveny deriváty serotoninu, které na tyrosin kinasy působí selektivně nekompetitivně s ATP (Schéma 6) [13].

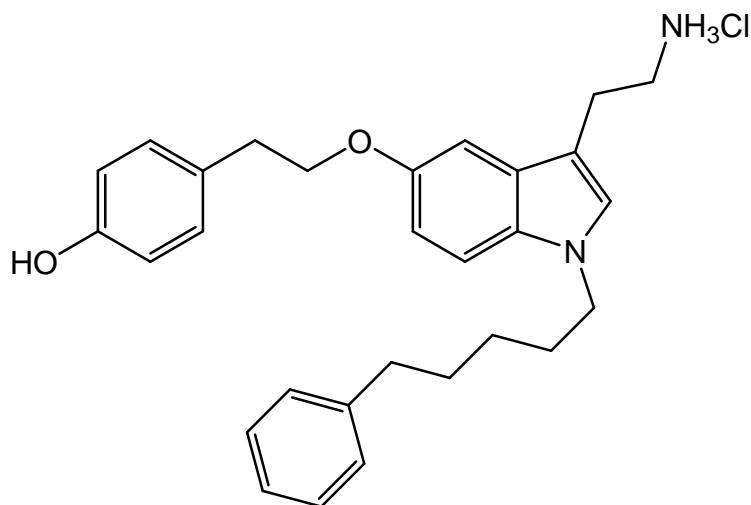


Schéma 6: Derivát serotoninu inhibující tyrosin kinasu [13].

### 1.2.8 Hormonální léčiva

Využívají hormonální závislosti některých typů nádorových buněk pro jejich růst. Jedná se většinou o **látky hormonální povahy**. Využívají se především látky povahy estrogenů k léčbě rakoviny prsu. Jako agonisté estrogenního receptoru jsou používána léčiva tamoxifen [43] nebo miproxifen, který se podává ve formě proléčiva s fosfátovou funkční skupinou (Schéma 7) [18]. Při léčbě prostaty se využívá anti-androgenů jako například cyproteronacetátu a flutamidu k chemické kastraci pacienta a inhibici stimulace růstu androgen dependentních nádorových buněk [43].

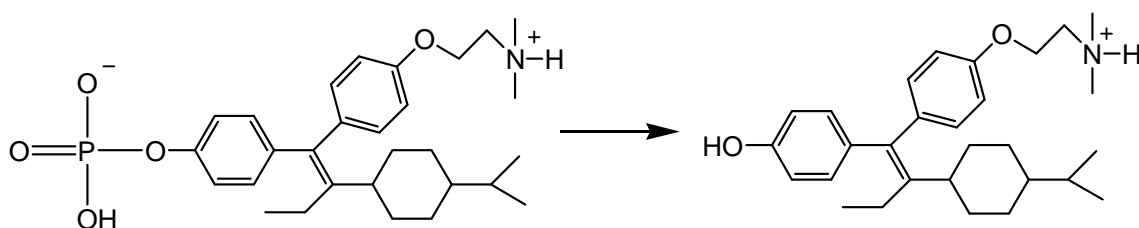


Schéma 7 : Struktura miproxifenu a jeho proléčiva [18].

Vidíme, že protinádorových léčiv je velké množství s různorodým mechanismem účinku. V současné době prochází vývojem léčiva, která působí na nádorovou buňku velmi specificky a cíleně. Můžeme sem zařadit léčiva, která ovlivňují diferenciaci nádorové buňky nebo vyvolávají její apoptózu. Jiná cytostatika mohou působit jako agonisté růstových faktorů (např. Herceptin pro EGFR) nebo ovlivňovat buněčný cyklus. Zajímavou skupinou látek jsou takové, které modifikují odpověď „hostitele“ na karcinogenezi - například modulátory imunitní odpovědi a látky omezující metastazování a abiogenezi v nádoru [44]. Účinky použitých léčiv se mohou také různým způsobem kombinovat (synergismus, antagonismus, aditivní účinek).

Při chemoterapii je upřednostňována systémová aplikační cesta, ať už perorální podávání nebo parenterální. Tyto způsoby mají velká omezení [14]. Užívání cytostatik s sebou nese spoustu závažných nežádoucích účinků, protože cytostatika atakují i zdravé nenádorové buňky. Snažíme se tyto nežádoucí účinky snížit, v nejlepším případě úplně eliminovat. Z tohoto důvodu je vhodné používat prolékovou strategii, kde je cílem podávat cytostatika selektivně do nádorové tkáně bez větších zásahů do tkáně zdravé [15]. K zacílení na nádorovou tkáň je využíváno jejich charakteristických vlastností, jako je hypoxie (snížený obsah kyslíku ve tkáni), pH lišící se od fyziologického, přítomnost specifických receptorů a antigenů, přítomnost enzymů sdružených s nádorem. Proléčivo je přímo aktivováno v jednom kroku.

Dalším možným přístupem může být terapie probíhající ve více krocích, kdy nejprve je určitým způsobem zaveden do místa nádoru enzym katalyzující aktivaci proléčiva a až následně je podáno samotné proléčivo [5]. Tyto metody budou probrány později.

### 1.3 Běžně používané funkční skupiny proléčiv a jejich metabolismus

#### 1.3.1 Estery

**Esterová** proléčiva jsou nejběžnější a nejlépe prostudovaná. Lze je získat z karboxylových kyselin, hydroxyderivátů a thioderivátů. Jejich syntéza není obtížná stejně jako štěpení, které probíhá hydrolyticky esterasami (karboxylesterasami, acetylcholinesterasami, arylerasami), ale také prostřednictvím cytochromu P450 (Schéma 8). Esterasy se nacházejí ve spoustě tkání (krev, játra, gastrointestinální trakt) (Tabulka 1) [16].

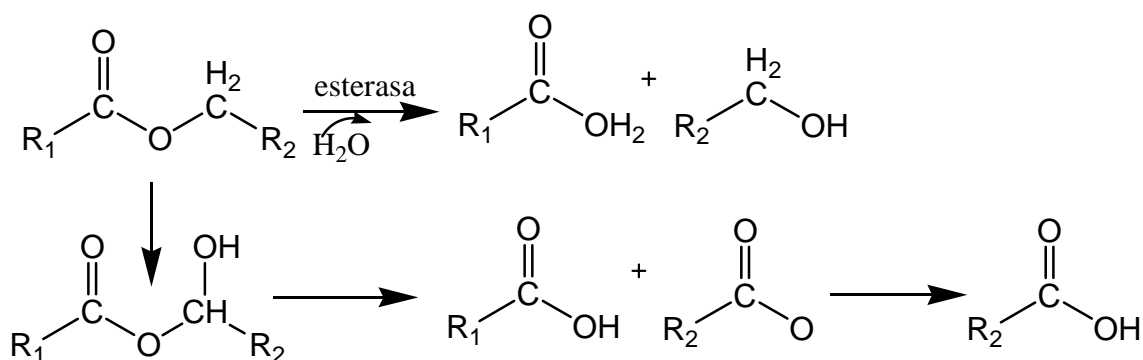


Schéma 8: Schéma štěpení esterové vazby. Hydrolytickým štěpením esterasami vzniká karboxylová kyselina a alkohol. Prostřednictvím CYP450 vzniká nejprve hydroxyester, který je posléze štěpen na karboxylovou kyselinu a aldehyd. V dalším kroku může být aldehyd oxidován na karboxylovou kyselinu nebo redukován na alkohol [16].

Jednu z těchto metabolických drah reprezentuje biotransformace irinotecanu (CPT 11). Irinotecan funguje jako inhibitor topoisomerasy I a je proléčivem účinné látky SN-38, která je až tisíckrát toxičtější než CPT 11. Irinotecan vykazuje terapeutickou aktivitu vůči kolorektálnímu a plicnímu nádoru a nádoru ovárií. U obou látek jsou známy 2 formy – laktonová nebo karboxylátová, které jsou v rovnováze závislé na pH prostředí. Přitom pouze laktonová forma je terapeuticky aktivní. Metabolická přeměna CPT 11 probíhá převážně v játrech, kde se na ní podílí hCE2, UGT (glukuronosyltransferasa), CYP3A a  $\beta$  – glukuronidasa (Schéma 9) [17].

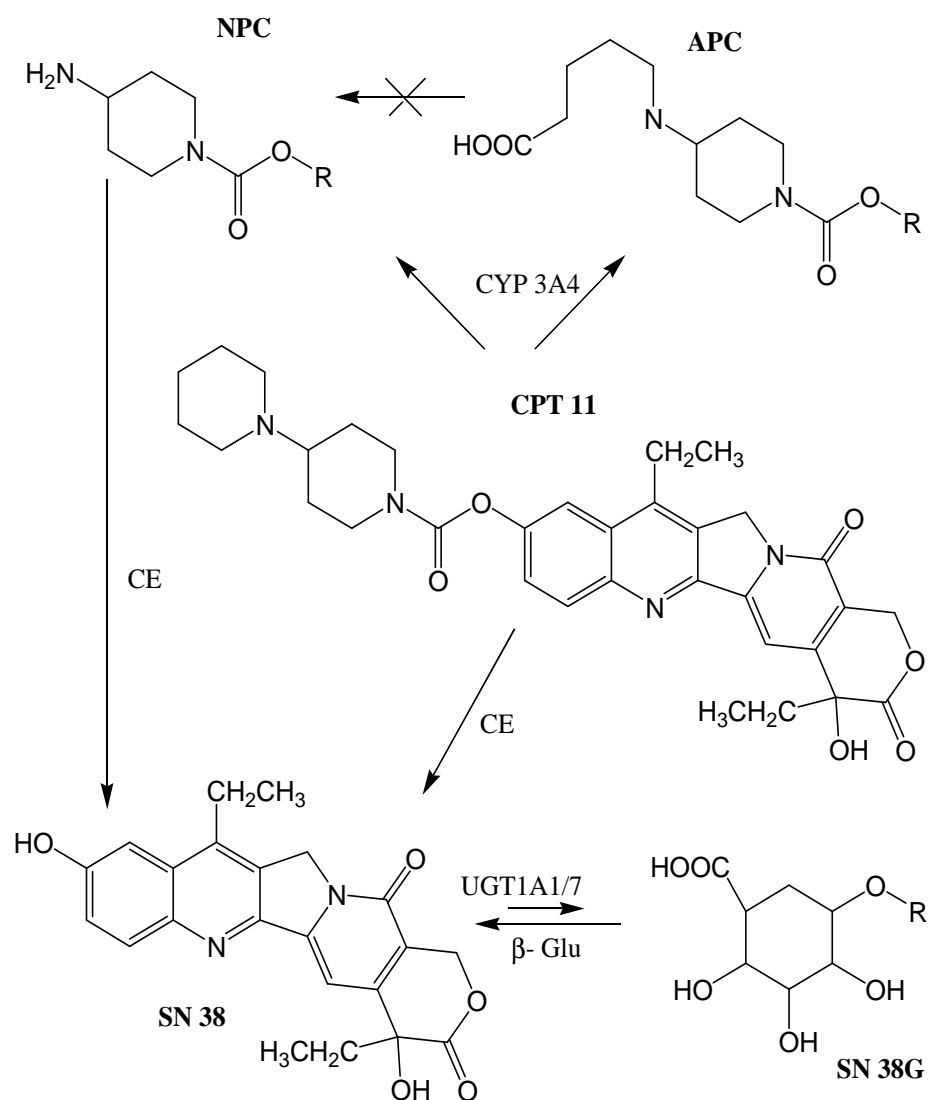


Schéma 9: Metabolická dráha CPT 11 – CPT 11 prostřednictvím CE přechází na aktivní metabolit SN – 38G, který je pomocí UGT převeden na glukuronidovaný derivát s následnou deglukuronidací β – Glu na SN-38. CYP 3A4 zprostředkuje oxidaci CPT 11 na NPC a APC, později mohou být hydrolyzovány CE [17].

Tabulka 1: Nejdůležitější enzymy podílející se na biotransformaci esterových proléčiv [16].

Typ	EC identifikační číslo	Lokalizace
Hydrolytické enzymy		
Esterasa A		
Paraoxonasa	3.1.8.1.	plazma, játra, mozek, ledviny, plíce
Esterasa B		
Karboxylesterasa	3.1.1.1.	krev, játra, mozek, ledviny, plíce, svaly, střevo, žaludek, kůže, srdce, prs, vaječníky, děložní hrdlo, varlata, močový měchýř, slinivka, štítná žláza, nosní/dýchací adipózní tkáň, placenta, brzlík, nádor
Acetylcholinesterasa	3.1.1.7.	plazma, játra, mozek, svaly, nervy, ledviny, střevo, sítnice, placeta, brzlík
Cholinesterasa	3.1.1.8.	plazma, játra, mozek, svaly, ledviny, střevo, sítnice, placenta
Oxidační enzymy		
Cytochromy P450		játra, mozek, ledviny, plíce, střevo, nadledvinky, varlata, kůže, slezina, placenta, čichová sliznice, oční tkáň, nádor

### 1.3.2 Fosfáty

**Fosfáty** odvodíme od hydroxylových nebo amino skupin. Jsou charakteristické snadnou rozpustností ve vodě, tedy vhodné k perorálnímu podávání. K jejich štěpení dochází enzymaticky alkalickými fosfátasami ve střevě a játrech. Biokonverze někdy probíhá až tak rychle, že dojde k přesycení parentální látkou a její precipitaci, což snižuje její biodostupnost. Tato skutečnost je závislá na střevním pH [18]. Biodostupnost fosfátových proléčiv se snižuje i v přítomnosti vápníku, např. z mléčných produktů nebo antacid [19].

Jako zástupce uvedme Estramustin fosfát – proléčivo estramustinu (Schéma 10), které se již dlouhou dobu využívá k léčbě pokročilého nádoru prostaty. To, že je estramustin účinný právě v buňkách prostaty, je dáno tím, že se v nich nachází specifický protein, na který se estramustin váže (EMBP). Estramustin působí tak, že se váže na proteiny sdružené s mikrotubuly, což vede k jejich depolymerizaci [19].

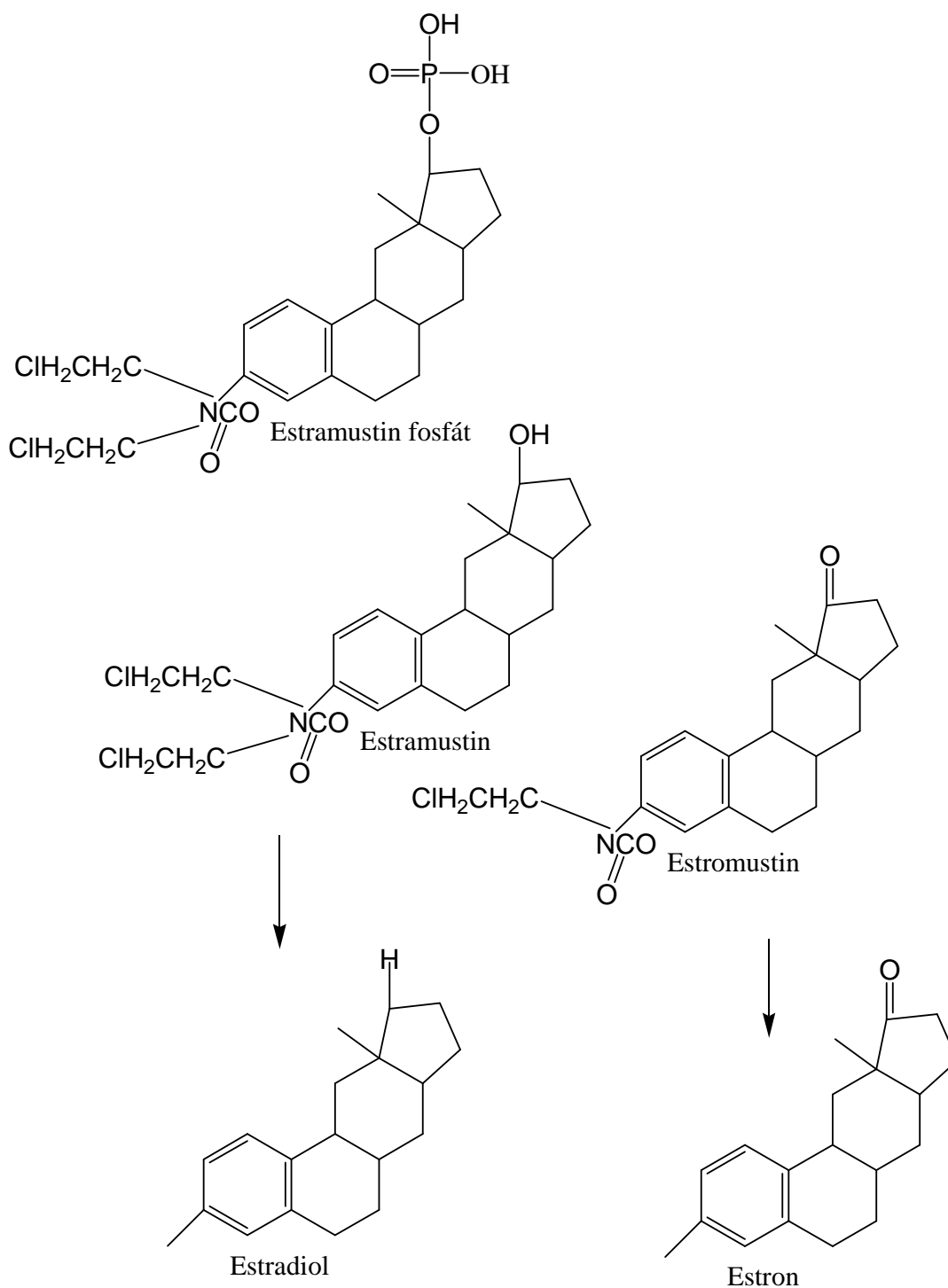


Schéma 10: Struktura a metabolismus Estramustin fosfátu [19].

