

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Pavλίna Fürbacherová

Příprava protinádorových léčiv vázaných v apoferritinu

Preparation of anticancer drugs bound in apoferritin

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Radek Indra, Ph.D.

Praha 2019

Prohlášení

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

V Praze dne

Podpis:

Poděkování

Touto cestou bych ráda vyjádřila poděkování svému školiteli Mgr. Radku Indrovi, PhD. za jeho odborné vedení, objasnění postupů při experimentální části a cenné rady a připomínky, které mi poskytl při psaní této práce. Rovněž děkuji své rodině za jejich podporu.

Abstrakt

Rakovina patří mezi nejzávažnější problémy, se kterými se potýká moderní medicína. V posledních letech došlo k velkému rozvoji nanotechnologií a jejich použití v medicíně. Cílem je zefektivnit podávání léčiv a přispět tak k léčbě nádorových onemocnění. Uložení látky do nanočástice může být řešením při nízké stabilitě léčiva a/nebo může přispět k eliminaci nežádoucích vedlejších účinků. Nanočástice apoferritin, která byla sledována v této bakalářské práci, je forma běžně se vyskytujícího proteinu ferritinu. V jeho struktuře se nachází dutina, do které je možné vložit požadované léčivo. Jeho chemické vlastnosti (vysoká stabilita při extrémních teplotách a široké škále pH, snadná manipulace pomocí změny pH) a také biokompatibilita z něj dělají potenciálně vhodný transportér.

V předkládané bakalářské práci byla studována schopnost apoferritinu inkorporovat do své struktury protinádorové léčivo cabozantinib. Jedná se o tyrosinkinázový inhibitor používaný pro léčbu karcinomu štítné žlázy, ledvinových buněk a hepatocelulárního karcinomu. Dále byl sledován vliv konečné hodnoty pH na vznik komplexu apoferritinu s cabozantinibem a také stabilita tohoto komplexu.

Ze získaných výsledků vyplývá, že apoferritin může enkapsulovat cabozantinib do své vnitřní struktury, přičemž konečná hodnota pH na tento proces nemá prakticky žádný vliv. Porovnáme-li výsledky měření stability, lze říci, že komplex apoferritinu s cabozantinibem není příliš stabilní a dochází k uvolňování cabozantinibu.

Klíčová slova

rakovina, nanočástice, apoferritin, protinádorová léčiva, cílená léčba, canozantinib

Abstract

Cancer is one of the most serious problems, which modern medicine faces. In recent years, nanotechnologies and their use in medicine, has developed greatly. The aim is to make drug administration more effective and help to improve treatment of cancer illnesses. Incorporation of chemical substance into a nanoparticle can solve the problem with low stability of the drug, and/or it help to eliminate side effects. Nanoparticle apoferritin, which was studied in this thesis, is a form of commonly occurring protein ferritin. Its structure contains cavity, that can be used for incorporation of drug. Its chemical structure (high temperature stability and stability at wide pH range, easy manipulation by changing pH) and its biocompatibility makes apoferritin a potentially suitable transporter.

Presented thesis studied apoferritin's ability to incorporate anticancer drug cabozantinib into its structure. Cabozantinib is tyrosine kinase inhibitor which is used for treatment of thyroid cancer, renal cell carcinoma and hepatocellular carcinoma. The effect of final pH to the formation of the complex of apoferritin with cabozantinib, and stability of this complex was also studied in this thesis.

Considering the results we can say that apoferritin is able to encapsulate cabozantinib into its inner structure. As we see in results, final pH doesn't affect this process. Considering stability results we can say that complex of apoferritin with encapsulated cabozantinib is not very stable and cabozantinib is released from complex.

[In Czech]

Keywords

cancer, nanoparticles, apoferritin, anticancer drugs, targeted therapy, cabozantinib

Obsah

1. Úvod	7
1.1 Rakovina	7
1.1.1 Léčba rakoviny	8
1.1.2 Klasická vs. cílená chemoterapie	9
1.2 Tyrosinkinázové inhibitory	10
1.2.1 Cabozantinib	11
1.3 Nanočástice	12
1.3.1 Apoferritin	15
2. Cíl práce	18
3. Materiál a metody	19
3.1 Přístroje	19
3.2 Chemikálie	19
3.3 Metody	20
3.3.1 Příprava vzorků pro testování rozpustnosti	20
3.3.2 Příprava roztoků cabozantinibu vázaného v apoferritinu o různých koncentracích	20
3.3.3 Vliv pH na enkapsulaci cabozantinibu do apoferritinu	20
3.3.4 Stanovení množství enkapsulovaného cabozantinibu pomocí HPLC	21
3.3.5 Sledování stability komplexu cabozantinibu s apoferritinem v čase	21
4. Výsledky	22
4.1 Sledování rozpustnosti cabozantinibu	22
4.2 Vliv reakčních podmínek na enkapsulaci cabozantinibu do apoferritinu	22
4.3 Vliv pH na zavření apoferritinového komplexu	24
5. Diskuze	28
6. Závěr	30
7. Seznam použité literatury	31

1. Úvod

1.1 Rakovina

Rakovina je jedním z nejzávažnějších celosvětových zdravotních problémů, se kterým se potýká moderní medicína ^[1]. Pojem „rakovina“ zahrnuje soubor různých, navzájem příbuzných onemocnění ^[2]. Jedná se o onemocnění způsobené abnormálním bujením tkáně, přičemž je známo více než 200 různých druhů rakoviny. K nádorovému bujení může dojít prakticky v kterékoliv části lidského těla ^[2]. Některé druhy rakoviny mohou dokonce napadat různé druhy tkání a rychleji se tak šířit do okolních orgánů ^[3].

V normálních, zdravých buňkách je dělení přísně regulováno pomocí příslušných genů. Každá buňka má geneticky přesně definovanou funkci i životnost a nové buňky vznikají na základě signálu pouze v případě potřeby – dojde-li k poškození nebo smrti buněk starých. Dojde-li ke genetickým změnám (mutaci) uvnitř buňky nebo skupiny buněk a k narušení procesu buněčného cyklu, začne docházet k nekontrolovanému růstu a proliferaci, staré a poškozené buňky nepodléhají přirozené apoptóze a dochází ke vzniku primárního tumoru, odkud se onemocnění šíří dál ^[3]^[4].

K mutacím a následnému vzniku nádoru může dojít náhodně již během dělení buňky, kdy dojde k delecii, poškození nebo zmnožení genu. Nedojde-li k včasnému rozpoznání chyby a zničení takové buňky, přestane být kontrolována a začne extrémně růst a množit se. K tomuto procesu však může dojít také později, i přesto, že došlo ke správnému dělení buňky. Vliv mohou mít také vnější aspekty, jako chemikálie, alkohol, stravovací návyky, radiace nebo cigaretový kouř, vzácně také nádorové viry ^[3]^[5].

Vlivem nádorového bujení může vzniknout benigní (nezhoubný) nebo maligní (zhoubný) tumor ^[5]. Benigní tumor je obvykle neinvazivní, roste pomalu, zpravidla je možná léčba chirurgickým zákrokem a nádor nemívá tendenci k recidivě. Buňky, které tvoří benigní tumor se příliš neliší od zdravých buněk. V některých případech však mohou být i benigní tumory problematické a život ohrožující, například pokud narostou do příliš velkých rozměrů, způsobují bolest nebo tlak na okolní orgány nebo pokud se jedná o mozkový nádor.

Maligní tumor nekontrolovaně a rychle roste, má sklon k recidivitě a může tvořit metastázy v důsledku napadání okolních buněk ^[3]^[6]. Rakovinné buňky se mohou odtrhnout z místa původního tumoru a putovat krevním nebo lymfatickým systémem na různá místa v těle, kde tvoří další tumory ^[2].

Výskyt rakoviny sleduje například American Cancer Society, která každoročně zveřejňuje statistiky zahrnující počet nových případů výskytu rakoviny a počet úmrtí v důsledku rakovinových onemocnění v Americe. Během let 2006–2015 byl počet případů výskytu u žen stabilní, zatímco u mužů byl pozorován pokles. Počet úmrtí v letech 2007–2016 klesl u žen i mužů. Přestože obecně lze říci, že počet úmrtí v důsledku rakoviny v posledních letech poklesl, byl pozorován nárůst socioekonomických nerovností, především v oblasti prevence rakovinových onemocnění ^[1]. V České republice sleduje tyto statistiky například Český statistický úřad nebo SVOD (Systém pro vizualizaci onkologických dat). Nádorová onemocnění jsou hned po kardiovaskulárních onemocněních druhou nejčastější příčinou úmrtí v České republice ^[7]. Více než 20 % všech úmrtí v Evropě a Severní Americe způsobí jeden z cca 100 různých nádorů, zejména jde o nádory plic a tlustého střeva ^{[5][7]}.

1.1.1 Léčba rakoviny

V dnešní době existuje hned několik způsobů léčby rakoviny. Jejich použití závisí především na typu a stádiu rakoviny. U některých pacientů je možné použití pouze jednoho typu léčby, mnohem častěji se však využívá jejich kombinace – obvykle chirurgický zákrok v kombinaci s chemoterapií, nebo radioterapií, případně kombinace všech tří typů ^[2].

Chirurgický zákrok je jedním z hlavních léčebných postupů při léčbě většiny nádorových onemocnění. Při zákroku je tumor mechanicky odstraněn z těla. Léčba je lokální, proto se obvykle nepoužívá v případě, že se rakovina již rozšířila po těle nebo při leukémii či rakovině lymfatického systému. V takových případech je vhodnější použít metody, které zasáhnou celé tělo, například chemoterapii nebo radioterapii. Odstranění nádoru chirurgicky může být také znemožněno polohou nádoru. Účinnost léčby obvykle závisí na stádiu rakoviny – včasnější zákrok vede k účinnějšímu odstranění nádoru ^[3].

