

# Protinádorová léčiva III – „cílená“ terapie

## Cílená protinádorová terapie

V druhé polovině minulého století se chemoterapie přiřadila k chirurgickým zásahům a radioterapii jako jeden ze základních způsobů léčby rakoviny. Byly objeveny nové účinné protinádorové léky a nalezeny způsoby, jak tyto léky aplikovat, aby byla potlačena jejich nežádoucí toxicita. Přes nesporné úspěchy klasické chemoterapie se však od 90. let minulého století dostávalo stále více do popředí její omezení. Hlavním cílem výzkumu a vývoje protinádorových léčiv se stalo zvýšení selektivity a účinnosti nových přípravků.

Základní charakteristikou nádorových buněk je rychlý růst a nekontrolované množení. Protinádorové léky byly nazvány cytostatika, protože růst a množení buněk potlačují. Působí především na rychle rostoucí nádorové buňky, ale brzdí do jisté míry i růst a množení i některých tkáňových buněk. Z toho vyplývají některé nežádoucí vedlejší účinky dosavadních cytostatik, z nichž je závažné zejména narušení krve tvorby. K selektivnímu zásahu proti nádorům pouhé rozdíly v rychlosti růstu buněk nestačí.

Výzkum nových léčiv se proto zaměřil na hledání možností jejich přesnějšího zacílení na nádorové buňky. Zvyšovat selektivitu protinádorové léčby umožnil zejména prudký rozvoj poznání příčin vzniku nádorů založený na poznáních molekulární biologie a genetiky. Zrodil se pojem **cílené terapie** (targeted therapy).. Díky lékům pro cílenou terapii zaznamenávají prodeje protinádorových léků dvouciferný nárůst.

Při cílené terapii byla nejprve použita některá nízkomolekulární léčiva, především inhibitory tyrosinových proteinkinas. Nyní se při ní ve stále rostoucí míře uplatňují různé biopolymery, především monoklonální protilátky. Použití těchto látek jako léčiv je někdy označováno jako biologická terapie (viz Farm12), což však není zcela přesné.

Cílená terapie je někdy – hlavně v médiích – považována za bezpečný protiklad chemoterapie. Přínosy cílené nebo „biologické“ terapie pro protinádorovou léčbu jsou nesporné, ale ani na tato léčiva nelze nahlížet zcela nekriticky. Nová „cílená“ nebo „biologická“ léčiva („biofarmaka“) působí sice selektivněji než klasická cytostatika, **zcela selektivní však nejsou a stále mají různé nežádoucí vedlejší účinky.**

Problémem je např. možnost poškození funkce srdce a cévního systému inhibitory angiogeneze. Jiná cílená léčiva mohou narušit svými vedlejšími účinky činnost jater, vyvolávat poruchy v zažívacím traktu nebo svědění a další nežádoucí kožní projevy. Jiným problémem je, že některá cílená léčiva ztrácejí účinnost tím, že se v nádorových buňkách vyvine rezistence.

Z různých cílených nízkomolekulárních léčiv se nejprve budeme zabývat látkami, které se využívají při terapeutických postupech kombinujících působení různých chemických látek a záření. Následovat bude přehled dalších nízkomolekulárních látek, které více či méně selektivně brzdí růst nádorových buněk v důsledku blokování procesů, které jsou důležité pro růst a množení buněk a které v nádorových tkáních probíhají nekontrolovaně.

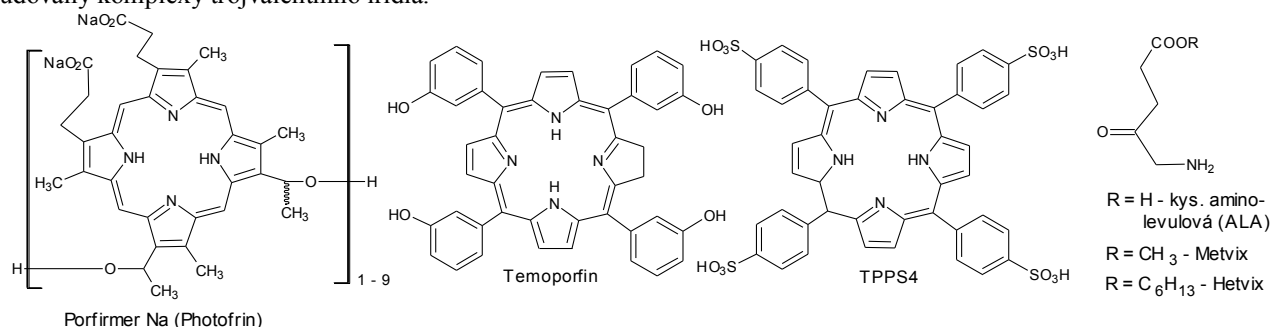
## Fotodynamická terapie

Před zhruba 20 lety vzbuzovala značnou pozornost jako nový způsob léčby nádorů tzv. fotodynamická terapie (FDT). Ukázalo se, že některé fotosenzibilizující látky se koncentrují v nádorových buňkách a po ozáření světlem o vhodné vlnové délce reagují s kyslíkem za vzniku singletového kyslíku a volných radikálů. Ty ničí ozářené buňky, zatímco neozářené buňky a buňky, do nichž fotosenzibilizátor nepronikl, poškozovány nejsou. Zásah je proto vysoce selektivní. Předchozí způsob léčení chemoterapií nebo radioterapií použití FDT nevylučuje, stejně jako po FDT může být nasazen jiný způsob terapie.

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

Prvním povoleným fotosenzibilizátorem byl derivát hematoporphyrinu, **porfirmer**, (Photofrin, Photobarr). Následovala **kyseřlina 5-aminolevulová** (ALA), prekurzor porfyrinů, a také její estery (methylester – Metvix, n-hexylester – Hetvix). ALA a její estery se používají v dermatologii k léčbě prekanceróz, hlavně se však uplatnily v diagnostice. Po podání ALA se v nádorové tkáni zvýší obsah porfyrinů, které při ozáření fluoreskují a tím nádor prozradí.

Fotosenzibilizátory 2. generace aktivuje světlo delších vlnových délek, které do nádoru proniká hlouběji. Jsou to jednak další deriváty porfyrinů, např. meso-tetra(4-sulfofenyl)porfyrin, **TPPS4** nebo i jiné planární kovové komplexy (chloriny s porfyrinovým skeletem odvozeným od chlorofylu nebo bakteriochlorofylu, deriváty ftalocyaninu nebo naftalocyaninu). Použití TPPS4 nebylo povoleno pro údajnou neurotoxicitu, lékaři z Karlovy university ale ukázali, že chromatograficky vyčištěný produkt neurotoxicitkou není. Aplikace tohoto senzibilizátoru byly v ČR poměrně intenzivně studovány, přípravek však byl nakonec povolen pouze pro použití ve veterinárním lékařství. Z dalších fotosenzibilizátorů byl klinicky odzkoušen a v EU povolen ještě m-tetrahydroxyfenylchlorin, **temoporfin** (Foscan) pro léčbu nádorů hlavy a krku, v Rusku byl povolen hydroxyhlinitý komplex sulfonovaného ftalocyaninu. Ani tyto senzibilizátory 2. generace se však v protinádorové léčbě výrazněji neuplatnily. Úspěšnější byl pouze derivát benzoporfyrinu, **verteporfin** (Visudyne), který však není určen pro protinádorovou léčbu, ale pro oční lékařství – fotodynamickou léčbu tzv. „vlhké“ formy věkem podmíněné makulární degenerace, což je onemocnění očí vyvolané nadměrnou tvorbou nových cévek v sítnici, krvácením v oku a zjizvením sítnice, které vede k oslepnutí. Jako zajímavost lze uvést, že nově jsou jako fotosenzibilizátory aktivované dlouhovlnným světelným zářením studovány komplexy trojvalentního iridia.



V poslední době začalo být studováno několik zajímavých variant fotodynamické terapie. Jednou je VTP (Vascular-Targeted Photodynamic Therapy), „na cévy zacílená“ FDT, která je zkoušena při léčbě raných stadií nádorů prostaty. Je založena na podání fotosenzibilizátoru do krevního oběhu a následné likvidaci nádorových buněk v prostatě po ozáření laserem. VTP přitom úspěšně nahrazuje radikální chirurgický zákrok spojený s následnými komplikacemi. Kombinace FDT s hypertermií spočívá v použití liposomů obsahujících fotosenzibilizátor ničící nádor po osvětlení a nanočástice železa ničící nádor teplem, které nanočástice produkují po aplikaci vysokofrekvenčního pole. Další varianta má překonat problém FDT spočívající v tom, že nádorové buňky jsou hypoxické, chudé na kyslík, což komplikuje jejich likvidaci za účasti kyslíkatých radikálů. Přitom se využívá navázaných cytotoxických látek (v zatím zkoušeném přípravku GS-DProSw jde o antibiotikum gramicidin S) na záření přepínatelnou molekulu diarylethenu. Působením UV záření je produkt inaktivován, po ozáření viditelným světlem se obnoví původní účinná konformace produktu, který pak likviduje jen osvětlené buňky nádoru a ne zakryté okolní zdravé buňky.

### Borová neutronová záchytová terapie

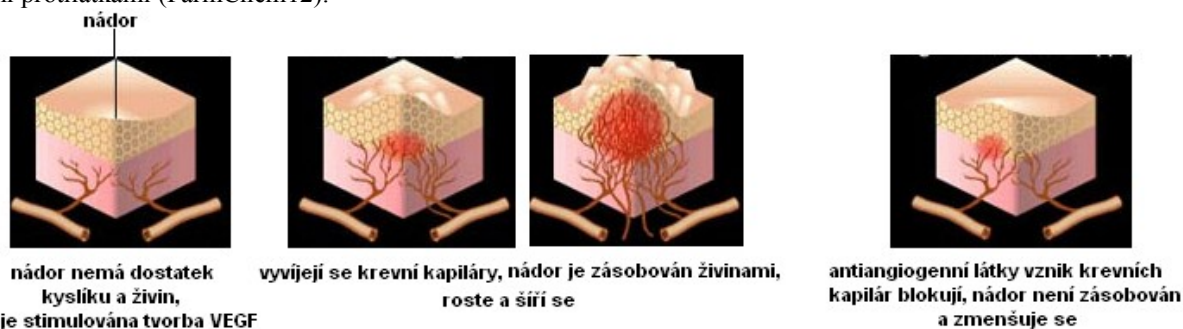
Jedním ze způsobů selektivní terapie nádorových onemocnění je vedle již zmíněné fotodynamické terapie tzv. **borová neutronová záchytová terapie** (boron neutron capture therapy, BNCT).

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

### Antiangiogenní terapie

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

Rostoucí nádorové buňky potřebují dostatek kyslíku a živin. Jakmile nádor naroste, přestává být zásobování nádorových buněk dostačující. Na nedostatek kyslíku reaguje buňka tvorbou hypoxií indukovaných faktorů, zejména HIF-1. Ten pak stimuluje expresi některých genů, což zajišťuje adaptaci buněk na dané podmínky. Výsledkem je mimo jiné zvýšená tvorba vaskulárního endoteliálního růstového faktoru, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). VEGF sekretovaný hypoxickými buňkami pak spouští angiogenesi, tj. předává signál buňkám cévní výstelky k tomu, aby z nich vyrostly nové krevní kapiláry, které pak zajišťují zásobování nádoru živinami i kyslíkem. Léčiva blokující růstové faktory nebo jejich receptory, popř. blokují přenos signálů v buňce, budou zmíněna později mezi inhibitory receptorových tyrosinkinás nebo monoklonálními protilátkami (FarmChem12).



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

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

Na druhé straně mohou ale antiangiogenní látky blokovat vznik nových cév i tam, kde je jejich vznik žádoucí. Jejich podání je proto vyloučeno v těhotenství, kdy se tvoří nové cévy rostoucího embrya. Mohou však negativně působit i na dospělého organismus, např. zvyšovat riziko embolie tvorbou krevních sraženin nebo mohou brzdit hojení ran. Pro regenerativní léčbu jsou dokonce vyvíjeny některé angiogenní látky, které naopak vznik nových cév podporují. Z nich byl schválen gel pro léčbu vředů na nohách diabetiků, zkouší se léky, které by byly přínosem pro léčbu ischemické choroby srdce.

Angiogenesi inhibuje celá řada bílkovin, peptidů i nízkomolekulárních látek.

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

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

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

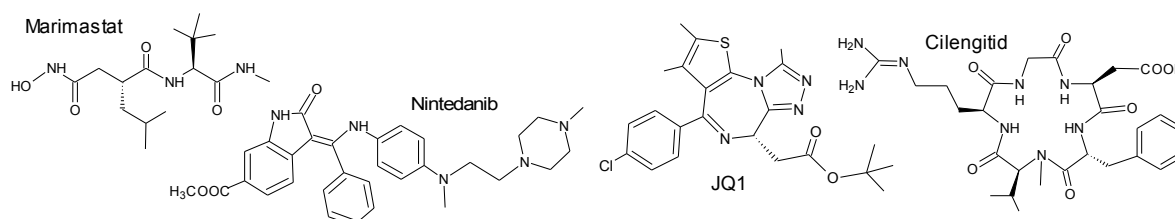
Matricové metaloproteinasy, MMP, jsou zinek obsahující enzymy, které degradují bílkoviny extracelulární matrice tvořící „kostru“ tkání. Tím umožňují jak vznik nových cév, tak i únik nádorových buněk z primárního nádoru, jejich šíření krevním oběhem a vznik metastáz. Inhibitory MMP by proto mohly brzdit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

Z nízkomolekulárních inhibitorů angiogenese je třeba zmínit **thalidomid** a další „**imunomodulační léky**“ (viz Farm10). Další skupinu inhibitorů tvoří látky, které blokují receptory pro růstové faktory.

Patří mezi ně především **nintedanib** (Ofev nebo Vargatef, Boehringer- Ingelheim). Blokáda receptorů pro růstové faktory v buňkách vytvářející cévy v nádorech vede k jejich apoptóze a destrukci cév v nádorech. Nintedanib byl povolen v r 2014 v kombinaci s docetaxelem jako terapie druhé volby u metastázujících nemalobuněčných nádorů plic, zkoušen je při léčbě nádorů střev. Má je malou biologickou dostupnost a je kritizován za vysokou cenu, která není úměrná jeho léčenému přínosu. Klinicky zkoušen je derivát thienotriazolodiazepinu **JQ1**, který by mohl významně přispět k léčbě „trojnásobně negativních“ (negativně testované na přítomnost estrogenních, progesteronových a HER2 receptorů) nádorů prsu, které nereagují na hormonální léčbu ani na léčbu protilátkami proti receptoru HER2 (= Human Epidermal growth factor Receptor 2). Problémem řady inhibitorů angiogeneze je jejich špatná distribuce do nádorové tkáně, kde pak inhibitory nemají koncentraci postačující k požadovanému účinku.