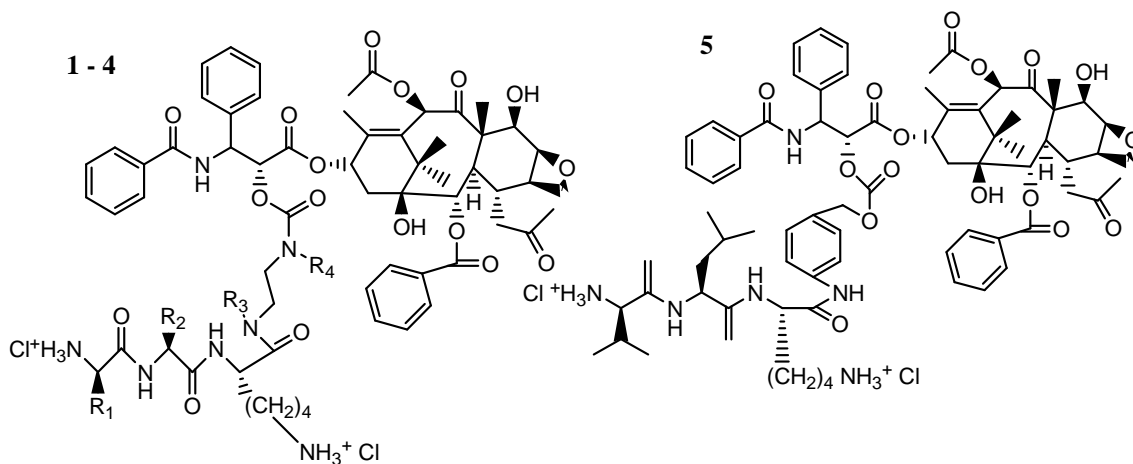
### 1.3.3 Karbonáty a karbamáty

**Karbonáty a karbamáty** jsou stabilnější než příbuzné estery, ale jsou štěpeny taktéž esterasami.

Derivatizace na karbamáty a karbonáty bylo využito již u výše uvedeného paklitaxelu (Schéma 11). Úpravou struktury mateřské látky klesla její toxicita u



některých derivátů až 8000-krát. Zároveň byla zvolena taková funkční skupina, která je selektivně cílená na enzym sdružený s nádorovými buňkami – plasmin. Plasmin hraje klíčovou roli v invazi řady tumorů a metastázování. Prostřednictvím tohoto enzymu dochází k uvolnění paklitaxelu (Schéma 12).



- 1  $R_1 = \text{CH}_3$   $R_2 = \text{CH}_2\text{Ph}$   $R_3 = R_4 = \text{H}$   
 2  $R_1 = \text{CH}_3$   $R_2 = \text{CH}_2\text{Ph}$   $R_3 = R_4 = \text{CH}_3$   
 3  $R_1 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$   $R_2 = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$   $R_3 = R_4 = \text{CH}_3$   
 4  $R_1 = \text{CH}_3$   $R_2 = \text{CH}_2\text{Ph}$   $R_3 = \text{H}$   $R_4 = \text{CH}_3$

Schéma 11: Struktura derivátů Paklitaxelu – karbamáty (1-4), karbonát (5). K derivatizaci došlo v poloze 2'. Jako spacer byl výhodně použit diamin, který je vhodný k připojení tripeptidu amidovou vazbou (1-4). U derivátu 5 je použit aromatického spaceru, který se po odštěpení tripeptidu plazminem eliminuje sám.

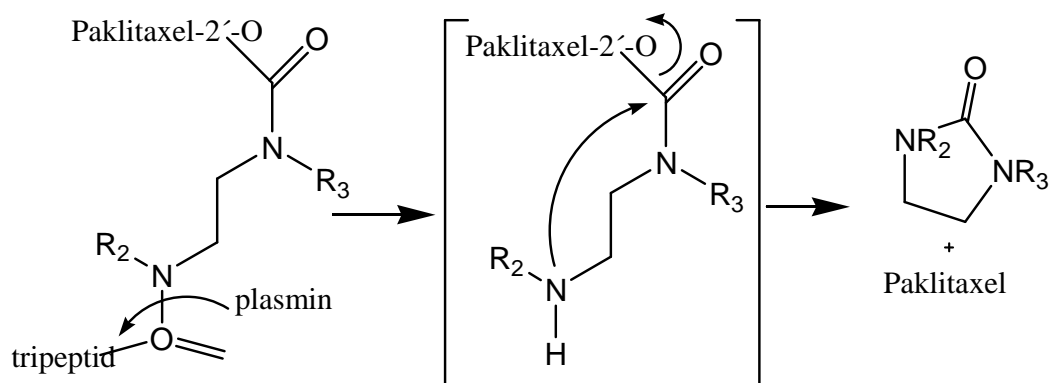


Schéma 12: Ze sloučeniny 1-4 se po hydrolyze plazminem spontánně cyklizuje derivát močoviny.

Z uvedených látek je nejnadějnější derivát 5, který postoupil k testování in vivo [20].

### 1.3.4 Amidy

**Amidy** nejsou jako proléčiva běžně používány z důvodů in vivo enzymatické stability.

Amidická skupina je výhodně zavedena ke zlepšení vlastností léčiva Gemcitabinu, který se používá k léčbě různých solidních nádorů (pankreatu, plic). Patří do skupiny antimetabolitů. Gemcitabin je podáván intravenózně a při vyšších dávkách vykazuje toxicitu vůči jaterní tkáni a gastrointestinálnímu traktu. Gemcitabin byl derivatizován na Valproad amid, který je stabilní vůči enzymatické hydrolyze. Eliminována se tím jeho toxicita. Proléčivo Valproad je možné podávat perorálně. Gemcitabin se pak uvolňuje do systémové cirkulace přes střevní sliznici. Valproad se hydrolyzuje na Gemcitabin v závislosti na pH. Při pH = 1 je hydrolyzován z 21%, v rozmezí pH = 6-8 k hydrolyze nedochází. Valproad amid došel v roce 2009 do klinické fáze testování (Schéma 13) [21].

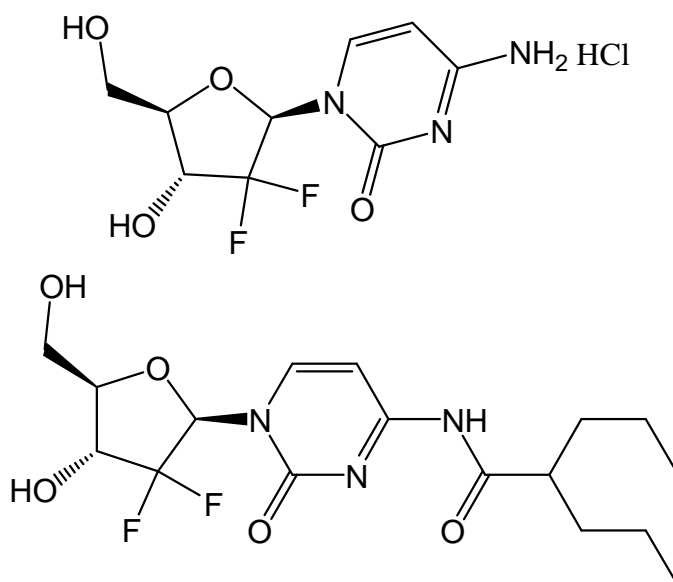


Schéma 13: Struktura Gemcitabinu a Valproadu se zavedenou promoiety na dusík cytidinu v poloze 4 [21].

### 1.3.5 Oximy

**Oximy** jsou odvozeny od ketonů a amidů. Jsou štěpeny prostřednictvím mikrozomálního CYP P450 (Schéma 14). Využívají se ke zlepšení propustnosti přes membrány. Konkrétní protinádorové proléčivo s oximovou funkční skupinou se nepodařilo vyhledat. Uplatňují se například jako antivirotika.

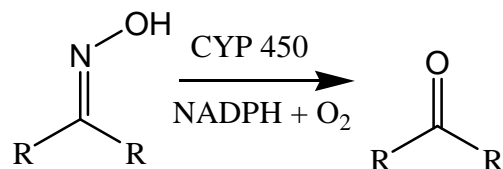


Schéma 14: Obecný metabolismu oximů [22].

## 1.4 Selektivní podávání proléčiv

K zacílení na nádorovou tkáň lze využít mnoho jejích znaků. Jak již bylo jednou řečeno, těmi nejběžnějšími jsou: hypoxie, pH lišící se od fyziologického, enzymy sdružené s nádorem, přítomnost specifických receptorů a antigenů [5]. Další možnou strategií selektivního podávání proléčiv jsou více stupňové metody ADEPT, GDEPT, PDEPT. Protože tato kapitola je velmi rozsáhlá, není jí možné v této práci popsat komplexně. Uvedeme si pouze některé příklady.

### 1.4.1 Hypoxie – významná vlastnost nádorové tkáně

Hypoxie je jev, který vzniká v důsledku špatně a atypicky vyvinutého cévního systému solidních nádorů. V hypoxickém prostředí jsou pro aktivaci proléčiva využity bioredukční enzymy (reduktasy). Pokud se aktivní látka dostane do tkáně s běžným obsahem kyslíku, oxiduje se, a tím pádem přejde do inaktivního stavu (Schéma 15).

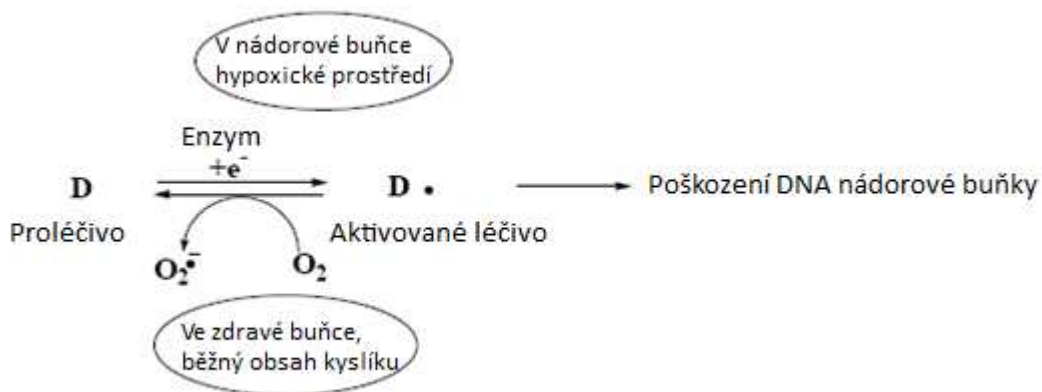


Schéma 15: Mechanismus aktivace pro hypoxii-selektivních léčiv [23].

Na hypoxické buňky jsou cíleny 3 skupiny sloučenin, tj: nitroaromáty, chinony a N-oxidy. Konkrétním zástupcem nitroaromátů je 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB1954). K jeho aktivaci dochází prostřednictvím NO synthasy (Schéma 16) [24].

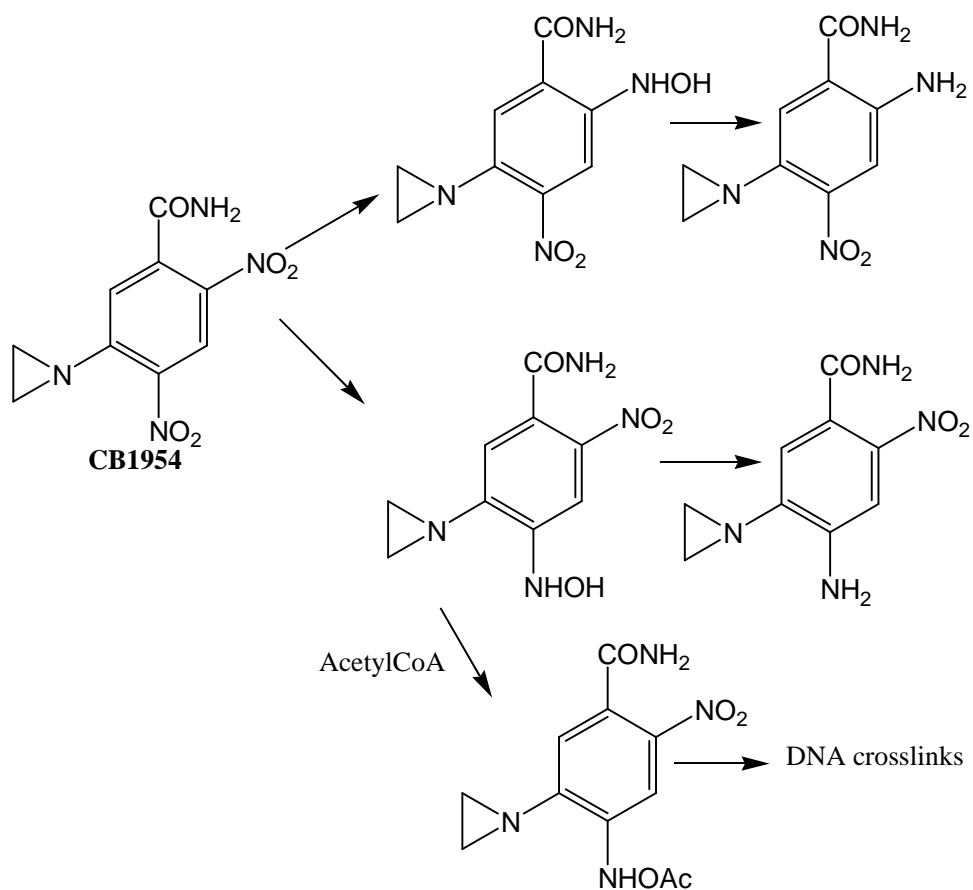


Schéma 16: Výchozí látka prochází redukcí na nitro skupině v poloze 2. Vzniká tím 2-hydroxyamino a 2-amino skupina. Alternativně může k redukcí docházet i v poloze 4 [24].

Ze zástupců chinonových proléčiv si uvedeme Mitomicin C. Aktivují jej enzymy NADPH- cytochrom P 450 reduktasa nebo xanthin oxidasa (Schéma 17) [25].

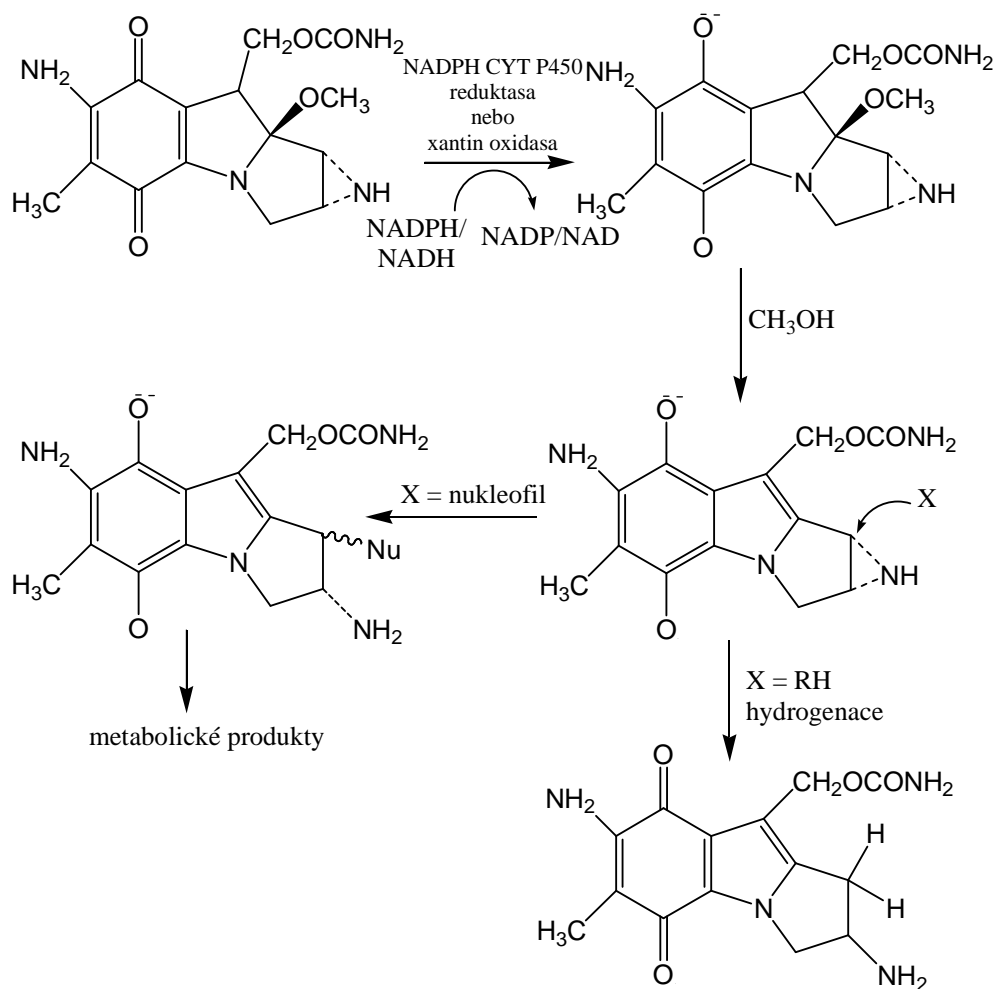


Schéma 17: Enzymatickou aktivací Mitomicinu C vznikne v prvním kroku radikálový intermediát, ze kterého se eliminuje methanol. Štěpení aziridinového kruhu a atak nukleofilu dává vzniknout metabolickému produktu nebo dojde i k hydrogenaci a vznikne 2,7-diaminomitosen [25].