Radioterapie využívá k léčbě vysoké dávky radiace (obvykle rentgenové záření) k zabití nádorových buněk poškozením jejich DNA, případně k zpomalení jejich růstu. Buňky v důsledku radiace nezahynou ihned, ale k jejich úmrtí dochází po týdnech až měsících po ukončení léčby ^[2]. Radioterapie se dělí na externí, kdy je místo nádoru ozařování externím paprskem, a interní, při které je zdroj záření zaveden přímo do těla ^[3].

Chemoterapie využívá léčiva působící proti nádorovým buňkám. Jedná se o systémovou léčbu, která zasahuje celé tělo. Typ použitého léčiva závisí na typu rakoviny [3]. Chemoterapie se často používá v kombinaci s jinými typy léčby, například pro zmenšení nádoru před chirurgickým zákrokem či radioterapií nebo naopak k odstranění nádorových buněk, které v těle zůstaly po předchozím zákroku. Léčiva mohou být podávána perorálně, intravenózně, intratekálně, intraperitoneálně, intraarteriálně nebo transdermálně. Nevýhodou chemoterapie jsou nežádoucí vedlejší účinky. Léčiva kromě nádorových buněk zabíjí nebo zpomalují také buňky zdravé. Častým příkladem jsou buňky v okolí úst, ve střevech a buňky zajišťující růst vlasů, v důsledku čehož chemoterapii často doprovází drobná zranění v dutině ústní, nevolnost či ztráta vlasů. Dalším obvyklým vedlejším účinkem je vyčerpání. Většina vedlejších účinků je pouze dočasná a po skončení chemoterapie dochází ke zlepšení. Léčba často probíhá v cyklech, kdy jsou období chemoterapie následována období odpočinku [2].

Imunoterapie je biologická léčba, která využívá v boji s nádorovými buňkami imunitní systém pacienta. Tato léčba je pro mnohé typy nádorových onemocnění ve fázi klinických studií, nicméně se už běžně používá například pro léčbu melanomů. Imunitní systém sám o sobě obvykle není schopný s rakovinnými buňkami bojovat, protože jsou schopny se před ním maskovat, případně ho obelhat vysláním signálu, který zastaví snahu imunitního systému buňku zničit [3]. Některé druhy imunoterapie fungují tak, že označí rakovinové buňky, čímž pomáhají imunitnímu systému je odhalit a zničit. Jiné typy posilují imunitní systém, který je pak schopný účinněji zasáhnout proti těmto buňkám. Mezi nejčastější vedlejší účinky imunoterapie patří kožní alergické reakce a symptomy podobné chřipce (horečka, zimnice, nauzea, nevolnost, malátnost, slabost, bolesti hlavy, svalů, kloubů atd.) [2].

1.1.2 Klasická vs. cílená chemoterapie

Přestože cytotoxická léčiva běžně používaná při chemoterapii mohou být zaměřena na konkrétní makromolekuly (např. enzymy), nemají obvykle schopnost efektivně rozlišovat mezi nádorovými a rychle se dělicími buňkami (např. buňky kostní dřeně), což způsobuje napadání zdravých buněk, které jsou vůči těmto látkám citlivé, a řadu nežádoucích

vedlejších účinků. Tato léčiva mají úzký terapeutický index a jejich působení bývá často nepředvídatelné ^{[8][9]}.

Naproti tomu cílená léčba používaná v posledních letech zejména v hematologii, která ovlivňuje signální dráhy vedoucí ke vzniku tumoru a působí specificky proti rakovinným buňkám a molekulám spojeným s nádorovým bujením, je mnohem efektivnější a s nižší nespecifickou toxicitou. Mechanismus účinku těchto léčiv je odlišný od klasických cytostatik ^{[8][10]}. Látky používané při cílené léčbě lze rozdělit do čtyř typů – monoklonální protilátky, inhibitory proteasomu, imunomodulační látky a inhibitory tyrosinkináz ^[10].

Použití monoklonálních protilátek s sebou nese celou řadu potíží. Antigen, na který se protilátka váže, by měl být vysoce specifický – přítomný ve všech nádorových buňkách a zároveň nepřítomný ve zdravých, navíc by veškeré nádorové buňky měly být přístupné pro protilátku. Protilátka by také neměla vyvolávat imunitní odpověď organismu. V současné době se nejvíce používají humanizované protilátky, které imunitní odpověď nevyvolávají ^[10].

Inhibitory proteasomu inhibují enzymový komplex ubikvitin-proteasom, který je zodpovědný za degradaci intracelulárních signálních proteinů. Díky tomu nedochází ke zničení signálních molekul, které již splnily svoji funkci a měly by být odstraněny, čímž dochází k chaosu v signálních drahách a následnému zániku buňky ^[10].

Mezi imunomodulační léčiva patří derivát kyseliny glutamové, thalidomid, a jeho deriváty – lenalidomid a CC-4047, které kromě nižší toxicity vykazují také vyšší účinnost. Mechanismus účinku těchto léčiv je komplexní. Dochází k modulaci sekrece některých cytokinů, zvýšení proliferace T-lymfocytů a ovlivnění aktivity NK buněk (z angl. natural killer). Tato léčiva mají také přímou protinádorovou aktivitu ^[10].

Posledním typem protinádorových látek používaných v cílené terapii jsou tyrosinkinázové inhibitory, které jsou podrobněji popsány v následující kapitole.

1.2 Tyrosinkinázové inhibitory

Tyrosinkinázy jsou proteiny, které slouží jako mediátory v signálních drahách a jsou klíčové v mnohých biochemických procesech jako je růst a diferenciací buněk, apoptóza a další. Jde o rodinu enzymů, které katalyzují fosforylaci tyrosinových zbytků v cílových proteinech pomocí ATP ^[11]. Mají významnou roli při ovlivnění signalizace

růstových faktorů, a proto se staly důležitým terapeutickým cílem při vývoji léčby rakoviny [8]. V normálních buňkách je jejich aktivita přísně regulována, vlivem mutace nebo nadměrné exprese však může dojít k maligním změnám [9] [11]. V rakovinných buňkách jsou tyto signální dráhy geneticky nebo epigeneticky pozměněny, aby poskytly maligním buňkám výhodu oproti normálním [11].

Důležité jsou především receptorové tyrosinkinázy, které se skládají z extracelulární domény, obsahující vazebné místo pro ligand, transmembránové domény a intracelulární katalytické domény. Vazba ligandu na receptor extracelulární domény způsobí dimerizaci tohoto receptoru a autofosforylaci tyrosinových zbytků na intracelulární doméně, což vede ke změně konformace proteinu a aktivaci signálních drah podílejících se na přenosu signálu do buňky [9][10].

Mezi tři hlavní mechanismy působení tyrosinkinázových inhibitorů patří kompetice s ATP a zablokování vazebného místa, vazba na extracelulární doménu pomocí monoklonálních protilátek a inhibice stimulačních ligandů signálních drah. Obsazení vazebného místa pro ATP zabrání fosforylaci a tím přenosu signálu do buňky [10].

1.2.1 Cabozantinib

Cabozantinib (obr. 2.1) je protinádorové léčivo prakticky nerozpustné ve vodě, podávané perorálně ve formě tablet. Jedná se o nesespecifický tyrosinkinázový inhibitor užívaný při cílené léčbě. V roce 2012 byl schválen ve Spojených státech a Evropské unii pro léčbu metastazujícího medulárního karcinomu štítné žlázy [12] [13]. Kromě toho je používán při léčbě pokročilého karcinomu ledvinových buněk a hepatocelulárního karcinomu [14].

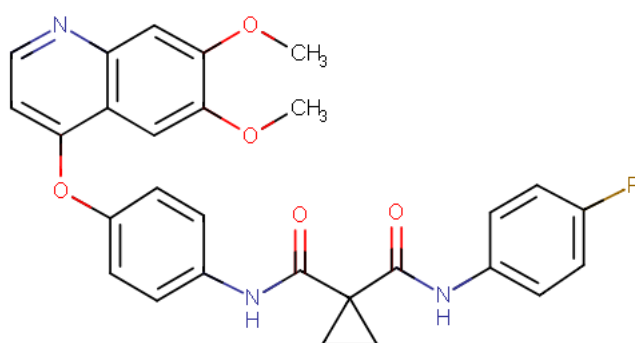
Cabozantinib se silně váže na specifické receptorové tyrosinkinázy, které jsou v nádorových buňkách nadměrně exprimovány, a tím inhibuje jejich aktivitu. Patří mezi ně receptor hepatocytárního růstového faktoru (MET), receptor vaskulárního endotelového růstového faktoru 2 (VEGFR2) a receptor RET. Díky této inhibici dochází k blokaci signálních drah vedoucích k buněčnému dělení a tím k potlačení růstu tumoru a angiogeneze a k regresi onemocnění [15][16][17].

Po orálním podání léčiva dochází po 2-5 hodinách k dosažení maximální koncentrace v plasmě. Zde se cabozantinib velice dobře váže na plasmatické proteiny (s více než 99,7 % efektivitou) [12]. K metabolismu cabozantinibu dochází pomocí cytochromů.

Především se jedná o CYP3A4 a v menší míře CYP2C9. K vylučování dochází zejména výkaly, částečně také močí [12]. Mezi metabolity nalezenými ve výkalech, moči a plazmě po orálním podání cabozantinibu byl především monohydrosulfát, dále pak N-oxid a štěpné produkty amidu [13].

Mezi běžné vedlejší účinky pozorované u pacientů léčených cabozantinibem patří průjem, bolest v oblasti úst, úbytek hmotnosti, nevolnost, vyčerpání, změna barvy vlasů, hypertenze, bolesti břicha a zácpa. Mezi závažnější nežádoucí účinky patří vznik gastrointestinálních perforací a píštělí, které mohou být i smrtelné, a závažné krvácení zažívacího traktu [12][18][19].