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

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



### Inhibice metabolismu nádorových buněk

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

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

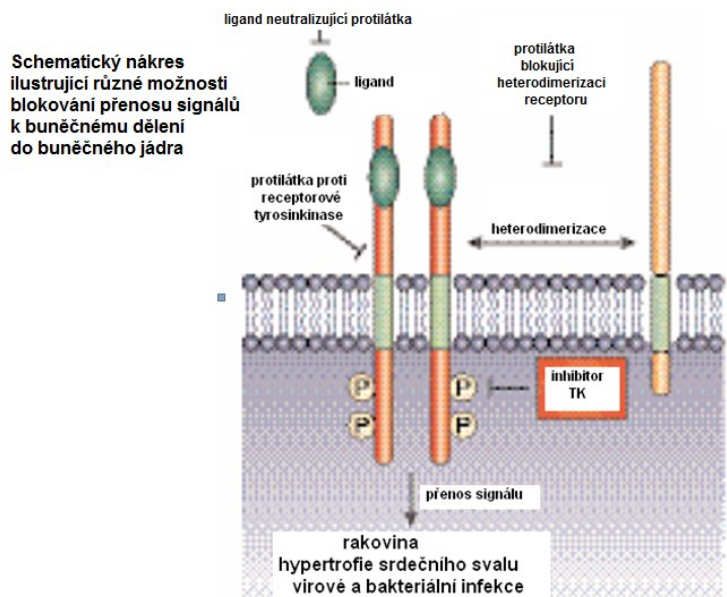
### Blokování přenosu signálů k buněčnému dělení

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

Důležitými růstovými faktory, které podporují růst a dělení nádorových buněk, jsou vedle již zmíněného VEGF zejména epidermální růstový faktor (EGF, Epidermal Growth Factor), transformující růstové faktory (TGF- $\alpha$  a TGF- $\beta$ , Transforming Growth Factor) a insulinu se podobající růstový faktor (IGF, Insulin-like Growth Factor). Další růstové faktory, které ovlivňují krvetvorbu, byly zmíněny mezi imunomodulačními léčivy. Ukázalo se, že na povrchu některých nádorových buněk je nadměrně zvýšeno množství receptorů pro tyto růstové faktory. Po interakci růstových faktorů s receptory musí být signál k růstu a dělení buněk předán až do buněčného jádra. To zprostředkovávají proteinkinasy spřažené s receptory. Při interakci s receptory jsou uvnitř buňky tyto kinasy aktivovány a začnou fosforylovat hydroxylové skupiny serinu, threoninu nebo tyrosinu v různých enzymech. Přitom se mění aktivita a někdy i funkce fosforylovaných enzymů, které pak působí na jiné proteiny signalizační kaskády. Některé kinasy mohou být i konstitutivně aktivní, tj. nepotřebují k aktivaci žádný vnější signál.

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

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

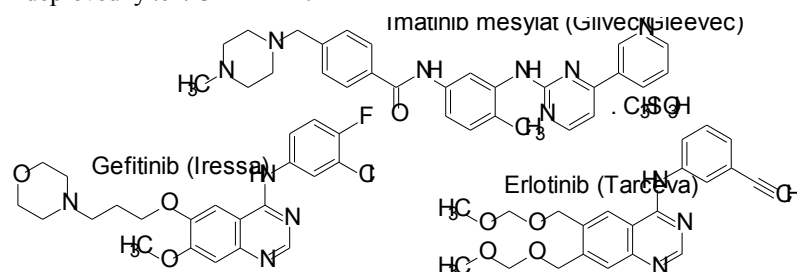


**Inhibitory proteinkinas nebo aktivátory fosforylas** blokují přenos signálu k dělení od kiny receptoru do jádra buňky. Inhibitory tyrosinových proteinkinas (TKI) působí jako „cílené“ léky především na nádorové buňky, v nichž je kinasová aktivita v důsledku mutací zvýšena nebo které nepotřebují k dělení vnější signály. Jejich účinky na normální buňky jsou tak podstatně menší než u standardních cytostatik.

Inhibitory tyrosinových proteinkinas mívají koncovku **-tinib**, inhibitory serinových a threoninových proteinkinas pouze **-nib**. Podle koncovky v názvu ale nelze vždy inhibitory spolehlivě rozlišit. Inhibitory proteinkinas jsou vyvíjeny od 90. let minulého století a pro onkologii představují stejný průlom, jakým bylo zavedení taxanů v 80. letech. Prvním byl **imatinib** (Glivec, Gleevec, Novartis), který byl vyvinut pro léčbu chronické myeloidní leukemie (CML). Tu způsobuje přesun genů mezi 9. a 22. chromosomem, při němž dojde ke spojení genů *abl* a *bcr* kódujících bílkoviny s tyrosinkinase resp. serin/tyrosinkinaseovou aktivitou. Produktem je tyrosinkinasa, která i bez signálu od růstového faktoru trvale aktivuje bílkoviny regulující buněčný cyklus. Buňka se spojenými geny se pak nekontrolovaně dělí. Imatinib se váže do vazebného místa kiny pro ATP. Přitom inhibuje jen tyrosin kinasu kódovanou *abl-bcr* a dvě další kiny, aktivitu ostatních kinas neovlivňuje.

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

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



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

Inhibitor tyrosin kiny receptoru pro EGF **gefitinib** (Iressa, AstraZeneca) byl povolen pro léčbu pokročilých stadií nádorů plic je povolen v Japonsku a EU, v USA, Kanadě a Švýcarsku je povoleno jen omezené použití, u pacientů s metastázujícími nádory plic s určitými mutacemi *EGFR* genu se ale dokonce stal lékem první volby. Tyrosin kiny EGFR je cílovou strukturou i pro **erlotinib** (Tarceva, původně OSI Pharmaceuticals, nyní Roche) určený pro léčbu nádorů plic a pankreatu (spolu s gemcitabinem).

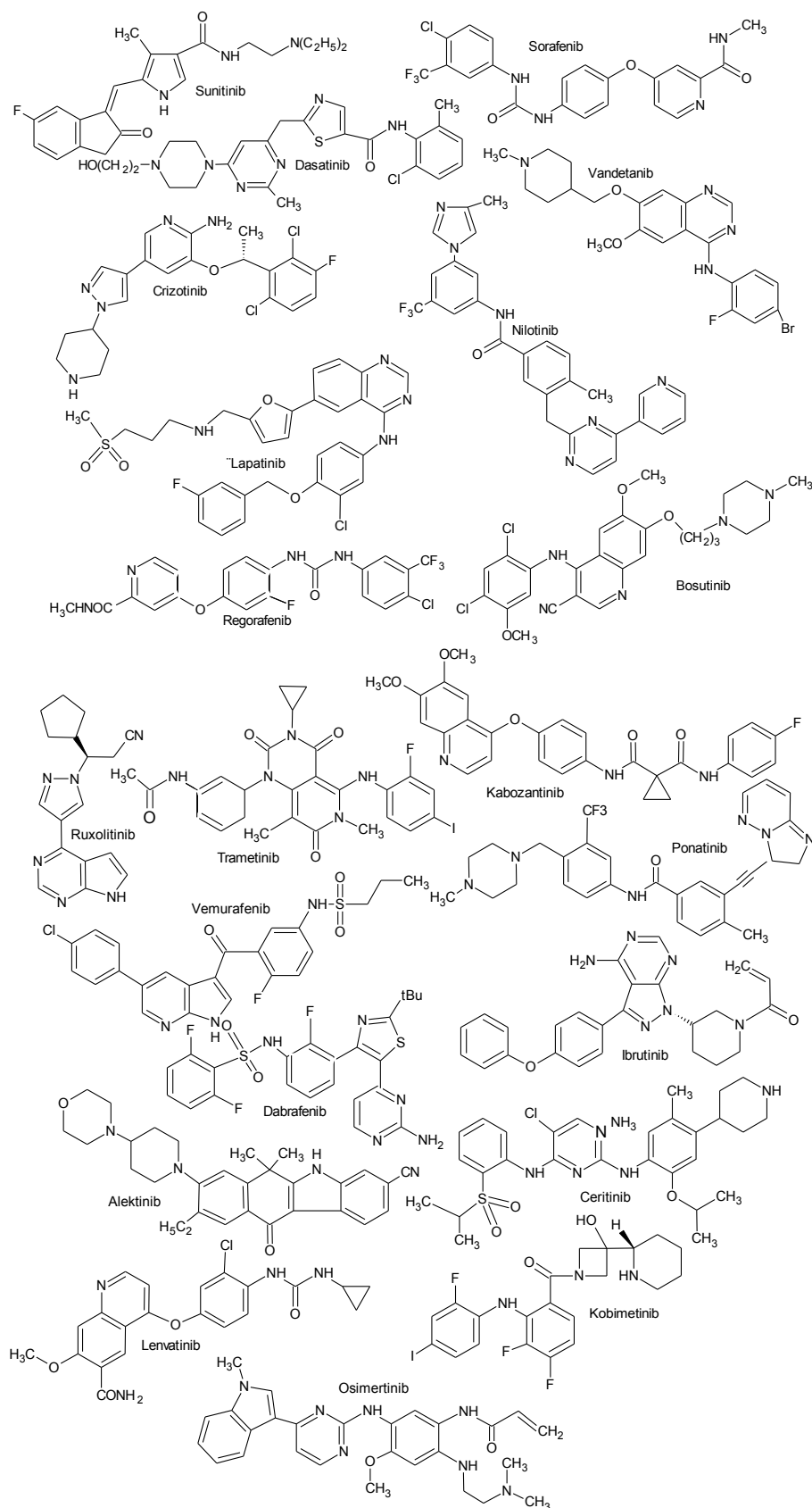
Když došlo k předčasnému úmrtí několika pacientů léčených gefitinibem, začalo být uplatnění inhibitorů tyrosinkinasy receptorů růstových faktorů přísněji posuzováno. Ukázalo se, že ani nová cílená léčiva nejsou tak bezpečná, jak o nich tvrdila reklama. Jejich přínosy ale stále podstatně převyšují rizika. Nežádoucí vedlejší účinky lze často omezit úpravou terapeutického režimu

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

Kinas, které se již staly cílovými strukturami protinádorových léčiv, je zatím asi 20 a další přibývají. Jsou to kinas kódovalé fúzními geny i další kinasy podílející se na nádorové transformaci a růstu nádorů. Před několika lety bylo ve vývoji na 232 pracovištích celkem 608 inhibitorů proteinkinas jako potenciálních protinádorových léků. K prvním třem dříve povoleným inhibitorům přibýly v r. 2006 tři další. **Sunitinib** (Sutent, Pfizer) je určen pro léčbu stromálních nádorů GI traktu, zkoušen je u nádorů ledvin, a to i při adjuvantní terapii po vyoperování nemocné ledviny. **Dasatinib** (Sprycel, Bristol-Myers Squibb) je duální inhibitor, který kromě tyrosinkinasy kódovalé fúzním genem *abl-bcr* inhibuje také kinasu Src. Může být používán jak k léčbě chronické myeloidní leukemie, tak i akutní lymfoblastické leukemie, zkoušen je při léčbě některých sarkomů.

**Sorafenib** (Nexavar, Bayer) inhibuje kinasu receptorů pro VEGF i PDGF a také Raf kinasu (to odráží název), která je aktivována produktem onkogenu *Ras*. Je určen k léčbě nádorů ledvin, jater, štítné žlázy, zkoušen byl nebo je u některých dalších nádorů. **Lapatinib** (Tykerb, Tyverb, GlaxoSmithKline) byl povolen r. 2007 pro léčbu nádorů prsu a plic, zkoušen je u nádorů střev. Je to duální inhibitor, jehož cílovými strukturami jsou tyrosinkinasy spřažené s dvěma typy receptorů pro EGF, mj. receptoru ErbB2 (HER2/neu), který se vyskytuje v nadměrném množství v buňkách nádorů prsu. **Nilotinib** (Tasigna, Novartis), který je určen pro pacienty s chronickou myeloidní leukemií, u nichž se vyvinula rezistence na imatinib, byl povolen rovněž v r. 2007. V r. 2011 byl povolen **krizotinib** (Xalkori, Pfizer) inhibující kinasu ALK (anaplastická lymfomová kinas), která je trvale aktivní u některých nemalobuněčných nádorů plic s fúzním genem *EML4-ALK*. Nově byly schváleny další inhibitory ALK **vandetanib** (Zactima nebo Cyprelsa, AstraZeneca) určený k léčbě nemalobuněčných nádorů plic a nádorů štítné žlázy, **pazopanib hydrochlorid** (Votrient, GlaxoSmithKline) – nádory ledvin a vaječníků, sarkomy měkkých tkání, **axitinib** (Inlyta, Pfizer) – nádory ledvin, zkoušen je pro léčbu nemalobuněčných nádorů plic, **bosutinib** (Bosulif, Pfizer), který inhibuje kinasu abl, a rovněž i kinasu src, která je nadměrně exprimována v leukemických buňkách rezistentních na imatinib. Schválen byl proto pro léčbu pacientů s leukemií, kteří přestali reagovat na dosavadní léčbu (článek o záměně isomerů bosutinibu – viz *Chem. listy* **2014**, *108*(1): 3-6), **regorafenib** (Stivarga, Bayer) blokující mj. Raf kinasu i kinasu receptoru pro neurotrofní faktor (vyvolává vznik podpůrných buněk nervové tkáně), povolen byl nejprve pro léčbu metastázujících nádorů střev a konečníku, nově pro léčbu stromálních nádorů zažívacího traktu (GIST), úspěšně zkoušen je u nádorů jater a sarkomů měkkých tkání. **Vemurafenib** (Zelboraf, Daiichi-Sankyo, Genentech) potlačuje účinek proteinu kódovaného mutovaným onkogenem *BRAF*, povolen byl v USA v r. 2011 a v Evropě v r. 2012 k léčbě pokročilých stadií melanomu, osvědčil se při léčbě metastázujících nádorů štítné žlázy. Jako lék „sirotek“ pro léčbu myelofibrosy, vzácného onemocnění kostní dřene, které může postihovat pacienty s různými typy leukemie, byl v r. 2011 povolen také **ruxolitinib** (Jakafi, Incyte), inhibitor kinas JAK1 a JAK2. Ten byl neúspěšně zkoušen u nádorů pankreatu a střev, pokračuje zkoušení některých kombinací s jinými protinádorovými léky. V závěru roku 2012 byl pro léčbu jednoho typu nádorů štítné žlázy a v r. 2016 k léčbě nádorů ledvin povolen **kabozantinib** (Cometriq, Exelixis a Ipsen), inhibitor kinas spřažené s VEGFR a kinasu MET, zkoušen byl se střídavými výsledky u dalších nádorů: neúspěšně u nádorů prostaty, s dobrým výsledkem u nemalobuněčných nádorů plic. V r. 2012 byl ještě povolen i **ponatinib** (Iclusiq, Ariad) k léčbě chronické myeloidní leukemie způsobené rezistentními mutantami genu *bcr-abl*. Lék ale může zapříčinit některé cévní problémy. V r. 2013 a 2014 byly povoleny léky GlaxoSmithKline **trametinib** (Mekinist), inhibitor kinas MEK a **dabrafenib** (Tafinlar) samostatně a pak i ve vzájemné kombinaci nebo i kombinaci s vemurafenibem pro léčbu metastázujících melanomů u pacientů s mutacemi genu *BRAF* a *MEK*. Dabrafenib je zkoušen i při léčbě nádorů mozku u dětí. V listopadu 2013 byl povolen FDA **ibrutinib** (Imbruvica, Pharmacyclics a Janssen Biotech) pro léčbu jednoho vzácnějšího typu lymfomů a v únoru 2014 pro léčbu chronické lymfolytické leukemie. Ibrutinib inhibuje enzym nazvaný Brutonova tyrosinkinasa (BTK) tím, že se kovalentně váže na cystein poblíž místa pro vazbu ATP. BTK je jedním z enzymů signalizační dráhy ovlivňující růst a množení maligních B-lymfocytů. Inhibitor BTK druhé generace **akalabrutinib** začal být klinicky zkoušen. **Alektinib** (Alecensa, Chugai, Roche) byl povolen v r. 2014 v Japonsku, v USA v prosinci 2015. Je inhibitorem kinas ALK kódované fúzním genem, určen je pro léčbu nemalobuněčných nádorů plic nereagujících na krizotinib. Pro stejnou indikaci je určen **ceritinib** (Zykadia, Novartis) povolený v dubnu 2014. Počátkem roku 2015 byl pro léčbu nádorů štítné žlázy a v r. 2016 pro léčbu pokročilých stadií nádorů ledvin povolen **lenvatinib** (Levima, Eisai), inhibitor kinas spřažených s receptory EGF. **Kobimetinib** (Cotellic, Genentech) byl povolen v USA v listopadu 2015 pro léčbu metastázujících melanomů s určitými mutacemi genu *BRAF*, používá se v kombinaci se vemurafenibem. V listopadu 2015 byl pro léčbu pokročilých nádorů plic rezistentních na dosavadní léčbu povolen ještě **osimertinib** (Tagrisso, AstraZeneca), inhibitor EGFR třetí generace, který interaguje s nežádoucími mutacemi EGFR, ne však s jeho normální formou.