Mezi N-oxidy patří Tirapazamin (Schéma 18). Jedná se o aromatický N-oxid, který postoupil do 3. fáze klinického testování. Jeho aktivní radikálové metabolity reagují s cukernou složkou DNA, což vede k jejímu poškození. V přítomnosti kyslíku by toto nebylo možné, protože radikály by podléhaly reakci právě s ním [23].

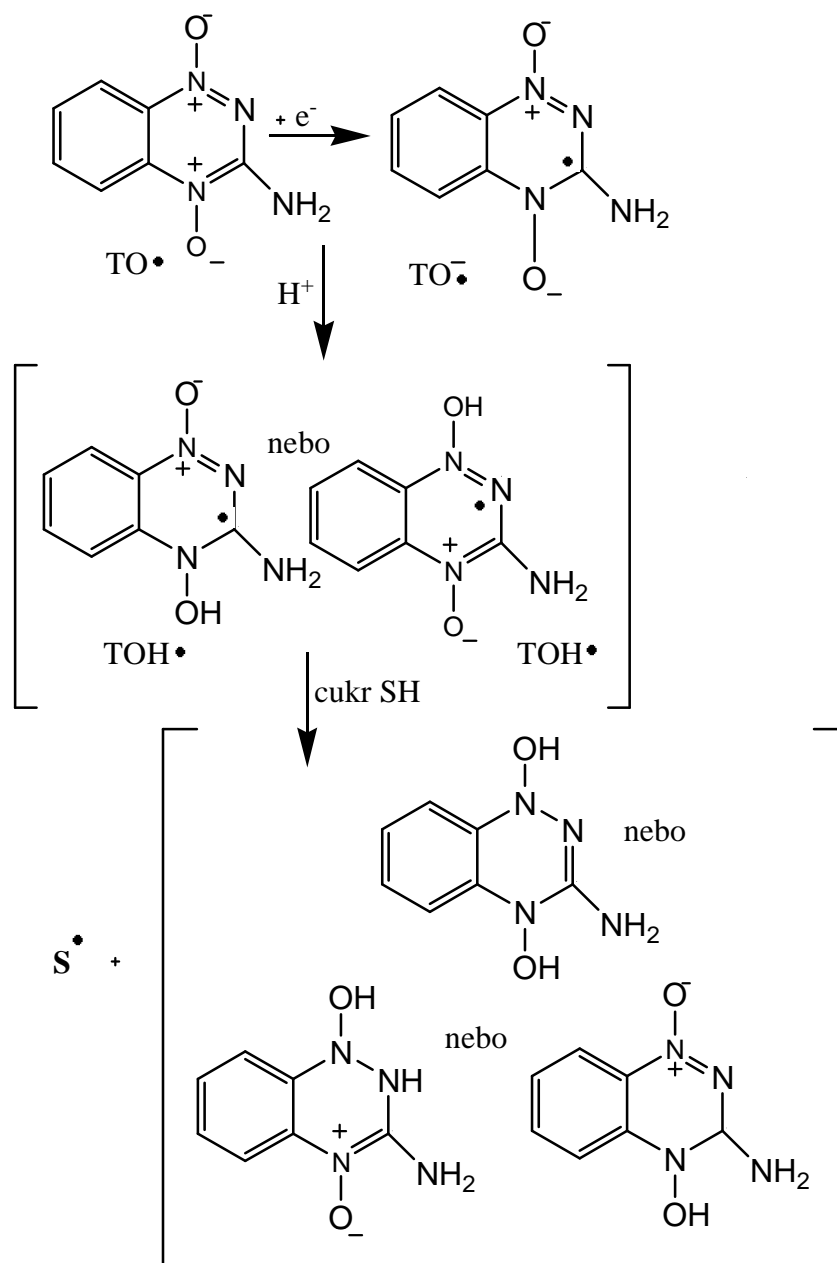


Schéma 18: Mechanismus aktivace Tirapazaminu – v prvním kroku dojde k enzymatické aktivaci na radikál aniont, následnou protonizací vznikne neutrální radikál, který má 2 izomerní formy. Radikálové formy reagují přímo s cukernou složkou DNA odtržením vodíkového atomu. Vznikají cukerné radikály, o kterých je známo, že způsobují zlomy v řetězci DNA [23].

#### 1.4.2 Odlišné pH

pH nádorové tkáně je možné pozměnit. Při podání glukosy do systému dojde k poklesu pH v nádorové tkáni oproti normální zdravé. Tím se aktivují lysozomální

enzymy, pro které je kyselé pH optimální. Následně tyto enzymy přeměňují proléčiva na jejich cytotoxickou formu selektivně v nádorové tkáni [15].

### 1.4.3 Enzymy sdružené s nádorem

V nádorové tkáni je aktivita popřípadě množství některých enzymů významně zvýšené. Právě tyto enzymy mohou sloužit jako cíle pro selektivní aktivaci proléčiv. Pro ilustraci si uvedeme několik příkladů.

Jedním z těchto cílů může být  $\beta$ -glukuronidasa. Její role v cílení na nádor je známa už dlouhou dobu. V roce 1966 byla Connorem a Whissonem objevena korelace mezi terapeutickou odpovědí na anilinový derivát yperitu a aktivitou  $\beta$ -glukuronidasy na modelu tumoru vneseného do myši [26]. Později byl objasněn mechanismus účinku na modelu potkana (Schéma 19) [27].

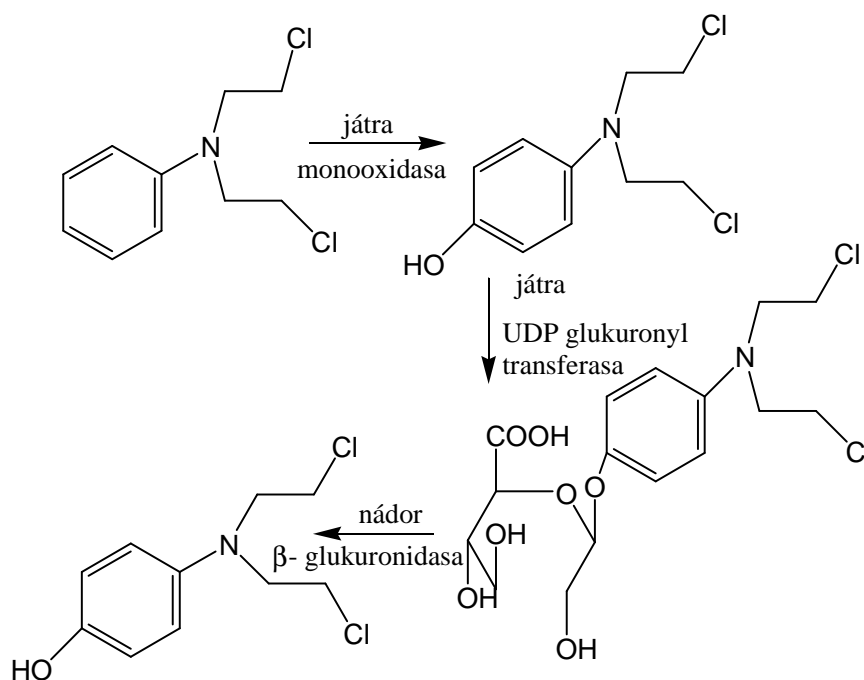


Schéma 19: Metabolismus *N,N*-di-(2-Chloroethyl)-anilinu – v játrech dojde k přeměně na méně toxický glukuronid přes vysoce toxický meziprodukt *p*-hydroxyanilin yperit. Následně v nádoru s vysokou aktivitou  $\beta$ -glukuronidasy je glukuronid rozštěpen a uvolní se opět toxická forma látky [27].

Glukuronidováno bylo velké množství proléčiv (např deriváty 5-fluorouracilu) a přibývají další. Mimo jiné jsou také intenzivně studovány glukuronidy antracyklinových antibiotik [5]. Proléčivo Doxorubicinu HMR 1826 (Schéma 20) vykazuje vynikající

účinnost v léčbě různých nádorů myši a opic. Jako většina dalších glukuronidovaných prolečiv je vhodné pro aplikaci metodou ADEPT [28].

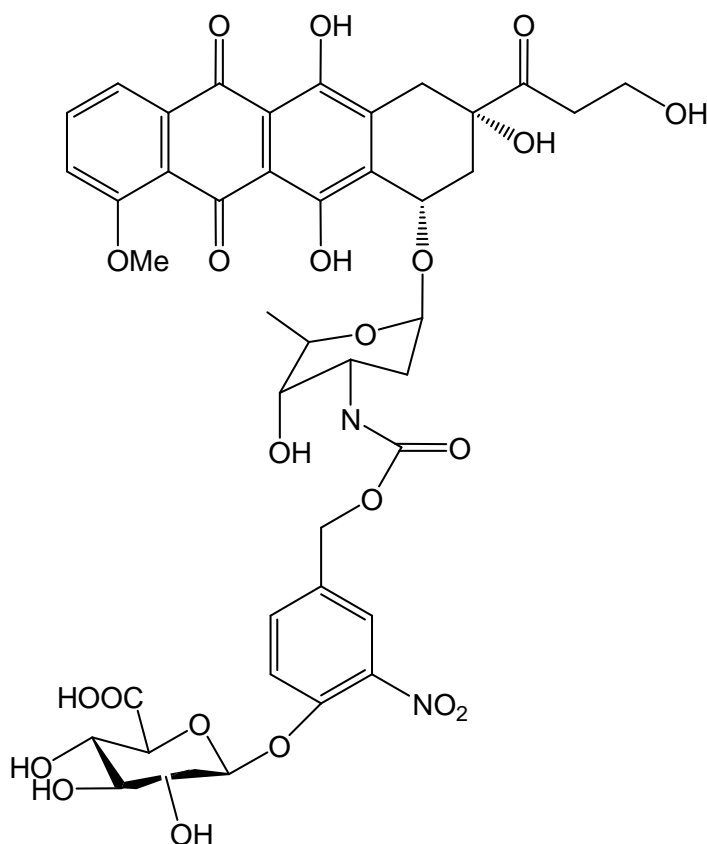


Schéma 20: Molekula derivátu doxorubicinu HMR 1826 [28].

Mezi další enzymy, které se nachází v nádorové tkáni ve zvýšené míře, patří proteasy – konkrétně aminopeptidasy, PSA (prostatický specifický antigen), kathepsiny (B, D, H a L) a plasmin. Proteasy hrají důležitou roli při metastazování nádoru. Primární nádor je zapouzdřen v extracelulární matrix, která je tvořena proteiny. Nádor exprimuje proteolytické enzymy, které mu umožní matrix prorazit [5]. Mimo proteasy jsou charakteristické ještě  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa, azoreduktasa a kyselá fosfatasa (Schéma 21) [29].



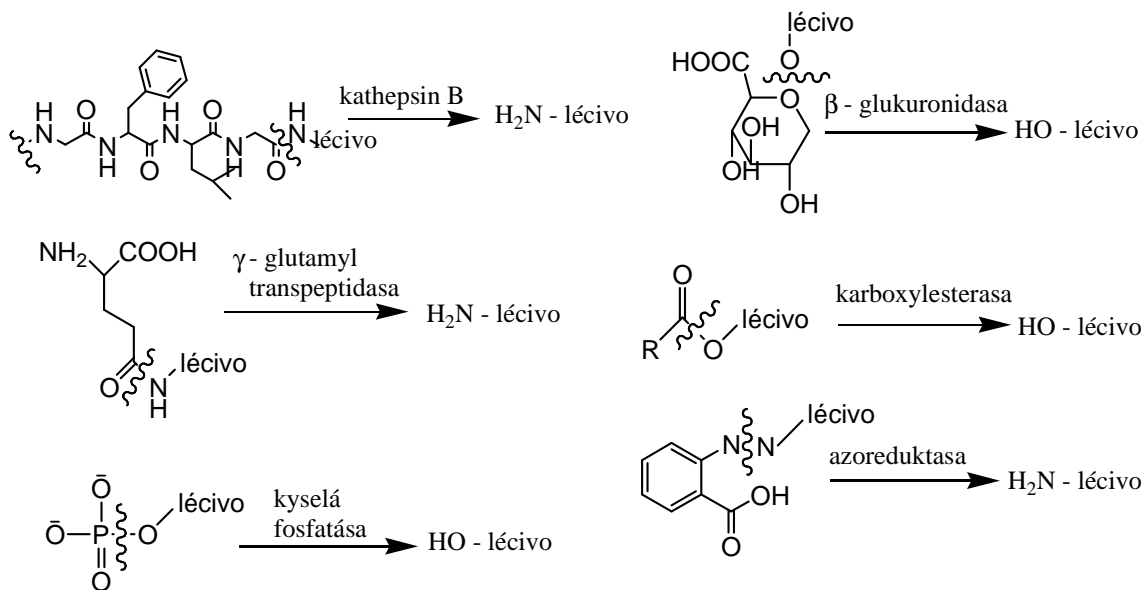


Schéma 21: Biotransformace proléčiv enzymy sruženými s nádorem [29].

#### 1.4.4 Specifické receptory a antigeny

Specifické receptory a antigeny jsou exprimované na povrchu nádorových buněk. K jejich zacílení jsou vyvíjena proléčiva, která jsou konjugovaná s monoklonálními protilátkami. Nedostatkem je, že protilátky mohou vyvolat imunitní odpověď organismu. Povrchové buněčné cíle jsou rozlišeny do dvou kategorií - neinternalizované, u kterých dochází ke štěpení konjugátu proléčiva a protilátky vně buňky a internalizované, kde dochází k aktivaci proléčiva uvnitř buňky po endocytóze. Některé možné cíle jsou vyjmenovány níže:

- antigeny: karcinoembryonální antigen, sacharidy krevních skupin, glykoproteiny mucinového typu (MUC1, CanAG), Lewis Y, X Lewis, antigeny rakoviny varlat (CT7, MAGE-A3), specifický membránový antigen proteas.
- cévní receptory: integriny, ( $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta5$ ), nukleolin, aminopeptidasa N, endoglin, cévní endoteliální růstový faktor (VEGF1-4)
- receptory plazmatických proteinů: nízkohustotní lipoproteiny, transferin
- peptidové receptory: receptory somastatinu, receptory bombesinu, receptory neuropeptidu Y
- receptory růstových faktorů a vitaminů: receptory kyseliny listové (FR- $\alpha$ , FR- $\beta$ , FR- $\gamma$ ), epidermální receptory růstového faktoru (EGF1, EGF2, Her2), receptory transformujícího růstového faktoru, receptory růstového faktoru fibroblastů

- sacharidové receptory: receptor asiaglykoproteinu, galektiny (galektin 1, galektin 2), selektiny (E-selektin, P-selektin), receptory kyseliny hyaluronové, (CD44, RHAMM, HARLEC) [29].

Cíleného dodání léčiva konjugovaného s monoklonální protilátkou je využito například u Metotrexátu inhibitoru metabolismu kyseliny listové (Schéma 22). Je spojen přes polyamidoamin dendrimer s protilátkou Herceptin (trastuzumab), která je cílená na HER 2. Herceptin je běžně používán při léčbě rakoviny prsu. Spojení přes polymerní nosič je výhodné z toho důvodu, že na něj lze navázat vyšší dávku léčiva, aniž by byla ohrožena specifita a vazebná účinnost protilátky. Při in vitro studiích bylo zjištěno, že konjugát má nižší toxicitu než samotný metotrexát. To je zřejmě způsobeno zadržováním konjugátu v lysozomech a pomalejším uvolňováním léčiva. Předpokládá se, že tyto vlastnosti budou lepší pro in vivo použití, které je dále testováno [30].