Cabozantinib je součástí klinických studií, kde byla prokázána jeho protinádorová aktivita u různých typů karcinomů, přičemž byla pozorována odpověď v případě nádorů měkkých tkání i kostí [19].



Obrázek 1.1: Strukturální vzorec cabozantinibu. Převzato z [16].

1.3 Nanočástice

Nanočástice jsou v posledních letech intenzivně zkoumány jako potenciální nosiče protirakovinných i dalších léčiv do místa účinku s co nejmenším dopadem na zdravé tkáně. Používají se pro řešení některých běžných problémů s podáváním léčiva, jako je nedostatečná specifita distribuce a dosažení cíle, špatná rozpustnost ve vodě, nedostatečná biologická dostupnost při perorálním podání nebo nízký terapeutický index. Další výhodou je snížení toxicity při zachování terapeutického účinku a omezení nežádoucích vedlejších účinků [20][21].

Mezi oblasti, ve kterých lze nanočástice využít, patří kromě podávání léků například fluorescenční značení, detekce proteinů, diagnostika a detekce patogenů, zkoumání struktury DNA, tkáňové inženýrství, separace a purifikace molekul a buněk a další [22].

Nanočástice používané v medicíně se velikostí pohybují kolem 3-200 nm. Interakce nanočástice s buňkou se liší v závislosti na jejím složení. V závislosti na způsobu přípravy dochází ke kovalentní vazbě na polymerní matici nebo je léčivo zachyceno na částici mechanicky [20] [21]. Funkční povrch nanočástic je relativně velký, a proto mohou navázat, adsorbovat a přenášet různé druhy látek. Po uzamčení léčiva do vnitřní struktury nosiče jsou nanočástice schopné díky odlišné fyziologii nádorových buněk selektivně doručit léčivo až na místo působení [20] [21].

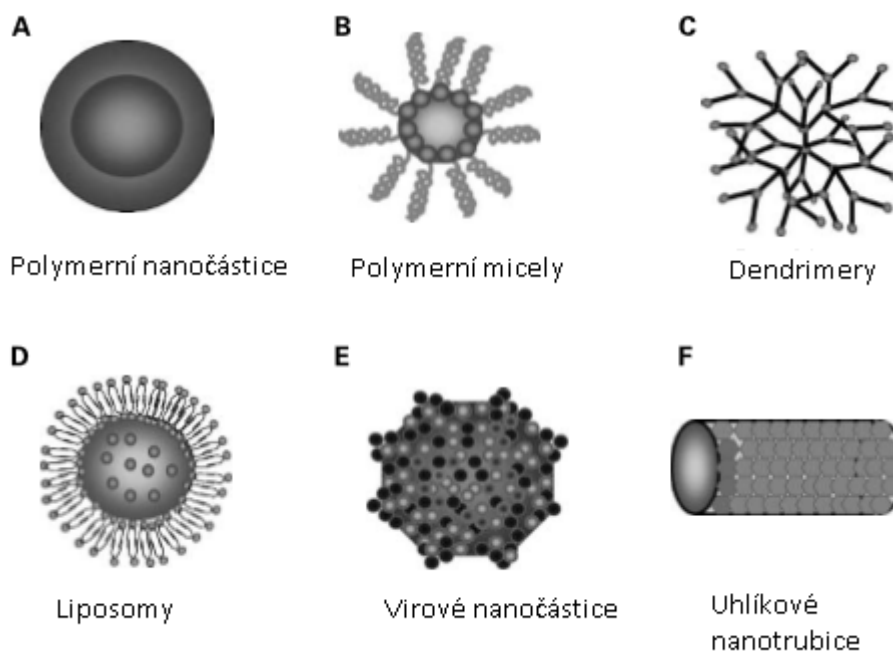
I použití nanočástic s sebou však nese zdravotní rizika, zejména vyšší potenciální toxicitu. Tato rizika závisí především na konkrétním složení dané nanočástice.

Při navrhování těchto systémů je nutno vzít v potaz, jak je léčivo schopno se do nosiče inkorporovat a později se z něj uvolnit, stabilitu a trvanlivost komplexu, biokompatibilitu s lidským organismem, distribuci a efektivitu cílení, funkčnost léčiva a také potenciální nežádoucí vedlejší efekty nosiče [21].

Důležitou vlastností nanočástic používaných jako nosiče léčiv, je jejich biodegradovatelnost. Poté, co se léčivo dostane na místo určení (tedy k nádorovým buňkám), je potřeba, aby došlo k uvolnění léčiva z částice, aby mohlo začít působit. V méně častých případech může být léčivo samotné navrženo jako nanočástice, která je dopravena k maligní tkáni bez použití nosiče. Obvykle je však systém složen ze dvou složek, přičemž jednu tvoří farmaceuticky aktivní komponenta (léčivo) a druhou látka sloužící jako nosič [21].

Nanočástice používané v medicíně (obr. 1.2) mohou být přírodní nebo syntetické a můžeme je podle jejich chemické povahy rozdělit do několika skupin:

- polymery (polymerní nanočástice, polymerní micely, dendrimery)
- lipidy (liposomy)
- viry (virové nanočástice)
- organokovové sloučeniny (nanotrubice) [20].



Obrázek 1.2: Typy nanočástic využívaných v medicíně pro transport léčiv. Převzato, upraveno z [20].

Nosiče na bázi polymerů

Mezi polymerní nosiče patří polysacharidy (chitosan, heparin), bílkoviny (albumin, apoferritin) nebo syntetické kopolymery. Léčivo je enkapsulováno uvnitř těchto nosičů nebo dochází ke konjugaci. Většina polymerních nanočástic je biodegradovatelná a po jejich degradaci dochází k uvolnění léčiva [21].

Polymerní micely jsou amfifilní (látky s hydrofilními i lipofilními vlastnostmi) kopolymery. Ve vodném roztoku se sbalí do struktury, kterou tvoří hydrofobní jádro, sloužící jako rezervoár hydrofobního léčiva, a hydrofilní obal, stabilizující strukturu a zajišťující rozpustnost struktury ve vodě [20].

Dendrimery jsou syntetické polymery složené z mnoha rozvětvených monomerů, které se tvoří radiálně kolem jádra. Přestože se jedná o malé molekuly o velikosti několika nanometrů, což je limitujícím prvkem při inkorporaci většího množství léčiva, jejich rozvětvená struktura jim umožňuje navázání léčiva na vnější povrch struktury. Jejich vnitřní dutina je dobře dostupná, jsou dobře rozpustné ve vodě a monodisperzní, což z nich činí velmi vhodné látky k přípravě nanočásticových nosičů. Funkčnost jejich povrchu je navíc dobře modifikovatelná, díky čemuž mohou nést současně několik různých molekul, například zobrazovací kontrastní látky, ligandy pro specifické cílení a terapeuticky aktivní léčivo, což z nich dělá multifunkční komplexy [20] [21].

Nosiče na bázi lipidů – liposomy

Liposomy jsou kulovité struktury složené z lipidových dvojvrstev, kde vnější dvojvrstva obklopuje centrální prostor. Liposomy jsou schopné inkorporovat do sebe prakticky jakékoliv léčivo bez ohledu na rozpustnost. Jejich povrch může být modifikován navázáním amfifilních látek nebo reaktivních skupin, čímž může dojít ke kovalentní vazbě ligandu ^{[20][23]}. Jejich malá velikost, flexibilita a biokompatibilita jim dává výhodu při průchodu i velmi malými tepnami a endotelovými okénky ^[21].

Virové nanočástice

Několik virů, zahrnujících například parvovirus psů nebo bakteriofágy, bylo vyvinuto pro použití v nanotechnologiích. Viry je možné konjugovat s různými protilátkami a ligandy (např. transferrin, kyselina listová) pro specifické cílení na nádorové buňky. Některé viry mají navíc přirozeně vysokou afinitu k receptorům některých nádorových buněk ^[20].

Uhlíkové nanotrubic

Jedná se o uhlíkové trubičky složené z benzenových kruhů. Mohou být jednostěnné nebo mnohostěnné. Jedná se o malé molekuly s velikostí do 1,5 nm pro jednostěnné a do 50 nm pro mnohostěnné. Jsou zcela nerozpustné ve vodě i jiných rozpouštědlech, vlivem čehož je u nich pozorována zvýšená toxicita. Při *in vitro* inkubaci keratinocytů v přítomnosti vysokých dávek jednostěnných uhlíkových trubic byla pozorována peroxidace lipidů, oxidativní stres, mitochondriální dysfunkce a morfologické změny buněk. Oba typy uhlíkových nanotrubic navíc způsobují agregaci krevních destiček. Při testech na hlodavcích byly pozorovány chronické záněty plic a intersticiální plicní fibróza ^[21].

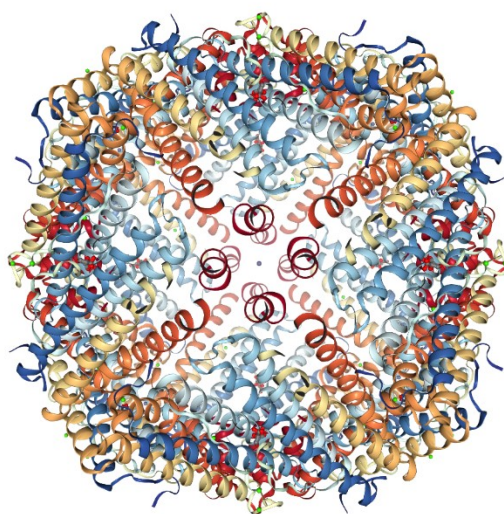
Pomocí chemické modifikace lze však zvýšit rozpustnost nanotrubic ve vodě, čímž dojde ke snížení jejich toxicity. Léčiva vázaná na uhlíkové nanočástice jsou ve srovnání s volným léčivem schopné projít do buněk s výrazně větší efektivitou ^[20].