U **cediranibu** (Recentin, AstraZeneca) skončily zkoušky při léčbě nádorů plic a metastázujících nádorů střev neúspěchem, úspěšně ale mají pokračovat zkoušky kombinace s olaparibem při léčbě nádorů vaječníků. Z klinicky zkoušených inhibitorů stojí dále za zmínku **bafetinib**, duální inhibitor blokující kinasu bcr-abl a lyn, který má statut „léku sirotku“ pro léčbu rezistentních leukemií, zkoušen je i u nádorů mozku. Jiným duálním inhibitorem je **neratinib** blokující kinasu receptorů HER2 a EGFR, zkoušený je s dobrými výsledky při léčbě metastázujících nádorů prsu, zejména při potlačování metastáz v mozku, komplikací pro jeho použití ale je, že vyvolává průjmy. Kinasu src blokuje i **sarakatinib**. **Telatinib** inhibující kinasu VEGFR2, PDGFR a KIT receptoru má léčit metastázující nádory žaludku. **Afatinib** (Giotrif) inhibuje mutantní kinasu spřaženou s EGFR, na které nepůsobí erlotinib a gefitinib. Brzdí rozvoj nádorů plic, ale neprodlužuje přežití pacientů, zkouší se u pokročilých nádorů prsu, povolen byl v Německu.



Pro léčbu mastocytomu, nádorového onemocnění psů, byl povolen **toceranib fosfát** (Palladia, Pfizer), inhibitor kinyzy KIT, který spolu s **masitinibem** (Kinavet resp. Masivet, AB Science) s podobnou inhibiční aktivitou patří mezi ojedinělé protinádorové léky určené pro veterinární lékařství, oba jsou ale zkoušeny i v humánní onkologii.

Inhibitor kinyzy VEGFR1-3 je **tivozanib**. Ten byl určen zejména pro léčbu metastázujících nádorů ledvin, nebyl však povolen, protože ve srovnání se sorafenibem neprodlužoval život pacientů. Neúspěšné byly i výsledky jeho klinických zkoušek u

nádorů střev a konečníku, nyní je zkoušen v kombinaci s protilátkou nivolumabem u pokročilých nádorů ledvin. **Brigatinib** představuje novou generaci inhibitorů kinasy ALK, zkoušen je úspěšně u ALK pozitivních nemalobuněčných nádorů plic nereagujících na krizotinib. **Tivantinib**, inhibitor kinasy c-MET, která je v nádorových buňkách trvale aktivní, byl nepříliš úspěšně zkoušen v kombinaci s erlotinibem u nádorů jater, střev a nemalobuněčných nádorů plic, **selumetinib** (AZD6244, AstraZeneca), inhibitor MAPKK1 a MAPKK2, kinas mitogeny aktivované proteinkinasy (nádory vaječníků, překonání u nádorů štítné žlázy, melanom; zkoušky léčby nemalobuněčných nádorů plic nebyly úspěšné) byl povolen jako lék „sirotek“ pro léčbu nádorů štítné žlázy rezistentních k radiojodu. **Icotinib** (první kinasový inhibitor vyvíjený v Číně, blokuje v buňkách nádorů plic kinasu spřaženou s receptorem EGFR podobně jako erlotinib a gefitinib). Z dalších zkoušených tyrosinových kinas nové generace lze zmínit **dakomitinib** (blokuje kinasu spřaženou s EGFR, u nádorů plic je účinnější než erlotinib), **rociletinib** rovněž inhibitor kinasy spřažené s EGFR (firma Clovis v r. 2016 nejprve stáhla žádost o povolení pro léčbu nádorů plic podanou patrně předčasně bez vyhodnocení všech dat a později zcela ukončila další vývoj), **masitinib** (léčba GIST, nádorů trávicího traktu vycházejících z vaziva, které jsou rezistentních na imatinib) a **chizartinib** (quizartinib, léčba akutní myeloidní leukemie). Při léčbě mesotheliomu, nádorového onemocnění plic způsobeného vdechováním asbestových vláken, je zkoušen **defaktinib** inhibující kinasu FAK odpovědnou za vznik nádoru. **Pakritinib** vyvinutý v Singapuru je podobně jako ruxolitinib inhibítorem kinasy Janus, která se účastní přenosu signálu předávaného cytokiny interakcí s jejich receptory. Jeho zkoušky fáze III byly zcela nedávno pozastaveny, když jeden z pacientů zemřel v důsledku nitrolebečního krvácení. Klinické zkoušení naopak nedávno začaly u **larotrekтинibu** (LOXO-101), selektivního inhibitoru kinasy receptoru tropomyosinu (TRK), faktoru stimulujícího vývoj neuronů při embryogenezi. Při dalším vývoji již není gen pro TRK přepisován. Může však fúzovat a přitom se tvorba TRK může obnovit, což pak má za následek vznik některých nádorů.

Pojem cílená terapie je někdy vysvětlován tak, že léčiva této kategorie ovlivňují jen procesy probíhající v nádorových buňkách. I když jsou inhibitory proteinkinas selektivnější než klasická cytostatika, ani ony nejsou prosté vedlejších účinků a vykazují v různé míře orgánovou toxicitu. Časté jsou i cévní problémy. Další nepříjemností je, že jejich účinnost je silně ovlivňována lékovými interakcemi.

U pacientů léčených imatinibem bylo zjištěno, že u 63% pacientů zvyšovaly lékové interakce vedlejší účinky přípravku, u 43% snižovaly jeho účinnost. Pokud je to možné, neměly by být inhibitory proteinkinas předepisovány současně s inhibitory protonové pumpy (léky proti žaludečním vředům), steroidními přípravky, blokátory kalciových kanálů snižujícími krevní tlak, některými antibiotiky a fungicidy.

Velkým problémem je i poměrně rychlý vznik rezistence nádorových buněk na TKI, způsobený tím, že si buňky často nahradí zablokovanou dráhu pro přenos signálů k dělení jinou signalizační dráhou.

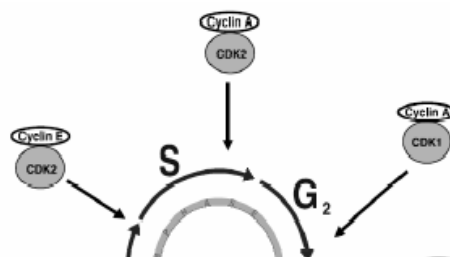
### Inhibitory proteinkinas regulujících buněčné dělení

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

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

U dělících se buněk řídí průběh buněčného cyklu bílkovina nazvané **cykliny**, jejichž koncentrace v buňce se v různých fázích cyklu mění. Cykliny aktivují **cyklindependentní kinas**, které pak fosforylací aktivují další bílkoviny. Cyklindependentních kinas je (podobně jako cyklinů), několik typů. Z devíti známých cdk, se pět účastní regulace buněčného cyklu. Důležité jsou zejména cdk2, cdk4 a cdk6. Kinas cdk2 je aktivována cyklinem E, který je buňkou syntetizován na konci fáze G1. Aktivace zahajuje fázi S, kdy se spolu s genetickým materiálem syntetizuje i cyklin A. Ten pak vytváří s cdk2 komplex zodpovědný za průběh fáze G2. Další cdk se účastní regulace v jiných fázích buněčného cyklu.

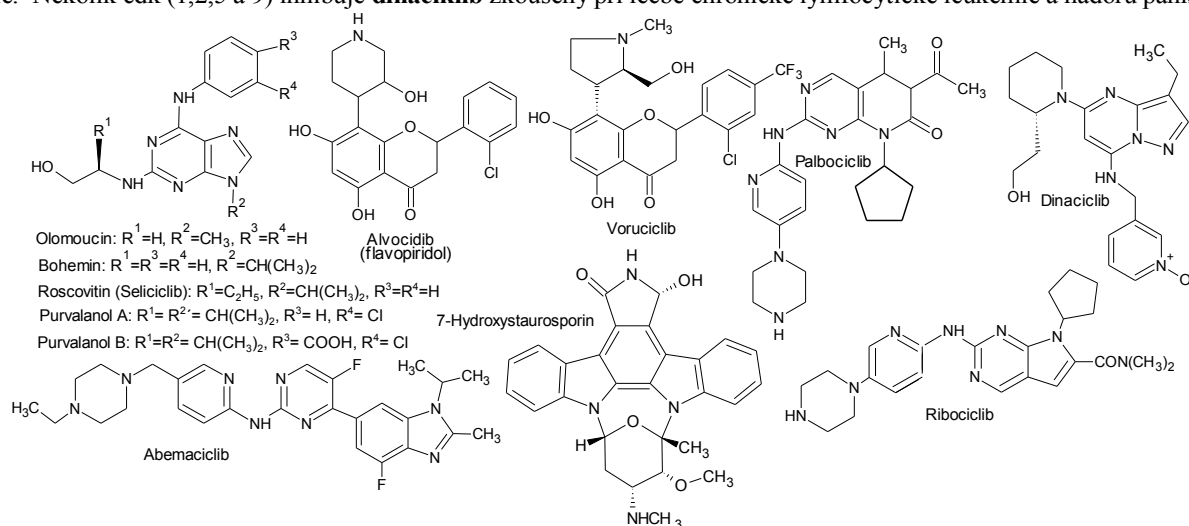
Inhibitorům cdk se před časem dostalo značné publicity v českých médiích, protože na počátku studia jednoho typu inhibitorů s purinovým skeletem stáli vědci z olomoucké filiálky Ústavu experimentální botaniky AV ČR. Ti při studiu analogů rostlinného růstového hormonu 6-benzylaminopurinu zjistili, že některé deriváty purinu růst buněk nestimulují, ale naopak potlačují. Příčinou byla inhibice cdk2. První účinná látka z této skupiny, 6-benzylamino-2-(2-hydroxy-ethyl)-9-methylpurin, byla nazvána **olomoucín**, pak byl připraven jiný purinový inhibitor, **bohemín**. Tyto látky se ale v terapii neuplatnily.





Při dalším studiu purinových inhibitorů cdk2 prováděném olomouckými pracovníky ve spolupráci s jejich francouzskými kolegy z města Roscoffu byl připraven **roskovitin**, později přejmenovaný na **seliciklib** (Cyclacel), který vedle cdk2A i cdk2B inhibuje i cdk7 a 9 je úspěšně klinicky zkoušen při léčbě mnohočetného myelomu, nádorů prsu, plic i některých neoplastických zánětlivých onemocnění (reumatoidní artritida, cystická fibróza). V USA pak byl s využitím postupů kombinatoriální syntézy (viz Farm03) připraven rozsáhlý soubor purinových inhibitorů cdk, z nichž **purvulanol B** měl při pokusech *in vitro* o tři řády vyšší účinnost než olomoucín, o něco méně účinný méně polární **purvulanol A** ale lépe pronikal do buněk.

Kromě purinových derivátů jsou ve vývoji inhibitory cdk2 i dalších cyklindependentních kinas s odlišnou chemickou strukturou. Flavonoid **alvociklib** (předtím nazývaný flavopiridol), látka pocházející z indické léčivé rostliny, nyní ale připravovaná synteticky, inhibuje cdk 1, 2, 4 a 7. Byl prvním inhibitorem cdk, který byl zkoušen na člověku a jako první byl povolen, a to pro léčbu akutní myeloidní leukemie. Zkoušen je ale i v dalších indikacích. Příbuzný flavonoid **voruciklib** je klinicky zkoušen ve fázi I. **7-Hydroxystauroporin** inhibuje cdk1 a 2 i několik dalších proteinkinas. Je to syntetický derivát antibiotika staurosporinu, který sám má protinádorovou účinnost, ale je příliš toxický. 7-Hydroxystauroporin byl zkoušen v kombinaci s cisplatinou při léčbě pokročilých stadií různých nádorových onemocnění. Inhibitorem cdk4 a cdk6 je **palbociklib** (Ibrance, Pfizer), který byl nebo je úspěšně zkoušen v kombinaci s dalšími protinádorovými léčivy u různých typů nádorů. Na základě zkoušek kombinace s letrozolem byl v únoru 2015 povolen jako průlomová terapie pokročilých stadií nádorů prsu s pozitivním nálezem estrogenních a negativním nálezem HER2 receptoru, v únoru 2016 bylo povoleno použití v kombinaci s fulvestrantem. Účinný by měl být i při léčbě akutní myeloidní leukemie (AML). Stejně typy cdk inhibují i **abemaciklib** a **ribociklib**, které jsou zkoušené rovněž u pokročilých stadií nádorů prsu samostatně nebo v kombinaci. **Ribociklib** v kombinaci s letrozolem výrazně prodlužoval dobu do progresu pokročilých stadií nádorů prsu a má být urychleně posouzen, problémem je možnost poškození jater a vznik mírné srdeční arytmie. Několik cdk (1,2,5 a 9) inhibuje **dinaciklib** zkoušený při léčbě chronické lymfocytické leukemie a nádorů pankreatu.

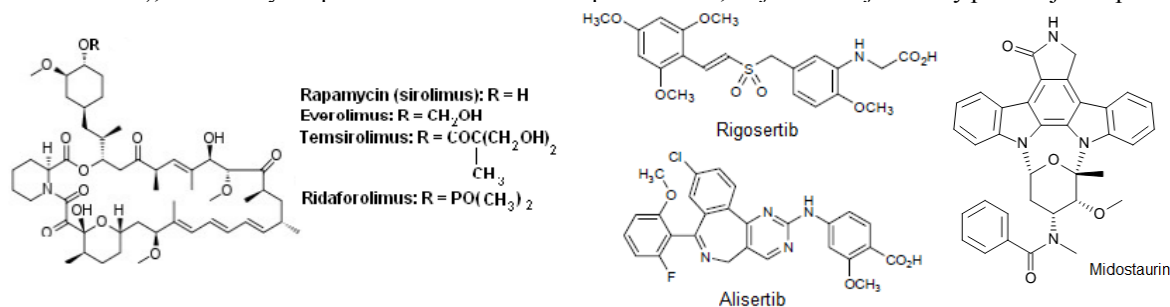


### Inhibitory dalších kinas, které ovlivňují růst nádorových buněk

Regulátorem buněčného cyklu je **kinasa mTOR**. Ta ovlivňuje produkci cyklinu D1 a tím i aktivitu cyklindependentních kinas cdk4 a cdk6. Její role v regulaci buněčného dělení je však širší, protože vedle produkce cyklinu D1 kontroluje i přísun živin do buněk a řídí tvorbu podjednotek faktorů HIF-1 $\alpha$  a HIF-1 $\beta$  vyvolanou nedostatkem kyslíku.

V buňkách normálních prokrvených tkání jsou podjednotky HIF rychle inaktivovány proteinem VHL, který však v některých hypoxických nádorových tkáních chybí. HIF se tam pak kumuluje a stimuluje tvorbu vaskulárního růstového faktoru a dalších

faktorů řídících vznik nových krevních a lymfatických cév. Inhibitory kinasy mTOR proto jednak brzdí buněčné dělení nádorových buněk, jednak mají i antiangiogenní vlastnosti. Zvyšují účinek jiných léčiv i radioterapie, při radioterapii chrání zdravé kmenové buňky. Jejich nevýhodou je určitá kardiotoxicita. Prvním léčivem z této skupiny bylo makrolidové antibiotikum **rapamycin** později přejmenované na **sirolimus** (kinasa mTOR byla nazvána podle toho, že je cílovou strukturou pro rapamycin – mTOR = **mammalian Target Of Rapamycin**). Ten sice byl úspěšně zkoušen i v protinádorové terapii, ale uplatnění našel hlavně při transplantacích jako imunosupresant. V onkologické terapii se spíše používají ethery a estery rapamycinu: **everolimus** (Afinitor, Novartis) schválený v r. 2011 pro léčbu nádorů pankreatu a **temsirolimus** (Torisel, Pierre Fabre/Wyeth), který byl povolen již v r. 2007 pro léčbu pokročilých stadií nádorů ledvin. V 5 onkologických indikacích byl zkoušen **ridaforolimus** (dříve deforolimus, Ariad a Merck), ten však výbor pro nová léčiva FDA nedoporučil s tím, že jeho vedlejší účinky převažují nad přínosy.



**Kinasy Plk** (Polo-like kinase) jsou serin/threoninové kinasy podobající se kinase Polo mušky octomilky, které řídí přechod z fáze buněčného cyklu G2 do mitotické fáze a její průběh.

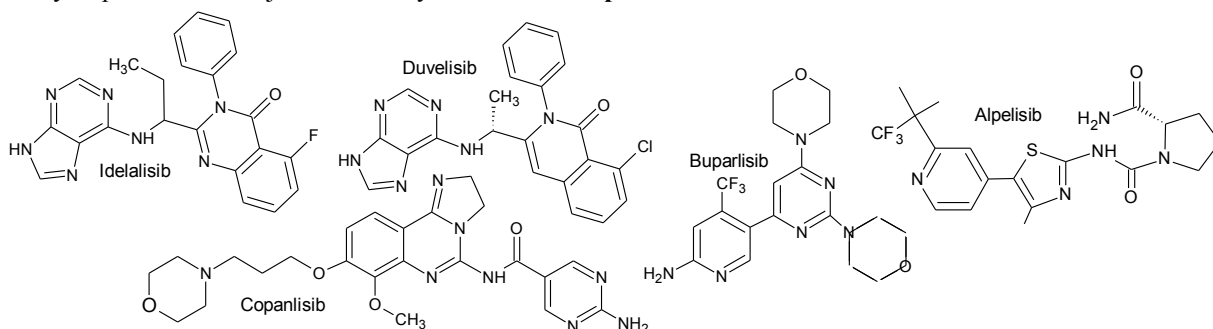
Plk jsou exprimovány v rostoucích a dělících se buňkách embryonálních tkání a nádorů, v buňkách zdravých dospělých tkání nejsou až na výjimky (buňky kostní dřevě, vaječníky, varlata) aktivní. Inhibitorem Plk (a rovněž i fosfatidylinositol 3 kinasy, PI3K) je **rigosertib**, který je úspěšně zkoušen při léčbě nádorů pankreatu (v kombinaci s gemcitabinem) a také myelodysplastického syndromu – poškození buněk kostní dřevě, které se projevuje mimo jiné poruchou tvaru a funkčnosti krvinek, anemií a leukemií. Inhibitorem několika kinas, zejména receptorové kinasy FLT3, je **midostaurin**, polosyntetický derivát staurosporinu, produkovaného *Streptomyces staurosporeus*, který je úspěšně zkoušen při léčbě akutní myeloidní leukemie.

Další kinasou, která reguluje buněčné dělení, je serin/threoninová **Aurora kinasa A (AURKA)**, která řídí oddělení centrosomů při dělení buněk.

Inhibitorem AURKA je **alisertib**, Ten byl zkoušený při léčbě vzácnějšího typu lymfomu po slibné fázi II selhal ve fázi III, pokračuje ale jeho zkoušení u nemalobuněčných nádorů plic a nehodgkinských lymfomů.

Při buněčném růstu, dělení, proliferaci a přežívání buněk mají významnou roli i **fosfoinositid-3-kinasy** (fosfatidylinositol-4,5-difosfát-3-kinasy, PI3K), které jsou klíčovou komponentou buněčné signalizace.

PI3K často mutují, což vede k jejich zvýšené aktivitě. Mutovaná hyperaktivní  $\delta$  isoforma PI3K se vyskytuje v B-lymfocytech při hematologických malignitách – leukemii a lymfomech. Inhibitory kinas PI3K mají v názvu koncovku –lisib. Účinným inhibitorem PI3K  $\delta$  je **idealalisib** (Zydelig, GS-1101, Gilead), který se osvědčil při zkouškách terapie relapsující nebo jiné léčbě odolávající chronické lymfocytické leukemie a některých typů lymfomů, a to jak v monoterapii, tak v kombinaci s bendamustinem nebo rituximabem. V r. 2014 byl pro tyto indikace povolen, po výskytu závažných vedlejších účinků a dokonce úmrtí jednoho pacientů ale FDA a EMA vydaly varování před jeho použitím u dosud jinak neléčených pacientů, v ostatních případech ale jeho přínosy mají převládat nad riziky. Při léčbě lymfomů je zkoušen **kopanlisib**. **Duvelisib** je testován rovněž při léčbě lymfomů a dalších hematologických maligních onemocnění a navíc zkoušen i při léčbě astmatu a reumatoidní artritidy, jeho přínosy ale jsou považovány za sporné. **Buparlisib** je na rozdíl od předchozích inhibitorů určen pro léčbu pokročilých stadií nádorů prsu, při nichž je zkoušen v kombinacích s různými dalšími léky. V podobné indikaci je zkoušen nový inhibitor PI3K **alpelisib**.



Z dalších typů inhibitorů lze zmínit **iminib**, inhibitor kinasy LIM, enzymu, který reguluje dynamiku buněčného skeletu tím, že brzdí depolymeraci aktinových vláken a naopak katalyzuje depolymeraci mikrotubulů. Měl by být účinný i u nádorů rezistentních na účinek standardních chemoterapeutik.

## Inhibitory prenylace

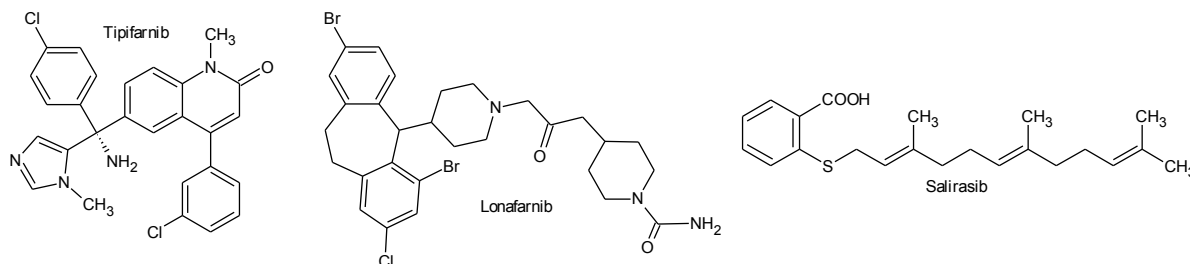
Řada bílkovin regulujících buněčný růst, diferenciaci a dělení obsahuje v aktivním stavu GTP, neaktivní forma GDP. Při regulaci buněčného dělení hrají významnou roli tři protoonkogeny *ras*. Produkty jejich transkripce, proteiny *ras*, jsou malé enzymy hydrolyzující GTP. Působí tak jako spínače mezi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

Protein *ras* sám jako takový není aktivní. Není však aktivován fosforylací jako jiné bílkoviny signalizační kaskády, ale prenylací, navázáním nenasyceného alifatického řetězce s isoprenoidní strukturou. Může jít buď o farnesylyaci, kdy se na protein *ras* navazuje řetězec  $C_{15}$  nebo geranylyaci, kdy se váží řetězce  $C_{20}$  tvořené 4 isoprenoidními jednotkami. Prenylace umožňuje zakotvení proteinu *ras* v buněčné membráně, což je podmínkou jeho účinnosti.

**Inhibitory farnesyltransferasy** blokují aktivaci proteinů *ras*, a to jak produktů exprese nativního genu *ras*, tak i mutovaných forem a tím brání přenosu signálu pro buněčnou proliferaci. Nezávisle na mutacích genů *ras* mohou tyto inhibitory zvyšovat náchylnost nádorových buněk k buněčné smrti, apoptóze, tím, že ovlivňují tvorbu důležité proapoptotické bílkoviny, „receptoru smrti“ DR5 (death receptor 5).

Farnesyltransferasu inhibují některá léčiva používaná v terapii jiných onemocnění, např. lovastatin, látka sloužící ke snižování hladiny cholesterolu, nesteroidní protizánětlivé léčivo sulindak sulfid a některé přírodní látky, jako je limonen. Cíleně pro léčbu rakoviny bylo připraveno několik účinných selektivních syntetických inhibitorů, které se zkoušejí.

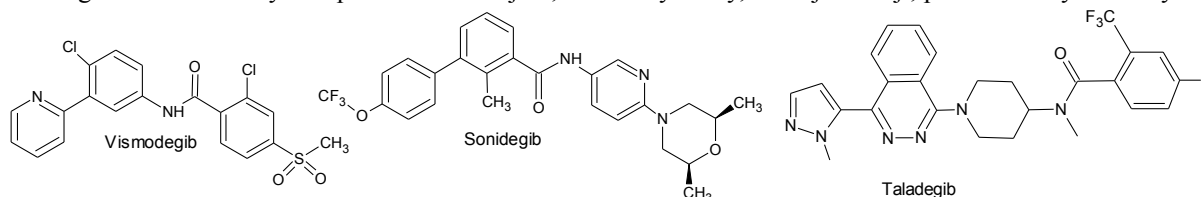
Nejdále (fáze III) pokročilo zkoušení **tipifarnibu** (Zarnestra, Johnson & Johnson), který se osvědčil při léčbě mnohočetného myelomu. Zkoušení **lonafarnibu** (Sarasar, Schering-Plough) při léčbě nemalobuněčných nádorů plic bylo zastaveno, avšak klinické zkoušky fáze III při léčbě jiných nádorů a leukemie pokračují. Nejméně 3 další inhibitory jsou v preklinické nebo první fázi zkoušek. Účinek onkogenů *ras* blokuje také nově zkoušený inhibitor **salirasib**, farnesylderivát thiosalicylové kyseliny, ten však působí jiným mechanismem než zábranou prenylace – vypuzením proteinu *ras* ze zakotvení v buněčné membráně, čímž je zabráněno předávání signálů k dělení buňky *ras* dráhou.



## Ovlivnění signalizační kaskády „ježek“

Lipoproteiny kódované geny **hedgehog** (*hh*, česky ježek, nazvány byly podle abnormálního vzhledu larvy mušky octomilky s mutovaným genem) jsou odpovědné za diferenciaci tkání v rostoucím embryu obratlovců i bezobratlých.

Působí tak, že se váží na receptor spřažený s G-proteinem nazvaný Patched (Ptch, česky záplatovaný), který blokuje jiný transmembránový protein Smoothened (Smo, česky vyhlazený). Navázáním agonisty na Ptch je Smo odblokován a může tedy v buňce nastartovat biochemické reakce **signalizační dráhy hedgehog**. Signály přenesené do buněčného jádra pak určují, které geny mají být transkribovány a tím řídí vývoj embrya. Signalizace *hh* má ale velký význam i pro dospělý organismus, kde řídí proliferaci kmenových buněk různých tkání. Přitom může jít o normální procesy v organismu, jako je aktivace vlasových kořínků, ale i o transformaci kmenových buněk na nádorové. Mutace vedoucí ke ztrátě funkčnosti Ptch nebo trvalé aktivaci Smo se mohou podílet na vývoji různých nádorů, zejména basaliomu, kožního nádoru vycházejícího z bazálních buněk pokožky. Vzhledem k významu signalizační kaskády *hh* i pro nádorové bujení, mohou být látky, které ji blokují, protinádorovými léčivy.



Prvním léčivem této skupiny je **vismodegib** (Erivedge, Genentech), který byl povolen v r. 2012 v USA a v r. 2013 v EU k léčbě metastázujícího nebo relapsujícího basaliomu (typ kožního nádoru), který nelze chirurgicky odstranit a v r. 2015 pro léčbu medulloblastomu, nádoru mozku postihujícího děti. Zkoušen je ještě při celé řadě dalších onkologických indikací, jako jsou metastázující nádory střev a konečníku, pokročilé nádory žaludku a další, slibné jsou výsledky u nádorů pankreatu. V r.

2015 byl povolen pro léčbu basaliomu další lék, **sonidegib** (Odomzo, Novartis). I ten je dále zkoušen, mj. rovněž u nádorů mozku. V r. 2016 bylo zahájeno klinické zkoušení nového inhibitoru signální dráhy hh **taladegibu** při léčbě nádorů prsu, naproti tomu byl po fázi II neúspěšného zkoušení při léčbě chondrosarkomu ukončen vývoj jiného inhibitoru Smo, **saridegibu**, polosyntetického derivátu alkaloidu cyklopaminu s poměrně složitou strukturou..

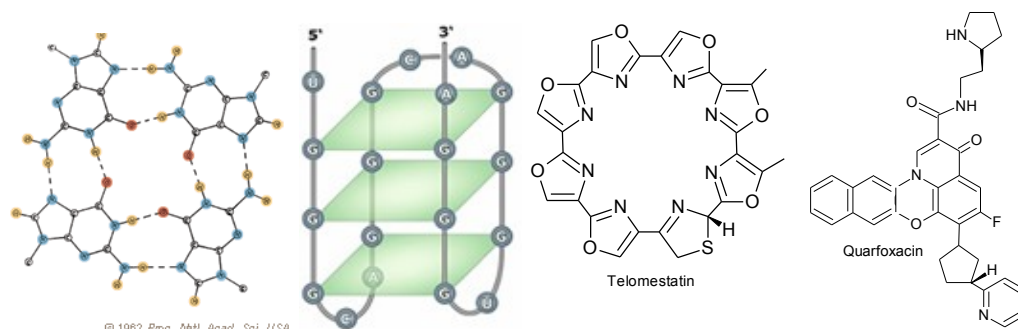
## Inhibitory telomerasy

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

Telomery obsahují opakující se hexanukleotidovou sekvenci TTAGGG tvořenou (u člověka) 8-14 tisíci páry nukleotidů, s jednořetězcovým prodloužením „G-převísem“ poskládaným do zvláštních struktur zvaných G-kvadruplexy tvořených čtyřmi molekulami guaninu propojených vodíkovými můstky. Koncovou strukturu telomeru si lze představit jako skelet několikapatrového domu, kde podlahy tvoří propojené molekuly guaninu. Ten spolu s 6 bílkovinami vytváří ochranný komplex, shelterin, potřebný pro stabilitu genomu. Při buněčném dělení ztrácí chromosomy určitou část telomerů, v normálních buňkách to je 100 - 150 párů bází za rok. Zkrácení telomerů na kritickou hodnotu dává signál k zastavení dalšího buněčného dělení zestárlé buňky.

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

V normálních tkáňových buňkách dospělého organismu není telomerasa aktivní, její aktivita však byla prokázána až u 86% nádorových buněk. Aktivita telomerasy, která je kontrolována shelterinem, je důležitá pro nádorovou transformaci, kdy buňky získávají schopnost neomezeného dělení. Aby telomerasa mohla zajistit prodloužení, musí být koncová DNA telomeru lineární a neposkládaná. Podmínkou jejího účinku proto je rozvolnění kvadruplexů. Protein shelterin G-kvadruplexy stabilizuje. Tím vyřazuje telomerasu z činnosti a omezuje dělení buňky. Blokování telomerasové aktivity, ať již přímou interakcí s enzymem nebo stabilizací kvadruplexů, bylo považováno za jednu z perspektivních možností protinádorové terapie, nebylo ale jednoznačně prokázáno, že tak lze skutečně zastavit růst a dělení nádorových buněk. Stabilizátory kvadrupletů by se kromě toho potenciálně mohly uplatnit i při řízení exprese některých genů a možná i při léčení některých dědičných nemocí způsobených chromozomálními aberacemi. Americký nositel Nobelovy ceny s českými předky T.T. Cech zjistil, že některé kovové ionty mohou kvadruplexy stabilizovat, jiný tým zjistil, že kvadruplexy stabilizuje i 2,6-diaminoantrachinon. Hledány proto byly další sloučeniny s podobným účinkem. Pomocí počítačového modelování interakcí různých látek s kvadruplexy bylo zjištěno, že kromě aminoantrachinonů mohou mít stabilizační účinek i některé porfyriny, deriváty perylenu, cyaninová barviva a některé další látky s planární strukturou, které se překvapivě váží vně, nikoliv mezi kvadruplexy. Zajímavým stabilizátorem je **telomestatin**, přirozená látka produkovaná jedním kmenem streptomycet i jeho syntetická analoga, u nichž více oxazolových kruhů nahrazeno thiazolovými (produkt je stálejší). Žádný ze zkoušených stabilizátorů nebyl vhodný pro další vývoj. Na zjištění, že telomerasu inhibují v důsledku interakce s G-kvadruplexy fluorované chinolony navázal vývoj protinádorového léčiva **kvarfloxinu** (také itarnafloxin, kódové označení CX-3543, Cyclene Pharmaceuticals), které je zkoušeno ve fázi II u neuroendokrinních karcinomů. Kvarfloxin sice ovlivňuje stabilitu G-kvadruplexů a jejich komplexů s bílkovinami, ale jeho protinádorový účinek je připisován spíše blokování biosyntézy ribosomů než inhibici účinku telomerasy.



Rozvolnění koncových struktur telomerů katalyzuje enzym nazvaný tankyrasa 1 patřící do rodiny poly(ADP-ribose)polymeras (PARP – viz dále). Tankyrasa 1 interaguje s TRF1, jednou ze složek shelterinu. Její inhibice zastavuje buněčný cyklus, inhibitory tankyrasy by proto mohly být další skupinou protinádorových léčiv.

Odlíšným mechanismem inhibuje telomerasu **AS1411** (Antisoma), na guanin bohatý oligonukleotid s 26 bázemi, který sám vytváří kvadruplexy. Byl náhodně objeven při studiu oligonukleotidů vytvářejících strukturu trojitě spirály. Výsledky prvních klinických zkoušek AS1411 na malém souboru pacientů s nádory ledvin (fáze I) byly ale rozporné: AS1411 nevykazoval žádnou přílišnou toxicitu, u jednoho pacienta došlo ke kompletní a u druhého k téměř úplné remisi, u 5 pacientů se stav nezměnil, u 2 zhoršil. Nadějnější výsledky přinášely první zkoušky **imetelstatu** (v r. 2010 byla zahájena fáze II klinického zkoušení při léčbě myelofibrózy, nádorového onemoc-

nění kostní dřeně), oligonukleotidu s 13 bázemi, modifikovanou cukernou složkou (3'-amino-3'-deoxyribosa) propojené thiofosfátovými skupinami a 3-palmitoylamido-2-hydroxypropylester koncového thiofátu. Díky přítomnosti vyšší mastné kyseliny může imetelstat překonávat hematoencefalickou bariéru a být tak využit i k léčbě zhoubných nádorů mozku. Imetelstat narušoval funkce jater a v r. 2014 byly na žádost FDA jeho klinické zkoušky přerušeny, ještě v téže roce ale byly obnoveny.

### Induktory apoptózy a látky narušující reparační mechanismy buňky

Pro správnou funkci organismu je důležitý nejen růst a dělení buněk, ale i jejich zánik. K tomu dochází jednak při poškození buňky různými vnějšími fyzikálními i chemickými faktory, jednak při předem naprogramované likvidaci nepotřebných buněk nebo buněk, u nichž došlo k určitým změnám nezaručujícím správnou funkci. V prvním případě jde o **nekrózu**, ve druhém o **apoptózu** (z řečtiny, *apo-* = od a *ptein* = padat), programovanou buněčnou smrt. Oba procesy se liší mj. v tom, že při nekróze zůstává buněčné jádro s DNA určitou dobu intaktní, zatímco proces apoptických změn na úrovni DNA začíná. Mechanismy apoptózy jsou poměrně složité a podílí se na nich celá řada enzymových reakcí. Signály k apoptóze dostává buňka ze svého vnitřního prostředí, mohou však přicházet i zvenčí. Signály k apoptóze vyvolané různými podněty se mohou v buňce spojit do jedné signální dráhy.

Jedním ze signálů k apoptóze je zkrácení telomerů na kritickou délku. Jiným je poškození DNA. Přitom je aktivován protein p53 kódovaný tumorsupresorovým genem *p53*. Protein p53 tak vlastně chrání buňku před nežádoucími dědičnými změnami genomu. Vyvolávat apoptózu může i aktivace dalších produktů tumorsupresorových genů nebo různé signální molekuly z vnějšího prostředí. Přitom hrají důležitou úlohu tzv. **receptory smrti** na povrchu buněk. Při interakcích cytokinů nebo jiných ligandů s těmito receptory dochází v cytoplasmě ke vzniku enzymového komplexu DISC indukujícího apoptózu. Cytoplasmatická část aktivovaného receptoru přitom aktivuje caspasu 8 (v české literatuře se píše o kaspasách, jde však o zkratku výrazu cysteinyl-**asp**artát specifická proteasa, takže správně by se název měl psát a vyslovovat s **c**), která pak aktivuje další enzymy apoptické dráhy. Existují i jiné mechanismy buněčné smrti nezávislé na aktivaci caspas. Apoptotické procesy lze zpočátku zastavit, po určité fázi se však stávají nevratnými. Produkty onkogenů mohou kroky vedoucí k apoptóze zablokovat.

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

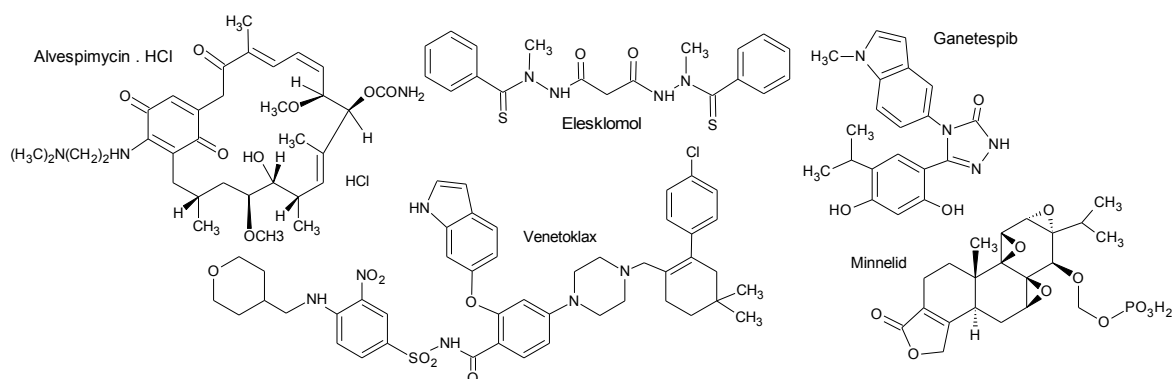
Faktor nekrózy nádorů indukuje apoptózu jako agonista „receptoru smrti“. Jinými agonisty jsou s TNF příbuzný TRAIL (TNF Related Apoptosis Inducing Ligand) i další cytokiny. Umělým agonistou receptorů je monoklonální protilátka **mapatumumab** (TRAIL-R1 Mab, Cambridge Antibody), která postoupila do fáze II klinických zkoušek při léčbě nádorů konečníku a střev, lymfomů a některých dalších nádorů. Ve fázi I klinických zkoušek je rekombinantní **TRAIL AMG-951** (Amgen). Indukce apoptózy funkcemi tumorsupresorovými geny nebo ligandy receptorů smrti je také cílem některých zkoušených přípravků pro genovou terapii (viz Farm 12). Dalším induktorem apoptózy je mitochondriální protein SMAC (Second Mitochondria-derived Activator of Caspase), který je uvolňován při působení proapoptických stimulů do buňky. SMAC je antagonistou některých inhibitorů apoptických proteinů IAP a vyvolává jejich degradaci v proteasomech. V protinádorové terapii se ale sám nepoužívá, vyvinuta však byla některá nízkomolekulární „SMAC-mimetika“, jako jsou **TL32711**, **LCL161**, **GDC-0917** nebo **HGS1029** s podobným antagonistickým účinkem na inhibitory apoptických proteinů, která začínají být klinicky zkoušena.

Kromě SMAC-mimetik mohou apoptotické procesy nastartovat i různá další nízkomolekulární léčiva, jejichž klinické zkoušení pokročilo dále.

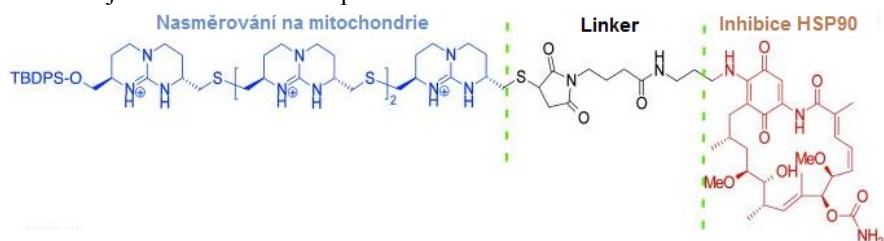
Indukce apoptózy je patrně hlavní příčinou protinádorového účinku oxidu arsenitého, u některých cytostatik (např. paklitaxelu), u antagonistů pohlavních hormonů a kortikoidů je užitečným doprovodným účinkem. Z různých nízkomolekulárních léčiv určených pro jiné oblasti terapie mohou apoptózu indukovat např. i sildenafil (Viagra) nebo kanabinoidy z marihuany.

Za induktory apoptózy lze považovat i benzochinonové antibiotikum geldenamycin a jeho deriváty s lepšími farmakologickými vlastnostmi **tanespimycin** a zejména **alvespimycin** (17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldenamycin) který je ve fázi II klinického zkoušení. Tyto látky indukují degradaci některých proteinů kódovaných mutovanými geny, mimo jiné i mutovaného proteinu p53 (gen *p53* je tumorsupresorový gen, bílkovinné transkripty jeho mutované formy mají pozměněnou konformaci a působí onkogenně). Účinek je zprostředkovan vazbou benzochinonových derivátů na protein tepelného šoku Hsp90, který má významnou roli v procesech buněčného dělení, buněčné transformace, apoptózy a angiogeneze. Inhibitory Hsp90 jsou i **ganetespi**b zkoušený při léčbě nemalobuněčných nádorů plic a mesotheliomu, nádoru vyvolaného vdechováním vláken asbestu a **luminespi**b (AU922), který by podle preklinických zkoušek mohl být využit k léčbě nádorů pankreatu. Jiný induktor, **elesklomol**, vyvolává apoptózu prostřednictvím jiného proteinu tepelného šoku Hsp70 a oxidativního stresu. Jeho první klinické zkoušky skončily neúspěchem, pozdější výsledky ale naznačují, že by se mohl uplatnit při léčbě metastazujícího melanomu. V září 2013 byly zahájeny klinické zkoušky inhibitoru Hsp70, **minnelidu**, ve vodě rozpustného derivátu triptolidu, látky izolované z čínské rostliny *Tripterygium wilfordii*.

**Venetoklax** (Venclexta, AbbVie, Roche) byl v r. 2016 povolen FDA i EMA pro léčbu chronické lymfocytické leukemie u pacientů s delecí na chromosomu 17, kteří nereagovali na předchozí jinou léčbu, zkoušen je u dalších hematologických malignit. Venetoklax inhibuje protein Bcl-2 (**B** cell lymphoma – 2), který má klíčovou roli pro přežívání buněk a je spojován se vznikem rezistence u některých leukemií a lymfomů. Předpokládá se, že zablokování Bcl-2 obnovuje v nádorových buňkách apoptické procesy.



Zajímavými cílenými léčivy by mohly být **gamitribiny** vyvinuté v r. 2009. Ty inhibují protein tepelného šoku 90 (Hsp90), který sice sám nemá kinasovou aktivitu, ale mimo jiné stabilizuje receptory pro růstové faktory a různé kinasy účastníci se přenosu signálů k buněčnému růstu a dělení, jako jsou kinasy PI3K a AKT. Inhibice Hsp90 také poškozuje mitochondrie nádorových buněk. Gamitribiny jsou zajímavé tím, že tvoří dvě různě vzájemně propojené interagující části. Kromě části molekuly inhibující Hsp90, která je stejná, obsahují gamitribiny část interagující s mitochondriemi navázanou přes spojovací řetězec. Ta se u zkoušených gamitribinů liší. Bez ohledu na rozdíly v její struktuře dochází při interakci gamitribinů ke ztrátě potenciálu membrány mitochondrií nádorových buněk, což vede ke změně její permeability a k buněčným procesům, které v konečném důsledku vyvolávají apoptózu. Pokud by molekula interagující s mitochondriemi nebyla propojena s inhibitorem Hsp90, pak by se tento efekt neprojevil. Jelikož mitochondrie normálních buněk Hsp90 neobsahují, neměly by gamitribiny poškozovat nenádorové buňky, takže by měly být vysoce selektivní. Jejich studium je ale zatím na samém počátku

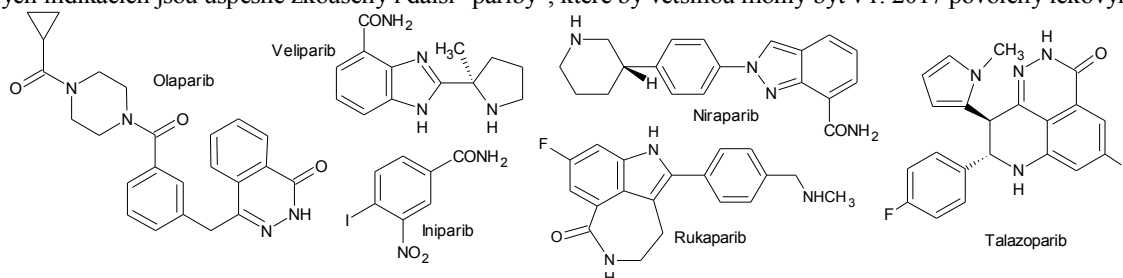


**Gamitribin G4** (podle B.H.Kang *et al.*, Combinatorial drug design targeting multiple cancer signaling networks controlled by mitochondrial Hsp90. *J Clin Invest.* **2009**; 119(3): 454–464.

## Zásahy do mechanismu opravy DNA

DNA je v organismu neustále poškozována mutacemi. K zajištění integrity genomu a přežívání buněk disponuje buňka několika reparačními mechanismy, které se navzájem doplňují. Dojde-li k poškození jednoho řetězce opraví DNA **poly(adenosindifosforiboso)polymerasa (PARP)** vystřížením nesprávné báze. Je-li PARP inhibována kumulují se zlomy jednoho řetězce DNA, což při replikaci vede ke vzniku zlomů dvouřetězových. Ty normálně pomáhají opravit produkty exprese tumorsupresorových genů *BRCA1* a *BRCA2*. Jsou-li však tyto tumorsupresorové geny poškozeny mutací – což je případ řady buněk nádorů prsu, vaječníků a některých dalších – dochází při inhibici PARP k neopravitelnému poškození DNA, které vyvolá procesy buněčné smrti. V posledních letech jsou proto inhibitory PARP intenzivně studovány.

Inhibitory PARP **olaparib**, **iniparib**, **niraparib**, **rukaparib**, **veliparib** nebo **talazoparib** (BMN 673) vyvolávají „syntetickou letalitu“ – selektivně usmrcují nádorové buňky s poškozenými geny *BRCA1* a *BRCA2*. Poškozené geny mohou být děděny. Iniparib s jednoduchou chemickou strukturou (4-jod-3-nitrobenzamid) po slibných výsledcích fáze II klinických zkoušek selhal ve fázi III, když neprodlužoval ani dobu přežití pacientek, ani dobu do progresu metastázujících nádorů prsu. Pokračují však jeho zkoušky u nemalobuněčných nádorů plic. Jednoduchou strukturu má i veliparib, který byl úspěšně zkoušen (fáze II) u metastázujících nádorů plic v kombinaci s temozolomidem. Nejdále pokročily zkoušky olaparibu (Lynparza, AstraZeneca), který byl v závěru roku 2014 povolen pro léčbu pokročilých nádorů vaječníků, zkoušen je u metastázujících nádorů prsu a prostaty. V podobných indikacích jsou úspěšně zkoušeny i další „pariby“, které by většinou mohly být v r. 2017 povoleny lékovými úřady.



## Inhibitory proteasomu

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

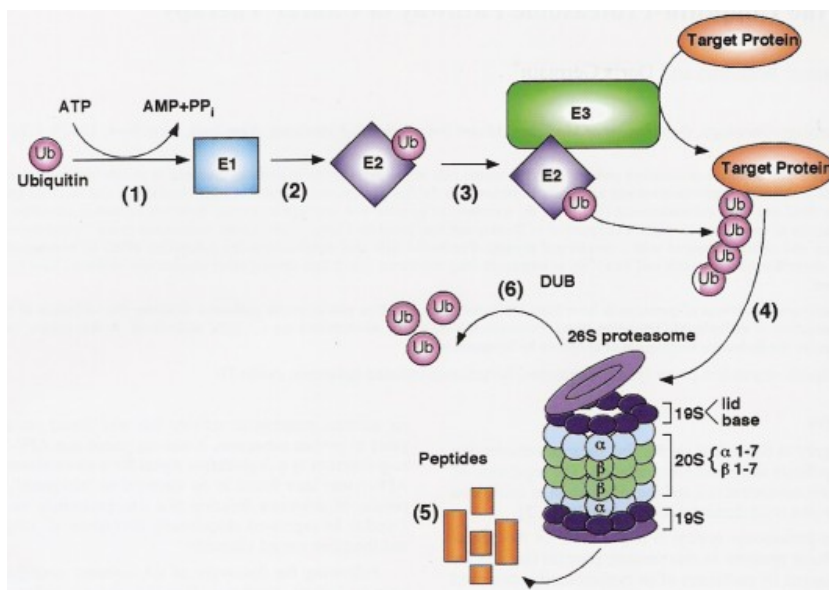
Většina bílkovin je v buňkách pravidelně obměňována za nové, a to i v buňkách, které se už nedělí, jako jsou nervové buňky. Průměrná životnost buněčných bílkovin je několik dní, některé však mají biologický poločas pouhých několik desítek minut, jiné naopak několik týdnů. Kromě bílkovin, které splnily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

K likvidaci zbytečných, poškozených nebo cizorodých bílkovin slouží proteasomy.

Proteasomy jsou buněčné struktury obsahující několik proteolytických enzymů, které postupně rozloží bílkoviny až na peptidy, které pak štěpí aminopeptidasa na aminokyseliny. Ty pak buňka využije ke stavbě nových bílkovin. V každé buňce vyšších organismů je až 30.000 proteasomů, které se účastní recyklace bílkovin. Velký význam mají proteasomy pro likvidaci proteinkinás, které již splnily svoji úlohu v buněčné signalizaci a řízení procesů dělení buněk. Proteasomy přitom fungují jako jakési biologické hodiny, které určují časový průběh koncentrace důležitých enzymů. Tím vlastně řídí jednotlivé fáze buněčného cyklu.

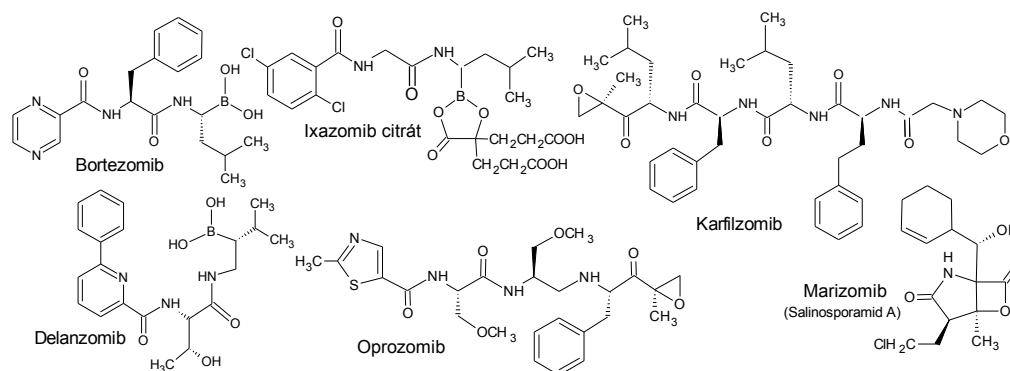
Aby proteasomy poznaly, co mají rozštěpit, musí být nepotřebná nebo poškozená bílkovina označena. K označení slouží navázání několika molekul polypeptidu **ubikvitinu**, který obsahuje 76 aminokyselin. Ubikvitinace je tak pro bílkoviny „polibkem smrti“. Je katalyzována třemi enzymy, které vlastně zprostředkovaně řídí chod buňky a jak se později ukázalo, mohou se podílet na nádorové transformaci.

Při označování bílkovin určených k degradaci proteasomem je nejprve na molekulu ubikvitinu z ATP navázán adenosinmonofosfát. Reakce je katalyzována ubikvitin aktivujícím enzymem, který je označován symbolem E1. Adenylovaný ubikvitin je pak ubikvitin konjugujícím enzymem (E2) navázán na další molekulu adenylovaného ubikvitinu, což se může několikrát opakovat. Nakonec je několik spojených molekul ubikvitinu (nejméně 4) navázáno na cílovou bílkovinu jedním z enzymů rozsáhlé rodiny substrátově specifických ubikvitin ligas (E3), který umí rozpoznat bílkovinu určenou k likvidaci. Označená bílkovina je pak transportována ubikvitin receptorovým proteinem k proteasomu, jehož „víko“ rozpozná receptor a vpustí bílkovinu, která má být degradována dovnitř proteasomu, kde dojde k proteolýze.



Některé látky mohou ubikvitinaci nebo konečnou činnost proteasomu selektivně inhibovat, aniž by interagovaly s ostatními buněčnými strukturami. Inhibice zastavuje recyklaci bílkovin a tím i buněčné dělení a vnáší do buňky chaos, který může vést k buněčné smrti, apoptóze. Inhibitory proteasomu proto mají protinádorový účinek. Chemicky to jsou analoga oligopeptidů, která mají koncový karboxyl nahrazen zbytkem kyseliny borité nebo ketoepoxidickým seskupením.

Jako první inhibitor proteasomu se do protinádorové terapie dostal **bortezomib** (Velcade, Millenium a Janssen-Cilag), který byl schválen jako lék pro léčbu mnohočetného myelomu. V brzké době by však jeho indikace mohly být rozšířeny na další nádorová i jiná onemocnění. Bortezomib je aplikován injekčně, jiný boronát **ixazomib citrát** (Ninlaro, Takeda) povolený v listopadu 2015 rovněž pro léčbu mnohočetného myelomu (v kombinaci s lenalidomidem a dexamethazonem) může být podáván orálně. Jde o profarmakum, které přechází na účinný ixazomib (MLN2238). Pro stejnou indikaci je určen další orální boronátový analog **delanzomib** (CEP-18770, Teva), který je ve stadiu klinických zkoušek.



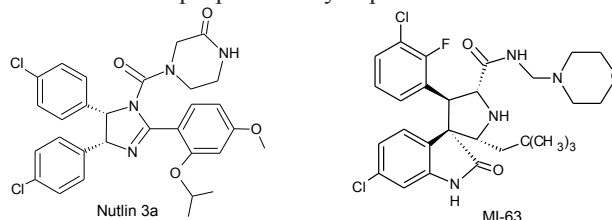
**Karfilzomib** (Kyprolis, PR-171, Amgen) podávaný v infuzi byl povolen v r. 2015, a to opět pro kombinovanou terapii mnohočetného myelomu. Je to inhibitor proteasomu 2. generace, který v molekule nemá boronátovou skupinu, ale oxiranový kruh v sousedství ketoskupiny. Zkoušen je další ketoepoxidický inhibitor **oprozomib** (ONX 0912, dříve PR-047), jehož předností by měla být možnost orálního podání. Odlišnou strukturu má přirozený inhibitor proteasomu **marizomib (salinosporamid A)** se čtyřčlenným  $\beta$ -laktonovým kruhem a chlorem v postranním řetězci, který je produkován bakteriemi *Salinispora tropica* získanými z mořských usazenin. Marizomib je klinicky zkoušen při léčbě mnohočetného myelomu, působí ale i na jiné nádory.

Při recyklaci bílkovin je třeba, aby peptidy produkované proteasomem byly dále rozštěpeny aminopeptidasou na aminokyseliny. Jestliže se tomu zabrání inhibiční aminopeptidasy, nedostávají se buňce stavební kameny pro biosyntézu nových bílkovin, buňka nemůže růst a dělit se.

Inhibitory aminopeptidasy proto jsou potenciálními protinádorovými léčivy stejně jako inhibitory proteasomu. Z nich byl zkoušen jako **tosedostat**, po smrti jednoho pacienta ale byly zkoušky v r. 2013 zastaveny. Tosedostat, hydroxamová kyselina charakteru dipeptidu esterifikovaného cyklopentanolem, je profarmakem, jehož esterová skupina enzymům krevní plasmy odolává, ale po proniknutí do buněk je hydrolyzována karboxyesterasami.

Jednou ze specifických ubikvitinligas je protein MDM2, jehož substrátem je tumorsupresor p53. Tím, že jej označuje ubikvitinylací, dává signál k jeho degradaci v proteasomu. Tumorsupresor pak nemůže plnit svoji roli. V nádorových buňkách je koncentrace MDM2 zvýšena. Zabránění interakce mezi MDM2 a p53 stabilizuje tumorsupresor a může indukovat apoptosu nádorových buněk.

Látkami, které mohou interakci MDM2 s p53 zablokovat, jsou **nutliny**, deriváty *cis*-imidazolinu nebo podobný derivát pyrrolidinu **MI-63** (Ascenta). Zahájeny byly klinické zkoušky nutlinu 3a u některých hematologických maligních onemocnění, MI-63 zatím prokazoval protinádorovou účinnost při preklinických pokusech.

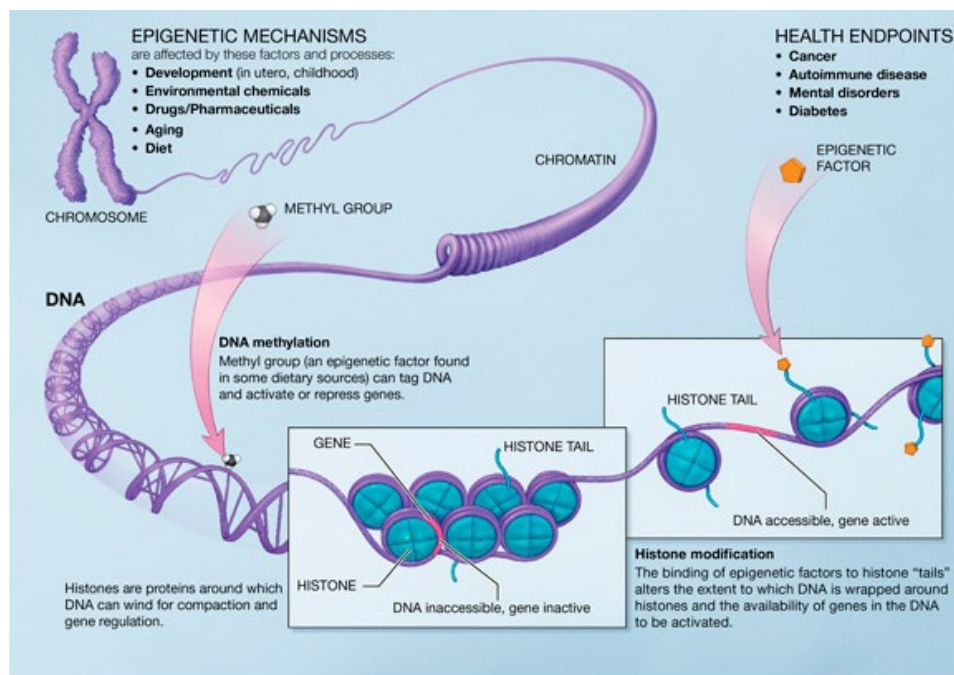


## Možnosti ovlivnění epigenetických změn podílejících se na regulaci exprese genů

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

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

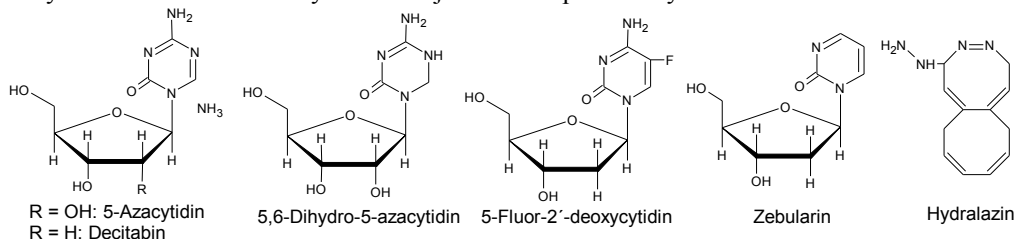




Source: National Institute of Health

V nádorových buňkách je vyšší zastoupení 5-methylcytosinu v DNA než v normální tkáni a naopak stupeň acetylce histonů v chromatinu nádorových buněk je nižší. DNA je methylována DNA-methyltransferasami. Inhibice DNA-methyltransferas může methyloci DNA zvrátit, inhibitory proto mohou být využity k léčbě onemocnění způsobených umlčením tumorsupresorových a některých dalších genů.

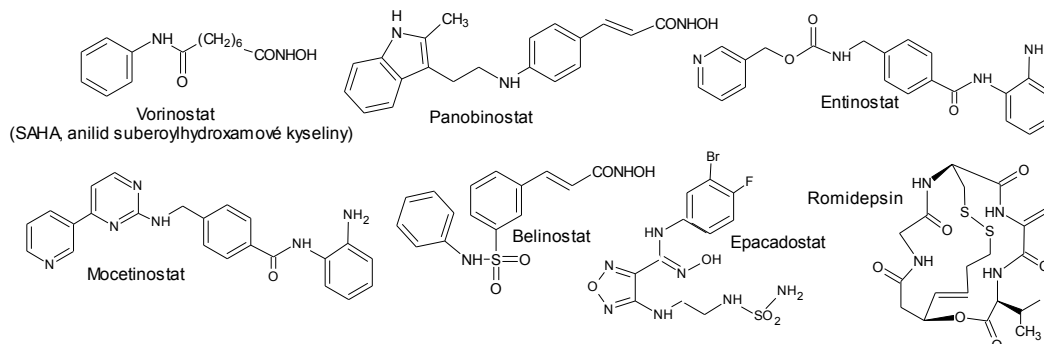
K methyloci DNA dochází téměř výlučně v sekvencích CpG, které se často vyskytují v promotorových oblastech. Methylována sekvence vytváří vazebnou doménu pro některé chromosomální proteiny (MBD, methylated CpG binding domain). Tím je potlačována transkripce. Methylována skupina se přitom váže do polohy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



Modifikacemi volných aminoskupin lysinu jsou ovlivňovány interakce histonů s DNA, ale i s faktory regulujícími replikaci a transkripci DNA a patrně i s enzymy podílejícími se na opravách a metabolismu DNA. Modifikace histonů ovlivňují také jejich stabilitu, protože na acylované aminoskupiny se nemůže navázat ubiquitin a tím je zablokována degradace histonů v proteasomech. Acetylací histonů nebo naopak odštěpením acetyl skupiny, případně i methyloci aminoskupiny lysinových zbytků se mění bazicita histonů a tím může být ovlivněna řada buněčných procesů.

Odštěpení acetyl skupiny katalyzuje enzym histondeacetylasa (HDAC). HDAC je metaloprotein, který pro svoji aktivitu potřebuje zinek. Je tedy inhibována chelátotvornými látkami, které mohou zinek vázat. Při některých nádorových onemocněních, zejména hematologických malignitách, je aktivita HDAC v nádorových buňkách zvýšena. Inhibitory HDAC mohou růst nádorů brzdít a být tak využity v protinádorové terapii. Používají se především v kombinacích s jinými protinádorovými léčivy, jejichž účinek potencují.

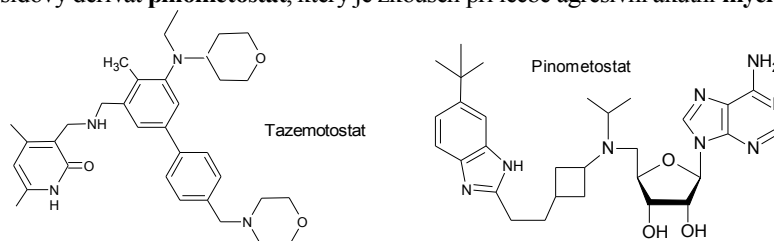
Jako první léčivo ze skupiny inhibitorů HDAC byl v říjnu 2006 povolen **vorinostat** (suberoylanilidhydroxamová kyselina, SAHA – Zolinza, Merck), a to pro terapii jednoho typu lymfomu, v r. 2015 byl povolen **panobinostat** (Farydak, Novartis) pro léčbu mnohočetného myelomu. Při léčbě nádorů mozku působí synergicky s radioterapií. Jako další inhibitory HDAC jsou klinicky zkoušeny deriváty hydroxamové kyseliny **belinostat** a **epacadostat**, 2-aminoanilidy substituovaných benzoových kyselin **mocetinostat** a **entinostat** a některé jiné chelatující látky. Entinostat zvyšuje účinnost retinoidů, zkoušen je mimo jiné i v kombinaci s 5-azacytidinem. Při léčbě nádorů plic měla tato kombinace dvou typů epigenetických léčiv přinést dokonce některá „dramatická zlepšení“ stavu pacientů.



Velmi účinným inhibitorem HDAC je depsipeptid **romidepsin** (Istodax, Fujisawa), produkt půdní bakterie *Chromobacterium violaceum*, který byl v listopadu 2009 povolen pro léčbu kožních lymfomů vycházejících z T-lymfocytů a je dále zkoušen v jiných onkologických indikacích. V kombinaci s decitabinem aktivuje tumorsupresorový gen, který je umlčen v nádorech ledvin a nádorech prsu, výhodná je i kombinace s protilátkami aktivujícími imunitní systém. HDAC lze inhibovat i jinými mechanismy a zajímavé je, že účinnými inhibitory tohoto enzymu jsou i jednoduché mastné kyseliny – klinicky jsou zkoušeny **solí kyseliny máselné** a **valproové** (2-propylvalerová kyselina, valproát sodný se používá zejména k potlačování epileptických záchvatů).

Methylaci aminoskupin v histonech katalyzuje lysin-N-methyltransferasa EZH2, která je enzymovou podjednotkou polyhřebinkového represivního komplexu (PRC2, Polycomb Repressive Complex 2) umlčujícího genu. Nadměrná exprese genu pro EZH2 byla zjištěna u nádorů prsu, prostaty, melanomu a močového měchýře apod., mutace u onemocnění nervového systému.

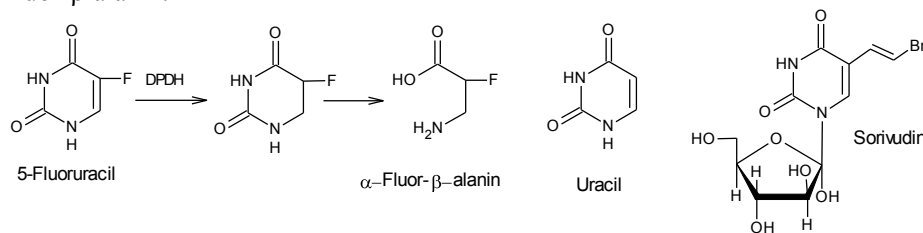
Inhibitorem EZH2 je **tazemetostat** (EPZ6438, Epizyme), jehož podání vyvolávalo při preklinických studiích buněčnou smrt a diferenciaci. Úspěšné byly i první klinické zkoušky tohoto orálního přípravku při léčbě nehodgkinských lymfomů a mesotheliomu. Jiným inhibitorem je aminonukleosidový derivát **pinometostat**, který je zkoušen při léčbě agresivní akutní **myeloidní leukemie**.



## Překonávání rezistence nádorových buněk

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

Protinádorový antimetabolit 5-fluoruracil nepůsobí na všechny pacienty stejně. Příčinou jsou rozdíly v aktivitě dihydropyrimidindehydrogenasy (DPD). Ta katalyzuje redukci 5-fluoruracilu na 4,5-dihydro-5-fluoruracil, který se nakonec rozloží na  $\alpha$ -fluor- $\beta$ -alanin.



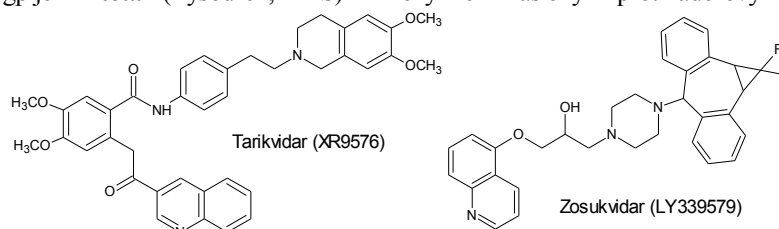
Při zvýšení aktivity DPD ztrácí 5-fluoruracil svoji účinnost, pro pacienty s deficiencí degradačního enzymu může být 5-fluoruracil příliš toxický. Metabolickou inaktivaci 5-fluoruracilu potlačuje přirozený substrát DPD uracil, jiným účinným inhibitorem DPD je např. antivirotikum **sorivudin**, (E)-5-(2-bromvinyl)-1 $\beta$ -D-arabinofuranosyluracil.

Jinou příčinou rezistence může být v případě léčiv působících na proteiny kódované mutovanými geny genetická nestabilita nádorových buněk. Mutovaný gen, jehož bílkovinný produkt – enzym – je léčivem inhibován, může při častém a relativně rychlém dělení nádorových buněk dále mutovat, což může ovlivnit interakce léčiva. V takovém případě je někdy třeba zvýšit dávku léčiva, to ale může vést k prohloubení vedlejších účinků, často ale bývá nutná náhrada původního léčiva novým přípravkem.

Platí to zejména pro některé inhibitory proteinkinasy, jako je např. imatinib. Bodové mutace fúzního genu *Bcr-Abl* mohou mít za následek změnu interagujících skupin na místě vazby imatinibu. Takových mutací byla zjištěna celá řada, např. u chronické myeloidní leukemie způsobené fúzním genem *Bcr-Abl* jich bylo popsáno nejméně 19. Např. mutace T315I zjištěná u 4-15% pacientů s rezistentní leukemií, při níž v genu dojde k záměně cytosinu za thymin, má za následek, že v poloze 315 polypeptidického řetězce dojde k náhradě threoninu za isoleucin. Tím je ale z bílkoviny na místě interakce eliminován kyslík, který je potřebný pro vytvoření vodíkové vazby s imatinibem. K 50% inhibici enzymu je pak potřebná desetinásobně zvýšená koncentrace léčiva než před mutací, což ale v tomto případě znamená, že imatinib nelze dále k léčbě používat. Jiné mutace mohou změnit konformaci kritického místa kódované bílkoviny, takže interakce s léčivem je znesnadněná nebo dokonce vyloučená ze sterických důvodů. Nové mutace *Bcr-Abl* nemusí způsobovat rezistenci pouze na imatinib, ale mohou ovlivnit účinnost i dalších TKI.

Specifickou příčinou rezistence nádorových buněk na některá léčiva je nadměrná exprese **glykoproteinu P (P-gp)**. P-gp transportuje léčiva ven z nádorové buňky i proti koncentračnímu gradientu. Nepůsobí specificky, ale transportuje z buňky cytostatika s odlišnou strukturou a mechanismem účinku. Je tedy příčinou tzv. „mnohočetné“ rezistence (multidrug resistance, MDR) nádorových buněk na cytostatika.

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



## Nákladovost terapie protinádorovými léčivy

Vstup nových přípravků na trh protinádorových chemoterapeutik je nyní obtížnější než dříve. Příčinou je mnohem složitější, nákladnější a zdlohavější klinické zkoušení nových léčiv. Přesto nová protinádorová léčiva poměrně rychle přibývají. Jsou sice účinnější a selektivnější než dosavadní léky, jsou však také podstatně dražší.

V r. 2015 činily v ČR dodávky léků z ATC skupin L01-L03 (tj. léčiv používaných převážně v onkologických indikacích, ale bez antidot a jiných pomocných a podpůrných léků) 9,66 mld. Kč (ceny dodavatelů bez obchodní přírůžky a DPH), což byla nejvyšší částka vynaložená na léky pro určité terapeutické kategorie. Prodeje cytostatik (skupina L01) přitom činily 6,57 mld. Kč, léků pro endokrinní terapii nádorových onemocnění (L02) 0,73 mld. Kč, imunostimulátorů (L03) 2,36 mld. Kč. Na celkových dodávkách léků v r. 2015, které dosáhly 61,98 mld. Kč, se léky skupin L01-03 podílely téměř jednou šestinou (15,6%), ve srovnání s rokem 2014 u nich došlo k nárůstu o 22,8%. Nárůst nákladů na protinádorové léky, lze vysvětlit kombinací řady faktorů – stárnutím populace a s tím souvisejícím růstem výskytu nových případů rakoviny, rostoucím počtem přežívajících pacientů, zejména ale vysokými cenami nově zaváděných moderních přípravků spolu s agresivnějšími způsoby terapie (kombinace různých léčiv, delší trvání léčby). V první desítku léčiv s nejvyšším objemem dodávek se u nás v r. 2015 objevilo 5 přípravků používaných v onkologii. Zejména přitom šlo o drahá „biologická léčiva“ (viz Farm12): na 2. místě se umístil interferon  $\beta_{1a}$  (který se ale hlavně používá mimo onkologii – ke zpomalení postupu onemocnění u roztroušené sklerózy) s 865,2 mil. Kč, na 3. místě protilátka trastuzumab (819,3 mil. Kč). V první desítku byly i další 2 protilátky: rituximab (757,4 mil. Kč) a bevacizumab (719,2 mil. Kč) a také jedno nízkomolekulární protinádorové léčivo – tyrosinkinasy inhibitor imatinib (560,2 mil. Kč).

Průměrná cena protinádorových léků je řádově vyšší než u léků ostatních terapeutických kategorií. V ČR činila průměrná cena balení protinádorových léčiv (L01) 6.680 Kč/bal., moderní „cílená“ léčiva ale průměr výrazně převyšují. Ceny některých nových protinádorových léčiv dosáhly takové výše, že je zdravotní pojišťovny odmítají hradit. To neplatí jen pro ČR, ale i pro další země. Příčinou vysokých cen nových léčiv je snaha farmaceutických firem o kompenzaci nákladů na zdlouhavý a nákladný výzkum a vývoj i mimořádně vysoká náročnost výzkumu a výroby. Vzhledem k trvající patentové ochraně jsou vyhlídky na snížení cen nástupem generik nebo biogenerik nejbližších letech zatím jen malé.

**Značně vysoké je riziko neúspěchu při klinických zkouškách nových protinádorových léčiv.**

Klinické zkoušení bývá povolováno u pacientů s pokročilým stadiem nádorového onemocnění, kdy standardní terapeutické postupy buď úplně selhaly, nebo jsou málo účinné. Zkouší se tedy jako tzv. léky druhé nebo i třetí volby. Pacienti v kontrolních skupinách nedostávají placebo, ale jsou léčeni standardními postupy léčby. Někdy se provádí „historická kontrola“, kdy se srovnávají dosažené výsledky se starými záznamy o neléčených nebo jinak léčených pacientech. Zkoušení léku i u pacientů s časnými stadii onemocnění nebo „naivních“ (dosud neléčených) pacientů je většinou povolováno teprve poté, až se lék osvědčí. To bývá předmětem kritiky, jiný postup by však byl neetický.

**Nová léčiva jsou povolována, jen když se prokáže, že jsou skutečným přínosem pro terapii.**

Až do nedávné doby považovali experti FDA za prokazatelný přínos pouze prodloužení doby přežití nebo doby do výskytu nových příznaků onemocnění nejméně o 15%. Temozolomid nebyl v USA před časem doporučen panelem expertů FDA pro léčení metastázujícího melanomu, protože prodloužení doby přežití pacientů bylo ve srovnání s léčbou dakarbazinem sice zřetelné, ne však dostatečně velké (7,7 proti 6,4 měsíců). Nyní se kritéria pro schvalování nových léčiv poněkud změnila a každý přípravek je posuzován individuálně. Kromě doby přežití jsou v úvahu brány i případné jiné přínosy

Ve snaze zastavit prudký růst nákladů na zdravotní péči hledají mnohé země možnosti úspory nákladů v úhradě léčiv. Do konfliktu s omezenými zdroji se přitom dostává zejména vysoká cena moderní protinádorové chemoterapie. To pak má za následek, že přístup pacientů k nejnovějším terapeutickým přístupům a možnostem efektivní protinádorové léčby bývá omezen.

Zavedení taxanů (paklitaxel, docetaxel) přineslo výrazné zlepšení výsledků léčby nádorových onemocnění vaječníků, prsu a plic, avšak současně značně zvýšilo nákladovost protinádorové léčby. Např. terapie kombinací cisplatiny a paklitaxelu stojí 10 x více než standardní léčba používající kombinaci cisplatiny a cyklofosfamidu. Proto jsou taxany předepisovány v průměru pouze asi 50% pacientům, kterým by mohly pomoci. Ve Velké Británii byla např. ještě nedávno léčba taxany hrazena pouze u 20% pacientů. Po protestech proti šetření na protinádorových léčiv musela britská vláda přislíbit nápravu a předepisování taxanů se rozšířilo.

Situace však není příznivá ani v jiných zemích. Vysoká nákladovost léčby brzdí preskripci dalších moderních léčiv. Jak již bylo zmíněno, velmi drahá je zejména léčba monoklonálními protilátkami (viz Farm12). Např. náklady na léčbu nádorů pankreatu bevacizumabem (Avastin) dosahují 800 tis. Kč za rok a za tuto částku se dosáhne prodloužení života pacienta o cca 6 měsíců. Roční léčba kolorektálního karcinomu cetuximabem (Erbix) je ještě dražší a stojí až asi 2 mil. Kč. O mnoho nižší cenu nemá ani léčba trastuzumabem (Herceptin), která stojí cca 590 tis. Kč za rok. Trastuzumab, který přinesl pozoruhodné výsledky léčení určitého typu metastázujících nádorů prsu zejména při kombinaci s taxany a jehož použití je u některých skupin pacientek nákladově ještě poměrně efektivní, není pro vysoké náklady terapie běžně dosažitelný pro převážnou většinu evropských pacientek. Vysoké náklady na protinádorovou léčbu, při níž se obvykle používá kombinace několika léčiv, dále zvyšuje podávání chemoprotektiv, antiemetik a dalších přípravků podpůrné léčby – a samozřejmě i hospitalizace, nemocniční ošetření a časté kontroly. Vysoké náklady brzdí jejich využití prakticky po celém světě.

V ČR se v minulých letech podařilo uzavřít dohody České onkologické společnosti s VZP a některými dalšími pojišťovnami o rozsahu a podmínkách úhrady nákladné onkologické léčby. Moderní „biologická léčba“ je nyní aplikována několika tisíci pacientů ročně. Podle odhadu jednoho předního českého onkologa by náklady na léčbu všech českých pacientů s nádorovým onemocněním s využitím nejnovějších možností medicíny činily přes 700 mld. Kč ročně. Takové náklady uhradit nelze, jsou téměř 2,5x vyšší než celkové roční výdaje ČR na zdravotnictví. Onkologové ale říkají, že se u nás ale vždy alespoň najdou prostředky pro léčbu těch pacientů, jimž protinádorové léky mohou zachránit nebo alespoň významně prodloužit život. Na léky, které život pacientů prodlouží jen o několik měsíců, ale prostředky již nejsou. Aktuální snahy o šetření nákladů na léky, materiál a vybavení nemocnic přitom vyvolávají obavy onkologů z většího omezování moderní účinné terapie.

**Vzhledem k vysokým nákladům na léčbu onkologických pacientů mají největší úspěchy na poli boje s rakovinou ty země, které do zdravotnictví vkládají nejvíce prostředků.**

V čele jsou USA s poměrně vysokou dobou přežívání nemocných. Mortalita má v USA sestupný trend a s výjimkou kožních nádorů je nižší než v Evropě. V letech 1975-79 žilo v USA 5 let od diagnózy kolorektálního karcinomu 51% bílých a 44% černých mužů a 53/48% žen, v letech 1995-2001 se podíl přežívajících zvýšil na 65,5/55,5% u mužů a 59,5/54,5% u žen. Mezi léty 1990 a 2007 došlo v USA k poklesu mortality na nádorová onemocnění u mužů o 22,2% a u žen o 13,9%. V r. 1990 činily v USA náklady na léčbu nádorových onemocnění celkem 104 mld. \$, ale kolem r. 2000 již 240 mld. \$. Nemalý podíl přitom představují náklady na protinádorové léky. V 80. letech se v USA spotřebovalo protinádorových léků za 200 mil. \$ ročně, v r. 1994 to již bylo 2,9 mld. a v r. 2000 už 9 mld. \$. Celkové výdaje systému Medicare, který v USA hradí léčbu seniorů starších 65 let a invalidních pacientů, vzrostly za desetileté období o 47%, ale u onkologické léčby to bylo o plných 267%.

I pojištění pacienti si ale někdy musí hradit dosti značný podíl nákladů na léčbu sami a nádorové onemocnění se tak stává značnou finanční zátěží pro pacienta i jeho rodinu a v zemích s vysokou spoluúčastí pacienta dokonce příčinou osobních bankrotů. Někdy se proto hovoří o tom, že nejzávažnějším vedlejším účinkem nových protinádorových léků je „finanční toxicita“

Růst nákladů na léčbu nádorových onemocnění přestává být únosný i pro nejbohatší země, jako je USA. Různé státy se snaží omezit růst nákladů na drahou léčbu vydáváním doporučení pro terapii a standardů léčby, případně vazbou určitých způsobů léčení na výši pojistného nebo připojištění.

V ČR jsou protinádorové léky většinou plně hrazeny. To však neznamená, že by mohly být libovolně předepisovány. Většina protinádorových léků je zařazena do kategorie "X", kde jsou hrazeny pojišťovny jako zvlášť účtované léčivé přípravky. Ty mohou být předepsány rámci lékového paušálu zdravotnického zařízení nebo po předchozím souhlasu revizního lékaře pojišťovny. Bohužel, při schvalování preskripce se často hledí pouze na cenu léku a nepřihlíží k celkovým nákladům léčby, kam patří i cena hospitalizace a další přímé i nepřímé zdravotní výdaje.

Omezenost zdrojů a nákladovost protinádorové terapie staví do popředí otázku volby terapeutického přístupu, aby se dosáhlo co nejlepšího poměru celkových nákladů na léčbu k dosaženému přínosu pro pacienta (cost/benefit ratio). Přitom je třeba brát v úvahu nejen ceny léků, ale i celkové náklady na léčbu. Srovnání celkových nákladů na různé způsoby terapie umožňuje **farmakoekonomika**. V ČR mají být farmakoekonomické rozborů využívány jako podklady pro kategorizaci léčiv.

Problémem je, že rozborů předkládá výrobce, který má zájem farmakoekonomické parametry svého léčiva vylepšit, např. vnechááním nákladů na potlačení vedlejších účinků. Při kategorizaci léků proto byla farmakoekonomika opomíjena a pouze se porovnávaly ceny léků určité terapeutické kategorie bez přihlídnutí k celkovým nákladům terapie. Ve Spojeném království porovnává nákladovost terapie s jejími přínosy Národní ústav pro klinickou excelenci NICE (National Institute for Clinical Excellence). Z takového porovnání např. vyvodil NICE, že léčba fludarabin fosfátem a monoklonálními protilátkami bevacizumabem a cetuximabem není nákladově efektivní. V USA má nyní vzniknout podobná instituce v rámci opatření prezidenta Obamy na pomoc ekonomice zdravotnictví.

V ČR se zabývá farmakoekonomikou léčby rakoviny drahými moderními léčivy Česká onkologická společnost, která ve spolupráci s Institutem biostatistiky a analýz MU a Masarykovým onkologickým ústavem vede registry nákladné léčby převážně metastázujících nádorů bevacizumabem, cetuximabem, imatinibem, lapatinibem, sunitinibem, sorafenibem a pemetrexedem, sumarizuje její přínosy i negativa.

Nové protinádorové nebo pomocné léky mohou přispět ke zkrácení doby hospitalizace nebo intenzivní péče, snížení počtu návštěv u lékaře, potřeby diagnostických testů, léků k potlačení vedlejších účinků apod. V takových případech je jasné, jak má být farmakoekonomická analýza provedena. Otázkou však je jak postupovat, jestliže nový lék **prodlouží dobu života pacienta**.

Celkové náklady na léčbu a následné kontroly přitom obvykle vzrostou. Klasická farmakoekonomická analýza by pak ukázala, že nový lék není farmakoekonomicky přínosný. Situace se však změní, vyčíslíme-li mezi přínosy i prodloužení života pacienta. Problémem přitom je, jak tento přínos objektivizovat, tj. jaké nákladové kritérium použít k rozhodování, zda má smysl pacientův život prodlužovat. Podle studie Farmakoekonomická analýza protinádorových léků ze skupiny tzv. cílené terapie (Skoupá J, Feltl D, Černá V., *Farmakoekonomika*, 2012; 6:9–13) činil v první linii léčby metastázujících nádorových onemocnění průměr nákladů 1,5 mil. Kč a ve druhé linii dokonce 2,2 mil. Kč za rok.

Nedávno byly v USA porovnány náklady 4 různých režimů terapie u pokročilých stadií nádorů prostaty. Při léčbě docetaxelem činilo prodloužení doby života pacientů v průměru 72 dní, náklady za každý den navíc činily 206 \$. Při léčbě abirateronem a prednisolonem to bylo 117 dní a 256 \$ na den, karbazitaxel prodlužoval život pacienta o 73 dní za 477 \$/den. Nejdéle, v průměru o 123 dní prodloužila život pacientů vakcína Provenge (sipuleucel T), náklady na jeden den života pacienta ale činily 757 \$. Otázkou přitom také je, jaká je kvalita prodlužovaného života. Např. v případě pokročilých stadií nemalobuněčného karcinomu plic zvyšují různé režimy kombinované chemoterapie ve srovnání s pouhou podpůrnou péčí medián přežití 2 – 3 x (z 9 – 22 týdnů na 20 – 37 týdnů). Tři měsíce života navíc však mohou pacientovi současně přinést zhoršení kvality života, protože bude přitom vystaven toxickým účinkům cytostatik. Otázkou je, zda v takovém případě má být dána přednost nákladné chemoterapii před paliativní léčbou zmírňující příznaky onemocnění. **A zda je přitom chemoterapie účelná, protože při omezených zdrojích mohou náklady na léčbu jednoho pacienta znamenat, že budou chybět peníze na léčbu jiného pacienta s příznivější prognózou.**

Má-li takové rozhodování být objektivní, je třeba v prvé řadě určit nákladový limit, do něhož bude prodloužení života pacienta považováno za efektivní. Kromě pouhého prodloužení života je třeba brát v úvahu i **kvalitu prodlužovaného života pacienta**.

Vyčísluje se proto zvýšení nákladů, které je třeba ve srovnání s dosavadní terapií vynaložit nejen na prodloužení doby života (LYG – Life Years Gained), ale na získání „roku života standardní kvality“, QALY (Quality Adjusted Life Year)“. Ty se přepočítávají vynásobením doby prodloužení života koeficientem vyjadřujícím stupeň poškození zdraví. Ten např. u pacienta s jednou amputovanou končetinou činí 0,5.

U pacientky přežívající po chirurgickém odstranění nádoru prsu bez známek onemocnění jeden rok to je asi 0,75, při nejméně dvouletém přežívání bez známek nemoci se koeficient zvyšuje na 0,85. Dojde-li k metastázování primárního nádoru, pak přepočítávací koeficient klesne na 0,48. Jestliže se při nasazení nového léku prodlouží průměrná doba přežití pacientů o půl roku při kvalitě života vyjádřené koeficientem 0,7, pak se novou léčbou získá 0,35 QALY. Zvýší-li se přitom ve srovnání se současnou terapií náklady na léčení o 5 tis. \$, pak náklady na 1 QALY vzrostou o 14.285 \$.

V budoucnosti bude možné snížit nákladovost léčby nádorových onemocnění zvýšením selektivity preskripce. Lepší znalost mechanismů účinku jednotlivých protinádorových léčiv a nové diagnostické postupy by měly umožnit **personalizovanou** neboli **individualizovanou terapii**. Tu zejména čeká velký rozvoj právě při léčbě pacientů s nádorovým onemocněním. Půjde o nasazení drahých protinádorových léčiv jen tam, kde lze předpokládat, že budou účinkovat a neztrácet čas a nezatěžovat pacienty ani pojišťovny a pacienti neúčinnou léčbou preparáty, které nebudou na jejich onemocnění působit a přitom mohou vyvolávat nežádoucí vedlejší účinky.

Současné možnosti diagnostiky při predikci účinnosti léčiv jsou zatím omezené. Genomické nebo proteomické analýzy jsou dosud stále poměrně nákladné a pojišťovny váhají s jejich úhradou. Vzhledem k extrémně vysokým cenám některých nových „biologických“ léčiv se specifickým účinkem, jsou však už nyní některé specifické testy farmakoekonomicky výhodné. Je to např. test na zjišťování, zda pacientky s pokročilými stadii nádorů prsu mají na nádorových buňkách zvýšené množství receptoru HER2, takže by jim mohla pomoci léčba trastuzumabem. Zrušení patentové ochrany testu projednáváné v USA by přitom mohlo test podstatně zlevnit. Ve vývoji je celá řada dalších testů, které umožní podobným způsobem predikovat výsledky určitých způsobů léčby a tak určit jakým směrem by se další léčba měla ubírat.

### Kontrolní otázky pro zopakování

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