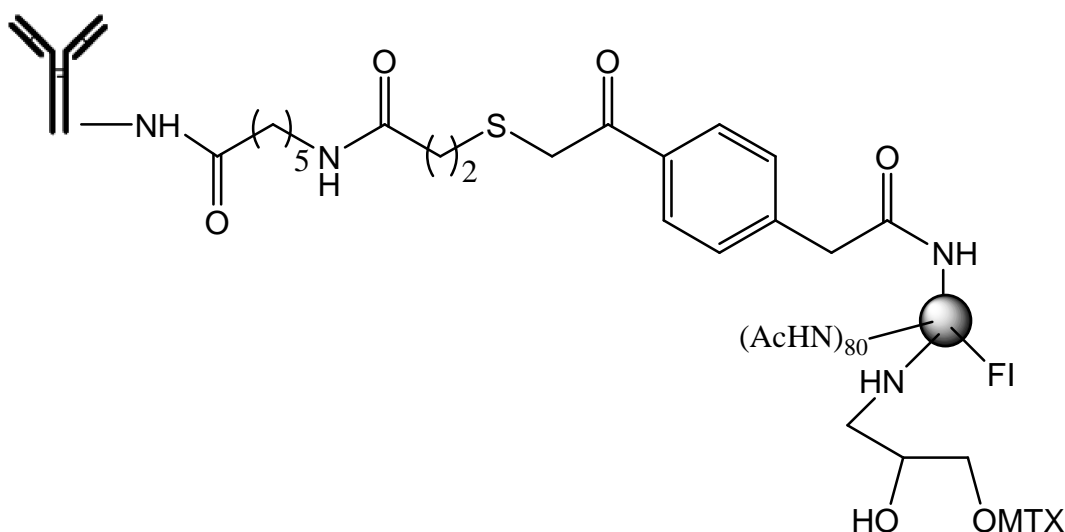


Schéma 22: Konjugát Metotrexátu s polymerním nosičem a monoklonální protilátkou [30].

#### 1.4.5 Metody ADEPT a GDEPT

**Protilátkou řízená enzymatická terapie proléčivý - Antibody directed enzyme prodrug therapy**

**Genově řízená enzymatická terapie proléčivý - Gene directed enzyme prodrug therapy**

Tyto dvě metody jsou založeny na dvoustupňovém mechanismu cílení. Při metodě ADEPT je v prvním kroku zaveden enzym konjugovaný s monoklonální protilátkou, která se váže na antigen exprimovaný nádorovými buňkami (Schéma 23). V

druhém typu dvoustupňové terapie – GDEPT je v prvním kroku do nádorových buněk vnesen gen, který kóduje biosyntézu enzymu (Schéma 24). Těmito dvěma způsoby jsou zaváděny do organismu enzymy, které se v něm přirozeně nevyskytují. Tyto enzymy pak aktivují proléčivo podané ve druhém kroku [5, 29].

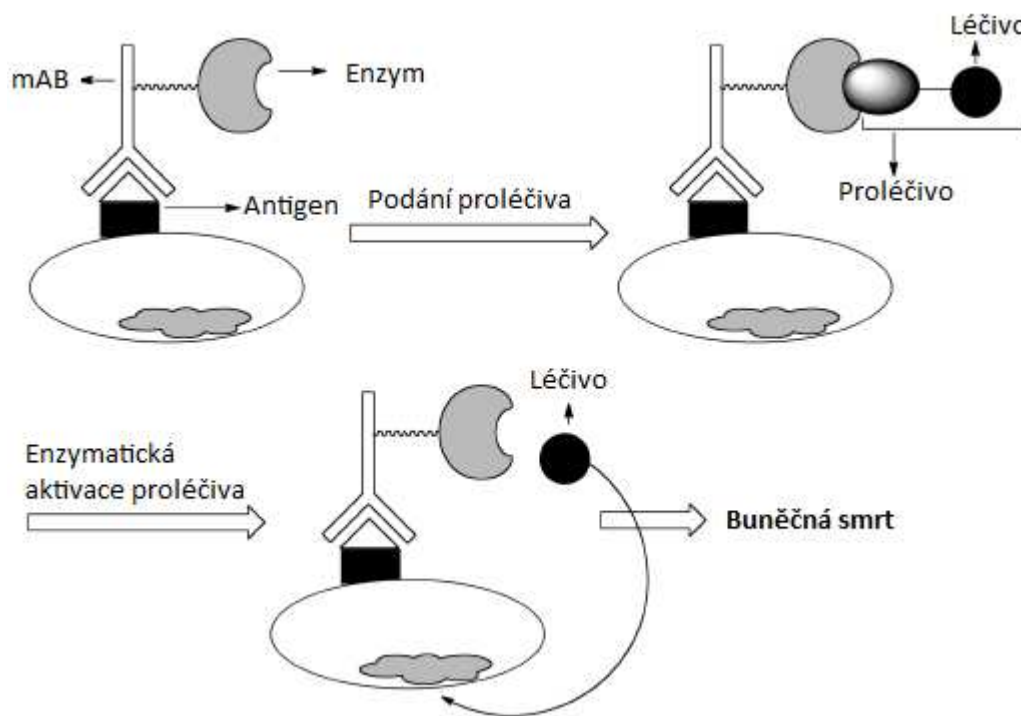


Schéma 23: Znázornění metody ADEPT – konjugát enzym-protilátka se váže na specifické antigeny exprimované na povrchu buňky. Enzym aktivuje proléčivo podané ve druhém kroku [29].

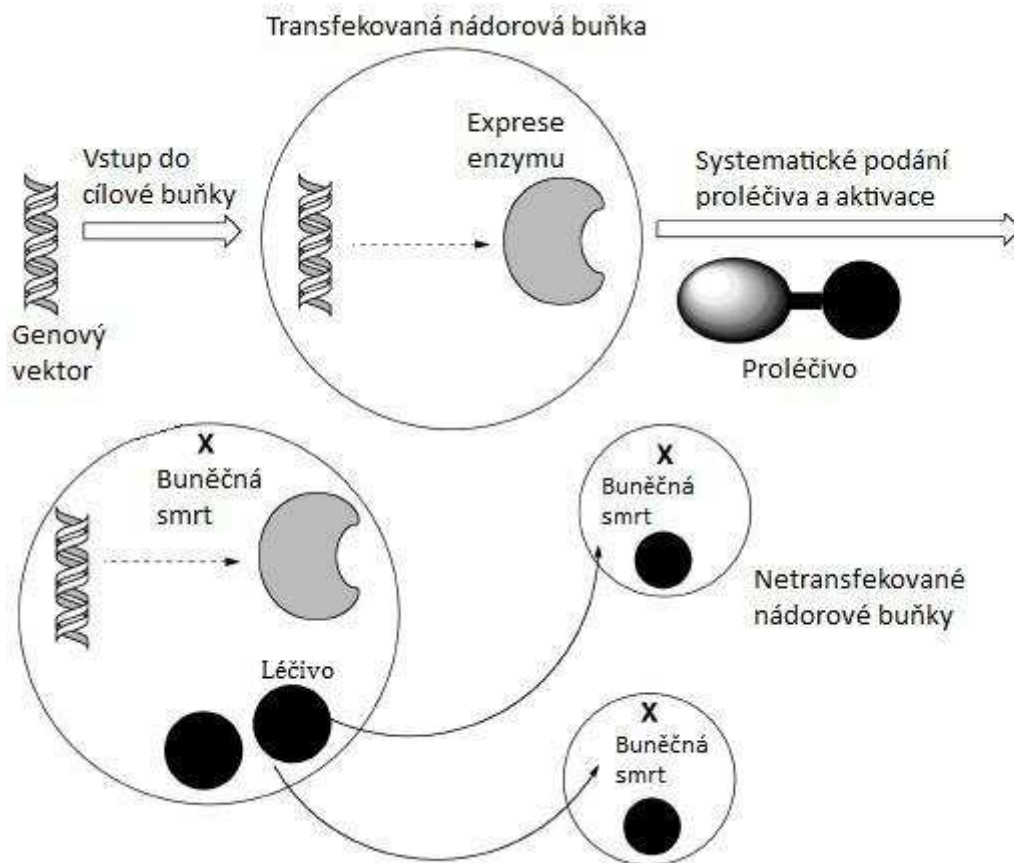


Schéma 24: Znázornění metody GDEPT – nejprve je zaveden vektor kódující daný enzym. Poté je podáno proléčivo, které se po aktivaci dostává i do netransfekovaných buněk [29].

Do klinické fáze testování se dostala sloučenina označovaná jako ZD2767P ((N-{4-[N,N-bis(2-iodoethyl)-amino]phenyloxycarbonyl}-L-glutamová kyselina). Právě tato látka je vhodná pro aplikaci metodou ADEPT. Používá se při léčbě kolorektálního karcinomu. K její aktivaci dochází prostřednictvím karboxypeptidasy G2 (CPG2), což je enzym bakteriálního původu. Tento enzym štěpí vazbu mezi kyselinou glutamovou a aromatickou skupinou (Schéma 25) [31]. Karboxypeptidasa byla konjugována s protilátkou A5CP, která je cílená na karcinoembryonální antigen (CEA) [32].

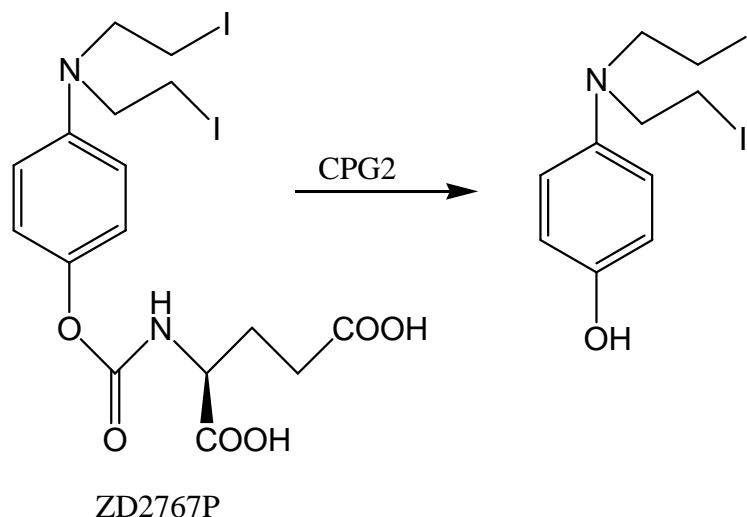


Schéma 25: Aktivace ZD2767P prostřednictvím karboxypeptidasy G2 za vzniku 4-[N,N-bis(2-jodoethyl)amino]fenolu [31].

#### 1.4.6 Nové metody cílení

Vidíme, že možností cíleného podávání proléčiv do místa nádoru je opravdu hodně a to jsou zde uvedeny pouze některé z nich. Cílená léčba nádorů udělala od svých prvopočátků velký pokrok. V současné době je pozornost odborné veřejnosti významně zaměřená na proléčiva vázaná na polymerních nosičích.

Na principu navazování na polymerní nosiče byla vyvinuta metoda **Polymer-directed enzyme prodrug therapy (PDEPT) – Polymerem řízená enzymatická terapie proléčiv** (Schéma 26). Stejně jako u metod ADEPT a GDEPT jde o dvou-  
 stupňový proces. PDEPT se ovšem liší v tom, že v prvním kroku je podáváno proléčivo vázané na polymer. Následně je podáván konjugát polymeru a enzymu, který proléčivo metabolizuje. Toto pořadí je výhodnější, protože nemůže docházet k aktivaci proléčiva už v systémovém oběhu [29].

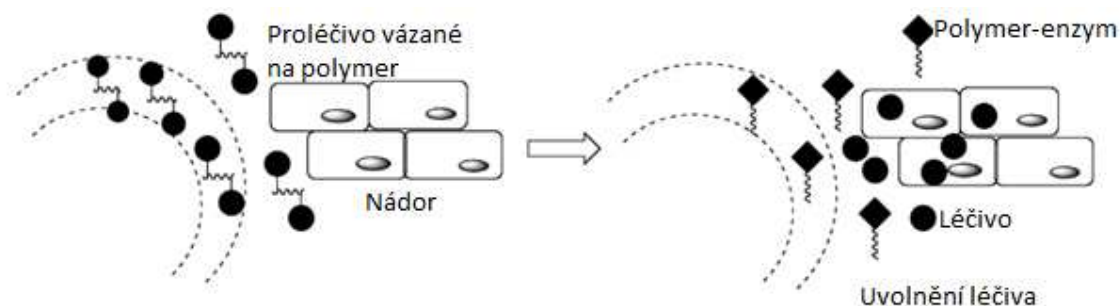


Schéma 26: Znázornění metody PDEPT – nejdříve je do místa nádoru zavedeno proléčivo vázané na polymer a následně polymer konjugovaný s enzymem aktivujícím proléčivo [29].

Polymerní částice pronikají přednostně do nádorové tkáně v důsledku EPR efektu (*enhanced permeability and retention*). Příčinou snadného průniku makromolekul a jejich zadržování v nádorové tkáni jsou rozdíly v anatomii a fyziologii mezi normální a nádorovou tkání (Schéma 27) [33].

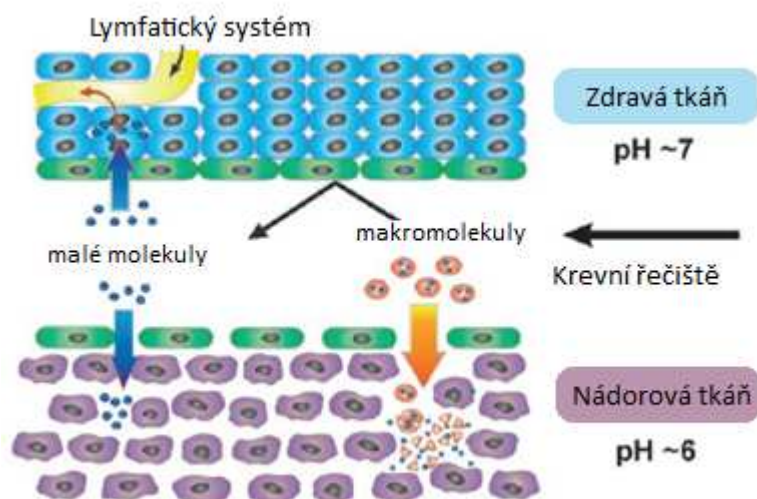


Schéma 27: V nádorové tkáni jsou kapilární póry větší než v normální, takže do ní makromolekuly snadno proniknou. Zároveň má nádorová tkáň nedostatečně vyvinutý lymfatický systém, což vede k zadržování makromolekul [33].

Jeden z modelů strategie PDEPT využívá HPMA-kopolymer-methakryloyl-glycinglycin-cefalosporin-doxorubicin (HPMA-co-MA-GG-C-Dox) jako makromolekulární prolečivo a kopolymer HPMA konjugovaný s nesavčí  $\beta$ -laktamasou (HPMA-co-MAGG- $\beta$ -L) jako aktivujícím enzymem (Schéma 28 a 29). Tato kombinace byla testovaná na modelu myšího melanomu (B16F10). Použití této látky vykazovalo výborné zacílení na nádor a významný pokles růstu tumoru [34].

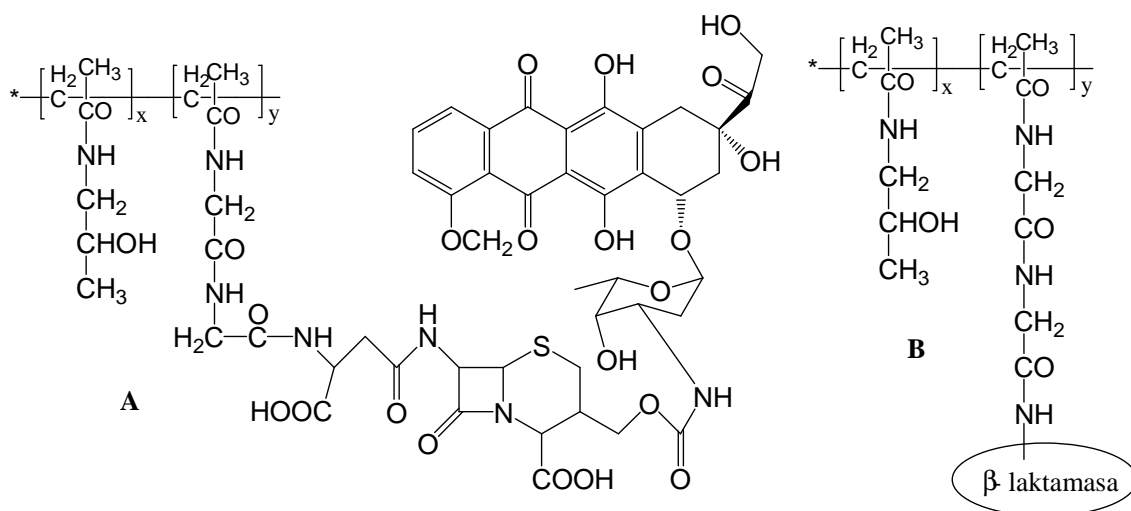


Schéma 28: Struktura proléčiva HPMA-co-MA-GG-C-Dox (A), struktura HPMA-co-MAGG- $\beta$ -L (B) [34].