1.3.1 Apoferritin

Apoferritin je protein z přirozeně se vyskytující rodiny ferritinů, V organismu molekula ferritinu přijímá ionty železa, které jsou oxidovány z oxidačního čísla +2 na +3 a

poté ukládány ve formě hydratovaných hydroxid-oxidů, aby došlo k eliminaci toxicity způsobenou Fentonovou reakcí, která by doprovázela redukci železitých iontů zpět na železnaté ^[5] ^[25]. Ferritiny tedy slouží jako zásobárna železa a transportní protein. Jedna molekula ferritinu je schopná uskladnit až 4 500 iontů trojmocného železa. Kromě železa se mohou enkapsulovat také další kovy, například měď, kobalt nebo gadolinium ^[26].

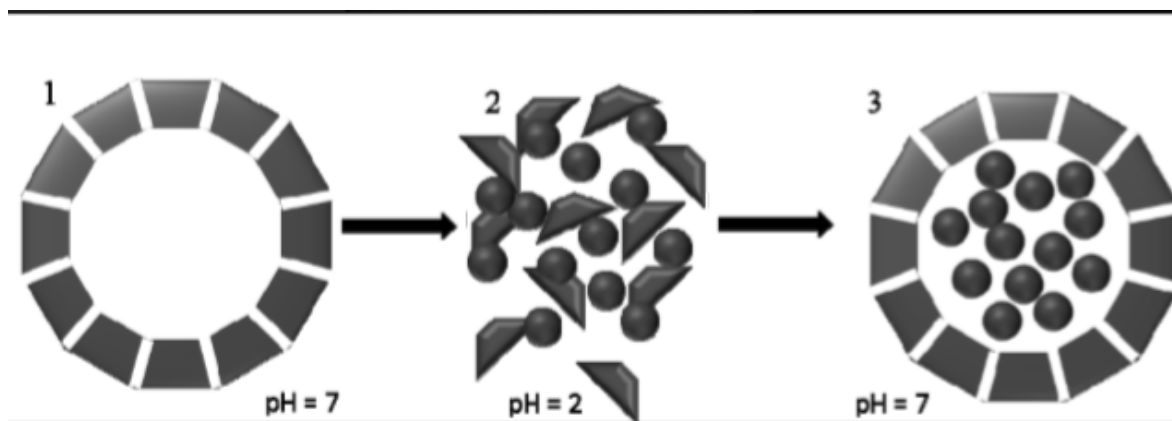
V organismu obsahují ferritiny navázané ionty železa. V jejich struktuře se nachází dutina o průměru 8 nm, ve které jsou ionty železa uskladněny. Uměle připravený ferritin má tuto dutinu prázdnou a je tedy možné do ní vložit požadovanou látku (např. léčivo). Tato forma se nazývá apoferritin. Jedná se o poměrně velký protein s klecovou strukturou, složený z 24 polypeptidových podjednotek dvou různých typů – H a L, mezi nimiž můžeme pozorovat 53 % shodu v sekvenci. Každá podjednotka o hmotnosti kolem 20 kDa vzniká samostatně a je připojena k ostatním pomocí nekovalentních interakcí, čímž tvoří výslednou strukturu molekuly. Předpokládá se, že poměr L/H, který se může lišit, je zodpovědný za různorodost apoferritinů izolovaných z různých tkání ^[27] ^[28]. Struktura apoferritinu je znázorněna na obrázku 1.3.



Obrázek 1.3: Struktura apoferritinu. Převzato z [30].

Struktura apoferritinu je silně závislá na hodnotě pH. Ke složení proteinu dochází za fyziologických podmínek. Při výrazném snížení pH ($\text{pH} \approx 2$) dochází k rozpadu komplexu na jednotlivé podjednotky. Toho se využívá při použití apoferritinu v cílené terapii. Po rozpadu proteinu na podjednotky po snížení pH se do roztoku přidá látka (léčivo), která má

být uzavřena do struktury apoferritinu. Po opětovném zvýšení pH na fyziologickou hodnotu ($\text{pH} \approx 7$) dojde ke znovusložení komplexu, tentokrát už s léčivem uzavřeným ve vnitřní dutině (obr. 1.4) ^{[29] [31]}. Vzhledem k absenci vhodných podmínek pro rozbalení (nízké pH) je zajištěno, že nedojde k nežádoucímu předčasnému uvolnění léčiva ze struktury ^[28].



Obr. 1.4: Znárodnění závislosti struktury apoferritinu na hodnotě pH a uzavření molekul léčiva do vnitřní dutiny struktury apoferritinu. Převzato, upraveno z [31].

Povrch apoferritinu lze snadno modifikovat, čímž mu můžeme dodat vlastnosti, které zjednoduší jeho transport k cílovým tkáním v organismu, a tím dojde ke snížení toxicity pro zdravé tkáně ^[24]. Struktura apoferritinu je navíc vysoce stabilní, díky čemuž přispívá k ochraně enkapsulovaného léčiva proti degradaci. Apoferritin je vysoce stabilní i při biologicky extrémních teplotách kolem 70 °C. Je také schopný vydržet široký rozsah pH (2–10) aniž by došlo k degradaci kvartérní struktury ^[28].

Vzhledem k vysoké stabilitě a schopnosti samosbalení v závislosti na pH je apoferritin hojně využíván v nanomedicině pro transport protinádorových léčiv a také v zobrazovacích metodách, kdy je do dutiny uzavřena kontrastní látka. Apoferritin s enkapsulovaným protinádorovým léčivem (např. doxorubicinem, carboplatinou, cisplatinou apod.) je předmětem testování a klinických studií ^{[28] [32]}.

2. Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je příprava a charakterizace cytostatika cabozantinibu inkorporovaného do nanočástice apoferritinu.

Dílčí cíle byly následující:

- nalezení vhodné rozpouštěcí soustavy pro úplné rozpuštění cabozantinibu
- sledování vlivu koncentrace cabozantinibu na enkapsulaci do apoferritinu
- sledování vlivu pH na enkapsulaci cabozantinibu do apoferritinu
- stanovení stability komplexu apoferritinu s cabozantinibem při teplotách +4 °C a -20 °C po dobu 8 týdnů

3. Materiál a metody

3.1 Přístroje

- analytické váhy: Discovery, Ohaus (*Švýcarsko*)
- třepačka: Thermomixer Eppendorf compact, Eppendorf (*Německo*)
- sonikátor: Ultrasonic Compact Cleaner Teson 1, Tesla (*Česká republika*)
- pH metr: ATI Orion 370 s kombinovanou elektrodou (*USA*)
Hamilton Lab pH Electrode, Sigma Aldrich (*USA*)
- centrifuga: Centrifuge 5418, úhlový rotor, Eppendorf (*Německo*)
- systém na přípravu ultračisté vody: Simplicity 185, Milipore (*Německo*)
- systém HPLC: systém UltiMate 3000, Thermo scientific Dionex (*USA*):
RS Pump, RS Autosampler
RS Fluorescent Detector
RS Diode Arra Detector
RS Column Compartment
RS Degasys
- kolona: Nucleosil 100-5, C18, 250 x 4 mm, 5 µm, Macherey-Nagel (*Německo*)
- program Chromleon
- filtrační mikrozkuhavky: Amicon Ultra-0,5, 3K 96pk, Millipore (*Německo*)

3.2 Chemikálie

- **Sigma Aldrich** (*USA*): apoferritin – equine spleen (50 mg/ml), fenacetin
- **Lach-Ner** (*Česká republika*): HCl, NaOH, CH₃COOH, CH₃COONH₄, methanol, KH₂PO₄, DMSO
- **J.T.Baker** (*USA*): acetonitril
- **LC Laboratories** (*USA*): cabozantinib

3.3 Metody

3.3.1 Příprava vzorků pro testování rozpustnosti

Byly připraveny vodné roztoky o koncentracích 1; 0,75 a 0,5 mg/ml a byl sledován vliv kyselého, resp. zásaditého prostředí na rozpustnost cabozantinibu. Ke třem vzorkům byla přidána 1M HCl a k dalším třem vzorkům o identických koncentracích byl přidán 1M KOH tak, že výsledná koncentrace kyseliny, resp. hydroxidu byla vždy 10 μ l/ml. Poslední vzorek o koncentraci 1 mg/ml byl ponechán bez přídavku kyseliny, resp. hydroxidu.

Další vzorky o koncentraci cabozantinibu 1 mg/ml byly rozpuštěny v čistém methanolu a dále ve 30% směsi DMSO s methanolem. Poslední vzorek o koncentraci 10 mg/ml byl rozpuštěn v čistém DMSO.

3.3.2 Příprava roztoků cabozantinibu vázaného v apoferritinu o různých koncentracích

Zásobní roztok cabozantinibu byl připraven rozpuštěním pevného léčiva v příslušném množství DMSO. K zásobnímu roztoku byla přidána ultračistá voda (29 μ l H₂O na 1 μ l roztoku cabozantinibu), roztok apoferritinu (2 μ l na 1 μ l cabozantinibu) a 1M HCl (cca 0,1 μ l na 1 μ l cabozantinibu). Bylo změřeno pH a případně bylo dále upraveno pomocí 1M HCl na hodnotu v rozmezí 2-4. Roztok byl 15 min inkubován na třepačce při \approx 37 °C. Následně bylo pomocí 1M NaOH upraveno pH na hodnotu více než 7 a roztok byl opět 15 min inkubován. Poté byly roztoky přeneseny do filtrů a stočeny na centrifuze po dobu 5 min při 15 000 rcf. Vzorky byly následně 2x promyty 300 μ l H₂O na centrifuze (5 min při 15 000 rcf, celkem 600 μ l vody). Jednotlivé vzorky byly následně analyzovány pomocí HPLC (viz. kapitola 3.3.4).