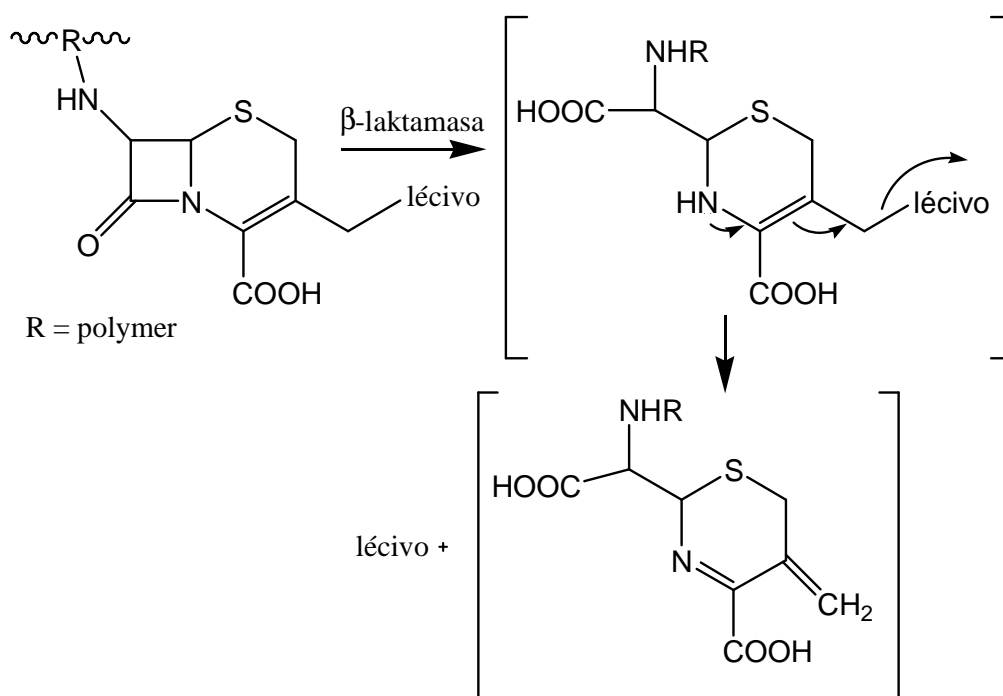


Schéma 29: Mechanismus uvolnění doxorubicinu z polymeru [34].

Alternativou k PDEPT je metoda **Polymer-directed enzyme liposome therapy (PELT) – Polymerem řízená enzymatická liposomální terapie**. K dopravení proléčiva do nádorové tkáně využívá liposomů, které snadno prostoupí do nádorové tkáně opět v důsledku EPR efektu. Proléčivo je metabolizováno enzymem, který je konjugovaný s polymerní částicí [29].

Modifikována metoda PDEPT byla využita pro selektivní podávání Doxorubicinu (Schéma 30). K zapouzdření Doxorubicinu byly použity liposomy citlivé

na teplotu (liposomy citlivé na nízkou teplotu - LTSL a liposomy citlivé na tradiční teplotu - TTSL). Je žádoucí, aby se léčivo z liposomu uvolnilo při mírné hypertermii (39° - 42°). Zároveň by nemělo unikat při běžné tělesné teplotě (37°). Do liposomů byla uzavřena i MRI kontrastní látka [Gd(HPDO3A)(H<sub>2</sub>O)], která umožňuje řídit a kontrolovat teplotu leze, ale také vizualizovat proces podání léku. Systém LTSL ukázal větší únik Doxorubicinu při 37° a jeho rychlejší uvolnění při 42° v porovnání s TTSL [35].

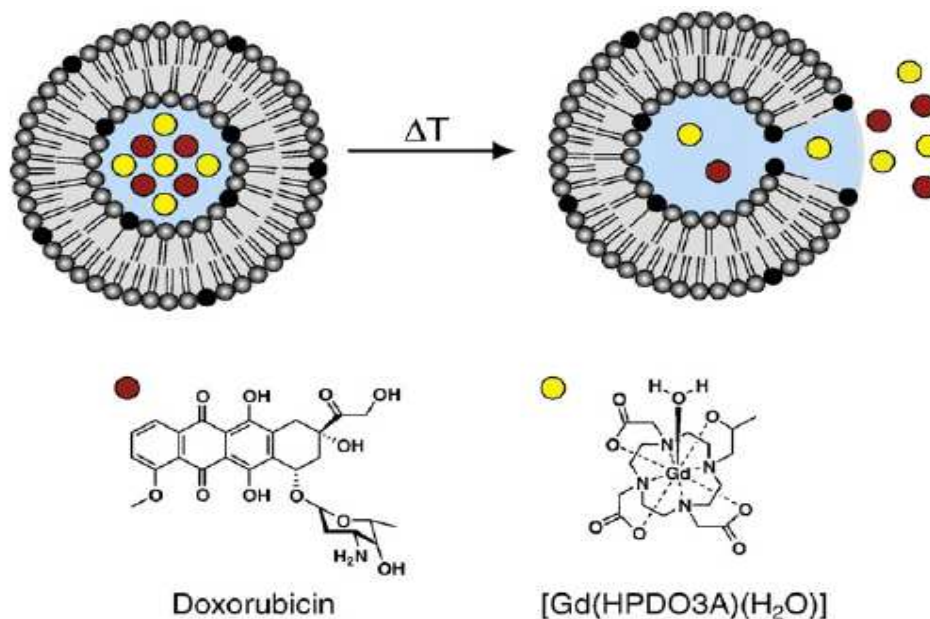


Schéma 30: Uvolnění doxorubicinu a [Gd(HPDO3A)(H<sub>2</sub>O)] – zvýšením teploty se rozpadá lipidová membrána lipozomu a léčivo se uvolní [35].

Je zřejmé, že další vývoj proléčiv bude zaměřen na hledání dalších možností cíleného podávání a zdokonalování nynějších postupů. V současné době se do popředí dostávají metody, které využívají polymery/biopolymery konjugované s proléčivou nebo enzymy. Design proléčiv je značně flexibilní jak v technikách, tak i komponentách, které lze použít [29]. Neustále přicházejí nové poznatky z této multioborové disciplíny.

## 1.5 Triterpeny

Triterpeny řadíme mezi terpeny – látky, které se přirozeně vyskytují v řadě rostlin (např. smetanka lékařská, bříza bílá a další). Struktura terpenů je tvořena isoprenovými jednotkami. Spolu se steroly dávají vzniku látkám označovaným jako isoprenoidy. Pro své biologické účinky je především zajímavá skupina cyklických



triterpenů, na které je soustředěna velká pozornost. Tuto rodinu látek můžeme dále rozdělit podle struktur na oleanové, ursanové, lupanové (Schéma 31), dammaran-eufanové a další deriváty. Všechny tyto látky jsou studované z důvodů potenciální biologické aktivity, protizánětlivých, hepatoprotektivních, analgetických, antimikrobiálních a jiných účinků. Ovšem v popředí zájmu stojí jejich cytotoxické účinky. Vzhledem k terapeutickému využití triterpenů jsou vyvíjeny metody jejich izolace, ale také metody syntézy modifikovaných derivátů s výhodnějšími farmakologickými vlastnostmi [36].

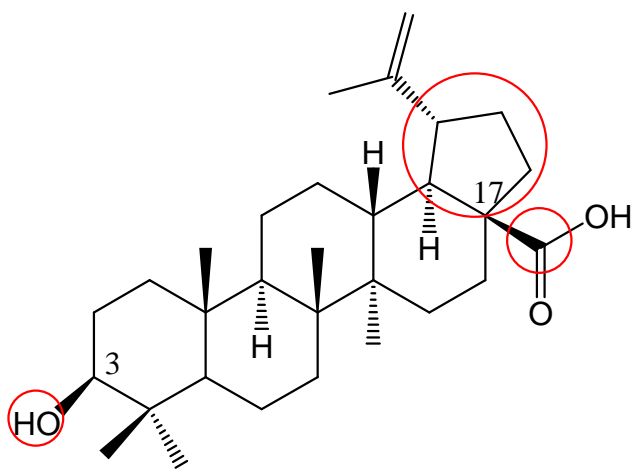
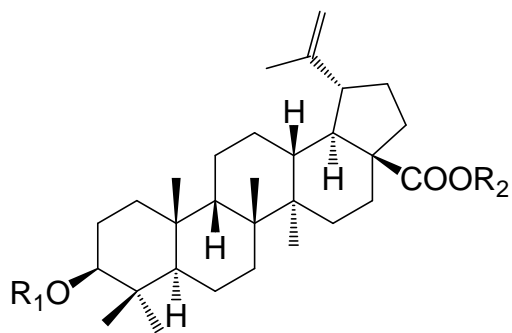


Schéma 31: Kyselina betulinová - zástupce lupanových triterpenů [36]. Zakroužkována jsou místa, která byla cílem derivatizace kyseliny betulinové námi zkoumaných sloučenin.

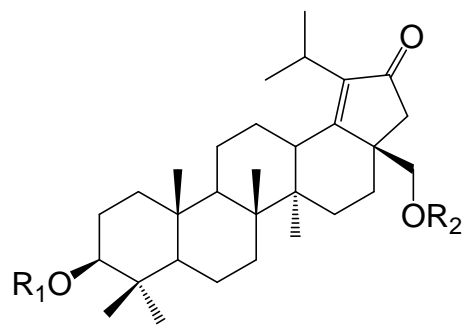
Za posledních 20 let byla prokázána cytotoxicita výše uvedené kyseliny betulinové vůči různým nádorovým liniím. Bohužel mezi vlastnosti kyseliny betulinové patří její velmi špatná rozpustnost. Proto byly hledány cesty jak ji zlepšit, přičemž převedením na estery došlo ke zlepšení této nežádoucí vlastnosti. Pro esterifikaci byly použity pivaloyloxymethyl a acetoxymethyl skupiny, o kterých je známé, že zlepšují průchodnost přes buněčnou membránu, což lze považovat za další výhodu. Očekávalo se, že esterová vazba bude rozštěpena nespecifickými intracelulárními esterasami a nebude přitom ovlivněna cytotoxicita kyseliny betulinové. Ale proti předpokladu u většiny esterových derivátů došlo k poklesu cytotoxické účinnosti [37]. Z uvedeného příkladu plyne, že je nutné hledat vhodné modifikace potencionálních léčiv, které budou jejich farmakologické vlastnosti zlepšovat aniž by docházelo k poklesu účinnosti.

Esterifikace kyseliny betulinové, ale i jiné její derivatizace umožňují pohlížet na léčivo, jako na jeho prodrug formu.

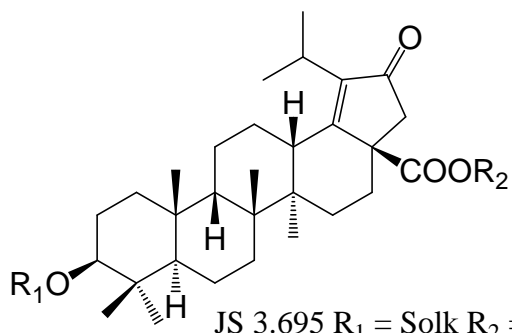
Na základě již prokázané účinnosti proléčiv Paklitaxelu se zavedenou karbonátovou skupinou [20], byla i kyselina betulinová modifikována tímto způsobem. Byly připraveny karbonátové deriváty, kde je různými způsoby modifikována hydroxylová skupina na uhlíku č. 3, karboxylová skupina na uhlíku č. 17 a také pentanový cyklus (Schéma 32). Některé z těchto sloučenin se staly předmětem naší studie, kdy jsme testovali možnosti metabolické aktivace prodrug formy léčiv a následného stanovení jejich cytotoxicity.



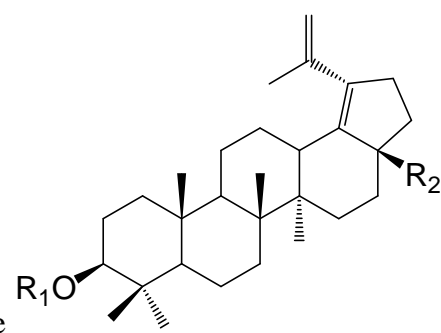
JS 3.678  $R_1 = \text{Solk}$   $R_2 = \text{Bn}$



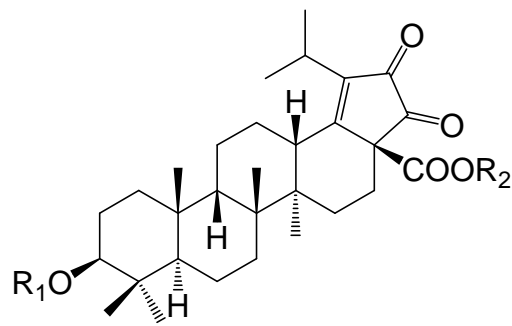
JS 3.952  $R_1 = \text{Ac}$   $R_2 = \text{Solk}$   
 JS 3.1053  $R_1 = \text{Gly}$   $R_2 = \text{Gly}$



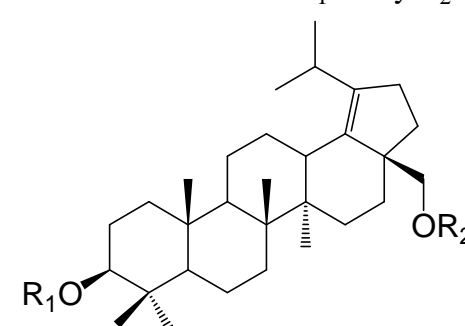
JS 3.695  $R_1 = \text{Solk}$   $R_2 = \text{Me}$



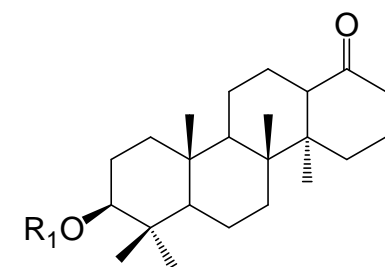
JS 3.954  $R_1 = \text{Solk}$   $R_2 = \text{Me}$   
 JS 3.957  $R_1 = \text{Gly}$   $R_2 = \text{Me}$



JS 3.948  $R_1 = \text{Solk}$   $R_2 = \text{Et}$



JS 3.1040  $R_1 = \text{Ac}$   $R_2 = \text{Gly}$   
 JS 3.1044  $R_1 = \text{Gly}$   $R_2 = \text{Ac}$



JS 3.1050  $R_1 = \text{Gly}$

Schéma 32: Deriváty kyseliny betulinové, které byly použity v této studii.

## 2. Experimentální část

## 2.1 Chemikálie, přístroje, spotřební materiál, roztoky

Chemikálie:

DMSO (Sigma), deionizovaná voda, kultivační médium RPMI – 1640 (Sigma), fetální telecí sérum (Biocom, ČR), streptomycin (Sigma), penicilin (Biotika, Sk.), dodecylsulfát sodný (Sigma), trypanová modř (Sigma), MTT (Sigma), NaCl, KCl, HCl,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Endoxan – cyclofosfamid (Baxter), Triterpeny JS 3.690, JS 3.678, JS 3.695, JS 3.952, JS 3.948, JS 3.954, JS 3.957, JS 3.1040, JS 3.1044, JS 3.1050, JS 3.1053, (poskytnuto Dr.Šarkem, katedra Organické chemie, PřF UP v Olomouci),

Přístroje:

vortex Genie 2 (P-LAB a.s.), laboratorní váhy (Scaltec), centrifuga (IEC Centra C13), pH metr (Metler Toledo), biohazard box (Forma Scientific), Bürknerova komůrka (Meopta, ČR), světelný mikroskop (Meopta, ČR),  $\text{CO}_2$  inkubátor (Jouan), ELISA reader (Labsystem iEMS MF, Anglie) software BIOLAB/CHEMOREZIST, GENESIS, MS Excel

Spotřební materiál:

kultivační láhve, „falkony“ (50ml zkumavky), 96-jamkové panely, filtry, špičky na pipety a další tkáňový plast (vše TPP, Švýcarsko)

Roztoky:

10x koncentrovaný PBS

80 g NaCl, 2g KCl, 32,1 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ , 2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  se rozpustí v 700 ml deionizované vody, pH se upraví na hodnotu 7,4 pomocí HCl a doplní se do 1 litru deionizovanou vodou, pH se zkontroluje a případně znovu upraví

1x PBS

Připraví se naředěním 1x PBS deionizovanou vodou

Roztok MTT

MTT se rozpustí ve sterilním fyziologickém roztoku na výslednou koncentraci 5 mg/ml, roztok se přefiltruje

### Roztok trypanové modři

trypanová modř se naředí na 0,5% v PBS

### Roztok 10% SDS

5 g SDS (dodecylsulfátu sodného) se doplní do 500 ml destilovanou vodou, pH se upraví na hodnotu 5

### Centrifugační roztok pro izolaci hepatocytů

NaCl (161 mmol/l), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,7 mmol/l), CaCl<sub>2</sub> (6,75 mmol/l), KCl (3,09 mmol/l), HEPES (32,7 mmol/l)

### Hanksův roztok I

NaCl (137 mmol/l), KCl (5,37 mmol/l), MgSO<sub>4</sub> (0,81 mmol/l), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,34 mmol/l), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,34 mmol/l), NaHCO<sub>3</sub> (25 mmol/l), HEPES (12,6 mmol/l), EGTA (0,6 mmol/l), pH 7,4

### Hanksův roztok II

NaCl (137 mmol/l), KCl (5,37 mmol/l), MgSO<sub>4</sub> (0,81 mmol/l), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,34 mmol/l), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,34 mmol/l), NaHCO<sub>3</sub> (25 mmol/l), HEPES (12,6 mmol/l), CaCl<sub>2</sub> (5,4 mmol/l), kolagenasa (530 a 930 PZS/g), pH 7,4

### Kultivační médium pro hepatocyty

Williamsovo E médium, dexametason (1 μmol/l), penicilin (100 U/ml), streptomycin (50 mg/l), L-glutamin (2 mmol/l), insulin (0,35 μmol/l), fetální telecí serum (10% V/V)

### Kultivační médium pro CEM

RPMI 1640, 5 ml/l zásobního roztoku streptomycinu, 0,5 ml/l zásobního roztoku penicilinu, 100 ml/l FCSI

## 2.2 Metody

### 2.2.1 Pasážování suspenzních buněk

Pro experimenty jsem použila buněčnou linii CEM, což je buněčná kultura odvozená od lidské lymfoblastické leukemie. Pasážování buněk (výměna média,

redukce počtu buněk) se provádělo pravidelně 3x týdně, aby je bylo možné použít pro další experimenty.

Postup:

1. Buňky prohlédneme pod mikroskopem a ujistíme se, že nejsou kontaminované.
2. Kultivační láhev protřepeme.
3. Potřebnou část buněk použijeme k experimentu, 1/3 celkového objemu buněčné suspence v láhvi dále inokulujeme, doplníme odpovídající množství kultivačního média (25 ml láhev – 5 ml média; 75 ml láhev – 15 ml média; 150 ml láhev – 35 ml média).
4. Uzávěr láhve vydesinfikujeme a vrátíme do inkubátoru.

### 2.2.2 Izolace hepatocytů

Izolované potkaní hepatocyty nám byly poskytnuty z Ústavu lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty v Olomouci. Izolace byla provedena modifikovanou dvoustupňovou kolagenasovou perfuzí popsanou Moldeusem [38]. Hepatocyty byly kultivované v 96-jamkových panelech potažených kolagenem ve Williamsově E-médiu. Kolagen byl získán izolací z potkaních ocásků [39].

Postup izolace:

1. Po intraperitoneálním podání anestetik 32 mg xylazinu a 125 mg ketamin hydrochloridu na 1 kg hmotnosti zavedeme kanylu do portální žíly.
2. Játra vyjmeme z břišní dutiny a promýváme Hanksovým roztokem I po dobu 4 minut.
3. Játra promýváme Hanksovým roztokem II po dobu 6 minut.
4. Takto promytá játra přemeseme do sterilní kádinky se 100 ml centrifugačního roztoku, opatrně vytřepeme uvolněné hepatocyty.
5. Buněčnou suspenzi přefiltrujeme přes gázu a opakovaně 3x centrifugujeme při 200 rpm, 4°C, 1 minutu. Po poslední centrifugaci buňky resuspendujeme v kultivačním médiu.
6. Buňky napipetujeme do 96-jamkového panelu v koncentraci  $1.10^5$  buněk/cm<sup>2</sup> a kultivujeme v CO<sub>2</sub> inkubátoru při 37 °C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub>.

7. Po 4 hodinové stabilizaci, kdy se jaterní buňky přichytí na dno panelu vyměníme médium za bezsérové a je možné přidat testované látky.

V našem případě jsme ke kultuře hepatocytů přidávali roztoky derivátů triterpenů, kde nejvyšší koncentrace odpovídala 200  $\mu\text{M}$ , přitom ředění koncentrační řady bylo 4x. Po inkubační době 2 hodiny jsme odebrali 50  $\mu\text{l}$  supernatantu od hepatocytů a napipetovali jej do panelu s CEMy, kde probíhal MTT test. Předpokládaná nejvyšší koncentrace aktivovaných metabolitů v nejvyšší jamce s CEMy byla 100  $\mu\text{mol/l}$ . V každé další jamce byla koncentrace 4x nižší. Jako pozitivní kontrolu aktivace prodrug forem jsme použili cyclofosfamid (Endoxan), který k aktivaci cytotoxické účinnosti vyžaduje metabolizaci.

### 2.2.3 Cytotoxický MTT test

Cytotoxický MTT test slouží k určení citlivosti nádorových buněčných linií vůči protinádorovým léčivům. Jako první popsal tuto metodiku Mosmann v roce 1983 [40]. Test probíhá po dobu třech dnů. Provádí se v 96-jamkových panelech, ve kterých se testuje koncentrační škála 6-ti koncentrací látky v sestupném ředění 4x (1:3) (Schéma 33). Každá koncentrace je testována v dubletu. Po uplynutí kultivace se do všech jamek přidává žlutý roztok MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid). Živé buňky redukují MTT na tmavě modré krystalky formazanu. K rozpuštění krystalů se používá silný detergent SDS. Intenzita zbarvení odpovídá procentu přežívajících buněk. Měří se absorbance při 540 nm. Vyhodnocení se provádí pomocí počítačového programu Chemorezist. Jako výsledek se získá hodnota  $\text{IC}_{50}$  - koncentrace, při které zahyne 50% buněk.

My jsme pomocí tohoto testu hodnotili hodnotu  $\text{IC}_{50}$  derivátů triterpenů, u kterých jsme předpokládali metabolickou aktivaci prodrug formy po kultivaci s izolovanými hepatocyty. Také jsme hodnotili účinek nemetabolizovaných derivátů.

Postup:

1. Buňky promyjeme kultivačním médiem a zcentrifugujeme 5 min. při 1500 rpm.
2. Po centrifugaci supernatant slejeme a přidáme 1 ml média.
3. Buňky spočítáme v Bürknerově komůrce.
4. Buňky naředíme na koncentraci 200 000 buněk/1ml média.



5. Buněčnou suspenzi napipetujeme do 96-jamkových panelů v objemu 50  $\mu\text{l}$  na jamku.
6. Do každé jamky přidáme 50  $\mu\text{l}$  supernatantu z panelu hepatocytů; popřípadě roztok JS derivátu o vhodné koncentraci a vhodném objemu, aby jeho nejvyšší koncentrace byla 100  $\mu\text{M}$ .
7. Necháme proběhnout kultivaci buněk v panelu po dobu tří dnů v inkubátoru při 37°C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub>.
8. Po ukončení kultivace napipetujeme do každé jamky 10  $\mu\text{l}$  roztoku MTT, buňky inkubujeme po dobu 3 hodin, sledujeme tvorbu modrých krystalů formazanu.
9. Následně do každé jamky napipetujeme 100  $\mu\text{l}$  10% SDS a inkubujeme přes noc.
10. Změříme absorbanci destičkovým spektrofotometrem.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>			JS A		JS B		JS C		JS D		JS E	
<b>B</b>	blank	kontrola	100 $\mu\text{M}$		100 $\mu\text{M}$		100 $\mu\text{M}$		100 $\mu\text{M}$		100 $\mu\text{M}$	
<b>C</b>			25 $\mu\text{M}$		25 $\mu\text{M}$		25 $\mu\text{M}$		25 $\mu\text{M}$		25 $\mu\text{M}$	
<b>D</b>			6,25 $\mu\text{M}$		6,25 $\mu\text{M}$		6,25 $\mu\text{M}$		6,25 $\mu\text{M}$		6,25 $\mu\text{M}$	
<b>E</b>			1,563 $\mu\text{M}$		1,563 $\mu\text{M}$		1,563 $\mu\text{M}$		1,563 $\mu\text{M}$		1,563 $\mu\text{M}$	
<b>F</b>			0,391 $\mu\text{M}$		0,391 $\mu\text{M}$		0,391 $\mu\text{M}$		0,391 $\mu\text{M}$		0,391 $\mu\text{M}$	
<b>G</b>			0,098 $\mu\text{M}$		0,098 $\mu\text{M}$		0,098 $\mu\text{M}$		0,098 $\mu\text{M}$		0,098 $\mu\text{M}$	
<b>H</b>												

Schéma 33: 96 jamkový panel s koncentrační řadou JS derivátů.

#### 2.2.4 Statistické vyhodnocení

Data byla analyzována v programu Statistica 8. Pomocí Mann - Whitney testu byly určeny hladiny statistické významnosti (p-hodnoty), které popisují rozdíly mezi jednotlivými variantami testů (A - H). Graficky jsou data prezentována pomocí krabicových grafů, hladina významnosti byla vynesena do grafu pro porovnání C a H typu testu. Statistické zpracování dat bylo provedeno ve spolupráci s Mgr. Lenkou Radovou, Ph.D. Tímto jí za její spolupráci děkuji.

## 2.3 Výsledky

Testování metabolické aktivace a následné stanovení cytotoxicity bylo prováděno za účelem porovnání a odhalení případných interakcí látek ve více variantách.

Ve variantách A – D jsme zjišťovali, jaké jsou optimální podmínky kultivace hepatocytů, aby metabolicky aktivovaly proléčiva.

V ostatních variantách E – H jsme testovali různé varianty cytotoxického MTT testu u derivátů bez metabolické aktivace. Zkoušeli jsme, zda na účinnost látek nemá vliv složení kultivačních médií nebo zda se látky neváží na kolagen. Jak již bylo zmíněno výše, ve všech variantách testů jsme jako pozitivní kontrolu použili v praxi používané cytostatikum Endoxan, které k aktivaci svého cytotoxického účinku potřebuje metabolickou aktivaci. Rozdíly mezi jednotlivými modely testů jsou podrobněji popsány níže, (Tabulka 2):

- A) Hepatocyty byly vysety na panely potažené kolagenem. Prošly 4 hodinovou stabilizací po izolaci a následně byly přidány roztoky testovaných látek. Hepatocyty byly kultivované ve Williamsově médiu se všemi aditivami kromě fetálního telecího séra.
- B) Hepatocyty byly vysety na panely bez kolagenu. Opět prošly 4 hodinovou stabilizační dobou, po které jsme přidali testované látky. Hepatocyty byly taktéž v bezsérovém Williamsově médiu.
- C) Hepatocyty byly vysety na panely potažené kolagenem. Testované látky byly přidány k hepatocytům ihned po izolaci a vysetí na panely do Williamsova média se všemi aditivami včetně séra.
- D) Hepatocyty byly vysety na panely potažené kolagenem. Testované látky byly přidány k hepatocytům ihned po izolaci a vysetí na panely do Williamsova média bez jakýchkoliv aditiv.

Tabulka 2: Porovnání variant kultivace hepatocytů pro metabolizaci a případnou aktivaci použitých proléčiv (W.M. = Williamsovo médium).

Varianta	A	B	C	D
<b>Stabilizace</b>	ano	ano	ne	ne
<b>Kolagen</b>	ano	ne	ano	ano
<b>Aditiva W.M.</b>	ano	ano	ano	ne
<b>Sérum</b>	ne	ne	ano	ne

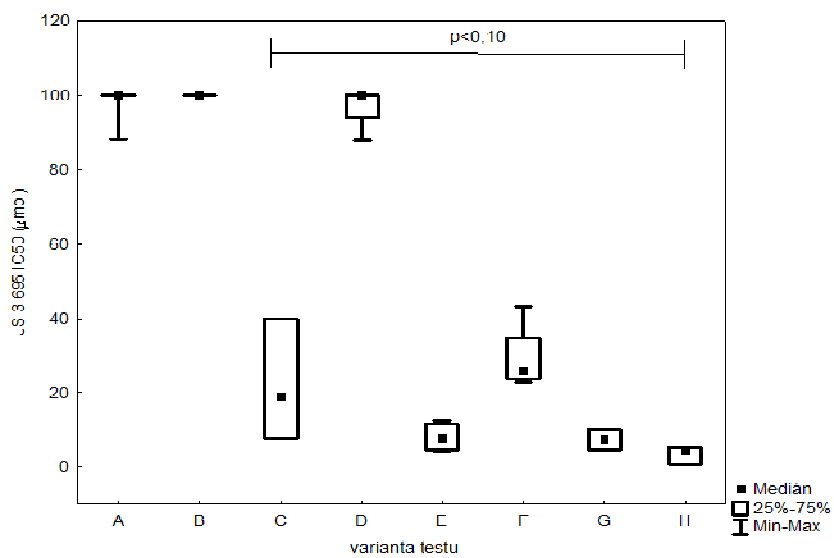
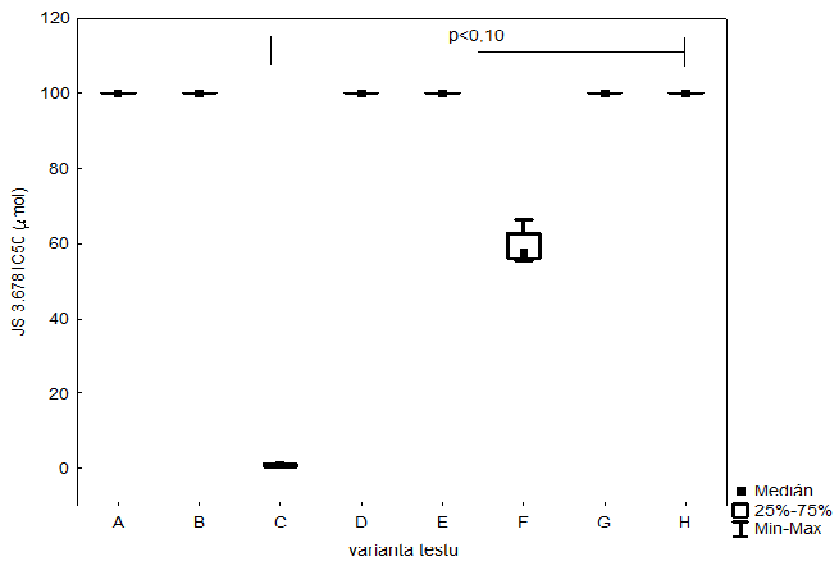
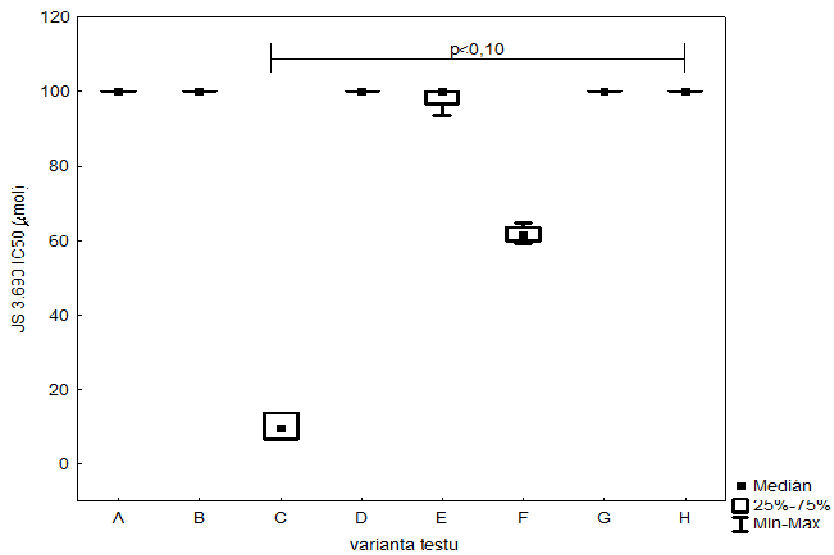
Po dvouhodinové inkubační době, kdy probíhala metabolizace, jsme odebrali 50  $\mu$ l supernatantu od hepatocytů. Napipetovali jsme jej k buněčné suspenzi CEMů v RPMI médiu, která byla předem rozpipetována do 96-jamkového panelu, kde probíhal samotný MTT test. V těchto případech jsme očekávali metabolickou aktivaci prodrug formy a její vyšší cytotoxickou účinnost.