3.3.3 Vliv pH na enkapsulaci cabozantinibu do apoferritinu

Při zkoumání vlivu pH na enkapsulaci cabozantinibu do apoferritinu bylo 12 vzorků připraveno stejným způsobem jako v kapitole 3.3.2, s tím rozdílem, že pH bylo při uzavírání upraveno na různé hodnoty v rozmezí cca 7-10.

3.3.4 Stanovení množství enkapsulovaného cabozantinibu pomocí HPLC

Hodnoty byly stanoveny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Bylo smícháno vždy 25 μl vzorku se stejným množstvím acetonitrilu. Vzorky byly následně aplikovány na HPLC, kde byla sledována plocha píku. Podmínky měření na HPLC jsou uvedeny v tabulce 3.1.

Tabulka 3.1: Podmínky HPLC.

Průtok	1 ml
Doba analyzování	8,5 min
Teplota kolony	37 °C
Detekční délka	254 nm
Nástřik	10 μl
Složení mobilní fáze	40 % 5mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 60 % acetonitrilu pH = 5

3.3.5 Sledování stability komplexu cabozantinibu s apoferritinem v čase

Postupem uvedeným v kapitole 3.3.2 byly připraveny vzorky cabozantinibu. Takto připravené vzorky byly po stočení odebrány z filtru, naředěny vodou na 4 ml (na dvojnásobné množství) a přeneseny po 200 μl do 20 uzavíratelných mikrozkušavek, které byly umístěny do lednice, resp. mrazáku. Vzorky umístěné do mrazáku byly nejprve zmrazeny tekutým dusíkem. Vzorky sledované v čase $t=0$ při teplotě $-20\text{ }^\circ\text{C}$ nebyly umístěny do mrazáku, ale byly pouze zmrazeny tekutým dusíkem a ihned rozpuštěny a měřeny. Vzorky byly postupně odebírány v časech 0, 1, 2, 4 a 8 týdnů. Poté byly naředěny 200 μl vody. Ke každému vzorku bylo přidáno 10 μl fenacetinu. 200 μl takto připraveného roztoku bylo přeneseno do filtru a stočeno na centrifuze po dobu 5 min při 15 000 ref. Z filtru i průtoku bylo pro každý vzorek odebráno 20 μl , ke kterým bylo přidáno 20 μl acetonitrilu a následně byly vzorky vyhodnoceny pomocí HPLC.

4. Výsledky

4.1 Sledování rozpustnosti cabozantinibu

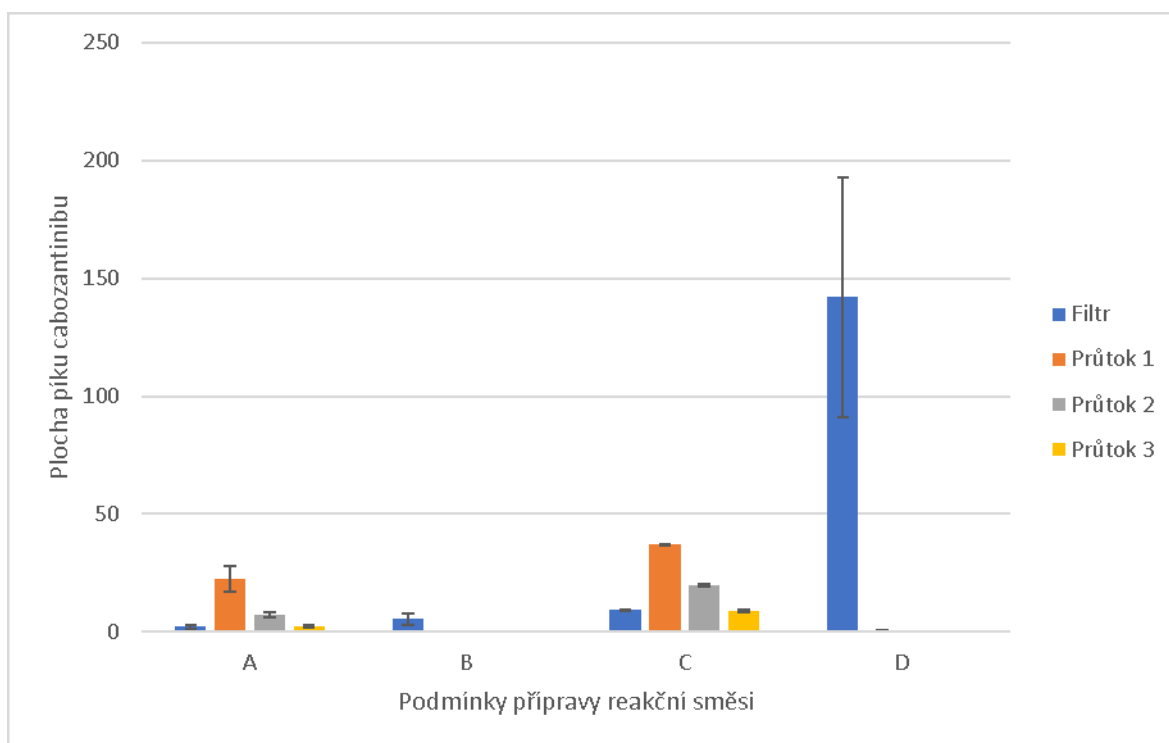
Vzorky pro sledování rozpustnosti byly připraveno podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.1.

Veškeré vzorky cabozantinibu rozpouštěného ve vodě i vzorek rozpuštěný v 30% směsi DMSO a methanolu, obsahovaly sraženiny nebo zákal. V čistém methanolu se cabozantinib nejprve rozpustil, nicméně po přidání apoferritinu a úpravě pH se opět objevila sraženina. Tento postup byl pro kontrolu zopakována s větším souborem vzorků se stejným výsledkem. V čistém DMSO se cabozantinib rozpouští dobře i při koncentraci 10 mg/ml. Dobrá rozpustnost umožňuje použití malého množství DMSO. Smíchání cabozantinibu rozpouštěného v DMSO s vodou vedlo k tvorbě sraženiny, která se ovšem po přidání apoferritinu a okyselení prostředí rozpustila. Pro veškeré další pokusy v této bakalářské práci byl proto vždy vzorek připraven rozpouštěním cabozantinibu v DMSO.

4.2 Vliv reakčních podmínek na enkapsulaci cabozantinibu do apoferritinu

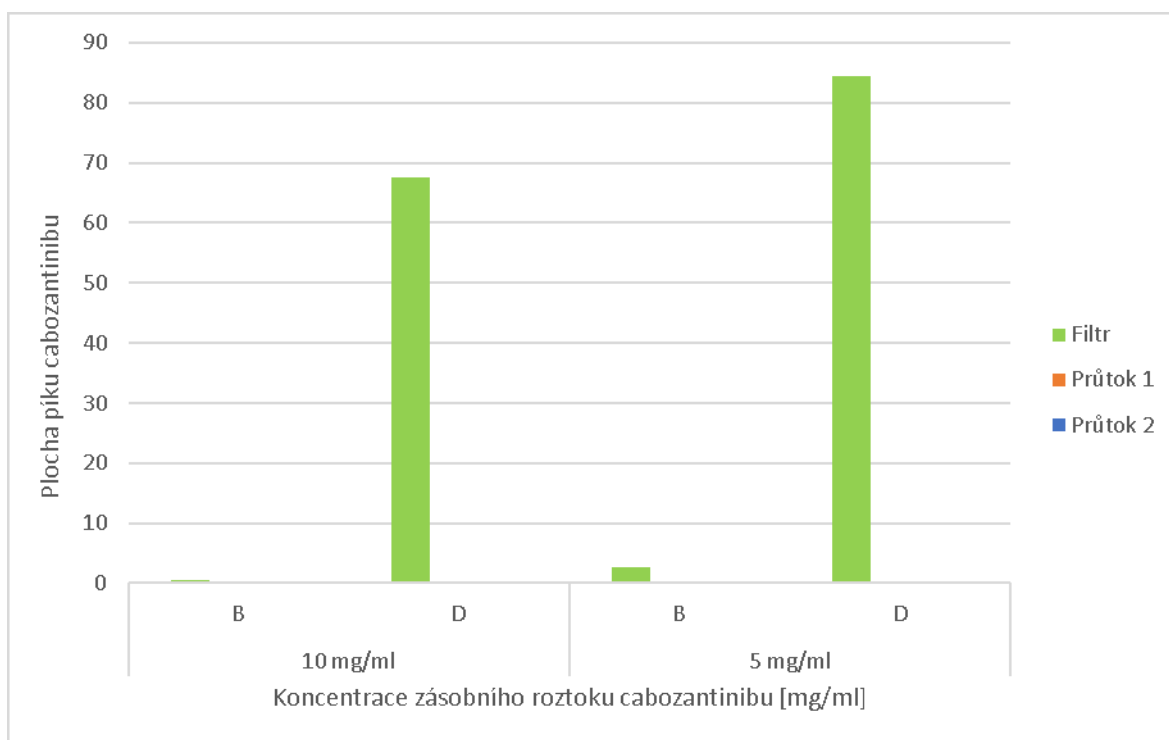
Při studiu vlivu reakčních podmínek byly ve vzorcích A-C vynechány některé z reakčních složek. Vzorek D byl připraven jako kompletní, včetně inkubace. Všechny vzorky byly připraveny jako dublety. Výsledky kontrolního experimentu ukazuje obr. 4.1. Hodnoty uvedené v grafu byly získány pomocí HPLC.

V případě vzorku A, do kterého nebyl přidán apoferritin, se ve filtru nezachytilo prakticky nic. Většina nevysráženého cabozantinibu byla detekována v průtoku po prvním stočení. V případě vzorku B, který obsahoval apoferritin, ale nebyla přidána kyselina ani hydroxid, bylo detekováno velmi malé množství ve filtru, ani jeden z průtoků neobsahoval prakticky nic. Již během přípravy bylo patrné, že se velké množství vzorku vysráželo. Vzorek C obsahoval apoferritin a kyselinu, ale ne hydroxid, takže nedocházelo ke zpětnému uzavření apoferritinu. Přestože se část navázala a zůstala ve filtru, většina cabozantinibu byla detekována v průtocích, zejména po prvním stočení. Vzorek D byl již kompletní, tzn. že obsahoval všechny reakční složky a mezi přidáním kyseliny a hydroxidu byl 15 min inkubován. U vzorků D se veškeré množství cabozantinibu zachytilo ve filtru.



Obr. 4.1: Vliv reakčních podmínek na enkapsulaci cabozantinibu do apoferritinu. Hodnoty v grafu jsou průměrem dvou měření. Vzorek A obsahoval 10 μl zásobního roztoku cabozantinibu (10 mg/ml) v 290 μl H_2O , dále bylo přidáno 1,4 μl HCl a 1,8 μl NaOH, poté byl vzorek 2x15 min inkubován. Vzorek B obsahoval 10 μl zásobního roztoku cabozantinibu (10 mg/ml) v 290 μl H_2O a 20 μl apoferritinu, poté byl 2x15 min inkubován. Vzorek C obsahoval 10 μl zásobního roztoku cabozantinibu (10 mg/ml) v 290 μl H_2O , 20 μl apoferritinu a 1,4 μl HCl, poté byl vzorek 2x 15 min inkubován. Vzorek D obsahoval 10 μl zásobního roztoku cabozantinibu (10 mg/ml) v 290 μl H_2O , 20 μl apoferritinu a 1,4 μl HCl, vzorek byl 15 min inkubován, poté bylo přidáno 1,8 NaOH a vzorek byl opět 15 min inkubován. Hodnoty označené jako „filtr“ představují množství cabozantinibu zachycené ve filtru jako finální vzorek (po stočení a promytí vodou). „Průtok 1“ představuje vzorek, který protekl filtrem po prvním stočení, „Průtok 2“ po 2. stočení (1. promytí vodou) a „Průtok 3“ po 3. stočení (po 2. promytí vodou).

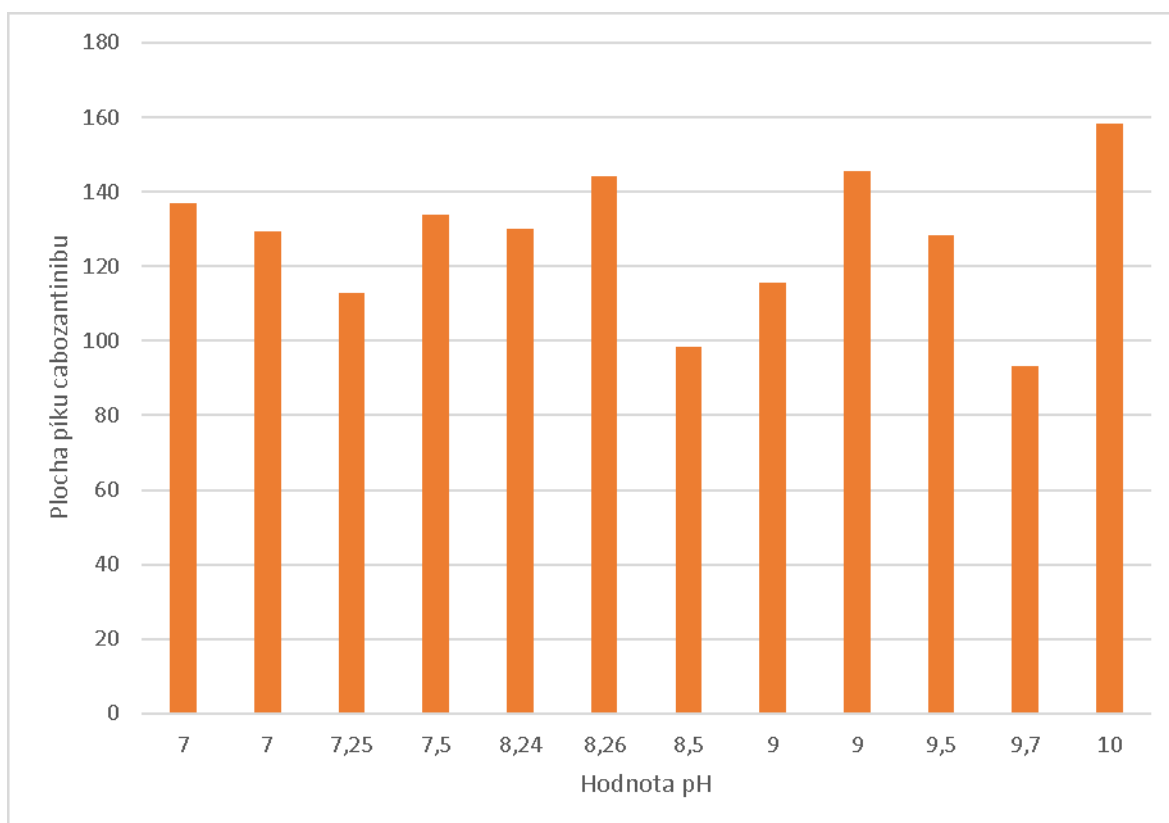
Další kontrolní experiment byl proveden s menší sadou vzorků (viz. obr. 4.2). Byly připraveny pouze vzorky B a D ze zásobních roztoků cabozantinibu o koncentracích 10 mg/ml a 5 mg/ml. Výsledky měření vzorku B pro koncentraci 10 mg/ml i 5 mg/ml ukazují, že ve filtru se téměř nic nezachytává. Zároveň se shodují s výsledky uvedenými v obr. 4.1. V případě vzorků D naopak vidíme, stejně jako v předchozím případě, že se prakticky veškerý cabozantinib zachytil ve filtru.



Obr. 4.2: Vliv koncentrace a reakčních podmínek na enkapsulaci cabozantinibu do apoferritinu. Obsah jednotlivých vzorků a postup jejich přípravy je shodný se vzorky popsány u obr. 4.1.

4.3 Vliv pH na zavření apoferritinového komplexu

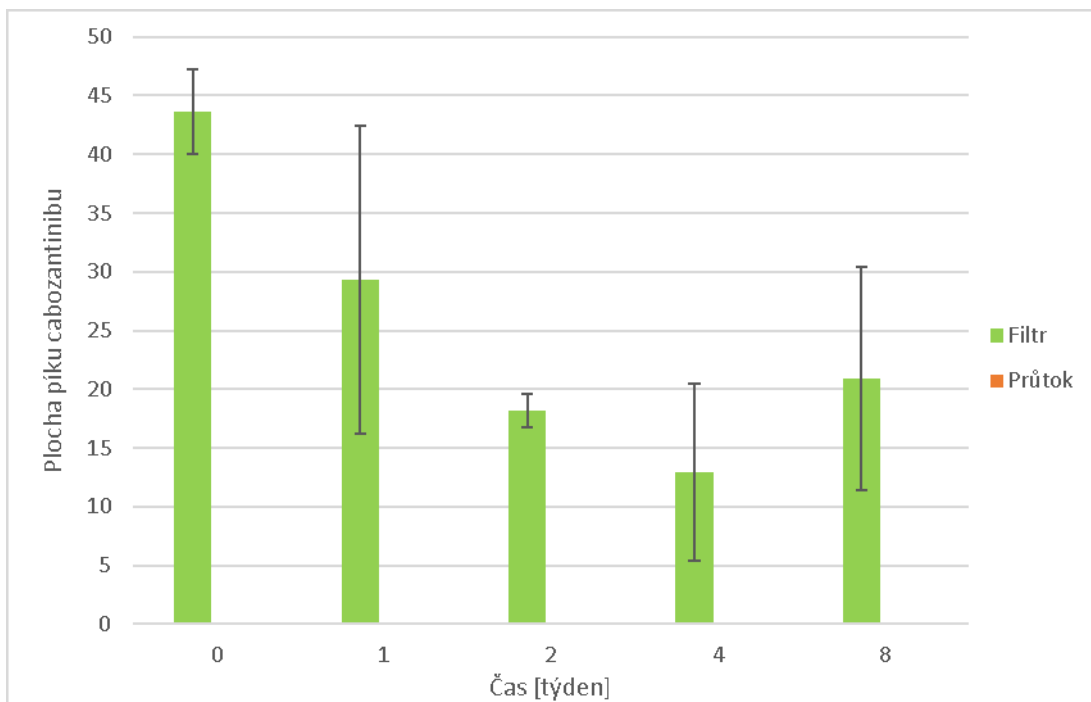
U protirakovinného léčiva vandetanibu byla pozorována lepší schopnost inkorporace léčiva do nanočástice apoferritinu při vyšších hodnotách pH. Tyto výsledky budou součástí diplomové práce Kateřiny Jákové vypracované na katedře biochemie Univerzity Karlovy^[33]. Experiment byl proto proveden i v případě cabozantinibu, kde však podobná závislost pozorována nebyla. Výsledky tohoto experimentu jsou znázorněny na obr. 4.3. Vzorek byl připraven dle postupu uvedeném v kapitole 3.3.3.