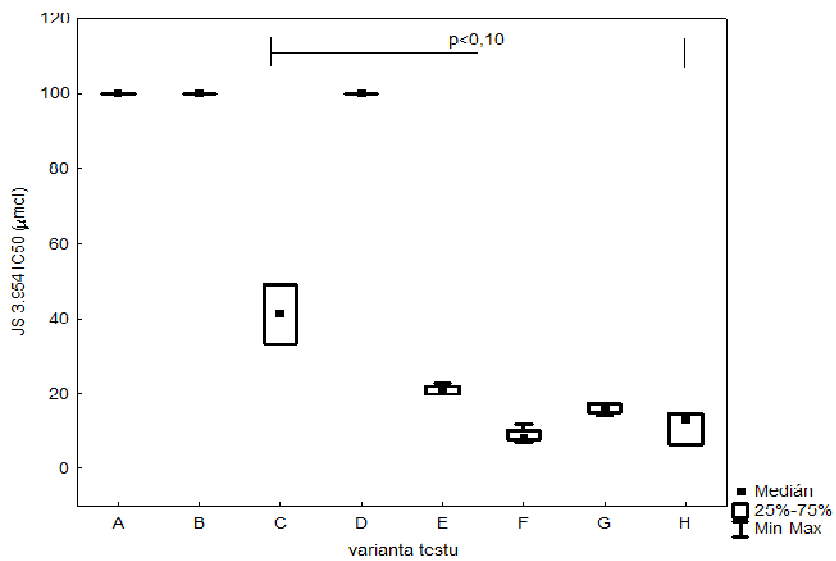
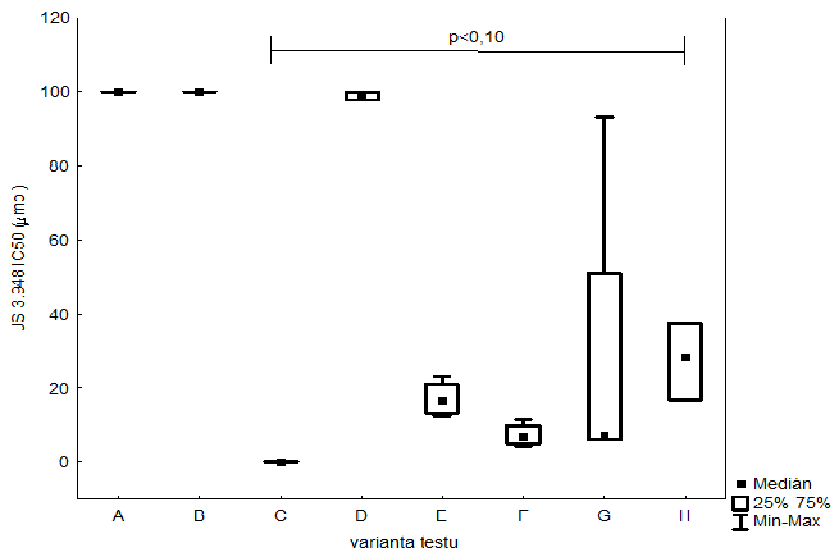
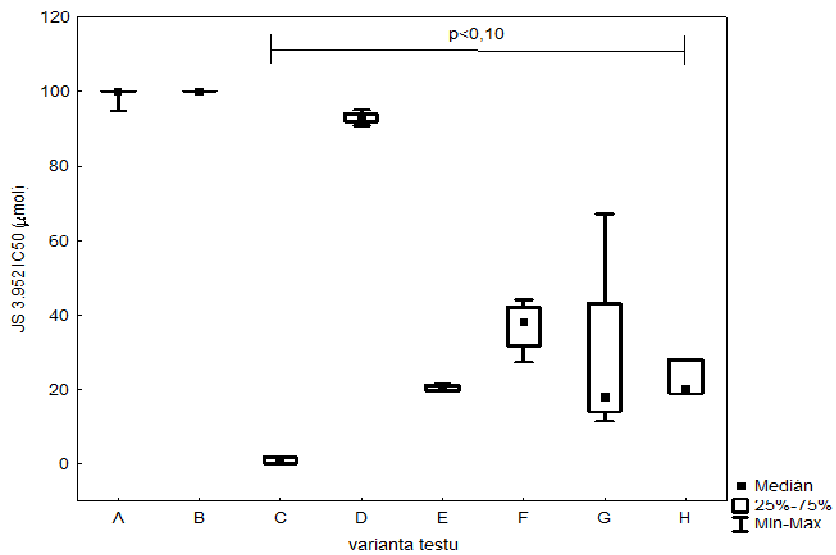
Dále byly provedeny MTT testy cytotoxicity derivátů bez předchozí inkubace s hepatocyty. Ve variantě E jsme ověřovali zda, se deriváty triterpenů neváží na kolagen, tím se nesnižuje jejich koncentrace a úměrně k tomu i účinnost. Roztoky testovaných látek byly nejprve inkubovány 2 hodiny ve Williamsově médiu v 96-jamkovém panelu, který byl potažený kolagenem. F a G varianty testů byly odlišné v tom, zda bylo Williamsovo médium obohaceno o aditiva, která se do něho přidávají pro kultivaci hepatocytů. Varianta H proběhla standardním způsobem pouze v RPMI (10% FCSI) médiu. Stručně můžeme jednotlivé varianty MTT testů bez předchozí metabolizace testovaných látek popsat takto:

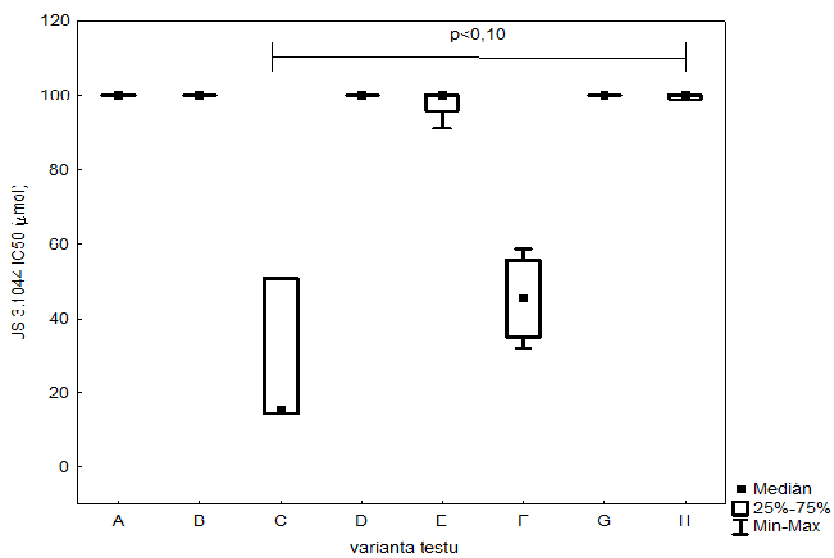
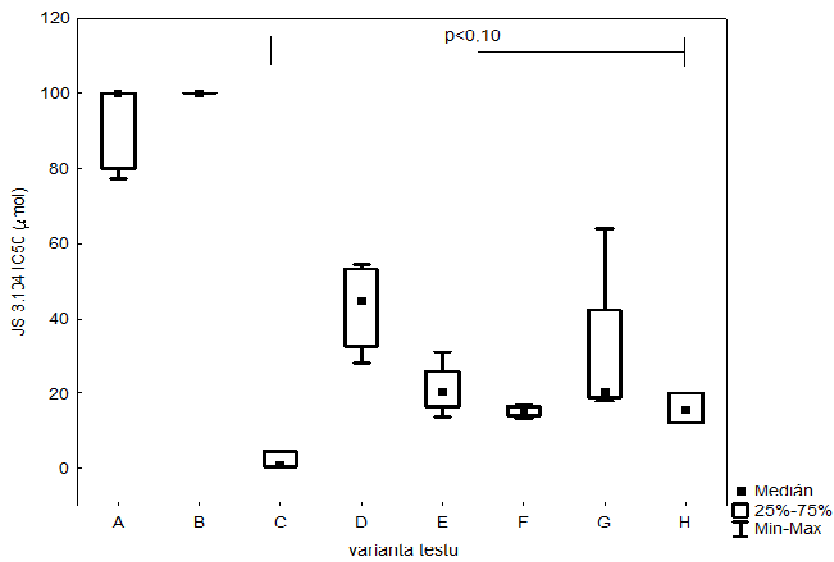
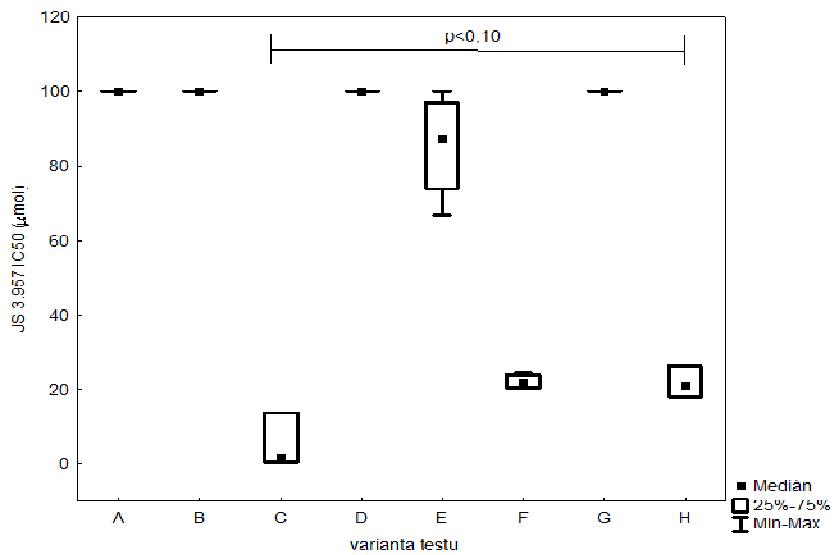
- E) 50  $\mu$ l supernatantu z panelu potaženého kolagenem, kde bylo Williamsovo médium s testovanými látkami a všemi aditivami, bylo po dvou hodinách přepipetováno do testovacího panelu k buněčné suspenzi nádorové linie CEM v kompletním RPMI (10% FCSI).
- F) Testované látky byly přidány k buňkám CEM, které byly kultivovány ve směsi Williamsova média bez aditiv s kompletním RPMI (10% FCSI) médiem v poměru 1:1.
- G) Testované látky byly přidány k buňkám CEM, které byly kultivovány ve směsi Williamsova média s aditivami s kompletním RPMI médiem (10% FCSI) v poměru 1:1.
- H) Testované látky byly přidány k buňkám CEM, které byly kultivovány pouze v kompletním RPMI médiu (10% FCSI).

Tabulka 3: Hodnoty průměrných IC<sub>50</sub> [μmol/l] (± směrodatná odchylka) pro jednotlivé varianty testů.

Varianta testu	Derivát JS															Kontrola	
	3.690	3.678	3.695	3.952	3.948	3.954	3.957	3.1040	3.1044	3.1050	3.1053	Endoxan					
A	100 ±0	100 ±0	98,62 ±3,69	99,5 ±1,51	100 ±0	100 ±0	100 ±0	93,52 ±9,92	100 ±0	100 ±0	100 ±0	100 ±0	100 ±0				
B	100 ±0	100 ±0	100 ±0	100 ±0	100 ±0	100 ±0	100 ±0	100 ±0	100 ±0	100 ±0	100 ±0	100 ±0	100 ±0				
C	9,98 ±2,14	0,83 ±0,18	22,17 ±5,66	1,13 ±0,62	0,1 ±0	41,18 ±4,08	5,31 ±6,13	1,97 ±1,83	26,83 ±18,22	17,54 ±0,61	0,29 ±0,05	2,55 ±2,45					
D	100 ±0	100 ±0	96,95 ±5,29	92,85 ±1,54	98,95 ±1,05	100 ±0	100 ±0	43 ±10,93	100 ±0	99,75 ±0,44	97,27 ±4,73	100 ±0					
E	98,37 ±2,82	100 ±0	8,14 ±3,54	20,53 ±0,66	17,13 ±4,32	20,92 ±1,2	85,39 ±12,74	21,31 ±6,2	97,81 ±3,79	100 ±0	100 ±0	100 ±0					
F	61,68 ±2,09	59,28 ±4,32	29,37 ±8,16	36,9 ±6,14	7,38 ±2,73	8,95 ±1,82	22,2 ±1,79	15,35 ±1,35	45,32 ±10,77	70 ±10,92	64,3 ±12,09	100 ±0					
G	100 ±0	100 ±0	7,38 ±2,65	28,64 ±22,44	28,57 ±37,36	16,19 ±1,35	100 ±0	30,61 ±19,26	100 ±0	100 ±0	100 ±0	100 ±0					
H	100 ±0	100 ±0	2,49 ±1,86	59,41 ±40,59	27,15 ±10,33	9,87 ±3,32	19,57 ±1,45	14 ±1,6	99,33 ±0,67	90,16 ±9,84	83,89 ±16,11	100 ±0					







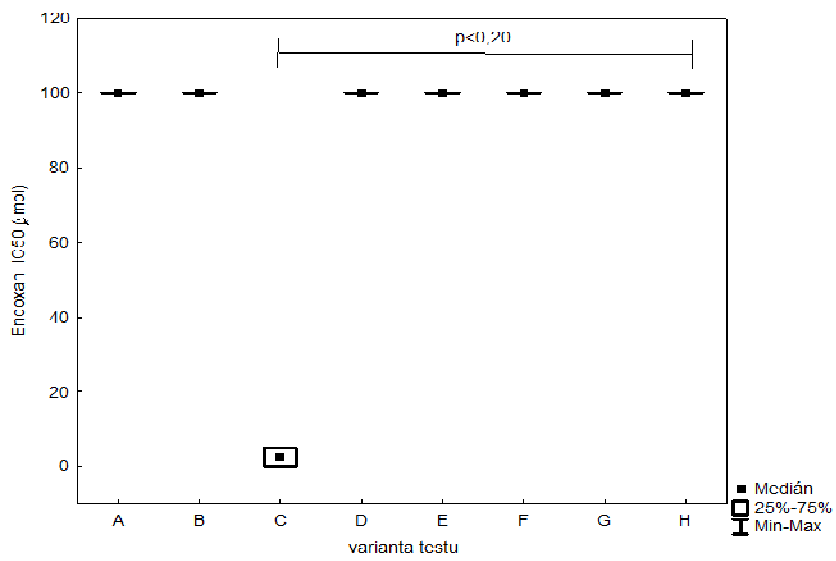
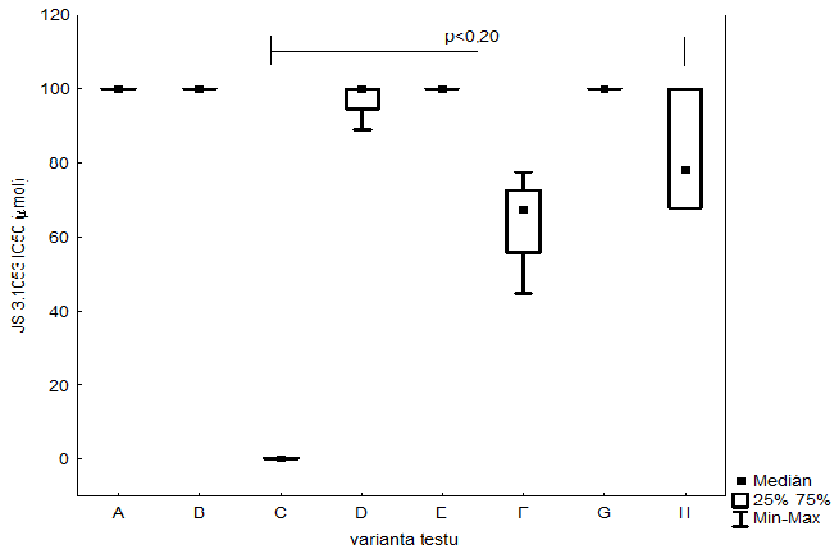
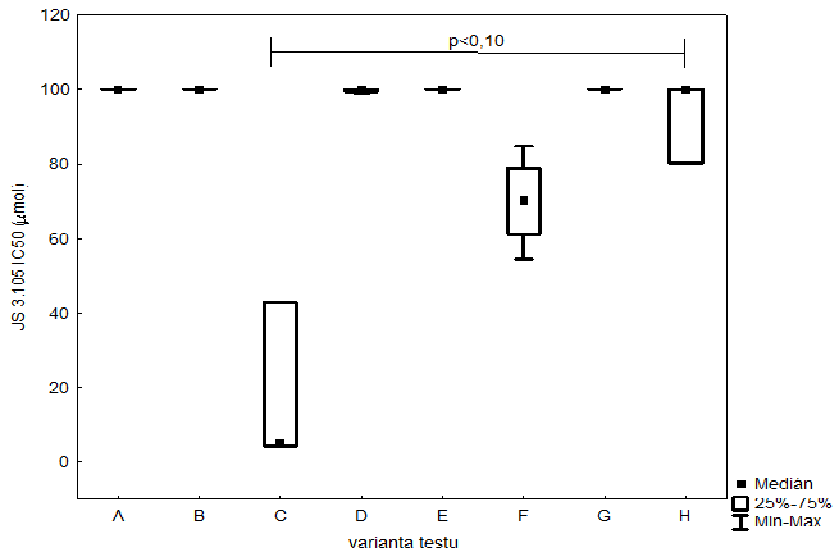




Schéma 34: Grafy porovnávající hodnoty  $IC_{50}$  jednotlivých variant testů pro každý derivát. Pro standardní MTT test bez metabolické aktivace a pro MTT test, kdy byly triterpeny metabolizovány/aktivovány inkubací s hepatocyty bez předchozí stabilizace, bylo provedeno vyhodnocení statistické významnosti.

## 2.4 Diskuse

Porovnáme-li navzájem získané výsledky jednotlivých variant testů (Tabulka 3) nabízí se několik vysvětlení, proč jsou odlišné. Při variantách A a B byly hepatocyty vysety jako primární kultury v monovrstvě. Prošly stabilizační periodou. Obecně je známo, že u takto kultivovaných hepatocytů dochází k rychlé ztrátě aktivity biotransformačních enzymů [41]. Můžeme tedy uvažovat, že k očekávané aktivaci prodrugů nedošlo nebo naopak mohly být námi studované pro-drug formy triterpenů metabolizovány jiným způsobem na neaktivní formu. Tím pádem nebyla zjištěna žádná cytotoxická účinnost.

Při variantě testu C jsme získali oproti ostatním testům významně nižší hodnoty  $IC_{50}$  u většiny derivátů. Pravděpodobně tedy došlo k aktivaci prodrug formy. Tuto hypotézu podporuje i zvýšení účinnosti u Endoxanu, který byl jinak ve všech ostatních testech zcela neaktivní. Hlavní roli v tomto případě sehrála skutečnost, že testované látky byly k hepatocytům přidány ihned po izolaci. Kultura hepatocytů se ještě podobala buněčné suspenzi. Je prokázáno, že aktivita enzymů je v brzké době po izolaci v buněčné suspenzi nejvyšší a s časem klesá [41].

Ve variantě D byly sice testované látky přidány podobně ihned po izolaci, ale  $IC_{50}$  jsou mnohem vyšší než ve variantě C. Hepatocyty byly kultivovány ve Williamsově médiu bez jakýchkoliv aditiv. Neměly tedy díky tomu optimální podmínky, což nejspíš ovlivnilo jejich metabolickou aktivitu. Proléčivo zůstalo v neaktivní formě.

Pro vyloučení možnosti, že dochází při přípravě aktivních metabolitů k vyvazování proléčiv na kolagen a do vlastního MTT testu se díky tomu dostávají ve významně nižší koncentraci a jsou proto neúčinné, jsme provedli variantu testu E. Vzhledem k podobným hodnotám  $IC_{50}$  jako při variantě testu H (standardní MTT test v 10% RPMI) můžeme konstatovat, že se triterpeny na kolagen významně neváží.

Podobným způsobem můžeme vyloučit i interakci testovaných látek se suplementy Williamsova média. Hodnoty  $IC_{50}$  testů F a G jsou podobné jako  $IC_{50}$  získané standardním MTT testem (H). Je možné, že mírný rozdíl  $IC_{50}$  F a G variant je

způsoben různým obsahem FCSI ve směsi kultivačního média. V médiu pro variantu G byl vyšší podíl FCSI. Testované látky se mohou vázat na sérové proteiny a tím měnit svou účinnost.

Poslední alternativa testu byla provedena standardním způsobem. Testované látky jsme přidali k buněčné suspenzi CEM v RPMI s přídavkem 10% FCSI.

V grafech (Schéma 34) názorně vidíme rozdíly hodnot  $IC_{50}$  jednotlivých variant testů pro každý derivát. Pro nás je nejvýznamnější rozdíl hodnot  $IC_{50}$  mezi variantou C (očekávaná metabolizace) a variantou H (standardní MTT test). Zjistili jsme, že u derivátů JS 3.954 a JS 3.695 je hodnota  $IC_{50}$  po metabolizaci vyšší než-li před ní a k metabolizaci derivátů na aktivní metabolity nedochází. U derivátů JS 3.678, JS 3.948, JS 3.952, JS 3.1040, JS 3.1053 jsme po metabolizaci zjistili naopak velmi nízké hodnoty  $IC_{50}$ , které se pohybují až do 0,29  $\mu\text{mol/l}$  v případě látky JS 3.1053 a velmi pravděpodobně dochází k aktivaci proléčiva. V případě nejúčinnějšího derivátu JS 3.948 byla  $IC_{50}$  ještě nižší než nejnižší testovaná koncentrace léčiva (0,1  $\mu\text{mol/l}$ ) a pro upřesnění  $IC_{50}$  bude nezbytné testy zopakovat v nižších testovaných koncentracích.

Terapeutická účinnost protinádorových léčiv, ale vlastně i všech ostatních je ovlivněna mnoha faktory, které jsou popsány v literatuře. Například farmakokinetika i farmakodynamika léčiv může být ovlivněna vazbou na plasmatické bílkoviny – hlavně lidský sérový albumin (HSA),  $\alpha$ -kyselá glykoproteiny (AAG). Vazba na ně je charakteristická zejména pro složité organické molekuly, kterými jsou některá cytostatika (např. doxorubicin, paklitaxel, vincristin). Při určení účinné dávky léčiva je nutné vzít tento jev v úvahu. Při studiích vazby na proteiny akridinových derivátů *in vitro* bylo zjištěno, že růst hodnot  $IC_{50}$  je lineární funkcí přidaného proteinu. Tedy čím vyšší je obsah proteinu, tím více léčiva se na něj naváže. Tím pádem léčivo nevykazuje takovou terapeutickou účinnost a vzroste hodnota  $IC_{50}$  [42]. Kromě toho se často setkáváme s jinou účinnou dávkou léčiva například na myším modelu a jinou pak u člověka.

Výsledky testů ukazují, že k metabolické aktivaci triterpenoidních derivátů je nejvhodnější C varianta testu. Do budoucna zůstává výzvou zdokonalení této varianty. Pro upřesnění námi naměřených dat bude nezbytné supernatant po inkubaci s hepatocyty podrobit analýze, abychom zjistili, které metabolity obsahuje. Dále by bylo dobré stanovit obsah metabolitů v závislosti na době inkubace prodrug formy léčiva s hepatocyty. Pro korektní stanovení cytotoxicity aktivovaných proléčiv by měl být

supernatant odebírán v okamžiku, kdy jeho množství dosáhne maximální koncentrace neměící se s časem.

### **3. Závěr:**

V této práci jsme se věnovali problematice proléčiv a jejich metabolické aktivaci. Naším cílem bylo optimalizovat metodiku metabolické aktivace sloučenin triterpenů, konkrétně karbonátových derivátů kyseliny betulinové. Pro metabolizaci a možnou aktivaci těchto látek jsme vyzkoušeli několik experimentálních modelů metabolizace s izolovanými potkaními hepatocyty. Varianty experimentů jsou popsány výše. Jeden z těchto testovaných modelů se zdá být pro metabolizaci léčiv účinný a jeho zdokonalení bude předmětem dalšího výzkumu.

Druhým cílem naší práce bylo stanovení cytotoxicity metabolizovaných proléčiv. K tomuto účelu jsme využili MTT test. Cytotoxicitu jsme stanovovali na senzitivní nádorové buněčné linii CEM. Zjistili jsme, že některé z metabolizovaných léčiv jsou vysoce účinné při koncentracích nižších než 0,1 $\mu$ mol/l. Při dalších experimentech by bylo vhodné stanovit cytotoxicitu i na dalších nádorových buněčných liniích.

Cíle bakalářské práce byly splněny.

## Seznam použité literatury

- [1] ALBERT, A. Chemical aspects of selective toxicity. *Nature*, 1958, vol. 182, s. 421-423
- [2] TESTA, B. Prodrug research: futile or fertile?. *Biochemical Pharmacology*, 2004, vol. 68, s. 2097-2106
- [3] RAUTIO, J. – KUMPULAINEN, H. – HEIBACH, T. – OLIYAI, R. – OH, D. – JÄRVINEN, T. – SAVOLAINEN, J. Prodrugs: design and clinical applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2008, vol. 7, s. 255-270
- [4] CORNFORD, E. M. – YOUNG, D. – PAXTON, J. W. – FINLAY, G. J. – WILSON, W. R. – PADRIDGE, W. M. Melphalan penetration of the blood–brain barrier via the neutral aminoacid transporter in tumor-bearing brain. *Cancer Research*, 1992, vol. 52, s. 138 – 143
- [5] DE GROOT, F. M. H. – DAMEN, E. V. P. – SCHEEREN, H. W. Anticancer Prodrugs for Application in Monotherapy: Targeting Hypoxia, Tumor-Associated Enzymes, and Receptors. *Current Medicinal Chemistry*, 2001, vol. 8, s. 1093 – 1122
- [6] HOLÝ, A. Principy biorganické chemie ve vývoji antivirotik a cytostatik. 2004, Univerzita Palackého v Olomouci, 1. Ed, ISBN: 80-244-0855-4
- [7] LONGLEY, D. B. – HARKIN, D. P. – JOHNSTON, P. G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, 2003, vol. 3, s. 330 – 338
- [8] BERG, J. M. – TYMOCZKO, J. L. – STRYER, L. *Biochemistry*. 2002, W H Freeman, 5. Ed, ISBN: 10: 0-7167-3051-0
- [9] KLENER, P. Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii. 2010, Grada Publishing, 1. Ed, ISBN: 978-80-247-2808-7
- [10] UCKUN, F. M – MAO, C. – JAN, S. T. – HUANG, H. – VASSILEVA. O. – NAVARA, C. S. – NARLA, R. K. Spongistatins as tubulin targeting agents. *Current Pharmaceutical Design*, 2001, vol. 7, s. 1291 – 1296
- [11] CINELLI, M. A. – MORRELL, A. E. – DEXHEIMER, T. S. – AGAMA, K. – AGRAWAL, S. – POMMIER, Y. – CUSHMAN, M. The structure-activity relationships of A-ring-substituted aromathecine topoisomerase I inhibitors strongly support a camptothecin-like binding mode. *Bioorganic & Medical Chemistry*, 2010, vol. 18, s. 5535 – 5552

- [12] DONG, L. F. – FREEMAN, R. – LIU, J. – ZOBALOVA, R. – MARINHERNANDEZ, A. – STANTIC, M. et al. Suppression of tumor growth in vivo by the mitocan alpha-tocopheryl succinate requires respiratory complex II. *Clinical Cancer Research*, 2009, vol. 15, s. 1593 – 1600
- [13] BÜTTNER, A. – COTTIN, T. – XU, J. – TZAGKAROULAKI, L. – GIANNIS, A. Serotonin derivatives as a new class of non-ATP-competitive receptor tyrosine kinase inhibitors. *Bioorganic & Medical Chemistry*, 2010, vol. 18, s. 3387 – 3402
- [14] KLENER, P. *Protinádorová chemoterapie*. 1996, Galén, 1. Ed., ISBN: 80-85824-36-1
- [15] SINHABABU, A. K. – THAKKER, D.R. Prodrugs of anticancer agents. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1996, vol. 19, s. 241-273
- [16] LIEDERER, B. M. – BORCHARDT, R. T. Enzymes involved in the bioconversion of ester-based prodrugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006, vol. 95, s. 1177 – 1195
- [17] MATHIJSEN, R. H. – VAN ALPHEN, R. J. – VERWEIJ, J. – LOOS, W. J. – NOOTER, K. – STOTER, G. – SPARREBOOM, A. Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). *Clinical Cancer Research*, 2001, vol. 7, s. 2182 – 2194
- [18] HEIBACH, T. – OH, D. M. – LI, L. Y. – RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. – GARCIA, G. – FLEISCHER, D. Enzyme-mediated precipitation of parent drugs from their phosphate prodrugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 2003, vol. 261, s. 81 – 92
- [19] BERGENHEIM, A. T. – HENRIKSSON, R. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of estramustine phosphate. *Clinical Pharmacokinetics*, 1998, vol. 34, s. 163 – 172
- [20] de GROOT, F. M. – van BERKOM, L. W. – SCHEEREN, H. W. Synthesis and biological evaluation of 2'-carbamate-linked and 2'-carbonate-linked prodrugs of paclitaxel: selective activation by the tumor-associated protease plasmin. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2000, vol. 43, s. 3093 - 3102
- [21] BENDER, D. M. – BAO, J. – DANTZIG, A. H. – DISEROAD, W. D. – LAW, K. L. – MAGNUS, N. A. – PETERSON, J. A. – PERKINS, E. J. et al. Synthesis, crystallization, and biological evaluation of an orally active prodrug of gemcitabine. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2009, vol. 52, s. 6958 - 6961

- [22] KUMPULAINEN, H. – MÄHÖNEN, N. – LAITINEN, M. L. – JAURAKKAJÄRVI, M. – RAUNIO, H. – JUVONEN, R. O. – VEPSSÄLÄINEN, J. – JÄRVINEN, T. – RAUTIO, J. Evaluation of hydroxyimine as cytochrome P450-selective prodrug structure. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2006, vol. 49, s. 1207 – 1211
- [23] LIU, J. Computational studie of anti-tumoc drug tirapazamine and reactions and rearrangements of nitrenes and carbenes. Dissertation, School of The Ohio State University, 2005, s. 15 – 16
- [24] CHANDOR, A. – DIJOLS, S. – RAMASSAMY, B. – FRAPART, Y. – MANSUY, D. – STUEHR, D. – HELSBY, N. – BOUCHER, J. L. Metabolic Activation of the Antitumor Drug 5-(Aziridin-1-yl)-2,4-Dinitrobenzamide (CB1954) by NO Synthases. *Chemical Research in Toxicology*, 2008, vol. 21, s. 836-843
- [25] PAN, S. S. – ANDREWS, P.A. – GLOVER, C.J.BACHUR, N. R. Reductive Activation of Mitomycin C and Mitomycin C Metabolites Catalyzed by NADPH-Cytochrome P-450 Reductase and Xanthine Oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1984, vol. 259, s. 959 – 966
- [26] CONNORS, T. A. – WHISSON, M. E. Cure of mice bearing advanced plasma cell tumours with aniline mustard: the relationship between glucuronidase activity and tumour sensitivity. *Nature*, 1966, vol. 210, s. 866 - &
- [27] CONNORS, T. A. – FARMER, P. B. – FOSTER, A.B. Metabolism of aniline mustard [*N,N*-di-(2-Chloroethyl)-aniline]. *Biochemical Pharmacology*, 1973, vol. 22, s. 1971 – 1980
- [28] PAPOT, S. – COMBAUD, D. – BOSSLET, K. – GERKEN, M. – CZECH, J. – GESSON, J. P. Synthesis and cytotoxic activity of a glucuronylated prodrug of nornitrogen mustard. *Bioorganic & Medical Chemistry*, 2000, vol. 10, s. 1835 – 1837
- [29] SINGH, Y. – PALOMBO, M. – SINKO, P. J. Recent trends in targeted anticancer prodrug and conjugate design. *Current Medicinal Chemistry*, 2008, vol. 15, s. 1802 – 1826
- [30] SHUKLA, R. – THOMAS, T. P. – DESAI, A. M. – KOTLYAR, A. – PARK, S. J. – BAKER, J. R. HER2 specific Delivery of Methotrexate by Dendrimer Conjugated anti-HER2 mAb. *Nanotechnology*, 2008, vol. 19
- [31] NICULESCU-DUVAZ, D. – SCALON, I. – NICULESCU-DUVAZ, I. – SPRINGER, C. J. A higher yielding synthesis of the clinical prodrug ZD2767P using

di-protected 4-[*N,N*-bis(2-hydroxyethyl)amino]phenyl chloroformate. *Tetrahedron Letters*, 2005, vol. 46, s. 6919 – 1922

[32] FRANCIS, R. J. – SHARMA, S. K. – SPRINGER, C. – GREEN, A. J. – HOPE-STONE, L. D. – SENA, L. – MARTIN, J. – ADOMSON, K. L. – ROBBINS, A. et al. A phase I trial of antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) in patients with advanced colorectal carcinoma or other CEA producing tumours. *British Journal of Cancer*, 2002, vol. 87, s. 600 - 607

[33] KRATZ, F. – MÜLLER, I. A. – RYPPA, C. – WARNECKE, A. Prodrug strategies in anticancer chemotherapy. *ChemMedChem*, 2008, vol. 3, s. 20 – 53

[34] SATCHI-FAINARO, R. – HAILU, H. – DAVIES, J. W. – SUMMERFORD, C. – DUCAN, R. PDEPT: polymer-directed enzyme prodrug therapy. 2. HPMA copolymer-beta-lactamase and HPMA copolymer-C-Dox as a model combination. *Bioconjugate Chemistry*, 2003, vol. 14, s. 797 – 804

[35] DE SMET, M. – LANGEREIS, S. – van den BOSCH, S. – GRÜLLH. Temperature-sensitive liposomes for doxorubicin delivery under MRI guidance. *Journal of Controlled Release*, 2010, vol. 143, s. 120 - 127

[36] DŽUBÁK, P. – ŠAREK, J. – CWIERTKA, K. – HAJDÚCH, M. – VYDRA, D. Bilogické účinky triterpenoidů: Protizánětlivé, antimikrobiální, hepatoprotektivní, analgetické a další farmakologické aktivity. *Klinická farmakologie*, 2004, vol 18, s. 96 – 101

[37] URBAN, M. – ŠAREK, J. – TIŠLEROVÁ, I. – DŽUBÁK, P. – HAJDÚCH, M. Influence of esterification and modification of A-ring in a group of lupane acids on their cytotoxicity. *Bioorg Med Chem.*, 2005, vol. 13, no. 9, s. 5527-5535

[38] MOLDEUS, P. – HOGBERG, J. – ORRENIUS, S Isolation and use of liver cells. *Methods in enzymology*, 1978, vol. 52, s. 60 – 71

[39] BERRY, M. – EDWARDS, A. – BARRIT, G. J. Isolated hepatocytes, preparation, properties and application. Elsevier, 1991 vol. 21, s. 384 – 386

[40] MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival – application to proliferation and cyto-toxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 1983, vol. 65, s. 55 - 63

[41] KUČERA, O. – LOTKOVÁ, H. – KŘIVÁKOVÁ, P. – ROUŠAR, T. – ČERVINKOVÁ, Z. Modelové systémy pro studium toxického poškození hepatocytů in vitro. *Československá fyziologie*, 2006, vol. 55, s. 103 - 110

- [42] FINLAY, G.J. – BAGULEY, B.C. Effect of proteinbinding on the in vitro activity of antitumour acridine derivates and related anticancer drug. *Cancer Chmethery and Pharmacology*, 2000, vol 45, s. 417 – 422
- [43] BRIGHTON, D. – WOOD, M. *Cancer Chemotherapy*, 2005, Elsevier, 1. Ed, ISBN: 0 443 07101 2
- [44] WU, X.Z. A new classification system of anticancer drugs– Based on cell biological mechanisms. *Medical Hypotheses*, 2006, vol 66, s. 883 - 887