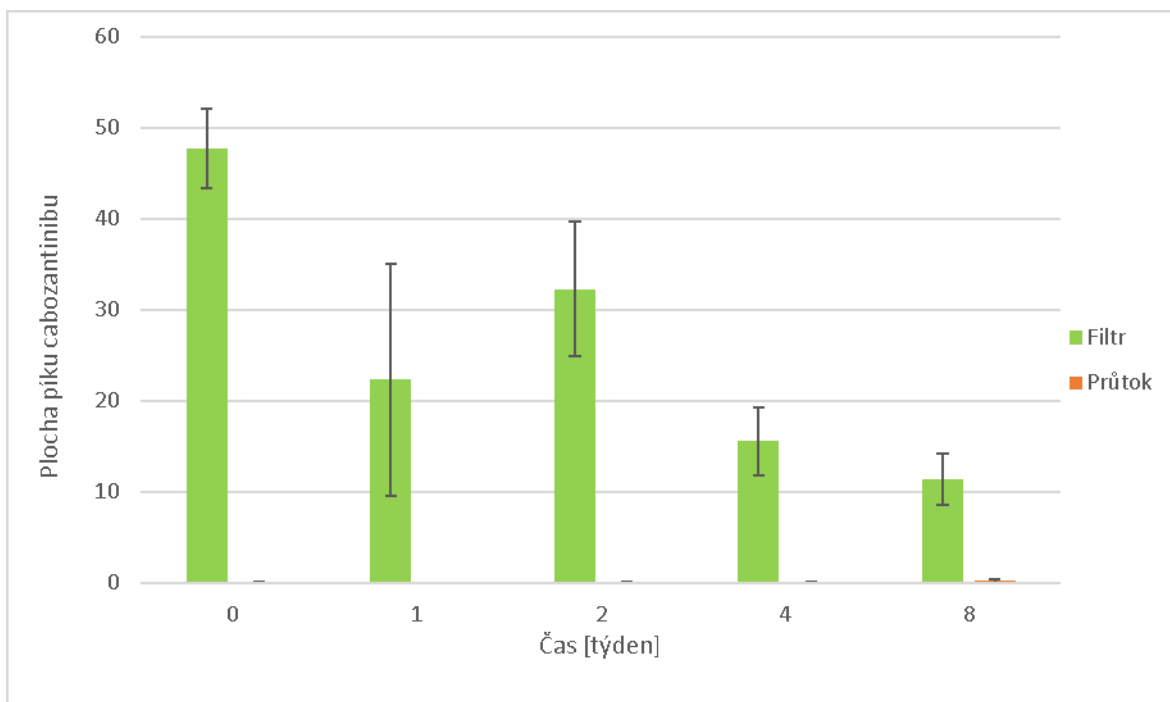
Obr. 4.3: Vliv pH na zavření cabozantinibu do apoferritinu.

4.4 Vliv teploty na stabilitu komplexu apoferritinu s cabozantinibem v čase

Vzorky připravené podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.5 byly po dobu 8 týdnů skladovány při dvou teplotách: +4 °C a -20 °C. Vzorky byly ve vybraných časových intervalech odebrány a bylo v nich stanoveno množství enkapsulovaného cabozantinibu. Výsledky tohoto měření jsou znázorněny na obr. 4.4, který ukazuje množství enkapsulovaného léčiva ve filtru a v průtoku v daných časových intervalech u vzorků skladovaných při -20 °C. Obr. 4.5 ukazuje tyto výsledky pro vzorky skladované při +4 °C.



Obr. 4.4: Závislost množství enkapsulovaného cabozantinibu na čase při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Data použitá v grafu jsou průměrem čtyř hodnot získaných měřením dvou nezávislých vzorků. Pro tyto hodnoty byly spočítány také směrodatné odchylky, které jsou v grafu rovněž znázorněny.



Obr. 4.5: Závislost množství enkapsulovaného cabozantinibu na čase při teplotě $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Data použitá v grafu jsou průměrem čtyř hodnot získaných měřením dvou nezávislých vzorků. Pro tyto hodnoty byly spočítány také směrodatné odchylky, které jsou v grafu rovněž znázorněny.

Obr. 4.4 ukazuje klesající stabilitu vzorků uchovávaných při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorky byly odebrány na počátku experimentu a poté postupně po 1, 2, 4 a 8 týdnech. U vzorků

odebraných v 8. týdnu vidíme nárůst, nicméně při započítání uvedených směrodatných odchylek lze obecně říci, že komplex cabozantinibu s apoferritinem je velice nestabilní a již po jednom týdnu pozorujeme velký pokles množství enkapsulovaného cabozantinibu.

Podobné je to v případě vzorků skladovaných při teplotě +4 °C (obr. 4.5). Zde pozorujeme nárůst při měření ve 2. týdnu, vzhledem k vysoké směrodatné odchylce u výsledků z 1. týdne je však velmi pravděpodobné, že výsledné hodnoty pro 1. a 2. týden jsou velice podobné. Celkově však množství enkapsulovaného cabozantinibu klesá. Již po týdnu jsou naměřené hodnoty více než o polovinu nižší než na počátku experimentu. Stabilita je tedy velice špatná i u vzorků uchovávaných při +4 °C.

5. Diskuze

V předkládané bakalářské práci byl úspěšně připraven komplex transportního proteinu apoferritinu s cytostatikem cabozantinibem, čímž byla potvrzena schopnost apoferritinu enkapsulovat léčivo do své struktury. Pro tyto účely bylo potřeba nejprve nalézt vhodnou rozpouštěcí soustavu, tedy takovou, ve které by se léčivo beze zbytku rozpustilo, ale zároveň nedegradovalo proteinovou strukturu. V případě vandetanibu, který byl zkoumán v rámci bakalářské práce Kateřiny Jáklové vypracované na katedře biochemie Univerzity Karlovy ^[33], bylo zjištěno, že kyselé pH napomáhá rozpouštění léčiva. Stejný postup byl zvolen také v případě cytostatika elliptycinu při jeho enkapsulaci do apoferritinu ^[34] ^[35]. Roztoky cabozantinibu byly proto okyseleny pomocí 1M HCl. Kromě vlivu kyselého prostředí byl testován také vliv prostředí bazického, kdy byl k roztokům přidán 1M KOH. Jako rozpouštědlo byla použita ultračistá voda. Jako další rozpouštědlo byl použit čistý methanol, čisté DMSO a 30% směs methanolu s DMSO. Nejlepší výsledky poskytlo rozpouštění v DMSO, ve kterém bylo po okyselení roztoku i při nízké koncentraci rozpouštědla dosaženo vysoké koncentrace léčiva bez toho, aby došlo k poškození proteinu. V žádné další testované rozpouštěcí soustavě se léčivo rozpustit nepodařilo a ve všech vzorcích se objevily sraženiny.

Při sledování vlivu reakčních podmínek bylo potvrzeno, že všechny uvedené reakční složky a kroky jsou nezbytné pro úspěšné uzavření cabozantinibu do apoferritinu. Ve vzorku A nebyl přítomen apoferritin, samotné léčivo se proto nemohlo zachytit ve filtru a veškeré množství filtrem proteklo. Většina cabozantinibu se vysrážela ještě před prvním promytím, již po prvním stočení a prakticky veškeré zbylé množství proteklo filtrem a nedošlo k jeho zachycení. Bez přidání kyseliny (vzorek B) nedošlo k otevření apoferritinové struktury a nedošlo tedy ani k enkapsulaci cabozantinibu. Většina cabozantinibu se navíc vysrážela již v průběhu přípravy, proto nebyl cabozantinib, s výjimkou malého množství ve filtru, ve vzorcích detekován. Ve vzorku C byla přidána kyselina, takže se apoferritin rozpadl na podjednotky a cabozantinib se mohl navázat. Nebyl však přidán hydroxid, a proto nedošlo ke zpětnému složení apoferritinového komplexu. Část cabozantinibu se navázala i bez uzavření komplexu, k enkapsulaci však došlo pouze s velmi nízkou efektivitou. Většina léčiva protekla během stočení a následujícího promytí a byla detekována v průtocích. Vzorek D byl připraven jako

kompletní – včetně přidání kyseliny i hydroxidu, a došlo tedy k enkapsulaci cabozantinibu do apoferritinu s vysokou efektivitou. Většina cabozantinibu byla proto detekována ve filtru, jelikož v komplexu s apoferritinem filtrem neprotekl. Nezbytnost jednotlivých kroků byla pozorována i u vandetanibu ^[33], ellipticinu^[35] a doxorubicinu ^[35].

V další části experimentu byl sledován vliv pH na uzavření komplexu apoferritinu s cabozantinibem. Ve výsledcích jsou patrné výkyvy, což by mohlo být způsobeno vznikem sraženin v některých vzorcích. Obecně lze ze získaných výsledků soudit, že výsledné pH na uzavření komplexu nemá příliš velký vliv.

V poslední části experimentu byla sledována stabilita připraveného komplexu při teplotě -20 °C a +4 °C po dobu 8 týdnů. Shodný experiment byl proveden s cytostatikem ellipticinem, u kterého byla rovněž sledována stabilita při zmíněných teplotách ^[34]. Stejný pokus s ellipticinem byl proveden také v rámci bakalářské práce Marka Wilhelma vypracované na katedře biochemie Univerzity Karlovy ^[35]. Ellipticin v komplexu s apoferritinem je stabilní při teplotě +4 °C po dobu 10 týdnů a při teplotě -20 °C po dobu cca 1 týdnu, přičemž po týdnu koncentrace klesla zhruba o třetinu ^[35]. Naproti tomu komplex s cabozantinibem je velice nestabilní a již po jednom týdnu jeho koncentrace klesá. Za uvedených podmínek přípravy je tudíž možné použití pouze v krátkém časovém horizontu. Pro dlouhodobé uskladnění léčiva je nutná další optimalizace přípravy.

6. Závěr

Cytostatické léčivo cabozantinib, studované v této bakalářské práci, se v klinické praxi používá pro cílenou léčbu metastazujícího medulárního karcinomu štítné žlázy, pokročilého karcinomu ledvinových buněk a hepatocelulárního karcinomu. Jedná se o látku inhibující tyrosinkinázy. Negativem cytostatických léčiv je jejich nespecifické působení, vlivem čehož dochází k ovlivňování okolních zdravých tkání a vzniku nežádoucích vedlejších účinků. Řešení tohoto problému nabízí nanotechnologie. Nové léčebné postupy využívají nanočástice jako transportéry dopravující léčivo do místa účinku (národu) bez ovlivnění zdravé tkáně. Mezi potenciální nanotransportéry patří například apoferritin, což je protein s klecovou strukturou obsahující dutinu, do které je možné léčivo enkapsulovat a mimo jiné ho tak ochránit před degradací. Výhodou apoferritinu je jeho vysoká chemická stabilita, biokompatibilita a biodegradabilita a snadná manipulace pomocí změny pH. Výhodou je rovněž možnost modifikace povrchu specifickými ligandy pro zacílení na požadovanou tkáň.

Jedním z cílů této bakalářské práce bylo připravit komplex apoferritinu s navázaným cabozantinibem. Tento cíl byl úspěšně splněn, podařilo se enkapsulovat léčivo do dutiny apoferritinu. Na základě výsledků lze říci, že enkapsulace je výsledkem změny pH, kdy je nutno roztok nejprve okyselit, aby došlo k „rozbití“ apoferritinové struktury a navázání léčiva, a následně zvýšit pH pro opětovné složení podjednotek a uzavření apoferritinového komplexu. Efektivita enkapsulace však nezávisí na konečném pH roztoku. Vliv koncentrace cabozantinibu na přípravu komplexu rovněž nebyl pozorován.

Dalším cílem bylo stanovení stability komplexu apoferritinu s cabozantinibem. Z výsledků lze usoudit, že stabilita je velice nízká. Při obou sledovaných teplotách (+4 °C a -20 °C) koncentrace komplexu značně klesá již po prvním týdnu skladování.

7. Seznam použité literatury

- [1] SIEGEL R. L., MILLER K. D., JEMAL A.: Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **69**, 7-34 (2019).
- [2] „What Is Cancer?“ [online]. *National Cancer Institute*, dostupné z: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>, [citováno 6.3.2019].
- [3] „What Is Cancer?“ [online]. *Cancer Research UK*, dostupné z: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer>, [citováno 6.3.2019].
- [4] PÉREZ-HERRERO E., FERNÁNDEZ-MEDARDE A.: Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **93**, 52-79 (2015).
- [5] KOOLMAN J., RÖHM K.-H.: Barevný atlas biochemie, 4. vydání. Grada, Praha (2012).
- [6] GAO J.-X.: Cancer stem cells: the lessons from pre-cancerous stem cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **12**, 67-96 (2008).
- [7] ÚSTAV ZDRAVOTNICKÝCH INFORMACÍ A STATISTIKY ČR: Novotvary 2016 (2016).
- [8] ARORA A., SCHOLAR E. M.: Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **315**, 971-979 (2005).
- [9] BROEKMAN F., GIOVANNETTI E., PETERS G. J.: Tyrosine kinase inhibitors: Multi-targeted or single-targeted? *World Journal of Clinical Oncology*, **2**, 80-93 (2011).
- [10] ADAM Z., KREJČÍ M., VORLÍČEK J. et al.: Obecná onkologie, 1. vydání. Galén, Praha (2011).
- [11] PAUL M. K., MUKHOPADHYAY A. K.: Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer. *International Journal of Medical Sciences*, **1**, 101-115 (2004).

- [12] „Cabozantinib“ [online]. *Drugbank*, dostupné z: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB08875>. [citováno 26.3.2019].
- [13] LACY S., HSU B., MILES D., AFTAB D., WANG R., NGUYEN L.: Metabolism and Disposition of Cabozantinib in Healthy Male Volunteers and Pharmacologic Characterization of Its Major Metabolites. *Drug Metabolism and Disposition*, **43**, 1190-1207 (2015).
- [14] „Cabozantinib“ [online]. *Chemocare*, dostupné z: <http://chemocare.com/chemotherapy/drug-info/cabozantinib.aspx> [citováno 26.3.2019]
- [15] ELISEI R., SCHLUMBERGER M. J., MÜLLER S. P., SCHÖFFSKI P., BROSE M. S., SHAH M. H., LICITRA L., JARZAB B., MEDVEDEV V., KREISSL M. C., NIEDERLE B., COHEN E. E. W., WIRTH L. J., ALI H., HESSEL C., YARON Y., BALL D., NELKIN B., SHERMAN S. I.: Cabozantinib in Progressive Medullary Thyroid Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **31**, 3639-3646 (2013).
- [16] „Cabozantinib“ [online]. *PubChem*, dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cabozantinib#section=Top> [citováno 28.3.2019]
- [17] CHOUERI T. K., HALABI S., SANFORD B. L., HAHN O., MICHAELSON M. D., WALSH M. K., FELDMAN D. R., OLENCKI T., PICUS J., SMALL E. J., DAKHIL S., GEORGE D. J., MORRIS M. J.: Cabozantinib Versus Sunitinib As Initial Targeted Therapy for Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma of Poor or Intermediate Risk: The Alliance A031203 CABOSUN Trial. *Journal of Clinical Oncology*, **35**, 591-597 (2017).
- [18] TRAYNOR K.: Cabozantinib approved for advanced medullary thyroid cancer. *American Journal of Health-System Pharmacy*, **70**, 88, (2013).
- [19] CHOUERI T. K., PAL S. K., McDERMOTT D. F., MORRISSEY S., FERGUSON K. C., HOLLAND J., KAELIN W. G., DUTCHER J. P.: A phase I study of cabozantinib (XL184) in patients with renal cell cancer. *Annals of Oncology*, **25**, 1603-1608 (2014).

- [20] CHO K., WANG X., NIE S., CHEN Z., SHIN D. M.: Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. *Clinical Cancer Research*, **14**, 1310-1316 (2008).
- [21] JONG W. H. D., BORM P.: Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine*, **3**, 133-149 (2008).
- [22] SALATA O. V.: Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of Nanobiotechnology*, **3** (2004).
- [23] GREGORIADIS G., FLORENCE A. T.: Liposomes in Drug Delivery. *Drugs*, **45**, 15-28 (1993).
- [24] DOSTÁLOVÁ S., ČERNÁ T., HYNEK D., KOUDELKOVÁ Z., VACULOVÍČ T., KOPEL P., HRABĚTA J., HEGER Z., VACULOVÍČOVÁ M., ECKSCHLAGER T., STIBOROVÁ M., ADAM V.: Site-Directed Conjugation of Antibodies to Apoferritin Nanocarrier for Targeted Drug Delivery to Prostate Cancer Cells, *Applied Materials & Interfaces*, **8**, 14430-14441 (2016).
- [25] HE D., MARLES-WRIGHT J.: Ferritin family proteins and their use in bionanotechnology. *New Biotechnology*, **32**, 651-657 (2015).
- [26] ZHEN Z., TANG W., TODD T., XIE J.: Ferritins as Nanoplatfoms for Imaging and Drug Delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **11**, 1913-1922 (2014).
- [27] SANTORO C., MARONE M., FERRONE M., COSTANZO F., COLOMBO M., MINGANTI C., CORTESE R., SILENGO L.: Cloning of the gene coding for human L apoferritin. *Nucleic Acids Research*, **14**, 2863-2876 (1986).
- [28] HEGER Z., SKALIČKOVÁ S., ZÍTKA O., ADAM V., KIZEK R.: Apoferritin applications in nanomedicine. *Nanomedicine*, **9**, 2233-2245 (2014).
- [29] CHEN X., WONG S. T. C.: Cancer Theranostics, 1. vydání, Academic Press, USA (2014).
- [30] „Recombinant human H ferritin“ [online]. *Protein Data Bank*, dostupné z: <http://www.rcsb.org/structure/2CHI> [citováno 3.4.2019].

- [31] BLAŽKOVÁ I., NGUYEN H. V., DOSTÁLOVÁ S., KOPEL P., STANISAVLJEVIC M., VACULOVIČOVÁ M., STIBOROVÁ M., ECKSCHLAGER T., KIZEK R., ADAM V.: Apoferritin Modified Magnetic Particles as Doxorubicin Carriers for Anticancer Drug Delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**, 13391-13402 (2013).
- [32] DOSTÁLOVÁ S., VAŠÍČKOVÁ K., HYNEK D., KŘÍŽKOVÁ S., RICHTERA L., VACULOVIČOVÁ M., ECKSCHLAGER T., STIBOROVÁ M., HEGER Z., ADAM V.: Apoferritin as an ubiquitous nanocarrier with excellent shelf life. *International Journal of Nanomedicine*, **12**, 2265-2278 (2017).
- [33] JÁKLOVÁ K.: Příprava léčiv vázaných v nanočásticích pro cílenou léčbu rakoviny: Bakalářská práce PřF UK Praha, katedra biochemie (2018).
- [34] INDRA R., ČERNÁ T., HEGER Z., HRABĚTA J., WILHELM M., DOSTÁLOVÁ S., LENGÁLOVÁ A., MARTÍNKOVÁ M., ADAM V., ECKSCHLAGER T., SCHMEISER H. H., ARLT V. M., STIBOROVÁ M.: Ellipticine-loaded apoferritin nanocarrier retains DNA adduct-based cytochrome P450-facilitated toxicity in neuroblastoma cells. *Toxicology*, **419**, 40-54 (2019).
- [35] WILHELM M.: Enkapsulace doxorubicinu a ellipticinu do apoferritinových nanočástic: Bakalářská práce PřF UK Praha, katedra biochemie (2018).

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka