

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie (B1501)

Studijní obor: BBI (1501R001)



Michal Kraus

Pokroky v chemoterapii a nová protinádorová léčiva

Advances in chemotherapy and novel antitumor drugs

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Marek Kovář, Ph.D.

Praha, 2018

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval svému školiteli RNDr. Marku Kovářovi, Ph.D., za odborné vedení, jeho neskonalou trpělivost, vstřícnost, cenné rady a připomínky při psaní této práce. Dále bych chtěl poděkovat dalším kolegům z laboratoře nádorové imunologie Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i., své rodině a přátelům za poskytnutí příjemného prostředí. V neposlední řadě patří velký dík mému příteli za jeho ohromnou podporu a pomoc.

Prohlášení

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

V Praze, 16. 8. 2018

Podpis:

Michal Kraus

Abstrakt

Nádorová onemocnění jsou po celém světě jednou z hlavních příčin úmrtí. Zatímco se některé typy nádorových onemocnění staly téměř úplně vyléčitelnými, většina maligních nádorů je stále potenciálně smrtelným onemocněním kvůli necitlivosti nádorů ke konvenční chemoterapii nebo značné rozmanitosti nádorových buněk v rámci tumoru a následnému rozvoji rezistence. Základní mechanismus účinku konvenčních protinádorových léčiv se většinou týká buněčného dělení. Poškození DNA, inhibice syntézy a opravy DNA nebo narušení formace dělicího vřeténka jsou nejčastějšími mechanismy. To však znamená, že většina těchto léčiv je obecně cytotoxická pro rychle se dělící buňky, což má za následek řadu nežádoucích vedlejších účinků pro pacienty. Hledání nových protinádorových léčiv, které cílí selektivněji na nádorové buňky, je předmětem zájmu vědeckých pracovníků již mnoho let. Každoročně je popsáno několik stovek nových potenciálních protinádorových léčiv, z nichž některé disponují zatím nepoznaným mechanismem svého účinku. Proces nazývaný *drug repurposing* zkoumá léky, které již byly schváleny pro jiný než onkologický účel, a vede k objevování zajímavých „nových“ látek s protinádorovou aktivitou. Jedním z dalších obecných trendů je posun k rozvoji cílené terapie, která pomalu nahrazuje tradiční cytotoxickou chemoterapii.

Klíčová slova: chemoterapie, cytostatika, nádorové onemocnění, inhibice proliferace, nová léčiva

Abstract

Cancer is among the leading causes of death worldwide. While some types of cancer became almost entirely curable, majority of malignant tumors are still potentially deadly diseases due to unsensitivity of tumors to conventional chemotherapy or diversity of cancer cells within the tumor and subsequent development of resistance. The underlying mechanism of action of conventional antitumor drugs is mostly related to cell division. DNA damage, inhibition of DNA synthesis and repair or disrupted formation of mitotic spindle are the most common mechanisms. However, it implies that most of the drugs are cytotoxic for rapidly dividing cells in general which results in variety of undesirable side effects for patients. Search for novel anticancer drugs targeting cancer cells more selectively has been point of interest of researchers for decades. Hundreds of new potential anticancer drugs are being described every year, some possessing so far unrecognized mechanisms of action. Process called drug repurposing examines drugs that have already been approved for clinical use in other than oncology field and results into discovering of interesting "novel" anticancer agents. Another general trend is represented by shift towards development of targeted therapy which is slowly replacing traditional cytotoxic chemotherapy.

Keywords: chemotherapy, cytostatics, cancer, inhibition of proliferation, novel drugs

Seznam zkratek

5-FU	5-fluorouracil	I-κB	inhibitor NF- κ B
ABC	ATP vazebná kazeta	MDR	mnohočetná léková rezistence
abl	Abelsonův myší leukemický virový homolog onkogenu	MEK	kináza mitogenem aktivované protein kinázy
Akt	protein kináza B	miRNA	mikro ribonukleová kyselina
ALDH	aldehyd dehydrogenáza	mTOR	savčí cíl rapamycinu
AP-1	aktivační protein 1	MTX	metotrexát
ATIC	5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid formyltransferáza/IMP cyklohydroláza	MTX-PG	polyglutamylovaný metotrexát
ATP	adenosin trifosfát	NF-κB	nukleární faktor kappa B
bcl-2	B buněčný lymfom 2	NLRP3	NACHT, LRR a PYD doménu obsahující protein 3
bcr	region zlomu klastru	NPL4	protein lokalizovaný v jádře 4
Bcr-Abl	protein kináza vzniklá fúzí bcr a abl	p53	tumorový protein p53
CTR1	transportér mědi 1	p97	valosin obsahující protein
DHF	dihydrofolát	PEGylace	navázání řetězce polyetylen glykolu
DHFR	dihydrofolát reduktáza	P-gp	P-glykoprotein
Dhh	desert hedgehog	PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
DNA	deoxyribonukleová kyselina	PIKK	kinázy příbuzné fosfatidylinositol-3-kinázám
DPD	dihydropyrimidin dehydrogenáza	PKA	protein kináza A
EGF	epidermální růstový faktor	PKC	protein kináza C
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor	PPAT	fosforibosyl pyrofosfát amidotransferáza
ERK	extracelulární signálem regulovaná kináza	Ptc	patched
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv	Raf-1	RAF proto-onkogen serin-threonin protein kináza
FdUMP	fluorodeoxyuridin monofosfát	Ras	protein potkaního sarkomu
FdUTP	fluorodeoxyuridin trifosfát	RFC	redukovaný folátový přenašeč
FGF2	fibroblastový růstový faktor 2	RNA	ribonukleová kyselina
FPGS	folylpolyglutamát syntetáza	RNR	ribonukleotid reduktáza
FR	folátový receptor	ROS	reaktivní formy kyslíku
FUTP	fluorouridin trifosfát	rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina
GA	geldanamycin	Shh	sonic hedgehog
GABA	gama aminomáselná kyselina	Smo	smoothened
Gli	s gliomem asociovaný homolog onkogenu	src	rodina nerekceptorových tyrozin kináz
GR	glutathion reduktáza	THF	tetrahydrofolát
HAT	histon acetyl transferáza	TMP	thymidin monofosfát
HDAC	histon deacetyláza	TNF-α	tumory nekrotizující faktor alfa
Hh	hedgehog	topo I	topoizomeráza I
Hsp	protein teplotního šoku	topo II	topoizomeráza II
Hsp90	protein teplotního šoku 90	TR	thioredoxin reduktáza
IGF-1	inzulinu podobný růstový faktor 1	tRNA	transferová ribonukleová kyselina
Ihh	indian hedgehog	TS	thymidylát syntáza
IL-1β	interleukin 1 beta	UFD1	ubikvitin fúzující degradační protein 1
IL-8	interleukin 8	v-Src	virová protoonkogenní tyrozin kináza
IMP	inosin monofosfát	Wnt	Wingless/Int-1

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Základy konvenční chemoterapie	8
2.1 Alkylační činidla.....	8
2.2 Antagonisté kyseliny listové.....	9
2.3 Analogy báží.....	11
2.4 Sloučeniny platiny	12
2.5 Mikrotubulární jedy.....	14
2.6 Inhibitory topoizomeráz	16
2.7 Interkalátory.....	17
2.8 Enzymy.....	19
3. Léčiva s novým mechanismem účinku	20
3.1 Inhibice Hsp90.....	20
3.2 Signalizační dráha Sonic hedgehog.....	21
3.3 Inhibice protein kináz	22
3.4 Indukce reaktivních forem kyslíku	24
4. Známá léčiva v nové indikaci	25
4.1 Arsenik.....	25
4.2 Thalidomid.....	25
4.3 Disulfiram.....	26
4.4 Valproát	27
5. Závěr	29
6. Seznam použité literatury.....	30

1. Úvod

První zmínka o nádoru a jeho odstranění pochází již ze starověkého Egypta z Ebersova papyru [1]. O popsání rakoviny jakožto onemocnění se zasloužil řecký lékař Hippokratés, který poprvé použil slovo *karkinos* [2]. Starověký lékař Galén označil zhoubné nádory jako *tumores praeter naturam* [1].

Léčba nádorových onemocnění ve starověku a středověku obnášela většinou pouze chirurgické odstranění nádoru, případně kauterizaci daného místa. Protože však často docházelo k relapsu onemocnění, bylo zřejmé, že je potřeba najít další léčebné metody. Některé tumory byly léčeny sloučeninami arsenu, což ne příliš úspěšně praktikoval i Avicenna [3]. V roce 1865 léčil Heinrich Lissauer pacienta s chronickou myeloidní leukémií Fowlerovým roztokem obsahujícím arsenitan draselný a výsledek byl poněkud uspokojivější [3]. Tato událost může být považována za první efektivní použití chemoterapie, kdy vlastní látka s protinádorovým účinkem je známa a jasně definována, a tudíž může být i přesně dávkována. Sloučenin arsenu je pro léčbu některých leukemií úspěšně využíváno i v posledních letech [4].

V první světové válce byl použit bojový plyn yperit neboli hořčičný plyn. Bylo zjištěno, že u vojáků zasažených tímto plynem dochází k leukocytopenii [5]. V druhé světové válce v roce 1943 došlo k útoku Němců na přístav Bari, ve kterém byly zakotveny lodě převážející náklad chemických zbraní včetně yperitu. Uniklý yperit zasáhl více než osmnáct set osob. Případem se zabýval doktor Stewart F. Alexander, který u obětí opět pozoroval výrazný úbytek leukocytů, a tak navrhl použití této látky pro léčbu leukemie a dalších nádorových onemocnění. Ovšem již rok před tímto útokem testovali Goodman a Gilman účinnost dusíkatého yperitu na léčbu myší leukemie [6]. Jejich výsledky spolu s poznatky Alexandra vedly k použití dusíkatého yperitu v klinické praxi, čímž byl odstartován vývoj chemoterapie, jak ji známe dnes.

Od čtyřicátých let minulého století se z vývoje protinádorových léčiv rychle stal průmysl operující v rádech desítek miliard dolarů. Všemi stupni klinického testování již prošlo mnoho různých látek spadajících do několika velkých skupin definovaných dle mechanismu jejich protinádorového účinku nebo struktury jejich molekul. Cílem této práce bylo vypracovat literární rešerši o látkách používaných v léčbě nádorových onemocnění kategorizovaných na základě mechanismu jejich účinku, a to s důrazem na nová cytostatika objevená a testovaná v poslední cca 30 letech.

2. Základy konvenční chemoterapie

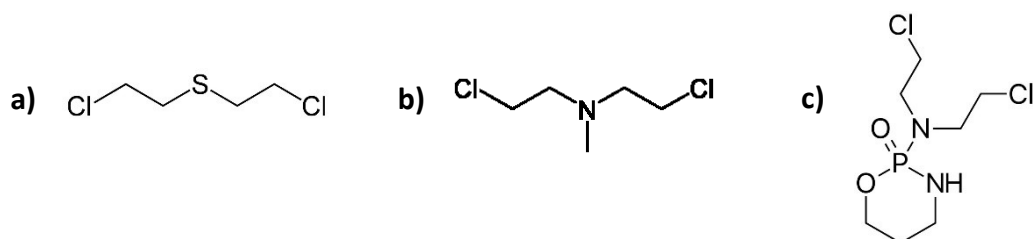
V průběhu několika desítek let bylo objeveno a popsáno mnoho látek, které se staly součástí klasické chemoterapie. Původní léčiva ovšem většinou vykazují příliš vysokou toxicitu, proto jsou vytvářeny jejich deriváty nebo se uplatňují látky jiné struktury s podobným mechanismem účinku.

2.1 Alkylační činidla

Po objevení cytostatického účinku yperitu se středem zájmu staly N-yperity (dusíkaté), které se vyznačovaly obecně menší reaktivitou oproti původním S-yperitům (Obr. 1). Následně proběhla léčba prvního onkologického pacienta v terminálním stádiu onemocnění – konkrétně lymfosarkomu – pomocí dusíkatého yperitu chlormethinu [7]. Lepší výsledek přinesla terapie Hodgkinova lymfomu chlormethinem spojená s ozařováním, kdy došlo k remisi onemocnění, ovšem s množstvím vedlejších účinků [8].

Gilman a Goodman po prvotních úspěších v léčbě leukemie chlormethinem na myším modelu popsali v roce 1946 cytotoxický efekt této látky – dochází ke vzniku reaktivního cyklického intermediátu, který se váže na důležité proteiny a chromatin, čímž je nenávratně poškozuje [8]. Hlavní podstata cytotoxicity ovšem spočívá v alkylaci bází DNA. Vazba alkylu je směřována převážně na N7 guaninu. Tak dochází ke spojení bází v rámci jednoho vlákna (intra-molekulární vazby) nebo spojení dvou vláken (inter-molekulární vazby) (Obr. 2), toto poškození DNA vede k apoptóze [9].

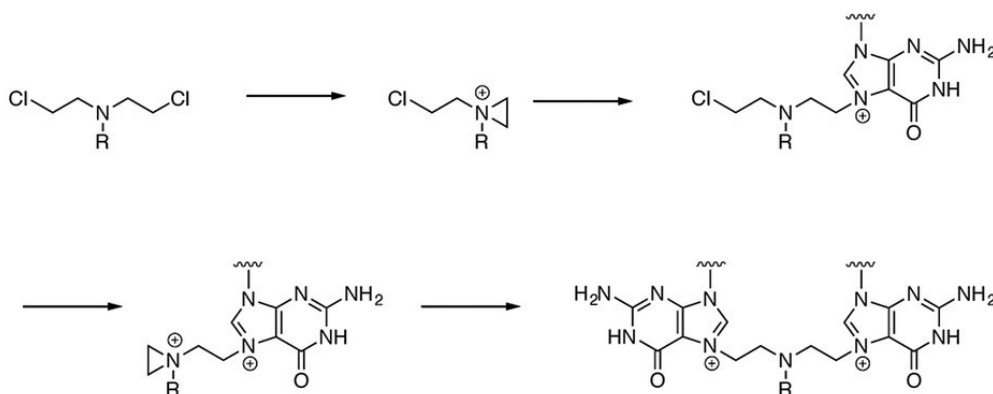
Během následujících let bylo vyvinuto mnoho léčiv fungujících na stejném principu jako původní yperity. Navázáním benzenového jádra na molekulu N-yperitu vznikl chlorambucil používaný pro léčbu chronické lymfatické leukemie [10] spolu s dalším N-yperitem bendamustinem [11]. Melfalan s molekulou fenylalaninu si našel své místo v léčbě mnohočetného myelomu [12]. Mezi další dodnes často používaná chemoterapeutika, především u hematologických malignit, patří cyklofosfamid [13]. Toto léčivo je inaktivní, teprve cytochromem P450 je v organismu cyklofosfamid metabolizován na aktivní látku. Ta může být ovšem redukována aldehyd dehydrogenázou (ALDH), proto buňky disponující tímto enzymem (např. hepatocyty) vykazují vůči cyklofosfamidu rezistenci [9].



Obrázek 1: Alkylační činidla

S-yperit (a), N-yperit chlormethin (b) a novější léčivo cyklofosfamid (c). Převzato z [14-16], upraveno.

Kvůli nespecifické toxicitě vykazují dusíkaté yperity při léčbě mnoho vedlejších účinků. Nejčastější je výše zmíněná leukocytopenie či obecně cytopenie. Dále se vyskytuje alopecie, zvracení nebo neplodnost. V neposlední řadě mají tato léčiva mutagenní potenciál, při léčbě malignity tak paradoxně může dojít k rozvoji jiného nádorového onemocnění [17]. Samotné nádorové buňky si proti yperitům často vytvářejí rezistenci. Mezi nejčastější mechanismy rezistence patří zvýšení efektivity opravných mechanismů DNA nebo hladiny glutathionu, který reaguje s aktivní molekulou léčiva [9].



Obrázek 2: Mechanismus vazby dusíkatého yperitu na N7 guaninu

Po odstoupení atomu chloru dojde k vytvoření reaktivního cyklického intermediátu. Ten se váže preferenčně na N7 guaninu. Druhý alkyl se pak váže na další guanin, a tak dochází k inter-molekulárním a intra-molekulárním vazbám. Převzato z [18], upraveno.

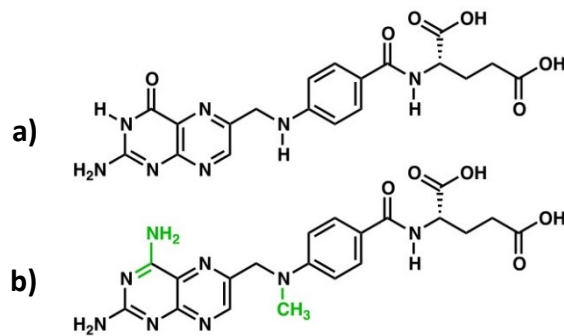
V léčbě nádorových onemocnění se uplatnily i různé deriváty nitrosourey, například karmustin a lomustin [19]. Tyto látky poškozují alkylací nejen DNA, ale i thioproteiny jako thioredoxin reduktázu (TR), glutathion reduktázu (GR) a ribonukleotid reduktázu (RNR) navázáním alkylu na vazebné místo pro thiolát [20]. Díky své lipofilní povaze, a tedy vysoké propustnosti skrze hematoencefalitickou bariéru, je těchto léčiv využíváno pro terapii nádorů mozku [21].

Mezi další léčiva fungující jako alkylační činidla patří mitomycin C, léčivo metastazujících nádorů žaludku [22], temozolomid používaný často pro léčbu glioblastoma multiforme [23] nebo platináty (viz 2.4 Sloučeniny platiny).

Poškozením DNA svou protinádorovou aktivitu zprostředkovává i bleomycin, avšak úplně odlišným mechanismem. Molekula tohoto léčiva totiž za přítomnosti iontu kovu (nejčastěji železa) a molekulárního kyslíku vykazuje enzymatickou aktivitu a štěpí DNA, případně i RNA. Bleomycin je spolu s dalšími DNA poškozujícími látkami součástí léčby některých lymfomů [24].

2.2 Antagonisté kyseliny listové

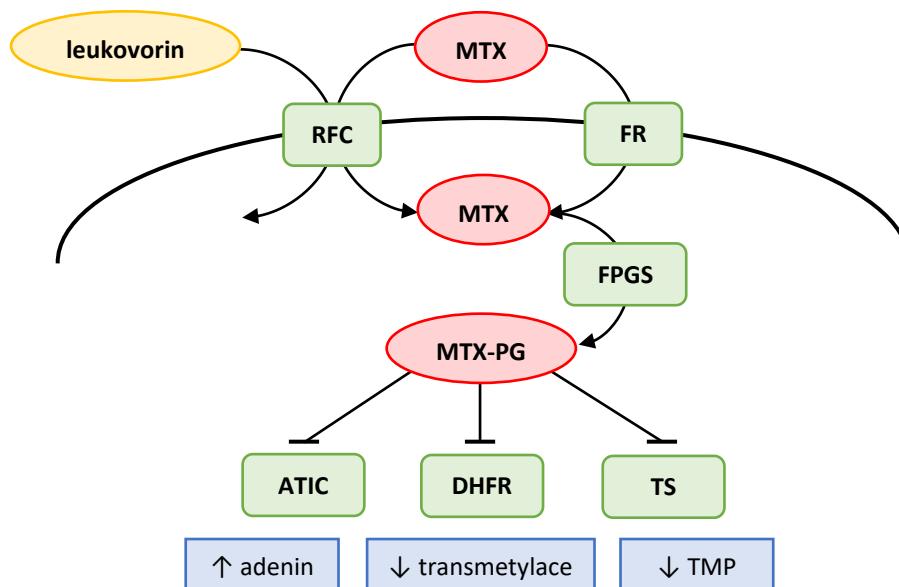
Z dřívějších pozorování bylo zřejmé, že kyselina listová je nezbytným faktorem pro proliferaci buněk hematologického původu [25]. Proto se krátce po druhé světové válce rozhodl Sidney Farber pro léčbu různých nádorových onemocnění právě pomocí derivátů folátu teropterinu a dipterinu [26]. Následně se s větším úspěchem setkala léčba dětí trpících akutní leukemií aminopterinem, dalším derivátem kyseliny listové, kdy došlo alespoň k dočasné remisi onemocnění [27]. V dalších studiích se ovšem Farber věnoval jiné sloučenině fungující jako antagonist folátu – amethopterinu (metotrexát, MTX) (Obr. 3). Mechanismus jeho účinku byl popsán v roce 1958. MTX vstupuje do buňky, kde je polyglutamylován – na postranní řetězec léčiva (kyselinu glutamovou) je navázáno několik dalších molekul glutamátu – což má za následek delší poločas v buňce. Polyglutamylovaný MTX (MTX-PG) inhibuje funkci dihydrofolát reduktázy (DHFR), která redukuje dihydrofolát (DHF) na tetrahydrofolát (THF), nezbytný koenzym při syntéze thyminu a purinů *de novo* [28]. MTX inhibuje i funkci dalších enzymů (Obr. 4). MTX se stal léčivem nejen hematologických malignit, s úspěchem jím byl v roce 1958 vyléčen i choriokarcinom [29].



Obrázek 3: Analog kyseliny listové

Kyselina listová neboli folát (a) a její analog MTX (b). Převzato z [30], upraveno.

Součástí léčby MTX se stal leukovorin, který zvyšuje terapeutický index MTX. Jedná se o analog THF s vyšší stabilitou, může tedy obnovit syntézu thyminu a purinů. Kombinace těchto léčiv dala vzniku tzv. *rescue therapy*, kde je pacientovi podána velmi vysoká dávka MTX po několika hodinách následovaná nízkou dávkou leukovorinu. MTX při vysoké extracelulární koncentraci vstupuje prostou difuzí do všech buněk, kde působí toxicky. Leukovorin v nízké dávce může do buněk vstoupit pouze pomocí specifických přenašečů, které jsou obecně exprimovány více ve zdravých buňkách než nádorových [31].



Obrázek 4: Mechanismus účinku MTX

MTX se do buňky dostává buď přes redukováný folátový přenašeč (RFC), nebo folátový receptor (FR). Poté je polyglutamylován pomocí folylpolyglutamát syntetázy (FPGS). MTX-PG kompetitivně inhibuje DHFR, a tedy redukcí DHF na THF který slouží jako přenašeč uhlíku při transmetylaci. Dále inhibuje funkci thymidylát syntázy (TS) důležité při syntéze thymidin monofosfátu (TMP). MTX také inhibuje enzym ATIC, který tvoří inosin monofosfát (IMP) a jeho pozastavení vede ke zvýšení množství adeninu v buňce. Při *rescue therapy* se využívá leukovorinu, který do buňky vstupuje stejnými přenašeči jako MTX.

MTX se využívá pro léčbu akutní lymfoblastické leukemie, karcinomu prsu nebo plic. Běžnými vedlejšími účinky léčby bývá myelosuprese, mukozitida a nevolnost. Proti tomuto léčivu ovšem často vzniká rezistence. Nádorové buňky se MTX brání snížením jeho polyglutamylace, zvýšením exprese genu kódujícího cílový enzym DHFR, případně změnou jeho struktury, čímž sníží afinitu k MTX. Také může dojít ke snížené expresi folátových přenašečů, tento typ rezistence však překonává *rescue therapy* [32].

Kromě léčby nádorů si díky imunosupresivním účinkům našel MTX uplatnění v léčbě autoimunitních chorob, například revmatoidní artritidy. Inhibicí enzymu ATIC pomocí MTX dojde ke zvýšení intracelulární a extracelulární koncentrace adenosinu. Imunokompetentní buňky pacientů s revmatoidní artritidou díky zvýšenému množství TNF- α exprimují více receptorů pro adenosin. Signalizace skrze tyto receptory má pak protizánětlivý účinek [33].

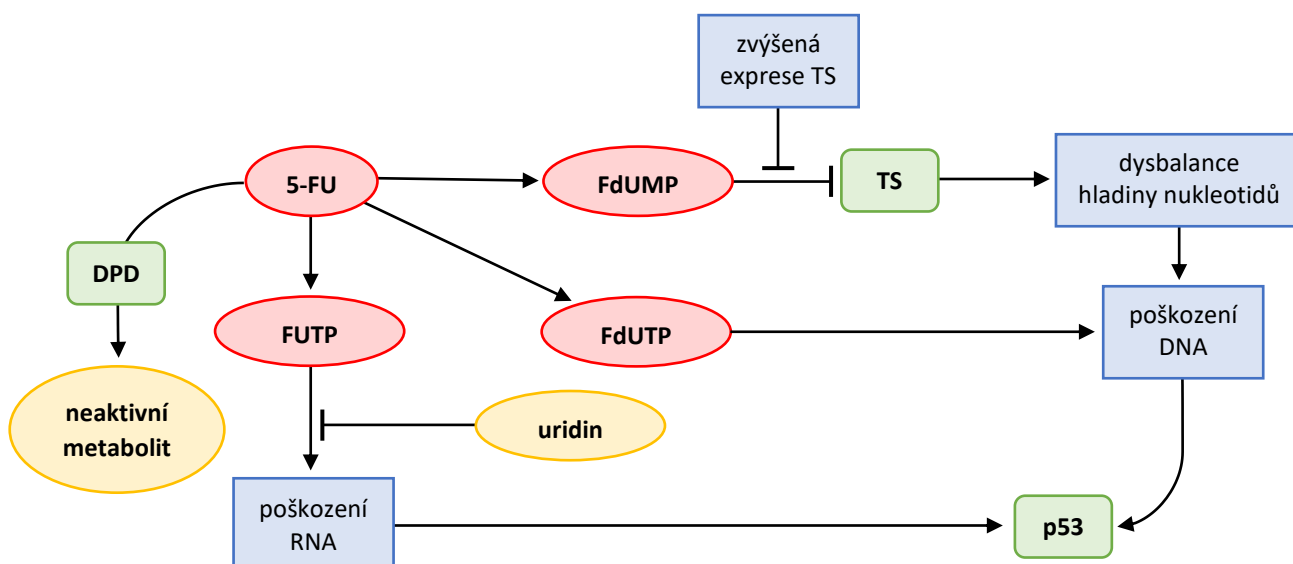
Pro léčbu T-buněčného lymfomu se v dnešní době využívá novějšího antagonisty kyseliny listové pralatrexátu, který vykazuje vyšší účinnost. Oproti metotrexátu se vyznačuje především vyšší afinitou k přenašeči RFC, je tedy efektivněji transportován do buňky [34]. Dalšími folátovými antimetabolity jsou pemetrexed často využívaný pro léčbu nemalobuněčného karcinomu plic [35] a raltitrexed, specifický inhibitor TS, který je účinný v léčbě kolorektálního karcinomu [36].

2.3 Analogy bázi

V roce 1954 byl objeven další typ antimetabolitu, tentokrát fungující jako antagonist syntézy purinových bázi, a to 6-merkaptopurin [37]. Tato látka inhibuje syntézu purinových nukleotidů *de novo*. Kompetuje s hypoxantinem, čímž brání vzniku potřebného nukleosidu [38], nebo je 6-merkaptopurin metabolizován na thio inosin monofosfát, který inhibuje fosforibosyl pyrofosfát amidotransferázu (PPAT) [39]. Účinek 6-merkaptopurinu tedy vede k nedostatku purinových nukleotidů v buňce a následně k apoptóze.

V padesátých letech bylo pozorováno, že některé nádorové buňky inkorporují větší množství uracilu do své RNA než buňky zdravé [40], disponují totiž větším množstvím enzymů metabolizujících uracil na nukleosid. Uracil z extracelulárního prostředí tedy nádorové buňky preferenčně zabudují do RNA, zdravé buňky jej pak spíše katabolizují [41]. Proto se tento mechanismus stal cílem protinádorové terapie a byl vyvinut derivát uracilu nesoucí atom fluoru 5-fluorouracil (5-FU). Tato látka vstupuje do metabolismu pyrimidinových nukleotidů. 5-FU je jednak v játrech metabolizován dihydropyrimidin dehydrogenázou (DPD) na neaktivní látku, dále je po vstupu do buňky 5-FU přeměněn na fluorodeoxyuridin monofosfát a trifosfát (FdUMP a FdUTP), případně fluorouridin trifosfát (FUTP). FdUMP inhibuje TS, což vede ke sníženému množství TMP a celkové změně intracelulární hladiny nukleotidů. To má za následek narušení syntézy a opravy DNA. Další dva metabolity, FdUTP a FUTP, se poté mohou přímo inkorporovat do patřičných nukleových kyselin, čímž ovlivní procesy translace, transkripce nebo replikace. Buňka na tyto změny poté může reagovat spuštěním apoptické dráhy mediované skrze p53 (Obr. 5) [42].

Inhibice TS naznačuje synergistický účinek s MTX. 5-FU se proto velmi často využívá v kombinaci s MTX, leukovorinem, případně dalšími látkami, pro léčbu kolorektálního karcinomu [43]. Vedlejší účinky samotného 5-FU zahrnují neutropenii, nevolnost a průjemy, a to především u pacientů se sníženou hladinou DPD, která 5-FU metabolizuje [44]. Mnoho nádorů na léčbu 5-FU neodpovídá kvůli častému rozvoji rezistence. Buňky mohou zvýšit expresi TS, čímž kompenzují inhibici tvorby nukleotidů, nebo expresi DPD, což vede ke zvýšenému odbourávání léčiva. Vyšší intracelulární hladina uridinu vede k inhibici inkorporace FUTP do RNA. V neposlední řadě, ztráta funkce proapoptického genu p53 vede také k rozvoji rezistence vůči 5-FU [42].



Obrázek 5: Účinek 5-FU na aktivaci p53

5-FU může být DPD přeměněn na neaktivní metabolit. V buňce je 5-FU přeměněn na aktivní metabolity FdUMP, FdUTP nebo FUTP. FdUMP inhibuje TS, což vede k dysbalanci hladiny nukleotidů, a následně k poškození DNA. FdUTP a FUTP mohou být inkorporovány do nukleových kyselin, čímž je poškodí. Poškození DNA i RNA aktivuje p53, což vede k apoptóze. Buňka může účinek metabolitů 5-FU inhibovat zvýšením exprese TS nebo hladiny uridinu.

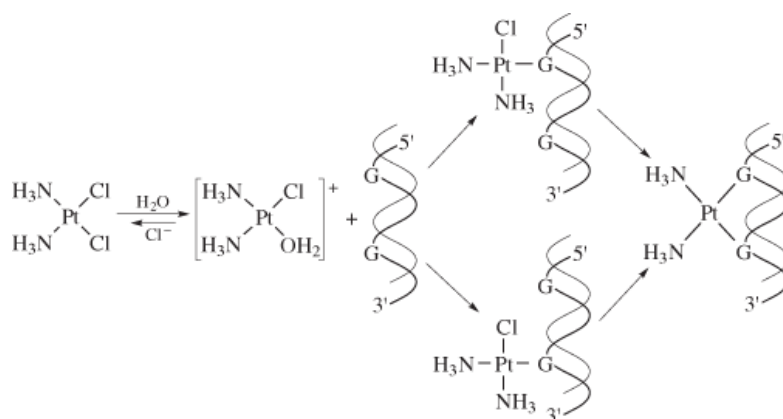
Organické molekuly obsahující fluor jsou v přírodě velmi vzácné. 5-FU je plně syntetickým léčivem, avšak v nedávné době byly nalezeny deriváty 5-FU v mořském houbovci *Phakellia fusca* [45].

V klinické praxi se často k léčbě dalších maligních nádorů, například žaludku nebo prsu, využívá léčivo kapecitabin, karbamát 5-fluorouridinu. Neaktivní kapecitabin prochází zdravou tkání a v nádorové tkáni, kde je vyšší koncentrace potřebných enzymů, je metabolizován na 5-FU. To snižuje celkovou toxicitu léčiva [46]. Spektrum halogenovaných analogů bází používaných pro léčbu malignit je široké. Fludarabin, který má podobu derivátu deoxyadenosin monofosfátu s atomem fluoru, se používá pro léčbu chronické lymfoidní leukemie. Deoxyadenosin s atomem chloru cladribin je léčivem lymfomů. Gemcitabin, deoxycytidin s fluorovanou molekulou ribózy, slouží pro terapii solidních nádorů pankreatu, plic a prsu. Molekula cytosin arabinosidu se od nukleosidu liší přítomností arabinózy místo ribózy a používá se k léčbě chronické myeloidní leukemie. Většina těchto léčiv funguje především na principu inkorporace do DNA a následné inhibice DNA polymerázy [47].

2.4 Sloučeniny platiny

V šedesátých letech minulého století byl zkoumán vliv elektrického pole na růst *Escherichia coli*. Výsledkem bylo překvapivé zjištění, že růst bakterií inhibují sloučeniny platiny vznikající v okolí katod [48]. Tak byla znovuobjevena cisplatina, která byla poprvé popsána Peyronem v roce 1845. Mechanismus cytotoxicity cisplatiny tkví v kovalentní vazbě na purinové báze DNA. Cisplatina se do buňky dostává pomocí přenašečů, jako je transportér mědi CTR1. V intracelulárním prostředí dojde k nukleofilní substituci atomů chloru za molekuly vody. Tento intermediát se váže na N7 guaninu, případně na adenin. Tím dojde k intra-molekulárním nebo inter-molekulárním vazbám v DNA podobně jako u alkylačních činidel (Obr. 6). Propojení vláken DNA a změna jejich struktury vedou k apoptóze [49].

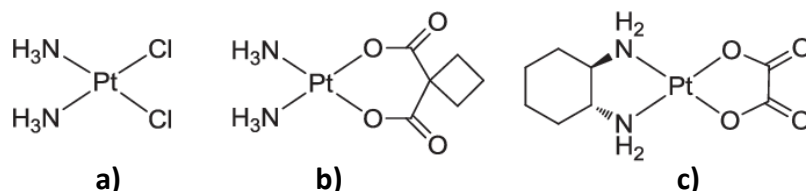
Před objevem cisplatiny činila úspěšnost léčby nádorů zárodečných buněk varlat pouhých 5 – 10 %. Zavedení cisplatiny do klinické praxe znamenalo revoluci v terapii tohoto nádorového onemocnění, pravděpodobnost úplného vyléčení stoupla na více než 75 % [50]. V léčbě nádorů varlat se cisplatina využívá dodnes [51], často v kombinaci s dalšími léčivy se stala součástí chemoterapie nádorů vaječníků, močového měchýře či prsu. Samotná cisplatina je však pro organismus značně toxická, především pro ledviny. Zde dochází k poškození tubulů cisplatinou vazbou jak na jadernou DNA, tak na mitochondrie. Pacientovi se proto při léčbě intravenózně podává velké množství tekutin, aby se zvýšil průtok vody ledvinami a snížilo jejich poškození (tzv. forsírovaná diuréza). Typické je také při terapii tímto léčivem poškození sluchu (ototoxicita). Příčinou ztráty sluchu může být generování reaktivních forem kyslíku (ROS) a snížení množství antioxidantních enzymů ve tkáni vnitřního ucha [52]. Rezistence maligních buněk vůči cisplatině často spočívá ve snížení transportu do buňky. Nádorové buňky vaječniku vykazují sníženou expresi jednoho z přenašečů cisplatiny CTR1 [53]. Cisplatina také ochotně reaguje s glutathionem, proto jeho zvýšené množství v buňkách vede k jejich nižší senzitivě vůči léčivu [54]. Rezistentní buňky mají také lépe vyvinuté mechanismy opravující cisplatinou poškozenou DNA [55].



Obrázek 6: Vazba cisplatiny na DNA

Po tzv. hydrataci (substituce atomu chloru za molekulu vody) se intermediát cisplatiny váže guaninové báze DNA. Dochází k intra-vláknovým (na obrázku) a inter-vláknovým vazbám. Převzato z [56].

Po objevení účinku cisplatiny bylo v následujících letech syntetizováno množství dalších sloučenin obsahujících platínu (Obr. 7). Základním cílem bylo vytvořit sloučeninu s nižší toxicitou pro organismus. Atomy chloru totiž představují snadno odstupující skupinu, což má za následek příliš vysokou reaktivitu molekuly. Tak vznikla karboplatina s nižší toxicitou, avšak i protinádorovou účinností. Novější oxaliplatina se stala častou součástí terapie kolorektálního karcinomu [57]. Satraplatina byla vyvinuta speciálně pro účely orální administrace a v klinických testech dobře účinkuje při léčbě karcinomu prostaty [58]. Další klinicky testovaný derivát, pikoplatina, obsahuje více substituentů okolo centrálního atomu platiny, což má za následek snížení citlivosti k redukci glutathionem [59].



Obrázek 7: Sloučeniny platiny

Cisplatin (a), karboplatin (b) a oxaliplatin (c). Převzato z [60], upraveno.

2.5 Mikrotubulární jedy

V roce 1963 byly z rostliny *Catharanthus roseus* (dříve *Vinca rosea*) izolovány vinka alkaloidy s výraznou protinádorovou aktivitou – vinblastin a vinkristin (Obr. 8) [61]. O pět let později byl nastíněn mechanismus jejich účinku, vinka alkaloidy ovlivňují mikrotubulární struktury v buňce [62]. Konkrétně inhibují polymeraci jednotlivých dimerů tubulinu, čímž zabraňují vzniku mikrotubulárních struktur. Mezi ty patří i dělicí vřeténko nezbytné pro buněčné dělení. Buňka tak nemůže podstoupit mitózu, zastaví se v metafázi buněčného cyklu a spustí apoptózu [63].

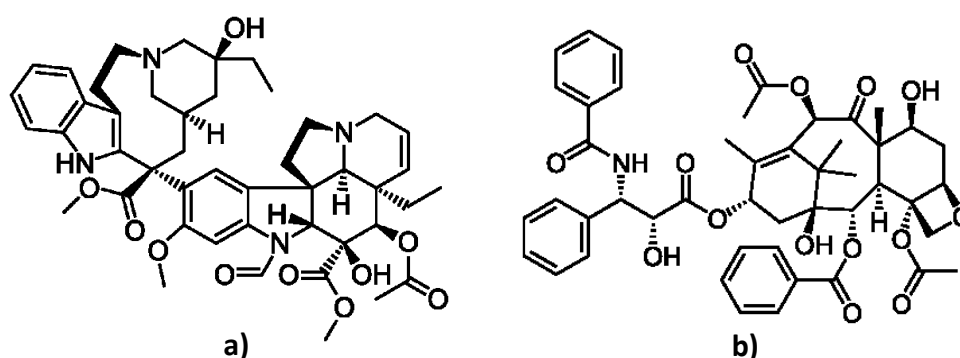
Oba výše zmíněné vinka alkaloidy si našly cestu do klinického využití a dodnes jsou využívány například k léčbě Hodgkinova lymfomu. Během léčby se může objevit neuropatie projevující se například svalovými křečemi nebo změnou citlivosti na různé podněty. Vinka alkaloidy totiž mohou inhibovat polymeraci mikrotubulů nezbytných pro správnou funkci axonů periferních neuronů. Buňky vystavené působení vinka alkaloidů si často vyvíjí rezistenci zvýšením exprese tzv. P-glykoproteinu (P-gp). Jedná se o membránový přenašeč schopný aktivně pumpovat ven z buňky množství pro buňku cizorodých látek. P-gp je nespecifický přenašeč, a proto je schopen snižovat intracelulární koncentraci širokého spektra různých xenobiotik. Vzniká tak fenomén mnohočetné lékové rezistence (MDR), kdy se buňka stává rezistentní vůči mnoha léčivům, se kterými nikdy nepřišla do kontaktu [64]. Vznik MDR je velkým problémem v léčbě nádorových onemocnění.

Po popsání struktury vinka alkaloidů bylo vytvořeno několik semisyntetických derivátů, které vykazovaly nižší toxicitu. V dnešní době je schválen vinorelbin pro léčbu nemalobuněčného karcinomu plic [65] a vindesin jako chemoterapeutikum maligního melanomu [66]. Mezi novější deriváty původních léčiv patří vinflunin s dvěma navázanými atomy fluoru testovaný pro léčbu nádoru urotélia [67].

V šedesátých letech byly také objeveny další přírodní látky interagující s mikrotubulární sítí, taxany. Paklitaxel (Obr. 8) izolovaný z kůry tisovce *Taxus brevifolia* [68] je silně hydrofobní látka, která má své vazebné místo na β -podjednotce tubulinového dimeru, jenž je již součástí vlákna. Svou vazbou stabilizuje zformovaná tubulinová vlákna a zabraňuje procesu depolymerace tubulinu [69], čímž se liší od vinka alkaloidů. Toxicita paklitaxelu opět spočívá v narušení odbourávání tubulinových struktur včetně dělicího vřeténka, zastavení buněčného cyklu ve fázi mitózy a následné buněčné smrti [70].

Paklitaxel začal být využíván pro léčbu solidních tumorů jako karcinomu prsu, vaječníku nebo plic. Značná hydrofobicita molekuly, a tedy téměř nulová rozpustnost ve vodě, byla velkým problémem pro klinická studie, protože používaná rozpouštědla (Cremofor EL) často vyvolávala přecitlivělost a nežádoucí účinky jako nevolnost. Samotný paklitaxel také může často způsobovat neutropenii nebo periferní neuropatii podobě jako vinka alkaloidy [71]. Podstata rezistence některých nádorů vůči paklitaxelu spočívá opět především ve zvýšené expresi P-gp a odstraňování léčiva z intracelulárního prostředí [72].

Dvacet let po popsání paklitaxelu byl představen semisyntetický taxan docetaxel [73]. Lepší rozpustnost této látky měla za následek upuštění od administrace v Cremofor EL, a tedy menší množství vedlejších účinků. Docetaxel je hojně využíván jakožto chemoterapeutikum pro léčbu karcinomu prsu, prostaty a nemalobuněčného karcinomu plic [74]. Nový derivát docetaxelu kabazitaxel je špatným substrátem pro P-gp, díky čemuž může být vhodným léčivem nádorů s rozvinutou MDR [75].



Obrázek 8: Mikrotubulární jedy

Vinkristin (a) a paklitaxel (b). Převzato z [76, 77], upraveno.

Příroda disponuje nepřehledným množstvím cytotoxických látek, z nichž značnou část tvoří sloučeniny interagující s mikrotubulární sítí. Mezi úplně první objevené inhibitory mikrotubulární formace patří kolchicin, který nemá uplatnění ani tak v chemoterapii nádorových onemocnění, jako v léčbě dny. Nízká dávka kolchicinu při tomto zánětlivém onemocnění inhibuje aktivaci NLRP3 inflamazomu, a tedy produkci prozánětlivého cytokinu IL-1 β [78]. Nedávno objevené látky ze skupiny epothilonů, které jsou metabolity myxobakterií, stabilizují mikrotubuly stejným mechanismem jako taxany, avšak s vyšší účinností [79]. Jsou také lépe rozpustné ve vodě, což z nich činí vhodná potenciální chemoterapeutika, například pro léčbu metastazujícího karcinomu prsu [80]. Z mořského houbovce izolovaný discodermolid se dostal do první fáze klinického testování [81], ve vazbě na mikrotubuly kompetuje opět s taxany. Nově popsaných mikrotubuly stabilizujících metabolitů mořských houbovců je však více. Zampanolid je například specifický tím, že se na β -podjednotky tubulinu váže kovalentně. Laulimalid a pelorusid A mají pak své vazebné místo na molekule tubulinu odlišné od taxanů [82].

2.6 Inhibitory topoizomeráz

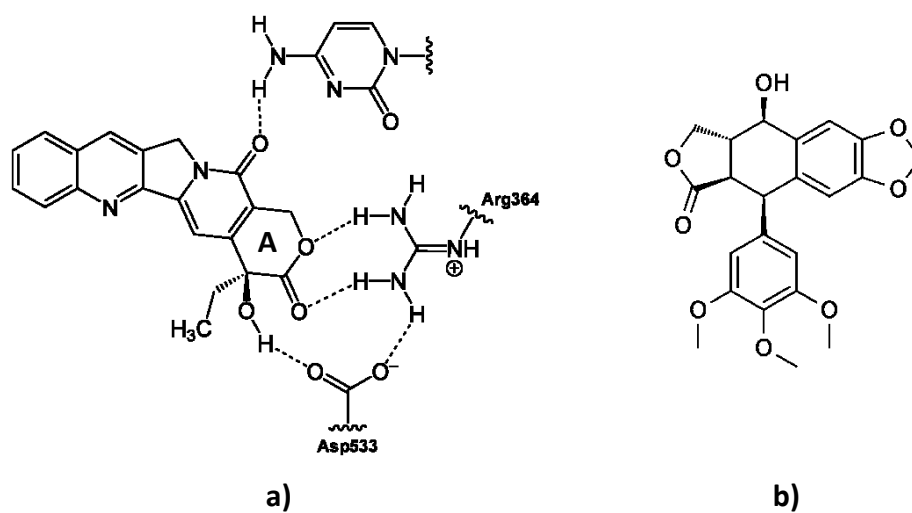
Dalším rostlinným alkaloidem s výrazným cytotoxickým účinkem je kamptothecin izolovaný v roce 1966 z kmene stromu *Camptotheca acuminata* [83]. Kamptothecin interaguje s topoizomerázou I (topo I), která na DNA vytváří jednovláknové zlomy, jimiž projde druhé vlákno a enzym původní vlákno zase zliguje. Tím ubírá nebo přidává nadobrátky na dvoušroubovici DNA [84]. Alkaloid svou vazbou na komplex DNA-topo I zamezí spojení vlákna DNA a disociaci enzymu od DNA. To má za následek mimo jiné zastavení pohybu replikační vidličky, a tím i replikace DNA v S-fázi buněčného cyklu [85]. Na DNA vznikají také jednovláknové zlomy, což vede k apoptóze [86]. Výsledky prvních klinických testů kamptothecinu ale nebyly uspokojující. Špatná rozpustnost ve vodě byla řešena převedením léčiva do jeho sodné soli, což obnáší otevření laktonového cyklu, který je ovšem nezbytný pro funkci této molekuly (Obr. 9) [87]. Léčba samotným kamptothecinem nebyla efektivní, navíc byla zaznamenána vysoká toxicita [88]. Proto byly vytvořeny deriváty kamptothecinu s lepší rozpustností a nižší toxicitou, z nichž dva byly schváleny pro klinické použití – irinotekan a topotekan.

Topotekan je jakožto chemoterapeutikum využíván pro léčbu malobuněčného plicního karcinomu a karcinomu ovaria. Irinotekan má své místo v léčbě nemalobuněčného karcinomu plic a kolorektálního karcinomu. Oproti původnímu alkaloidu kamptothecinu mají topotekan a irinotekan sice nižší toxicitu, přesto se často objevuje myelosuprese [89]. Buňky se derivátům kamptothecinu mohou bránit nejen efektivním snížením jejich intracelulární koncentrace pomocí různých ABC transportérů, ale také například bodovými mutacemi v samotné topo I, které vedou ke znemožnění vazby léčiva [90].

Novější derivát kamptothecinu exatekan prokázal v *in vitro* testech lepší aktivitu než předešlé látky a prošel druhou fází klinických testů v použití pro léčbu nemalobuněčného karcinomu plic [91]. Také byl vyvinut rubitekan vhodný pro orální podání [92].

Součástí medicíny původního obyvatelstva Severní Ameriky byla po dlouhou dobu rostlina zvaná *Podophyllum* [93]. Pryskyřice z této rostliny je pro organismus toxická a dráždí sliznice. Ve čtyřicátých letech minulého století byla urology využívána k léčbě genitálních bradavic [94], čímž byla zjištěna podobnost účinku kolchicinu a pryskyřice z této rostliny na inhibici intenzivně proliferujících buněk [95]. Později bylo opravdu zjištěno, že jedna látka z této směsi, podofylotoxin (Obr. 9), se váže na stejné místo jako kolchicin na podjednotce tubulinu, čímž inhibuje jeho polymeraci [96]. Později syntetizované deriváty podofylotoxinu, epipodofylotoxiny etoposid a teniposid, ovšem prokazovaly naprosto odlišný mechanismus svého účinku, a to inhibici topoizomerázy II (topo II) [97]. Tento enzym vytváří v DNA dvouvláknový zlom, jímž projde druhé dvouvláknové vlákno, následně dojde k ligaci. Tím topo II mění nadšroubovicové vinutí o ± 2 [84]. Etoposid i teniposid po navázání na topo II zabraňují jak průchodu DNA dvouvláknovým zlomem, tak ligaci tohoto zlomu. Tím dojde k poškození DNA generováním dvouvláknových zlomů [98].

Zatímco původní alkaloid podofylotoxin zůstal léčivem genitálních bradavic, etoposid a teniposid jsou dodnes využívány pro léčbu mnoha nádorových onemocnění. Jmenovitě etoposid pro nádory varlat [99], teniposid v kombinaci s dalšími cytostatiky pro akutní lymfoidní leukemii [100]. Oba epipodofylotoxiny mají nescifické vedlejší účinky, jako je výrazná myelosuprese [101]. Podstata rezistence některých nádorových buněk vůči těmto inhibitorům topo II tkví ve zvýšené expresi P-gp i ve změnách exprese a struktury vlastního enzymu [102]. Nově syntetizované deriváty podofylotoxinu dokonce vykazují různé odlišné mechanismy účinku, jsou také schopny efektivně obejít MDR buněk, což z nich činí potenciální aspiranty pro budoucí chemoterapeutika [103].



Obrázek 9: Inhibitory topoizomeráz

(a) vazba kamptothecinu do komplexu DNA-topo I. Pro vazbu je nezbytný uzavřený laktonový cyklus A. (b) molekula podofylotoxinu, inhibitoru topo II. Převzato z [104, 105], upraveno

2.7 Interkalátory

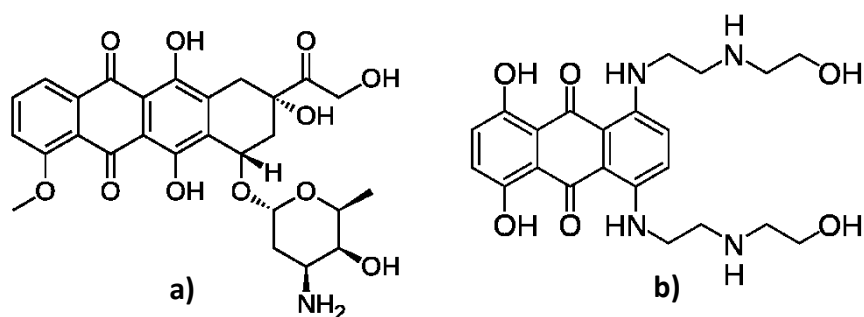
V padesátých letech byly, původně jako antibiotika z kultur bakterií rodu *Streptomyces*, objeveny sloučeniny jménem antracykliny, vykazovaly ovšem výraznou toxicitu pro savčí buňky. Později, v letech šedesátých, byly izolovány dva nejvýznamnější zástupci této skupiny – daunorubicin a následně doxorubicin [106]. Byla zjištěna korelace mezi cytotoxicitou doxorubicinu a množstvím dvouvláknových DNA zlomů v buňkách [107], což nasvědčuje faktu, že antracykliny inhibují topo II. U všech buněčných typů tomu tak ovšem nebylo [108], což znamená, že cytotoxický efekt antracyklinů je zprostředkován více mechanismy. Mezi ně dále patří DNA interkalace a produkce ROS [109]. Typická planární molekula antracyklinů (Obr. 10) se interkaluje mezi páry bází DNA, přičemž cukerná složka napomáhá stabilizaci celého komplexu antracyklin-DNA [110], to má za následek již zmíněnou inhibici topo II nebo zastavení replikace a následnou buněčnou smrt.

Antracykliny jsou dnes jedněmi z nejpoužívanějších chemoterapeutik pro velmi široké spektrum malignit. Doxorubicin se stal nezbytnou součástí léčby karcinomu prsu, různých leukémií, lymfomů, mnohačetného myelomu a řady dalších nádorových onemocnění. Daunorubicin je využíván méně, většinou pro terapii akutní myeloidní leukemie. Přes významné postavení antracyklinových léčiv v konvenční

chemoterapii se vyznačují tyto látky vysokou toxicitou. Vážným problémem je kardiotoxicita, která vzniká z důvodu generace ROS poškozujících kardiomyocyty. Zde je třeba nutně dbát na to, aby nebyla překročena maximální kumulativní dávka léčiva za celý život pacienta. Léčba nejen antracykliny, ale inhibitory topo II obecně, je spjata i s chromozomovými translokacemi, které jsou příčinou rozvoje sekundárních malignit, a to hlavně leukemií [101]. Nádorové buňky se vůči antracyklinům stávají rezistentní mnohými způsoby, především vyšší expresí přenašečů jako P-gp nebo delecí různých proapoptických proteinů jako p53 [111].

Pokrokem v chemoterapii doxorubicinem je změna podání samotného léčiva. PEGylace (navázání řetězce polyetylen glykolu) nebo vložení doxorubicinu do lipozomu prokazatelně snižují jeho toxicitu a v některých případech zvyšují účinnost léčby [101]. Stále jsou vyvíjeny nové antracykliny, například epirubicin s relativně nízkou toxicitou účinný při léčbě karcinomu prsu [112] nebo idarubicin použitelný pro léčbu akutní myeloidní leukemie [113], oba však v kombinaci s dalšími léčivy.

Podobná léčiva, ovšem s planární tricyklickou molekulou, jsou antracendiony (Obr. 10). Za účelem snížení kardiotoxicity byl vyvinut mitoxantron, který nemá v molekule cukerný zbytek, u něž se předpokládalo, že je zodpovědný právě za kardiotoxicitu antracyklinů [114]. Své využití má mitoxantron v léčbě akutní myeloidní leukemie nebo karcinomu prsu a prostaty, kde často s úspěchem nahrazuje původní doxorubicin [115]. Další látkou této skupiny je pixantron, který v současné době podstupuje klinické testování [116].



Obrázek 10: Interkalační činidla

Doxorubicin (a) i mitoxantron (b) se vyznačují polycyklickou planární molekulou. Převzato z [117, 118], upraveno.

Dlouho známé a používané barvivo akridinová oranž vykazuje také chemoterapeutický potenciál. Akumuluje se totiž preferenčně v nádorových tkáních z důvodu jejich vyšší acidity. V buňce je toto barvivo schopné se interkalovat do DNA. Akridinová oranž ukázala v klinickém testování zajímavou účinnost v léčbě osteosarkomu, a to především v kombinaci s fototerapií nebo radioterapií, kdy po ozáření je molekula akridinové oranže excitována a působí na nádorové buňky cytotoxicky [119].

Aktinomycin D je chemoterapeutikum bakteriálního původu používané například pro léčbu Wilmsova tumoru [120]. Jeho molekula je složená z dvou cyklických peptidů a planární tricyklické části, která se interkaluje do DNA, což vede primárně k inhibici transkripce [121].

2.8 Enzymy

Některé nádorové buňky ztratily v procesu maligní transformace schopnost syntetizovat neesenciální aminokyselinu L-asparagin. Tento fenomén byl poprvé pozorován již v padesátých letech minulého století, kdy u myši došlo k regresi nádoru po podání morčecího séra. Následně bylo zjištěno, že sérum morčete obsahuje enzym L-asparaginázu [122], který štěpí L-asparagin na asparagovou kyselinu a amoniak. Nedostatek L-asparaginu tak vede k zastavení proteosyntézy a případně buněčné smrti.

L-asparagináza se dnes používá k léčbě akutní lymfoblastické leukemie. Léčivo nevykazuje výraznou toxicitu, problémem může být hypersenzitivita nebo alergická reakce. Tento problém efektivně řeší PEGylace L-asparaginázy. Leukemické buňky mohou přestat odpovídat na léčbu L-asparaginázou zvýšením exprese asparagin syntetázy [123]. L-asparagináza ztrácí při léčbě svou účinnost také přítomností specifických protilátek blokujících aktivitu enzymu [124].

Na stejném principu je založená terapie L-methioninázou. Methionin je sice esenciální aminokyselinou, zdravé buňky ovšem disponují methionin syntázou, která vytváří methionin methylací homocysteinu. Naproti tomu tento enzym některým nádorovým buňkám chybí, a proto jsou na L-methioninu závislé [125].

Z oocytů severoamerického skokana *Rana pipiens* byla izolována ranpirináza. Jedná se o enzym z rodiny ribonukleáz A. Cílem jeho katalytické aktivity je zřejmě rRNA, tRNA a také miRNA, jejíž hladina bývá v nádorových buňkách zvýšena. Specifický protinádorový účinek ranpirinázy může být způsoben kladným nábojem tohoto enzymu, přičemž metastazující nádorové buňky se vyznačují výraznějším negativním nábojem než buňky zdravé, proto enzym více endocytují. Ranpirináza se dostala do třetí fáze klinických testů v léčbě maligního mezoteliomu [126], do klinické praxe se však nedostala.

3. Léčiva s novým mechanismem účinku

Každoročně je objeveno mnoho látek s protinádorovou aktivitou. Některé z nich dokonce disponují naprosto novým mechanismem svého účinku. Některé tyto látky ovlivňují struktury specifické pro nádorové buňky, díky čemuž se stávají cílenými léčivy.

3.1 Inhibice Hsp90

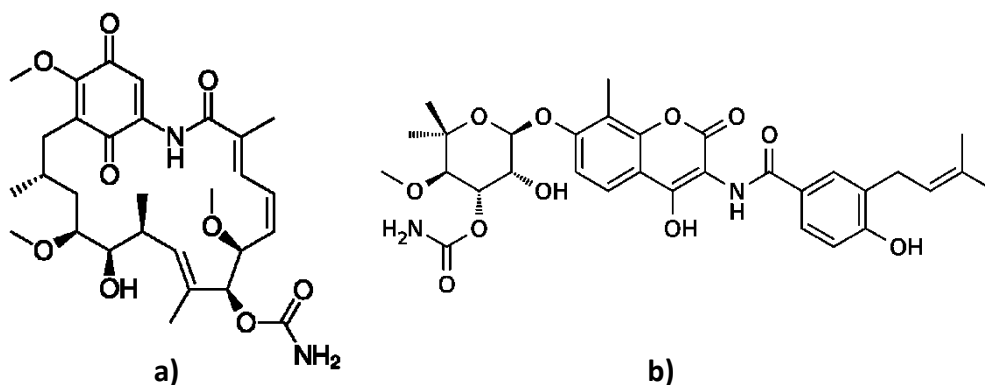
Pro správné fungování buňky jsou nezbytné proteiny teplotního šoku (heat shock proteins, Hsps), které fungují jako chaperony. Napomáhají správnému skládání nově syntetizovaných a poškozených proteinů nebo je stabilizují, především při probíhajícím buněčném stresu. Mezi tyto chaperony patří i heat shock protein 90 (Hsp90), s nímž interagují různé protein kinázy, transkripční faktory, receptory a jiné proteiny [127]. Mnoho typů nádorových buněk se vyznačuje signifikantně zvýšenou expresí Hsp90 oproti buňkám nenádorovým, a to až desetinásobně [128], což činí z tohoto proteinu atraktivní cíl protinádorové terapie.

Na počátku sedmdesátých let byl poprvé izolován z kultury *Streptomyces geldanamycin* (GA) (Obr. 11) [129], který prokazoval protinádorovou aktivitu *in vitro* i *in vivo* [130]. Nejprve byl mechanismus účinku této látky přisuzován inhibici tyrozin kináz rodiny Src, následně bylo zjištěno, že tyto kinázy GA přímo neovlivňuje [131]. Váže se totiž na Hsp90, který s těmito tyrozin kinázami tvoří komplex. GA se váže do N-terminální domény Hsp90, která slouží k vazbě ATP, což mění konformaci tohoto proteinu, a inhibuje tak jeho ATPázovou aktivitu [132].

Hsp90 je však nezbytný pro funkci mnoha dalších proteinů. Takovým příkladem může být Raf-1, který je součástí signalizační kaskády modulující aktivitu různých transkripčních faktorů. Stimul z extracelulárního prostředí (například růstovým faktorem) vede k aktivaci Ras, který dále aktivuje Raf-1. Raf-1 aktivuje fosforylací MEK kinázu, která následně fosforyluje extracelulární signálem regulované kinázy (ERKs). Ty jsou zodpovědné za aktivaci rozličných transkripčních faktorů, jejichž aktivita vede například ke zvýšené proliferaci buněk. Protein Raf-1 funguje pouze v komplexu s Hsp90 a při inhibici Hsp90 pomocí GA je Raf-1 destabilizován a odbouráván, čímž je daná signalizační kaskáda narušena [133]. Hsp90 také stabilizuje proteiny kódované různými onkogeny, například v-Src nebo fúzní kinázu typickou pro buňky chronické myelodní leukemie Bcr-Abl (viz 3.3 Inhibitory protein kináz). Vazba GA na Hsp90 také vede ke zvýšené degradaci těchto proteinů [134].

Derivát GA tanespimycin se dostal do druhé fáze klinického testování u metastatického karcinomu ledvin [135]. Léčivo vykazuje pouze mírnou hepatotoxicitu a nežádoucí účinky jako nevolnost a průjem, ty ovšem mohou být důsledkem použití rozpouštědla dimethylsulfoxidu [136], protože je tanespimycin špatně rozpustný ve vodných roztocích.

Novobiocin (Obr. 11) je antibiotikum inhibující funkci bakteriální gyrázy B. Nicméně bylo zjištěno, že v savčích buňkách je schopen inhibovat Hsp90, váže se ovšem na jiné místo než GA, a to do C-terminální domény vázající ATP [137].



Obrázek 11: Inhibitory Hsp90

GA (a) a novobiocin (b). Převzato z [138, 139], upraveno.

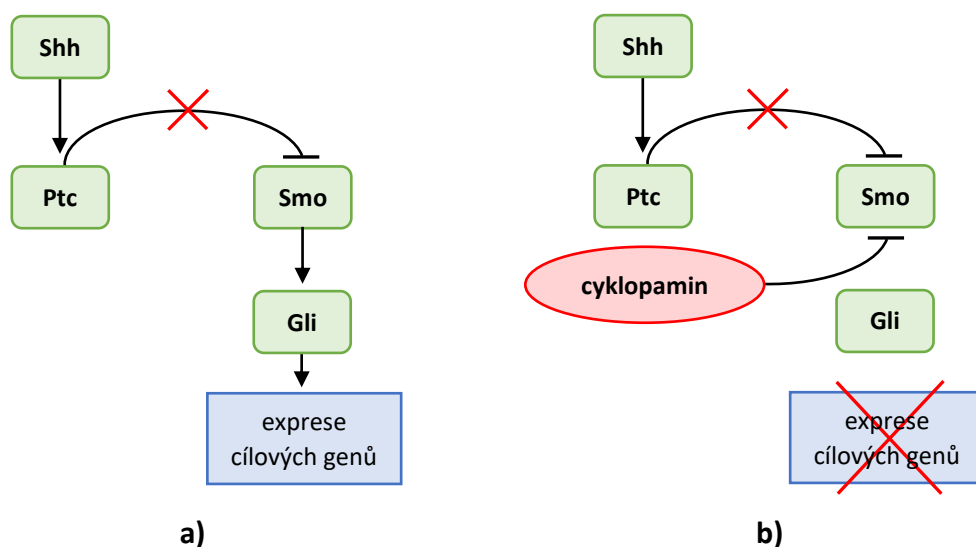
3.2 Signalizační dráha Sonic hedgehog

U larev drozofily byly identifikovány skupiny genů, které jsou nezbytné pro vývoj osy a segmentace těla [140]. Jejich analogy byly popsány i u savců a tyto geny byly pojmenovány hedgehog (Hh). Tento název byl zvolen kvůli vzhledu muších larev, které po eliminaci Hh svými tělními výrůstky připomínaly ježka. Savčí analogy se poté dělí do skupin nesoucích názvy desert hedgehog (Dhh), indian hedgehog (Ihh) a sonic hedgehog (Shh) dle dvou druhů ježků a známé postavičky z videohry [141]. Nefunkčnost Shh vede u savců k nesprávnému vývoji notochordu, tělní osy, končetin a mimo jiné také ke kyklopii [142].

V šedesátých letech byl pozorován výskyt malformací, a to především kyklopie, narozených jehňat, jejichž matky konzumovaly rostlinu *Veratrum californicum* [143]. Později byla popsána látka steroidní povahy způsobující tyto vývojové vady – cyklopamin (Obr. 13) [144]. Bylo potvrzeno, že cyklopamin ovlivňuje signalizační dráhu zprostředkovanou produkty Shh genů [145]. V buňkách maturovaných tkání inhibuje protein patched (Ptc) funkci transmembránového proteinu smoothed (Smo). Ptc funguje jako receptor pro Shh, jehož navázáním je Ptc inaktivován. Tím se aktivuje Smo, který dále aktivuje transkripční faktory skupiny Gli, a tedy expresi příslušných genů [146]. Cyklopamin se váže na protein Smo, čímž inhibuje jeho funkci, a tedy aktivaci downstream transkripčních faktorů (Obr. 12) [147].

Některé nádorové buňky vykazují deregulaci signalizační dráhy Shh [148]. U buněk bazocelulárního karcinomu byly zjištěny inaktivační mutace v genu pro Ptc [149] i aktivační mutace genu kódujícího Smo [150]. Proto byl cyklopamin zvolen jako potenciální protinádorové léčivo. Růst buněk medulloblastomu byl cyklopaminem inhibován *in vitro* a *in vivo* [151].

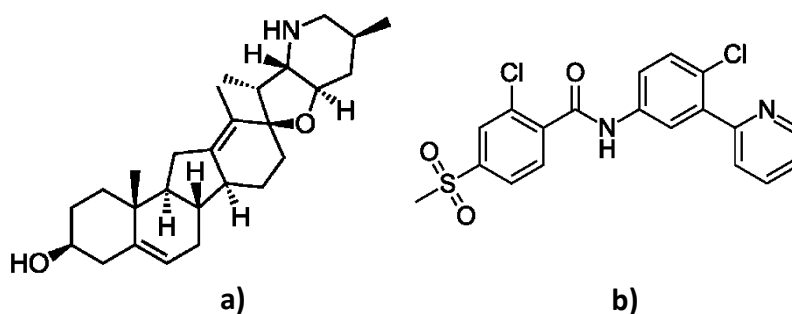
Nízká rozpustnost ve vodě a nestálost v kyselém prostředí byla však překážkou pro použití cyklopaminu v klinických testech, proto byl vytvořen semisyntetický derivát saridegib vykazující lepší farmakologické vlastnosti [152]. Saridegib potvrdil svou účinnost v léčbě různých solidních nádorů včetně špatně léčitelného chondrosarkomu s mírnými vedlejšími účinky zahrnujícími nevolnost a alopecii [153].



Obrázek 12: Účinek cyklopaminu na signální dráhu Shh

(a) Navázáním Shh na Ptc může Smo oddisociovat a následně aktivovat transkripční faktory skupiny Gli ovlivňující genovou expresi. (b) Cyklopamin svou vazbou selektivně inhibuje Smo, což také inhibuje expresi cílových genů.

Strukturálně od cyklopaminu odlišný inhibitor proteinu Smo vismodegib (Obr. 13) prokázal svou účinnost při léčbě bazocelulárního karcinomu [154] i medulloblastomu [155] a v roce 2012 byl schválen FDA jakožto první chemoterapeutikum inhibující signální dráhu Shh.



Obrázek 13: Molekuly inhibitorů signální dráhy Shh

Cyklopamin (a) a vismodegib (b). Převzato z [156, 157], upraveno.

3.3 Inhibice protein kináz

Protein kinázy svou aktivitou regulují velké množství buněčných pochodů. Od první popsané protein kinázy A (PKA) bylo popsáno přes pět stovek dalších enzymů této skupiny. Protein kinázy se dělí na dvě základní skupiny dle fosforylovaného substrátu – tyrozin kinázy a serin-threonin kinázy. Existují ovšem i serin-threonin protein kinázy schopné fosforylovat substrát na tyrozinovém zbytku, stejně tak jako tyrozin kinázy fosforylující na serinu nebo threoninu [158]. Toto rozdělení tedy zřejmě není tak striktní.

Jednotlivé protein kinázy se sdružují do signálních kaskád vedoucích od receptoru až k aktivaci transkripčního faktoru ovlivňujícího expresi příslušných genů. Abnormální exprese, mutace protein kináz nebo deregulace jejich kinázové aktivity, a tedy ovlivnění těchto kaskád, jsou často asociovány s rozvojem maligních nádorových onemocnění [159].

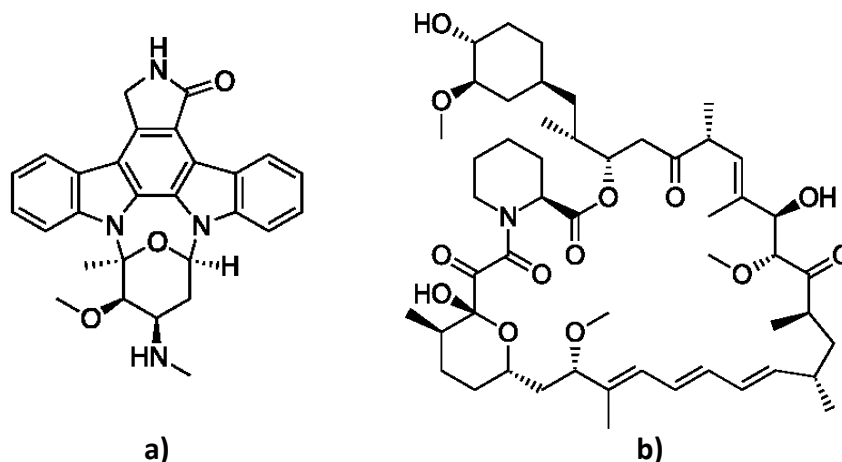
Buňky potřebují k proliferaci stimul z okolního prostředí. Tím může být vazba epidermálního růstového faktoru (EGF) na svůj tyrozin kinázový receptor EGFR, který dále aktivuje kaskádu Ras – Raf-1 – MEK – ERK (viz 3.1 Inhibice Hsp90). Zvýšená exprese EGFR je typická například pro karcinom prsu [160]. Mutace protein kinázy zahrnuté v signalizační kaskádě může mít také za následek její spontánní aktivaci bez nutnosti předchozího signálu, což může vést k maligní transformaci buňky [161]. Inhibice některých protein kináz tedy představuje mechanismus cílené protinádorové terapie. Vývoj léčiv fungujících na tomto principu vyústil v několik desítek schválených a klinicky používaných přípravků.

Při vývoji specifických inhibitorů protein kinázy Abl [162] byla syntetizována látka zvaná imatinib, která se uplatnila především při léčení chronické myeloidní leukemie a některých případů akutní lymfoblastické leukemie [163]. Pro chronickou myeloidní leukemii je typická přítomností filadelfského chromozomu, který v buňkách vzniká translokací chromozomu 22 a 9 v přesně definovaném místě, čímž dojde k fúzi genů bcr a abl. Výsledkem přeskupení je fúzní protein kináza Bcr-Abl, který se vymyká přirozené regulaci a je konstantně aktivní [164]. Imatinib inhibuje kinázovou aktivitu tohoto enzymu kompeticí s ATP [165] a v roce 2001 byl schválen FDA pro léčbu chronické myeloidní a akutní lymfoblastické leukemie.

V roce 1977 byl z kultury *Streptomyces staurosporeus* poprvé izolován alkaloid staurosporin (Obr. 14) s antifungální aktivitou [166]. Vykazoval i protinádorovou aktivitu přisuzovanou velmi účinné inhibici PKC [167] zprostředkovanou vazbou alkaloidu na katalytickou doménu enzymu [168]. Později bylo prokázáno, že staurosporin neselektivně inhibuje řadu dalších protein kináz [169]. Mimo jiné také inhibuje funkci topo II, kdy zabraňuje přenosu fosfodiesterové vazby v DNA na tyrozinové zbytky topo II při štěpení vlákna DNA [170].

V roce 2017 byl derivát staurosporinu midostaurin schválen FDA pro léčbu akutní myeloidní leukemie. Nespecifická inhibice více protein kináz midostaurinem z něj činí vhodné léčivo pro jinak rezistentní buňky, i když se zdá být při vyšších dávkách toxický pro plíce a gastrointestinální trakt [171].

V sedmdesátých letech byl ze vzorku půdy z Velikonočního ostrova izolován sekundární metabolit bakterií *Streptomyces rapamycin* (Obr. 14). Rapamycin vykazoval imunosupresivní a protinádorovou aktivitu, jeho cíl v savčích buňkách byl ovšem popsán o mnoho let později a nazván příznačně savčí cíl rapamycinu (mammalian target of rapamycin, mTOR). Jedná se o serin-threonin kinázu příbuznou s fosfatidylinositol-3-kinázami (PIKK), která je součástí signalizační kaskády PI3K/Akt/mTOR. Tato kaskáda je spuštěna například růstovým faktorem IGF-1 a vede k proliferaci buněk, zvýšení jejich metabolické aktivity nebo inhibici apoptózy, proto je tato signalizační kaskáda často deregulována v nádorových buňkách [172]. mTOR je tak atraktivním cílem pro protinádorovou terapii. Původní inhibitor mTOR rapamycin (sirolimus) se uplatnil především v potlačení reakce štěpu proti hostiteli při transplantacích. Jeho deriváty everolimus a temsirolimus jsou však úspěšně využívány například v léčbě nádorů ledvin [173].



Obrázek 14: Inhibitory protein kináz

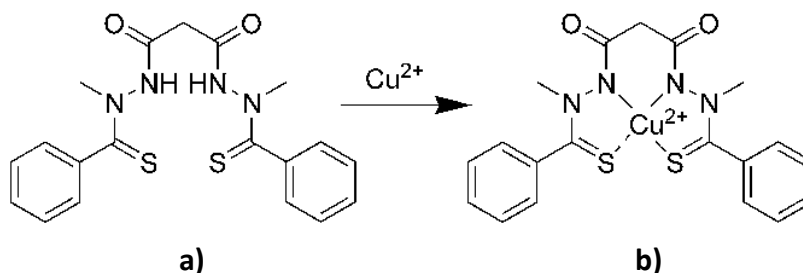
Staurosporin (a) a rapamycin (b). Převzato z [174, 175], upraveno.

3.4 Indukce reaktivních forem kyslíku

Reakce probíhající v mitochondriích a peroxizomech jsou místem vzniku velkého množství ROS. Tyto látky slouží v buňce k eliminaci patogenů, napomáhají rozvoji zánětu nebo mohou kovalentně modifikovat proteiny sloužící k přenosu signálu. Zároveň ale způsobují oxidativní poškození DNA, proteinů a lipidů vedoucí k apoptóze. Nádorové buňky se vyznačují zvýšeným množstvím ROS [176]. Generace ROS může být proto cílem protinádorové terapie. V nádorových buňkách je kvůli vyšší základní hladině ROS snazší jejich další tvorbou překročit pro buňku neúnosnou mez, následné poškození poté vede k apoptóze [177].

Mnohé organické sloučeniny tvořící komplexy s atomem mědi prokazují cytotoxický účinek generováním ROS, které následně poškozují struktury v buňce [178]. Elesklomol, nové potenciální protinádorové léčivo, funguje jako chelátor mědi (Obr. 15). V extracelulárním prostředí dojde k navázání Cu^{2+} . Tento komplex je transportován do mitochondrie, kde dojde k uvolnění atomu Cu^{2+} , který reaguje s komponenty elektron transportního řetězce. Dochází k redukci Cu^{2+} na Cu^+ za vzniku ROS a následného oxidativního stresu. Elesklomol je poté vyloučen ven z buňky, kde může opět navázat atom Cu^{2+} [179]. Zvýšená míra oxidativního stresu pak vede k apoptóze [180].

Léčivo bylo v první fázi klinického testování v terapii akutní myeloidní leukemie velmi dobře tolerováno a nevykazovalo signifikantní toxicitu [181].



Obrázek 15: Molekula elesklomolu a chelace mědi

Elesklomol (a) vytváří koordinačně kovalentní vazbu s atomem mědi (b). Převzato z [182], upraveno.

4. Známá léčiva v nové indikaci

U některých léčiv vytvořených původně pro jiné účely byla v posledních letech objevena výrazná protinádorová aktivita. Protože jsou tyto látky často používány již mnoho let, jejich metabolismus a vedlejší účinky bývají dobře popsány. To spolu s jejich nízkou cenou činí z procesu *drug repurposing* atraktivní odvětví vývoje protinádorových léčiv.

4.1 Arsenik

Sloučeniny arsenu jsou známé a terapeuticky používané více než 2400 let. Ve středověku byl arsenik (oxid arsenitý, As_2O_3) často využíván jako jed, byl jím zřejmě otráven například Napoleon. V 15. století postuloval William Withering, že nejlepším lékem jsou jedy podávané v malých dávkách. V 18. století poté vytvořil Thomas Fowler roztok hydrogenuhličitanu draselného a arseniku, který se několik dalších staletí používal pro léčbu různých chorob. V devatenáctém století se Fowlerův roztok stal součástí léčby leukemií. Paul Ehrlich ve 20. století syntetizoval organickou sloučeninu arsenu salvarsan následně používanou pro léčbu syfilitidy. Arsenik se opět dostal do popředí až poměrně nedávno, kdy byla zjištěna jeho účinnost při léčbě akutní promyelotické leukemie [183].

Arsenik zprostředkovává svou protinádorovou aktivitu více způsoby, základním principem je ovšem kovalentní modifikace proteinů na aminokyselinových zbytcích obsahujících síru. To má za následek například snížení množství antiapoptického proteinu bcl-2 v buňce. Dále inhibici glutathion peroxidázy, a tedy zvýšení hladiny ROS, což vede k poškození buňky a apoptóze. Arsenik také indukuje diferenciaci promyelotických buněk, čímž snižuje jejich proliferační potenciál, nebo potlačuje proces angiogeneze [184].

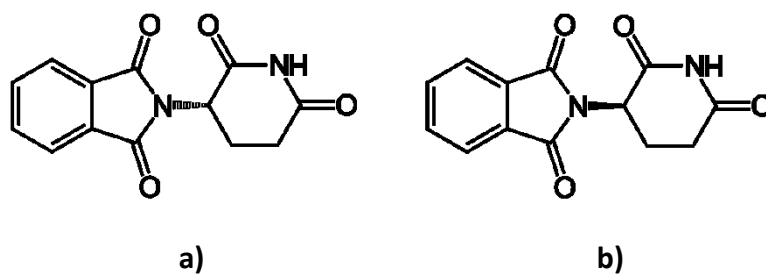
Účinnost arseniku v léčbě akutní promyelotické leukemie vedla v roce 2000 k jeho schválení FDA pro terapii tohoto onemocnění. Ačkoliv je obecně arsen příčinou mnoha akutních i chronických otrav, léčba nízkými dávkami arseniku nevykazuje výraznou toxicitu ani myelosupresi častou pro jiná cytostatika. Klinicky testované jsou i organické sloučeniny arsenu, například darinaparsin, který vykazuje potenciál v léčbě solidních tumorů [185].

4.2 Thalidomid

Na konci padesátých let minulého století byl objeven sedativní účinek thalidomidu. Látka vykazovala minimum vedlejších účinků, a proto se brzy stala nejprve v Německu, poté i v dalších zemích, velmi oblíbeným léčivem pro potlačení ranní nevolnosti. Thalidomid se stal snadno dostupným lékem, který byl často užíván těhotnými ženami. Následně se ovšem projevíly teratogenní účinky thalidomidu. Více než deset tisíc dětí se narodilo s vrozenými vývojovými vadami, především fokomelií [186]. Molekula thalidomidu se vyskytuje ve dvou enantiomerech, přičemž (+)-(R)-thalidomid má sedativní účinky, zatímco (-)-(S)-thalidomid je teratogenní (Obr. 16). Léčivo se ovšem podávalo jako racemická směs a v organismu často dochází ke konverzi těchto dvou enantiomerů [187].

Po tomto neštěstí a následném stažení z trhu bylo zjištěno, že thalidomid inhibuje proces angiogeneze indukovaný FGF2, což je zřejmě jednou z příčin jeho teratogenního účinku [188]. Thalidomid totiž inhibuje funkci transkripčního faktoru NF- κ B, a to indukcí ROS nebo potlačením I- κ B kinázy [189, 190]. NF- κ B je zodpovědný mimo jiné za expresi FGF2 nebo například prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-8. Mezi další potenciální mechanismy účinku této látky patří interakce s proteinem Cereblon, který je součástí ubikvitin ligázového komplexu. Vazbou thalidomidu na Cereblon dojde k omezení ubikvitinylace proteinů, a tedy jejich degradace [191].

Široké spektrum cílů aktivity thalidomidu má za následek jeho imunomodulační a protinádorovou aktivitu. Především ovlivnění exprese cytokinů stálo za uplatněním thalidomidu v léčbě *erythema nodosum leprosum*, zánětlivé komplikace lepry [192]. Thalidomid byl dále schválen v léčbě mnohočetného myelomu, kde se uplatňuje ovlivnění exprese cytokinů, potlačení procesu angiogeneze i inhibice ubikvitinylace, a tedy degradace proteinů. Nejčastějším vedlejším účinkem léčby je sedace pacienta, dále se často objevuje periferní neuropatie [193]. O něco lepších výsledků a nižší toxicity v léčbě mnohočetného myelomu dosáhly deriváty thalidomidu lenalidomid a pomalidomid [194].



Obrázek 16: Enantiomery thalidomidu

Molekula thalidomidu a její dva enantiomery, teratogenní (-)-(S)-thalidomid (a) a sedativní (+)-(R)-thalidomid (b). Převzato z [195], upraveno.

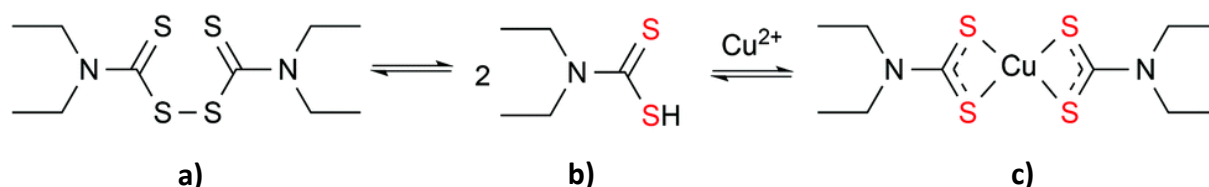
4.3 Disulfiram

Pro léčbu chronického alkoholismu je po mnoho desetiletí používán disulfiram. Jedná se o dithiokarbamát, který je v organismu metabolizován na sulfoxid vázající se na cystein v aktivním centru ALDH, čímž ireverzibilně inhibuje její funkci [196]. Etanol je po požití metabolizován na acetaldehyd a následně kyselinu octovou pomocí ALDH. Inhibice tohoto enzymu tedy vede k akumulaci acetaldehydu. Intoxikace acetaldehydem je mimořádně nepříjemná, její projevy zahrnují bolesti hlavy, nevolnost, zvracení, celkovou slabost nebo potíže s dýcháním [197]. To vede pacienta k vytvoření podmíněného reflexu.

Disulfiram se ovšem vyznačuje i protinádorovou aktivitou [198]. Metabolit disulfiramu tvoří komplex s atomem Cu^{2+} (Obr. 17), který může vstoupit do intracelulárního prostředí [199]. Organické sloučeniny tvořící měďnaté komplexy jsou schopné inhibovat funkci proteazomu [200]. Starší studie také uvádí, že disulfiram inhibuje chymotrypsinovou aktivitu 20S proteazomu, což má za následek nahromadění ubikvitinylovaných proteinů v buňce a následnou apoptózu. [201]. Disulfiram ovšem ovlivňuje spíše proteiny upstream od samotného proteazomu. Proteiny určené k degradaci jsou po označení ubikvitinem

často stále zakotveny v membráně nebo jsou součástí proteinového komplexu. K jejich uvolnění a následnému transportu do proteazomu je potřeba p97-NPL4-UFD1 segregázy. Součástí tohoto proteinového komplexu je kofaktor NPL4 vázající ubikvitin [202]. Metabolit disulfiramu s navázaným Cu^{2+} se váže na NPL4, čímž způsobuje jeho chybnou agregaci s p97 a inhibici funkce celého komplexu [203].

V současné době probíhá druhá fáze klinického testování disulfiramu pro léčbu metastazujícího karcinomu prsu.



Obrázek 17: Chelatace měďnatého kationtu metabolitem disulfiramu

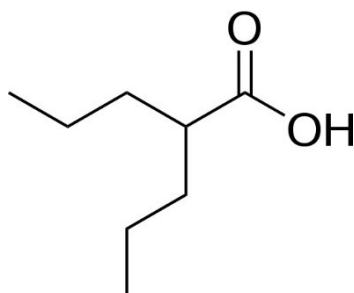
Disulfiram (a) je štěpen na dvě identické molekuly, tento metabolit (b) je pak schopen pomocí atomů síry koordinačně vázat atom mědi (c). Převzato z [204], upraveno.

4.4 Valproát

Sůl kyseliny valproové (Obr. 18) je léčivo s úspěchem používané několik desetiletí pro léčbu epilepsie nebo dalších neurologických onemocnění jako bipolární afektivní porucha. Při léčbě těchto onemocnění ovlivňuje valproát v centrální nervové soustavě syntézu a přenos γ -aminomáselné kyseliny (GABA), syntézu kyseliny β -hydroxymáselné a přímo působí na napětím ovládané Na^+ kanály v membránách neuronů. Také ovlivňuje přenos dopaminu a serotoninu. Dysbalance v hladinách těchto důležitých neurotransmiterů často stojí za vznikem epileptických záchvatů [205]. Valproát ale vykazuje velmi široké spektrum dalších účinností. Bylo také zjištěno, že inhibuje růst nádorových buněk ovlivněním acetylace histonů [206].

Míru genové exprese lze mimo jiné ovlivnit acetylací a deacetylací histonů. Histony jsou oktamery kladně nabitých proteinů, z nichž každý disponuje bazickou N-terminální doménou bohatou na lyzin. Navázáním acetylu na zbytek lysinu dojde k vyrušení jeho kladného náboje, čímž jsou zeslabeny iontové interakce mezi proteinem a záporně nabitou DNA. Dojde tak k dekonenzaci chromatinu a obecně zvýšení genové exprese. Proces acetylace a deacetylace zprostředkovávají dvě skupiny enzymů – histon acetyltransferázy (HATs) a histon deacetylázy (HDACs). Zvýšená exprese nebo mutace v některé z HATs nebo HDACs může vést k rozvoji malignity. Vznik non-Hodgkinova lymfomu je například spjatý se zvýšenou aktivitou HDACs a represí určitých genů. Inhibice HDACs má za následek zvýšenou acetylaci histonů, a tedy vyšší expresi těchto genů, které mohou způsobit diferenciaci nádorové buňky, čímž zanikne její proliferativní potenciál [207]. Právě indukce diferenciaci nádorových buněk byla pozorována při testování valproátu *in vitro*. Valproát se totiž váže do katalytického místa HDAC, čímž přímo inhibuje její funkci. Enzym je pak také více degradován. Potenciálních mechanismů účinku tohoto léčiva je ovšem zřejmě více, například zvýšená vazba transkripčního faktoru AP-1 na DNA, snížení aktivity PKC nebo ovlivnění signalizační dráhy Wnt [208].

Probíhá řada klinických studií sledujících účinek valproátu při léčbě různých maligních nádorových onemocnění, většinou v kombinaci s dalšími léčivy. Příkladem může být léčba nádorů hlavy a krku společně s cisplatinou a monoklonálními protilátkami cílenými proti EGFR [209]. Díky dlouholetému klinickému využívání valproátu v léčbě epilepsie jsou dobře prozkoumány jeho vedlejší účinky. Ty zahrnují nevolnost, avšak při delším podávání naopak možné zvýšení tělesné hmotnosti. Z vážnějších důsledků je to především rozvoj pankreatitidy a vzácně selhání jater [205].



Obrázek 18: Kyselina valproová
Převzato z [210].

5. Závěr

Od pozorování úbytku leukocytů u vojáků otrávených yperitem a nápadu použít tuto látku pro léčbu leukemie uběhlo již tři čtvrtě století. Maligní tumory nicméně stále zůstávají obávaným a velmi těžko léčitelným onemocněním. Konvenční chemoterapie často pouze prodlouží přežití pacienta, případně zmírní průběh onemocnění. Jelikož tradiční chemoterapeutika obvykle neselektivně zabíjí rychle se dělící buňky, obnáší chemoterapie mnoho vedlejších účinků, jako je myelosuprese, nevolnost, gastrointestinální potíže nebo alopecie. Chemoterapie tak může v některých případech vyvolat více obtíží než samotné onemocnění. Proto také mnoho pacientů se špatnou prognózou chemoterapii odmítá.

Poptávka po nových protinádorových léčivech s nižší toxicitou a vyšší účinností je obrovská. Jednou z cest je vytváření derivátů již osvědčených léčiv s lepšími farmakologickými vlastnostmi. Dalším způsobem může být hledání zcela nových látek v jiných organismech. Příroda je nevyčerpatelným zdrojem rozličných biologicky aktivních látek a různé metabolity rostlin, živočichů, hub a především bakterií vykazují velmi zajímavou protinádorovou účinnost. Problémem může být jak složitý proces izolace, charakterizace a optimalizace efektivní syntézy těchto látek, tak i klinické testování, které je mimořádně nákladné a zdoluhavé. Proto se dnes také přistupuje k testování protinádorové aktivity léčiv již schválených pro jiné účely. Vzniká tak repertoár „nových“ látek, které mají potenciál stát se velmi efektivními protinádorovými léčivy.

Protože je každé nádorové onemocnění specifické, dnešním trendem je cílená terapie s použitím látek mířených selektivně proti konkrétním klíčovým proteinům nádorových buněk. Kombinace léčiv často také potencuje jejich účinek. Dalším přístupem, vedle chemoterapie, chirurgického odstranění nádoru nebo radioterapie, je imunoterapie, která je založena na aktivaci složek imunitního systému pacienta, jež následně zprostředkovávají protinádorovou odpověď. Léčba „šitá na míru“ daného pacienta a jeho nádorového onemocnění pak může být skutečně efektivní, a kurabilními se tak stanou i maligní onemocnění dnes vykazující velmi špatnou prognózu.

6. Seznam použité literatury

- [1] C. D. Haagensen, "An Exhibit of Important Books, Papers, and Memorabilia Illustrating the Evolution of the Knowledge of Cancer: For the Graduate Fortnight on Tumors at the New York Academy of Medicine, October 17 to 28, 1932," *The American Journal of Cancer*, vol. 18, pp. 42-126, 1933.
- [2]* A. Sudhakar, "History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods," *J Cancer Sci Ther*, vol. 1, pp. 1-4, Dec 1 2009.
- [3]* R. J. Papac, "Origins of cancer therapy," *Yale J Biol Med*, vol. 74, pp. 391-8, Nov-Dec 2001.
- [4] S. L. Soignet, P. Maslak, Z. G. Wang, S. Jhanwar, E. Calleja, L. J. Dardashti, *et al.*, "Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide," *N Engl J Med*, vol. 339, pp. 1341-8, Nov 5 1998.
- [5] E. B. Krumbhaar and H. D. Krumbhaar, "The Blood and Bone Marrow in Yelloe Cross Gas (Mustard Gas) Poisoning: Changes produced in the Bone Marrow of Fatal Cases," *J Med Res*, vol. 40, pp. 497-508 3, Sep 1919.
- [6]* J. J. Li, *Laughing Gas, Viagra, and Lipitor: The Human Stories behind the Drugs We Use*: Oxford University Press, 2006.
- [7] A. Gilman, "The initial clinical trial of nitrogen mustard," *Am J Surg*, vol. 105, pp. 574-8, May 1963.
- [8] A. Gilman and F. S. Philips, "The Biological Actions and Therapeutic Applications of the B-Chloroethyl Amines and Sulfides," *Science*, vol. 103, pp. 409-36, Apr 5 1946.
- [9]* A. G. Hall and M. J. Tilby, "Mechanisms of action of, and modes of resistance to, alkylating agents used in the treatment of haematological malignancies," *Blood Rev*, vol. 6, pp. 163-73, Sep 1992.
- [10] R. Foa, I. Del Giudice, A. Cuneo, G. Del Poeta, S. Ciulli, F. Di Raimondo, *et al.*, "Chlorambucil plus rituximab with or without maintenance rituximab as first-line treatment for elderly chronic lymphocytic leukemia patients," *Am J Hematol*, vol. 89, pp. 480-6, May 2014.
- [11] M. Ninkovic, M. Fiegl, M. Mian, P. Mondello, F. Kocher, C. Waldthaler, *et al.*, "Routine Use of Bendamustine in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia: An Observational Study," *Anticancer Res*, vol. 35, pp. 5129-39, Sep 2015.
- [12] T. Facon, J. Y. Mary, C. Hulin, L. Benboubker, M. Attal, B. Pegourie, *et al.*, "Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone alone or reduced-intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma (IFM 99-06): a randomised trial," *Lancet*, vol. 370, pp. 1209-18, Oct 6 2007.
- [13]* C. M. Wendtner and M. Gregor, "Current perspectives on the role of chemotherapy in chronic lymphocytic leukemia," *Leuk Lymphoma*, vol. 59, pp. 300-310, Feb 2018.
- [14] Wikimedia Commons contributors. *File:Sulfur-mustard-2D-skeletal.png*. Available: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Sulfur-mustard-2D-skeletal.png&oldid=157053163>
- [15] Wikimedia Commons contributors. *File:Chlormethine.svg*. Available: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Chlormethine.svg&oldid=193474132>
- [16] W. C. contributors. *File:Cyclophosphamide.svg*. Available: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Cyclophosphamide.svg&oldid=219606925>
- [17]* L. F. Povirk and D. E. Shuker, "DNA damage and mutagenesis induced by nitrogen mustards," *Mutat Res*, vol. 318, pp. 205-26, Dec 1994.
- [18] T. Kurinamaru, N. Kojima, and R. Kurita, "An alkylating immobilization linker for immunochemical epigenetic assessment," *Chem Commun (Camb)*, vol. 53, pp. 8308-8311, Jul 20 2017.
- [19]* T. H. Wasserman, M. Slavik, and S. K. Carter, "Clinical comparison of the nitrosoureas," *Cancer*, vol. 36, pp. 1258-68, Oct 1975.
- [20] K. U. Schallreuter, F. K. Gleason, and J. M. Wood, "The mechanism of action of the nitrosourea anti-tumor drugs on thioredoxin reductase, glutathione reductase and ribonucleotide reductase," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1054, pp. 14-20, Aug 13 1990.
- [21]* A. A. Brandes, M. Bartolotti, A. Tosoni, and E. Franceschi, "Nitrosoureas in the Management of Malignant Gliomas," *Curr Neurol Neurosci Rep*, vol. 16, p. 13, Feb 2016.

- [22] M. B. Miranda, J. T. Hartmann, S. E. Al-Batran, M. Kripp, D. Gencer, A. Hochhaus, *et al.*, "Mitomycin C and capecitabine in pretreated patients with metastatic gastric cancer: a multicenter phase II study," *J Cancer Res Clin Oncol*, vol. 140, pp. 829-37, May 2014.
- [23] J. A. Quinn, S. X. Jiang, D. A. Reardon, A. Desjardins, J. J. Vredenburgh, J. N. Rich, *et al.*, "Phase II trial of temozolomide plus o6-benzylguanine in adults with recurrent, temozolomide-resistant malignant glioma," *J Clin Oncol*, vol. 27, pp. 1262-7, Mar 10 2009.
- [24]* S. M. Hecht, "Bleomycin: new perspectives on the mechanism of action," *J Nat Prod*, vol. 63, pp. 158-68, Jan 2000.
- [25] L. Wills, P. W. Clutterbuck, and B. D. Evans, "A new factor in the production and cure of macrocytic anaemias and its relation to other haemopoietic principles curative in pernicious anaemia," *Biochem J*, vol. 31, pp. 2136-47, Nov 1937.
- [26] S. Farber, E. C. Cutler, J. W. Hawkins, J. H. Harrison, E. C. Peirce, 2nd, and G. G. Lenz, "The Action of Pteroylglutamic Conjugates on Man," *Science*, vol. 106, pp. 619-21, Dec 19 1947.
- [27] S. Farber and L. K. Diamond, "Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid," *N Engl J Med*, vol. 238, pp. 787-93, Jun 3 1948.
- [28] M. J. Osborn, M. Freeman, and F. M. Huennekens, "Inhibition of dihydrofolic reductase by aminopterin and amethopterin," *Proc Soc Exp Biol Med*, vol. 97, pp. 429-31, Feb 1958.
- [29] M. C. Li, R. Hertz, and D. M. Bergenstal, "Therapy of choriocarcinoma and related trophoblastic tumors with folic acid and purine antagonists," *N Engl J Med*, vol. 259, pp. 66-74, Jul 10 1958.
- [30] Wikimedia Commons contributors. *File:Methotrexate vs folate.svg*. Available: https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Methotrexate_vs_folate.svg&oldid=220178322
- [31]* J. D. Borsi, E. Sagen, I. Romslo, and P. J. Moe, "Rescue after intermediate and high-dose methotrexate: background, rationale, and current practice," *Pediatr Hematol Oncol*, vol. 7, pp. 347-63, 1990.
- [32]* R. Gorlick, E. Goker, T. Trippett, M. Waltham, D. Banerjee, and J. R. Bertino, "Intrinsic and acquired resistance to methotrexate in acute leukemia," *N Engl J Med*, vol. 335, pp. 1041-8, Oct 3 1996.
- [33]* P. M. Brown, A. G. Pratt, and J. D. Isaacs, "Mechanism of action of methotrexate in rheumatoid arthritis, and the search for biomarkers," *Nat Rev Rheumatol*, vol. 12, pp. 731-742, Dec 2016.
- [34] O. A. O'Connor, S. Horwitz, P. Hamlin, C. Portlock, C. H. Moskowitz, D. Sarasohn, *et al.*, "Phase II-I-II study of two different doses and schedules of pralatrexate, a high-affinity substrate for the reduced folate carrier, in patients with relapsed or refractory lymphoma reveals marked activity in T-cell malignancies," *J Clin Oncol*, vol. 27, pp. 4357-64, Sep 10 2009.
- [35] R. C. Doebele, D. Spigel, M. Tehfe, S. Thomas, M. Reck, S. Verma, *et al.*, "Phase 2, randomized, open-label study of ramucirumab in combination with first-line pemetrexed and platinum chemotherapy in patients with nonsquamous, advanced/metastatic non-small cell lung cancer," *Cancer*, vol. 121, pp. 883-92, Mar 15 2015.
- [36] C. H. Kohne, P. Thuss-Patience, M. Friedrich, P. T. Daniel, A. Kretzschmar, T. Benter, *et al.*, "Raltitrexed (Tomudex): an alternative drug for patients with colorectal cancer and 5-fluorouracil associated cardiotoxicity," *Br J Cancer*, vol. 77, pp. 973-7, Mar 1998.
- [37] H. E. Skipper, J. R. Thomson, G. B. Elion, and G. H. Hitchings, "Observations on the anticancer activity of 6-mercaptopurine," *Cancer Res*, vol. 14, pp. 294-8, May 1954.
- [38] L. L. Bennett, Jr., L. Simpson, J. Golden, and T. L. Barker, "The Primary Site of Inhibition by 6-Mercaptopurine on the Purine Biosynthetic Pathway in Some Tumors in Vivo," *Cancer Res*, vol. 23, pp. 1574-80, Oct 1963.
- [39] J. S. Salser and M. E. Balis, "The Mechanism of Action of 6-Mercaptopurine. I. Biochemical Effects," *Cancer Res*, vol. 25, pp. 539-43, May 1965.
- [40] R. J. Rutman, A. Cantarow, and K. E. Paschkis, "Studies in 2-acetylaminofluorene carcinogenesis. III. The utilization of uracil-2-C14 by preneoplastic rat liver and rat hepatoma," *Cancer Res*, vol. 14, pp. 119-23, Feb 1954.
- [41] C. H. De Verdier and V. R. Potter, "Alternative pathways of thymine and uracil metabolism in the liver and hepatoma," *J Natl Cancer Inst*, vol. 24, pp. 13-29, Jan 1960.
- [42]* D. B. Longley, D. P. Harkin, and P. G. Johnston, "5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies," *Nat Rev Cancer*, vol. 3, pp. 330-8, May 2003.

- [43] S. Cascinu, P. Alessandrini, D. Rossi, E. Del Ferro, A. Fedeli, V. Casadei, *et al.*, "Multimodal biochemical modulation of 5-fluorouracil by leucovorin, methotrexate, and interferon alpha in patients with advanced colorectal cancer," *Cancer Chemother Pharmacol*, vol. 38, pp. 385-6, 1996.
- [44]* J. J. Lee, J. H. Beumer, and E. Chu, "Therapeutic drug monitoring of 5-fluorouracil," *Cancer Chemother Pharmacol*, vol. 78, pp. 447-64, Sep 2016.
- [45] X. H. Xu, G. M. Yao, Y. M. Li, J. H. Lu, C. J. Lin, X. Wang, *et al.*, "5-Fluorouracil derivatives from the sponge *Phakellia fusca*," *J Nat Prod*, vol. 66, pp. 285-8, Feb 2003.
- [46]* T. Y. Kim, D. Y. Oh, and Y. J. Bang, "Capecitabine for the treatment of gastric cancer," *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 9, pp. 1471-81, 2015.
- [47]* C. M. Galmarini, J. R. Mackey, and C. Dumontet, "Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment," *Lancet Oncol*, vol. 3, pp. 415-24, Jul 2002.
- [48] B. Rosenberg, L. Vancamp, and T. Krigas, "Inhibition of Cell Division in *Escherichia Coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode," *Nature*, vol. 205, pp. 698-9, Feb 13 1965.
- [49]* L. Kelland, "The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy," *Nat Rev Cancer*, vol. 7, pp. 573-84, Aug 2007.
- [50] L. H. Einhorn, "Treatment of testicular cancer: a new and improved model," *J Clin Oncol*, vol. 8, pp. 1777-81, Nov 1990.
- [51] A. L. Pouliquen, G. Bousquet, C. Le Maignan, C. Bauer, N. Lejri, J. L. Misset, *et al.*, "Optimization of cisplatin doses in a testicular cancer patient with acute renal failure," *J Oncol Pharm Pract*, vol. 17, pp. 265-9, Sep 2011.
- [52]* R. Oun, Y. E. Moussa, and N. J. Wheate, "The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists," *Dalton Trans*, vol. 47, pp. 6645-6653, May 15 2018.
- [53] A. K. Holzer and S. B. Howell, "The internalization and degradation of human copper transporter 1 following cisplatin exposure," *Cancer Res*, vol. 66, pp. 10944-52, Nov 15 2006.
- [54] P. Mistry, L. R. Kelland, G. Abel, S. Sidhar, and K. R. Harrap, "The relationships between glutathione, glutathione-S-transferase and cytotoxicity of platinum drugs and melphalan in eight human ovarian carcinoma cell lines," *Br J Cancer*, vol. 64, pp. 215-20, Aug 1991.
- [55] S. W. Johnson, P. A. Swiggard, L. M. Handel, J. M. Brennan, A. K. Godwin, R. F. Ozols, *et al.*, "Relationship between platinum-DNA adduct formation and removal and cisplatin cytotoxicity in cisplatin-sensitive and -resistant human ovarian cancer cells," *Cancer Res*, vol. 54, pp. 5911-6, Nov 15 1994.
- [56] E. C. a. E. Moore. (2010). *Metals and Life Chapter 9*. Available: <http://prospect.rsc.org/metalsandlife/index.html>
- [57] A. de Gramont, A. Figer, M. Seymour, M. Homerin, A. Hmissi, J. Cassidy, *et al.*, "Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer," *J Clin Oncol*, vol. 18, pp. 2938-47, Aug 2000.
- [58] C. N. Sternberg, D. P. Petrylak, O. Sartor, J. A. Witjes, T. Demkow, J. M. Ferrero, *et al.*, "Multinational, double-blind, phase III study of prednisone and either satraplatin or placebo in patients with castrate-refractory prostate cancer progressing after prior chemotherapy: the SPARC trial," *J Clin Oncol*, vol. 27, pp. 5431-8, Nov 10 2009.
- [59] J. Holford, F. Raynaud, B. A. Murrer, K. Grimaldi, J. A. Hartley, M. Abrams, *et al.*, "Chemical, biochemical and pharmacological activity of the novel sterically hindered platinum co-ordination complex, cis-[amminedichloro(2-methylpyridine)] platinum(II) (AMD473)," *Anticancer Drug Des*, vol. 13, pp. 1-18, Jan 1998.
- [60] Y. Sun, R. Yin, S. Gou, and Zhaojian, "Antitumor platinum(II) complexes of N-monoalkyl-1R, 2R-diaminocyclohexane derivatives with alkyl groups as hindrance," *J Inorg Biochem*, vol. 112, pp. 68-76, Jul 2012.
- [61]* I. S. Johnson, J. G. Armstrong, M. Gorman, and J. P. Burnett, Jr., "The Vinca Alkaloids: A New Class of Oncolytic Agents," *Cancer Res*, vol. 23, pp. 1390-427, Sep 1963.
- [62] K. G. Bensch and S. E. Malawista, "Microtubule crystals: a new biophysical phenomenon induced by Vinca alkaloids," *Nature*, vol. 218, pp. 1176-7, Jun 22 1968.
- [63] M. A. Jordan, D. Thrower, and L. Wilson, "Mechanism of inhibition of cell proliferation by Vinca alkaloids," *Cancer Res*, vol. 51, pp. 2212-22, Apr 15 1991.
- [64]* X. J. Zhou and R. Rahmani, "Preclinical and clinical pharmacology of vinca alkaloids," *Drugs*, vol. 44 Suppl 4, pp. 1-16; discussion 66-9, 1992.

- [65] T. Wibmer, C. Kropf, T. Merk, C. Schumann, V. Hombach, and S. Kruger, "Efficacy and safety of combination chemotherapy with mitomycin and vinorelbine for the treatment of advanced non-small cell lung cancer," *Lung Cancer*, vol. 60, pp. 231-9, May 2008.
- [66] S. Lakhani, P. Selby, J. M. Bliss, T. J. Perren, M. E. Gore, and T. J. McElwain, "Chemotherapy for malignant melanoma: combinations and high doses produce more responses without survival benefit," *Br J Cancer*, vol. 61, pp. 330-4, Feb 1990.
- [67]* H. Gerullis, F. Wawroschek, C. H. Kohne, and T. H. Ecke, "Vinflunine in the treatment of advanced urothelial cancer: clinical evidence and experience," *Ther Adv Urol*, vol. 9, pp. 28-35, Jan 2017.
- [68] M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, and A. T. McPhail, "Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*," *J Am Chem Soc*, vol. 93, pp. 2325-7, May 5 1971.
- [69] P. B. Schiff, J. Fant, and S. B. Horwitz, "Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol," *Nature*, vol. 277, pp. 665-7, Feb 22 1979.
- [70] M. A. Jordan, R. J. Toso, D. Thrower, and L. Wilson, "Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 90, pp. 9552-6, Oct 15 1993.
- [71]* E. K. Rowinsky, E. A. Eisenhauer, V. Chaudhry, S. G. Arbuck, and R. C. Donehower, "Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol)," *Semin Oncol*, vol. 20, pp. 1-15, Aug 1993.
- [72] W. R. Waud, K. S. Gilbert, S. D. Harrison, Jr., and D. P. Griswold, Jr., "Cross-resistance of drug-resistant murine P388 leukemias to taxol in vivo," *Cancer Chemother Pharmacol*, vol. 31, pp. 255-7, 1992.
- [73] M. C. Bissery, D. Guenard, F. Gueritte-Voegelein, and F. Lavelle, "Experimental antitumor activity of taxotere (RP 56976, NSC 628503), a taxol analogue," *Cancer Res*, vol. 51, pp. 4845-52, Sep 15 1991.
- [74]* A. Montero, F. Fossella, G. Hortobagyi, and V. Valero, "Docetaxel for treatment of solid tumours: a systematic review of clinical data," *Lancet Oncol*, vol. 6, pp. 229-39, Apr 2005.
- [75]* B. P. Bouchet and C. M. Galmarini, "Cabazitaxel, a new taxane with favorable properties," *Drugs Today (Barc)*, vol. 46, pp. 735-42, Oct 2010.
- [76] Wikimedia Commons contributors. *File:Vincristine.svg*. Available: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Vincristine.svg&oldid=46264660>
- [77] Wikimedia Commons contributors. *File:Taxol.svg*. Available: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Taxol.svg&oldid=118291743>
- [78] N. Dalbeth, T. J. Lauterio, and H. R. Wolfe, "Mechanism of action of colchicine in the treatment of gout," *Clin Ther*, vol. 36, pp. 1465-79, Oct 1 2014.
- [79]* D. M. Bollag, P. A. McQueney, J. Zhu, O. Hensens, L. Koupal, J. Liesch, *et al.*, "Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action," *Cancer Res*, vol. 55, pp. 2325-33, Jun 1 1995.
- [80] J. W. Smith, 2nd, S. Vukelja, A. Rabe, N. Wentworth-Hartung, N. Koutrelakos, S. H. Shao, *et al.*, "Phase II randomized trial of weekly and every-3-week ixabepilone in metastatic breast cancer patients," *Breast Cancer Res Treat*, vol. 142, pp. 381-8, Nov 2013.
- [81] A. Mita, A. C. Lockhart, T. L. Chen, K. Bochinske, J. Curtright, and W. Cooper, *A phase I pharmacokinetic (PK) trial of XAA296A (Discodermolide) administered every 3 wks to adult patients with advanced solid malignancies* vol. 22, 2004.
- [82] J. J. Field, P. T. Northcote, I. Paterson, K. H. Altmann, J. F. Diaz, and J. H. Miller, "Zampanolide, a Microtubule-Stabilizing Agent, Is Active in Resistant Cancer Cells and Inhibits Cell Migration," *Int J Mol Sci*, vol. 18, May 3 2017.
- [83] M. E. Wall, M. C. Wani, C. E. Cook, K. H. Palmer, A. T. McPhail, and G. A. Sim, "Plant Antitumor Agents. I. The Isolation and Structure of Camptothecin, a Novel Alkaloidal Leukemia and Tumor Inhibitor from *Camptotheca acuminata* 1,2," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 88, pp. 3888-3890, 1966/08/01 1966.
- [84]* J. J. Champoux, "DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism," *Annu Rev Biochem*, vol. 70, pp. 369-413, 2001.
- [85] Y. H. Hsiang, M. G. Lihou, and L. F. Liu, "Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin," *Cancer Res*, vol. 49, pp. 5077-82, Sep 15 1989.

- [86]* Y. Pommier, C. Redon, V. A. Rao, J. A. Seiler, O. Sordet, H. Takemura, *et al.*, "Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage," *Mutat Res*, vol. 532, pp. 173-203, Nov 27 2003.
- [87] B. C. Giovanella, N. Harris, J. Mendoza, Z. Cao, J. Liehr, and J. S. Stehlin, "Dependence of anticancer activity of camptothecins on maintaining their lactone function," *Ann N Y Acad Sci*, vol. 922, pp. 27-35, 2000.
- [88] W. D. Kingsbury, J. C. Boehm, D. R. Jakas, K. G. Holden, S. M. Hecht, G. Gallagher, *et al.*, "Synthesis of water-soluble (aminoalkyl)camptothecin analogues: inhibition of topoisomerase I and antitumor activity," *J Med Chem*, vol. 34, pp. 98-107, Jan 1991.
- [89]* E. Martino, S. Della Volpe, E. Terribile, E. Benetti, M. Sakaj, A. Centamore, *et al.*, "The long story of camptothecin: From traditional medicine to drugs," *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 27, pp. 701-707, Feb 15 2017.
- [90] A. Fujimori, W. G. Harker, G. Kohlhagen, Y. Hoki, and Y. Pommier, "Mutation at the catalytic site of topoisomerase I in CEM/C2, a human leukemia cell line resistant to camptothecin," *Cancer Res*, vol. 55, pp. 1339-46, Mar 15 1995.
- [91] J. P. Braybrooke, M. Ranson, C. Manegold, K. Mattson, N. Thatcher, P. Cheverton, *et al.*, "Phase II study of exatecan mesylate (DX-8951f) as first line therapy for advanced non-small cell lung cancer," *Lung Cancer*, vol. 41, pp. 215-9, Aug 2003.
- [92] F. Caponigro, G. Carteni, J. P. Droz, A. Milano, W. B. Davis, and P. Pollard, "Phase II study of rubitecan in recurrent or metastatic head and neck cancer," *Cancer Chemother Pharmacol*, vol. 62, pp. 209-14, Jul 2008.
- [93]* T. F. Imbert, "Discovery of podophyllotoxins," *Biochimie*, vol. 80, pp. 207-22, Mar 1998.
- [94] M. Sullivan and L. S. King, "Effects of resin of podophyllum on normal skin, condylomata acuminata and verrucae vulgares," *Arch Derm Syphilol*, vol. 56, pp. 30-47, Jul 1947.
- [95] M. L. King and M. M. Sullivan, "The Similarity of the Effect of Podophyllin and Colchicine and Their Use in the Treatment of Condylomata Acuminata," *Science*, vol. 104, pp. 244-5, Sep 13 1946.
- [96] F. Cortese, B. Bhattacharyya, and J. Wolff, "Podophyllotoxin as a probe for the colchicine binding site of tubulin," *J Biol Chem*, vol. 252, pp. 1134-40, Feb 25 1977.
- [97] W. Ross, T. Rowe, B. Glisson, J. Yalowich, and L. Liu, "Role of topoisomerase II in mediating epipodophyllotoxin-induced DNA cleavage," *Cancer Res*, vol. 44, pp. 5857-60, Dec 1984.
- [98]* J. M. van Maanen, J. Retel, J. de Vries, and H. M. Pinedo, "Mechanism of action of antitumor drug etoposide: a review," *J Natl Cancer Inst*, vol. 80, pp. 1526-33, Dec 7 1988.
- [99]* P. J. Loehrer, Sr., "Etoposide therapy for testicular cancer," *Cancer*, vol. 67, pp. 220-4, Jan 1 1991.
- [100] G. K. Rivera and W. E. Evans, "Clinical trials of teniposide (VM-26) in childhood acute lymphocytic leukemia," *Semin Oncol*, vol. 19, pp. 51-8, Apr 1992.
- [101]* K. Seiter, "Toxicity of the topoisomerase II inhibitors," *Expert Opin Drug Saf*, vol. 4, pp. 219-34, Mar 2005.
- [102] B. H. Long, L. Wang, A. Lorico, R. C. Wang, M. G. Brattain, and A. M. Casazza, "Mechanisms of resistance to etoposide and teniposide in acquired resistant human colon and lung carcinoma cell lines," *Cancer Res*, vol. 51, pp. 5275-83, Oct 1 1991.
- [103]* X. Zhang, K. P. Rakesh, C. S. Shantharam, H. M. Manukumar, A. M. Asiri, H. M. Marwani, *et al.*, "Podophyllotoxin derivatives as an excellent anticancer aspirant for future chemotherapy: A key current imminent needs," *Bioorg Med Chem*, vol. 26, pp. 340-355, Jan 15 2018.
- [104] Wikimedia Commons contributors. *File:Camptothecin binding.svg*. Available: https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Camptothecin_binding.svg&oldid=127858910
- [105] Wikimedia Commons contributors. *File:Podophyllotoxin2DCSD.svg*. Available: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Podophyllotoxin2DCSD.svg&oldid=150763055>
- [106]* J. W. Lown, "Discovery and development of anthracycline antitumor antibiotics," *Chemical Society Reviews*, vol. 22, pp. 165-176, 1993.
- [107] G. J. Goldenberg, H. Wang, and G. W. Blair, "Resistance to adriamycin: relationship of cytotoxicity to drug uptake and DNA single- and double-strand breakage in cloned cell lines of adriamycin-sensitive and -resistant P388 leukemia," *Cancer Res*, vol. 46, pp. 2978-83, Jun 1986.

- [108] F. A. Fornari, J. K. Randolph, J. C. Yalowich, M. K. Ritke, and D. A. Gewirtz, "Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells," *Mol Pharmacol*, vol. 45, pp. 649-56, Apr 1994.
- [109]* D. A. Gewirtz, "A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin," *Biochem Pharmacol*, vol. 57, pp. 727-41, Apr 1 1999.
- [110] E. J. Gabbay, D. Grier, R. E. Fingerle, R. Reimer, R. Levy, S. W. Pearce, *et al.*, "Interaction specificity of the anthracyclines with deoxyribonucleic acid," *Biochemistry*, vol. 15, pp. 2062-70, May 18 1976.
- [111] J. Cox and S. Weinman, "Mechanisms of doxorubicin resistance in hepatocellular carcinoma," *Hepat Oncol*, vol. 3, pp. 57-59, Jan 1 2016.
- [112] M. Erman, E. Baltali, A. Karaoglu, H. Abali, H. Engin, Y. Ozisik, *et al.*, "A phase II study on the safety and efficacy of 5-fluorouracil, epirubicin, cyclophosphamide (FEC) followed by paclitaxel in the adjuvant treatment of breast cancer," *Cancer Invest*, vol. 23, pp. 215-21, 2005.
- [113] W. K. Hofmann, G. Heil, C. Zander, S. Wiebe, O. G. Ottmann, L. Bergmann, *et al.*, "Intensive chemotherapy with idarubicin, cytarabine, etoposide, and G-CSF priming in patients with advanced myelodysplastic syndrome and high-risk acute myeloid leukemia," *Ann Hematol*, vol. 83, pp. 498-503, Aug 2004.
- [114] J. Roboz, C. L. Richardson, and J. F. Holland, "Comparison of the interaction of antineoplastic aminoanthraquinone analogs with DNA using competitive fluorescence polarization," *Life Sci*, vol. 31, pp. 25-30, Jul 5 1982.
- [115]* B. J. Evison, B. E. Sleebbs, K. G. Watson, D. R. Phillips, and S. M. Cutts, "Mitoxantrone, More than Just Another Topoisomerase II Poison," *Med Res Rev*, vol. 36, pp. 248-99, Mar 2016.
- [116] R. Pettengell, B. Coiffier, G. Narayanan, F. H. de Mendoza, R. Digumarti, H. Gomez, *et al.*, "Pixantrone dimaleate versus other chemotherapeutic agents as a single-agent salvage treatment in patients with relapsed or refractory aggressive non-Hodgkin lymphoma: a phase 3, multicentre, open-label, randomised trial," *Lancet Oncol*, vol. 13, pp. 696-706, Jul 2012.
- [117] Wikimedia Commons contributors. *File:Doxorubicin.svg*. Available: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Doxorubicin.svg&oldid=26382331>
- [118] Wikimedia Commons contributors. *File:Mitoxantrone_skeletal.svg*. Available: https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Mitoxantrone_skeletal.svg&oldid=28682044
- [119]* K. Kusuzaki, H. Murata, T. Matsubara, H. Satonaka, T. Wakabayashi, A. Matsumine, *et al.*, "Review. Acridine orange could be an innovative anticancer agent under photon energy," *In Vivo*, vol. 21, pp. 205-14, Mar-Apr 2007.
- [120] S. Farber, G. D'Angio, A. Evans, and A. Mitus, "Clinical studies on actinomycin D with special reference to Wilms' tumor in children," *Ann NY Acad Sci*, vol. 89, pp. 421-5, Oct 5 1960.
- [121] M. Gellert, C. E. Smith, D. Neville, and G. Felsenfeld, "Actinomycin Binding to DNA: Mechanism and Specificity," *J Mol Biol*, vol. 11, pp. 445-57, Mar 1965.
- [122] J. D. Broome, "Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. I. Properties of the L-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance," *J Exp Med*, vol. 118, pp. 99-120, Jul 1963.
- [123]* K. Kumar, J. Kaur, S. Walia, T. Pathak, and D. Aggarwal, "L-asparaginase: an effective agent in the treatment of acute lymphoblastic leukemia," *Leuk Lymphoma*, vol. 55, pp. 256-62, Feb 2014.
- [124] E. H. Panosyan, N. L. Seibel, S. Martin-Aragon, P. S. Gaynon, I. A. Avramis, H. Sather, *et al.*, "Asparaginase antibody and asparaginase activity in children with higher-risk acute lymphoblastic leukemia: Children's Cancer Group Study CCG-1961," *J Pediatr Hematol Oncol*, vol. 26, pp. 217-26, Apr 2004.
- [125] W. Kreis and M. Goodenow, "Methionine requirement and replacement by homocysteine in tissue cultures of selected rodent and human malignant and normal cells," *Cancer Res*, vol. 38, pp. 2259-62, Aug 1978.
- [126]* W. Ardel, K. Shogen, and Z. Darzynkiewicz, "Onconase and amphinase, the antitumor ribonucleases from *Rana pipiens* oocytes," *Curr Pharm Biotechnol*, vol. 9, pp. 215-25, Jun 2008.
- [127]* J. S. Isaacs, W. Xu, and L. Neckers, "Heat shock protein 90 as a molecular target for cancer therapeutics," *Cancer Cell*, vol. 3, pp. 213-7, Mar 2003.

- [128] M. Ferrarini, S. Heltai, M. R. Zocchi, and C. Rugarli, "Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells," *Int J Cancer*, vol. 51, pp. 613-9, Jun 19 1992.
- [129] C. DeBoer, P. A. Meulman, R. J. Wnuk, and D. H. Peterson, "Geldanamycin, a new antibiotic," *J Antibiot (Tokyo)*, vol. 23, pp. 442-7, Sep 1970.
- [130] K. Sasaki, H. Yasuda, and K. Onodera, "Growth inhibition of virus transformed cells in vitro and antitumor activity in vivo of geldanamycin and its derivatives," *J Antibiot (Tokyo)*, vol. 32, pp. 849-51, Aug 1979.
- [131] L. Whitesell, S. D. Shifrin, G. Schwab, and L. M. Neckers, "Benzoquinonoid ansamycins possess selective tumoricidal activity unrelated to src kinase inhibition," *Cancer Res*, vol. 52, pp. 1721-8, Apr 1 1992.
- [132] J. P. Grenert, W. P. Sullivan, P. Fadden, T. A. Haystead, J. Clark, E. Mimnaugh, *et al.*, "The amino-terminal domain of heat shock protein 90 (hsp90) that binds geldanamycin is an ATP/ADP switch domain that regulates hsp90 conformation," *J Biol Chem*, vol. 272, pp. 23843-50, Sep 19 1997.
- [133] T. W. Schulte, M. V. Blagosklonny, L. Romanova, J. F. Mushinski, B. P. Monia, J. F. Johnston, *et al.*, "Destabilization of Raf-1 by geldanamycin leads to disruption of the Raf-1-MEK-mitogen-activated protein kinase signalling pathway," *Mol Cell Biol*, vol. 16, pp. 5839-45, Oct 1996.
- [134] W. G. An, T. W. Schulte, and L. M. Neckers, "The heat shock protein 90 antagonist geldanamycin alters chaperone association with p210bcr-abl and v-src proteins before their degradation by the proteasome," *Cell Growth Differ*, vol. 11, pp. 355-60, Jul 2000.
- [135] E. A. Ronnen, G. V. Kondagunta, N. Ishill, S. M. Sweeney, J. K. Deluca, L. Schwartz, *et al.*, "A phase II trial of 17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin in patients with papillary and clear cell renal cell carcinoma," *Invest New Drugs*, vol. 24, pp. 543-6, Nov 2006.
- [136] U. Banerji, A. O'Donnell, M. Scurr, S. Pacey, S. Stapleton, Y. Asad, *et al.*, "Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin in patients with advanced malignancies," *J Clin Oncol*, vol. 23, pp. 4152-61, Jun 20 2005.
- [137] M. G. Marcu, A. Chadli, I. Bouhouche, M. Catelli, and L. M. Neckers, "The heat shock protein 90 antagonist novobiocin interacts with a previously unrecognized ATP-binding domain in the carboxyl terminus of the chaperone," *J Biol Chem*, vol. 275, pp. 37181-6, Nov 24 2000.
- [138] Wikimedia Commons contributors. *File:Geldanamycin.svg*. Available: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Geldanamycin.svg&oldid=205941687>
- [139] Wikimedia Commons contributors. *File:Novobiocin2DCSD.svg*. Available: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Novobiocin2DCSD.svg&oldid=185175947>
- [140] C. Nusslein-Volhard and E. Wieschaus, "Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*," *Nature*, vol. 287, pp. 795-801, Oct 30 1980.
- [141] Y. Echelard, D. J. Epstein, B. St-Jacques, L. Shen, J. Mohler, J. A. McMahon, *et al.*, "Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity," *Cell*, vol. 75, pp. 1417-30, Dec 31 1993.
- [142] C. Chiang, Y. Litingtung, E. Lee, K. E. Young, J. L. Corden, H. Westphal, *et al.*, "Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function," *Nature*, vol. 383, pp. 407-13, Oct 3 1996.
- [143] W. Binns, L. F. James, J. L. Shupe, and G. Everett, "A Congenital Cyclopien-Type Malformation in Lambs Induced by Maternal Ingestion of a Range Plant, *Veratrum Californicum*," *Am J Vet Res*, vol. 24, pp. 1164-75, Nov 1963.
- [144] R. F. Keeler, "Teratogenic compounds of *veratrum californicum* (durand) - VI: The structure of cyclopamine," *Phytochemistry*, vol. 8, pp. 223-225, 1969/01/01/ 1969.
- [145] J. P. Incardona, W. Gaffield, R. P. Kapur, and H. Roelink, "The teratogenic *Veratrum* alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction," *Development*, vol. 125, pp. 3553-62, Sep 1998.
- [146]* L. Lum and P. A. Beachy, "The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers," *Science*, vol. 304, pp. 1755-9, Jun 18 2004.
- [147] J. K. Chen, J. Taipale, M. K. Cooper, and P. A. Beachy, "Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened," *Genes Dev*, vol. 16, pp. 2743-8, Nov 1 2002.

- [148] N. Dahmane, J. Lee, P. Robins, P. Heller, and A. Ruiz i Altaba, "Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours," *Nature*, vol. 389, pp. 876-81, Oct 23 1997.
- [149] M. Aszterbaum, A. Rothman, R. L. Johnson, M. Fisher, J. Xie, J. M. Bonifas, *et al.*, "Identification of mutations in the human PATCHED gene in sporadic basal cell carcinomas and in patients with the basal cell nevus syndrome," *J Invest Dermatol*, vol. 110, pp. 885-8, Jun 1998.
- [150] C. W. Lam, J. Xie, K. F. To, H. K. Ng, K. C. Lee, N. W. Yuen, *et al.*, "A frequent activated smoothed mutation in sporadic basal cell carcinomas," *Oncogene*, vol. 18, pp. 833-6, Jan 21 1999.
- [151] D. M. Berman, S. S. Karhadkar, A. R. Hallahan, J. I. Pritchard, C. G. Eberhart, D. N. Watkins, *et al.*, "Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade," *Science*, vol. 297, pp. 1559-61, Aug 30 2002.
- [152] M. R. Tremblay, A. Lescarbeau, M. J. Grogan, E. Tan, G. Lin, B. C. Austad, *et al.*, "Discovery of a potent and orally active hedgehog pathway antagonist (IPI-926)," *J Med Chem*, vol. 52, pp. 4400-18, Jul 23 2009.
- [153] A. Jimeno, G. J. Weiss, W. H. Miller, Jr., S. Gettinger, B. J. Eigel, A. L. Chang, *et al.*, "Phase I study of the Hedgehog pathway inhibitor IPI-926 in adult patients with solid tumors," *Clin Cancer Res*, vol. 19, pp. 2766-74, May 15 2013.
- [154] D. D. Von Hoff, P. M. LoRusso, C. M. Rudin, J. C. Reddy, R. L. Yauch, R. Tibes, *et al.*, "Inhibition of the hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma," *N Engl J Med*, vol. 361, pp. 1164-72, Sep 17 2009.
- [155] C. M. Rudin, C. L. Hann, J. Laterra, R. L. Yauch, C. A. Callahan, L. Fu, *et al.*, "Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449," *N Engl J Med*, vol. 361, pp. 1173-8, Sep 17 2009.
- [156] Wikimedia Commons contributors. *File:Cyclopamine.svg*. Available: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Cyclopamine.svg&oldid=298535088>
- [157] Wikimedia Commons contributors. *File:Vismodegib2DACS.svg*. Available: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Vismodegib2DACS.svg&oldid=208903482>
- [158]* R. A. Lindberg, A. M. Quinn, and T. Hunter, "Dual-specificity protein kinases: will any hydroxyl do?," *Trends Biochem Sci*, vol. 17, pp. 114-9, Mar 1992.
- [159]* R. Roskoski, Jr., "A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors," *Pharmacol Res*, vol. 100, pp. 1-23, Oct 2015.
- [160] M. K. Wendt, J. A. Smith, and W. P. Schiemann, "Transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition facilitates epidermal growth factor-dependent breast cancer progression," *Oncogene*, vol. 29, pp. 6485-98, Dec 9 2010.
- [161] H. Davies, G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, *et al.*, "Mutations of the BRAF gene in human cancer," *Nature*, vol. 417, pp. 949-54, Jun 27 2002.
- [162] E. Buchdunger, J. Zimmermann, H. Mett, T. Meyer, M. Muller, B. J. Druker, *et al.*, "Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative," *Cancer Res*, vol. 56, pp. 100-4, Jan 1 1996.
- [163] B. J. Druker, M. Talpaz, D. J. Resta, B. Peng, E. Buchdunger, J. M. Ford, *et al.*, "Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia," *N Engl J Med*, vol. 344, pp. 1031-7, Apr 5 2001.
- [164]* M. W. Deininger, J. M. Goldman, and J. V. Melo, "The molecular biology of chronic myeloid leukemia," *Blood*, vol. 96, pp. 3343-56, Nov 15 2000.
- [165] T. Schindler, W. Bornmann, P. Pellicena, W. T. Miller, B. Clarkson, and J. Kuriyan, "Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase," *Science*, vol. 289, pp. 1938-42, Sep 15 2000.
- [166] S. Omura, Y. Iwai, A. Hirano, A. Nakagawa, J. Awaya, H. Tsuchya, *et al.*, "A new alkaloid AM-2282 OF Streptomyces origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization," *J Antibiot (Tokyo)*, vol. 30, pp. 275-82, Apr 1977.
- [167] T. Sako, A. I. Tauber, A. Y. Jeng, S. H. Yuspa, and P. M. Blumberg, "Contrasting actions of staurosporine, a protein kinase C inhibitor, on human neutrophils and primary mouse epidermal cells," *Cancer Res*, vol. 48, pp. 4646-50, Aug 15 1988.

- [168] N. E. Ward and C. A. O'Brian, "Kinetic analysis of protein kinase C inhibition by staurosporine: evidence that inhibition entails inhibitor binding at a conserved region of the catalytic domain but not competition with substrates," *Mol Pharmacol*, vol. 41, pp. 387-92, Feb 1992.
- [169] F. Meggio, A. Donella Deana, M. Ruzzene, A. M. Brunati, L. Cesaro, B. Guerra, *et al.*, "Different susceptibility of protein kinases to staurosporine inhibition. Kinetic studies and molecular bases for the resistance of protein kinase CK2," *Eur J Biochem*, vol. 234, pp. 317-22, Nov 15 1995.
- [170] P. Lassota, G. Singh, and R. Kramer, "Mechanism of topoisomerase II inhibition by staurosporine and other protein kinase inhibitors," *J Biol Chem*, vol. 271, pp. 26418-23, Oct 18 1996.
- [171]* M. M. Gallogly, H. M. Lazarus, and B. W. Cooper, "Midostaurin: a novel therapeutic agent for patients with FLT3-mutated acute myeloid leukemia and systemic mastocytosis," *Ther Adv Hematol*, vol. 8, pp. 245-261, Sep 2017.
- [172] K. E. O'Reilly, F. Rojo, Q. B. She, D. Solit, G. B. Mills, D. Smith, *et al.*, "mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt," *Cancer Res*, vol. 66, pp. 1500-8, Feb 1 2006.
- [173]* D. Benjamin, M. Colombi, C. Moroni, and M. N. Hall, "Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors," *Nat Rev Drug Discov*, vol. 10, pp. 868-80, Oct 31 2011.
- [174] Wikimedia Commons contributors. *File:Staurosporine.svg*. Available: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Staurosporine.svg&oldid=64824661>
- [175] Wikimedia Commons contributors. *File:Sirolimus structure.svg*. Available: https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Sirolimus_structure.svg&oldid=234334943
- [176] T. P. Szatrowski and C. F. Nathan, "Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells," *Cancer Res*, vol. 51, pp. 794-8, Feb 1 1991.
- [177]* D. Trachootham, J. Alexandre, and P. Huang, "Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?," *Nat Rev Drug Discov*, vol. 8, pp. 579-91, Jul 2009.
- [178]* C. Marzano, M. Pellei, F. Tisato, and C. Santini, "Copper complexes as anticancer agents," *Anticancer Agents Med Chem*, vol. 9, pp. 185-211, Feb 2009.
- [179] M. Nagai, N. H. Vo, L. Shin Ogawa, D. Chimmanamada, T. Inoue, J. Chu, *et al.*, "The oncology drug elesclomol selectively transports copper to the mitochondria to induce oxidative stress in cancer cells," *Free Radic Biol Med*, vol. 52, pp. 2142-50, May 15 2012.
- [180] J. R. Kirshner, S. He, V. Balasubramanyam, J. Kepros, C. Y. Yang, M. Zhang, *et al.*, "Elesclomol induces cancer cell apoptosis through oxidative stress," *Mol Cancer Ther*, vol. 7, pp. 2319-27, Aug 2008.
- [181] D. Hedley, A. Shamas-Din, S. Chow, D. Sanfelice, A. C. Schuh, J. M. Brandwein, *et al.*, "A phase I study of elesclomol sodium in patients with acute myeloid leukemia," *Leuk Lymphoma*, vol. 57, pp. 2437-40, Oct 2016.
- [182] B. B. Hasinoff, X. Wu, A. A. Yadav, D. Patel, H. Zhang, D. S. Wang, *et al.*, "Cellular mechanisms of the cytotoxicity of the anticancer drug elesclomol and its complex with Cu(II)," *Biochem Pharmacol*, vol. 93, pp. 266-76, Feb 1 2015.
- [183]* K. H. Antman, "Introduction: the history of arsenic trioxide in cancer therapy," *Oncologist*, vol. 6 Suppl 2, pp. 1-2, 2001.
- [184]* S. Waxman and K. C. Anderson, "History of the development of arsenic derivatives in cancer therapy," *Oncologist*, vol. 6 Suppl 2, pp. 3-10, 2001.
- [185] S. M. Matulis, A. A. Morales, L. Yehiayan, C. Crutch, D. Gutman, Y. Cai, *et al.*, "Darinaparsin induces a unique cellular response and is active in an arsenic trioxide-resistant myeloma cell line," *Mol Cancer Ther*, vol. 8, pp. 1197-206, May 2009.
- [186]* S. Zhou, F. Wang, T. C. Hsieh, J. M. Wu, and E. Wu, "Thalidomide-a notorious sedative to a wonder anticancer drug," *Curr Med Chem*, vol. 20, pp. 4102-8, 2013.
- [187] T. Eriksson, S. Bjorkman, B. Roth, A. Fyge, and P. Hoglund, "Stereospecific determination, chiral inversion in vitro and pharmacokinetics in humans of the enantiomers of thalidomide," *Chirality*, vol. 7, pp. 44-52, 1995.
- [188] R. J. D'Amato, M. S. Loughnan, E. Flynn, and J. Folkman, "Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 91, pp. 4082-5, Apr 26 1994.
- [189] J. M. Hansen and C. Harris, "A novel hypothesis for thalidomide-induced limb teratogenesis: redox misregulation of the NF-kappaB pathway," *Antioxid Redox Signal*, vol. 6, pp. 1-14, Feb 2004.

- [190] J. A. Keifer, D. C. Guttridge, B. P. Ashburner, and A. S. Baldwin, Jr., "Inhibition of NF-kappa B activity by thalidomide through suppression of IkappaB kinase activity," *J Biol Chem*, vol. 276, pp. 22382-7, Jun 22 2001.
- [191] T. Ito, H. Ando, T. Suzuki, T. Ogura, K. Hotta, Y. Imamura, *et al.*, "Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity," *Science*, vol. 327, pp. 1345-50, Mar 12 2010.
- [192] J. Sheskin, "Thalidomide in the Treatment of Lepra Reactions," *Clin Pharmacol Ther*, vol. 6, pp. 303-6, May-Jun 1965.
- [193]* S. Koeppen, "Treatment of multiple myeloma: thalidomide-, bortezomib-, and lenalidomide-induced peripheral neuropathy," *Oncol Res Treat*, vol. 37, pp. 506-13, 2014.
- [194]* Y. X. Zhu, K. M. Kortuem, and A. K. Stewart, "Molecular mechanism of action of immunomodulatory drugs thalidomide, lenalidomide and pomalidomide in multiple myeloma," *Leuk Lymphoma*, vol. 54, pp. 683-7, Apr 2013.
- [195] Wikimedia Commons contributors. *File:Thalidomide-structures.png*. Available: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Thalidomide-structures.png&oldid=146187773>
- [196] M. L. Shen, K. L. Johnson, D. C. Mays, J. J. Lipsky, and S. Naylor, "Determination of in vivo adducts of disulfiram with mitochondrial aldehyde dehydrogenase," *Biochem Pharmacol*, vol. 61, pp. 537-45, Mar 1 2001.
- [197]* B. Johansson, "A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of disulfiram and its metabolites," *Acta Psychiatr Scand Suppl*, vol. 369, pp. 15-26, 1992.
- [198] K. Iljin, K. Ketola, P. Vainio, P. Halonen, P. Kohonen, V. Fey, *et al.*, "High-throughput cell-based screening of 4910 known drugs and drug-like small molecules identifies disulfiram as an inhibitor of prostate cancer cell growth," *Clin Cancer Res*, vol. 15, pp. 6070-8, Oct 1 2009.
- [199] D. Cen, D. Brayton, B. Shahandeh, F. L. Meyskens, Jr., and P. J. Farmer, "Disulfiram facilitates intracellular Cu uptake and induces apoptosis in human melanoma cells," *J Med Chem*, vol. 47, pp. 6914-20, Dec 30 2004.
- [200] K. G. Daniel, D. Chen, S. Orlu, Q. C. Cui, F. R. Miller, and Q. P. Dou, "Clioquinol and pyrrolidine dithiocarbamate complex with copper to form proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human breast cancer cells," *Breast Cancer Res*, vol. 7, pp. R897-908, 2005.
- [201] D. Chen, Q. C. Cui, H. Yang, and Q. P. Dou, "Disulfiram, a clinically used anti-alcoholism drug and copper-binding agent, induces apoptotic cell death in breast cancer cultures and xenografts via inhibition of the proteasome activity," *Cancer Res*, vol. 66, pp. 10425-33, Nov 1 2006.
- [202] N. O. Bodnar, K. H. Kim, Z. Ji, T. E. Wales, V. Svetlov, E. Nudler, *et al.*, "Structure of the Cdc48 ATPase with its ubiquitin-binding cofactor Ufd1-Npl4," *Nat Struct Mol Biol*, vol. 25, pp. 616-622, Jul 2018.
- [203] Z. Skrott, M. Mistrik, K. K. Andersen, S. Friis, D. Majera, J. Gursky, *et al.*, "Alcohol-abuse drug disulfiram targets cancer via p97 segregase adaptor NPL4," *Nature*, vol. 552, pp. 194-199, Dec 14 2017.
- [204] M. E. Helsel and K. J. Franz, "Pharmacological activity of metal binding agents that alter copper bioavailability," *Dalton Trans*, vol. 44, pp. 8760-70, May 21 2015.
- [205]* E. Perucca, "Pharmacological and therapeutic properties of valproate: a summary after 35 years of clinical experience," *CNS Drugs*, vol. 16, pp. 695-714, 2002.
- [206] M. Gottlicher, S. Minucci, P. Zhu, O. H. Kramer, A. Schimpf, S. Giavara, *et al.*, "Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells," *EMBO J*, vol. 20, pp. 6969-78, Dec 17 2001.
- [207]* P. Marks, R. A. Rifkind, V. M. Richon, R. Breslow, T. Miller, and W. K. Kelly, "Histone deacetylases and cancer: causes and therapies," *Nat Rev Cancer*, vol. 1, pp. 194-202, Dec 2001.
- [208]* R. A. Blaheta and J. Cinatl, Jr., "Anti-tumor mechanisms of valproate: a novel role for an old drug," *Med Res Rev*, vol. 22, pp. 492-511, Sep 2002.
- [209] F. Caponigro, E. Di Gennaro, F. Ionna, F. Longo, C. Aversa, E. Pavone, *et al.*, "Phase II clinical study of valproic acid plus cisplatin and cetuximab in recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of Head and Neck-V-CHANCE trial," *BMC Cancer*, vol. 16, p. 918, Nov 25 2016.
- [210] Wikimedia Commons contributors. *File:Valproic acid.svg*. Available: https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Valproic_acid.svg&oldid=34354877

Reviews jsou označeny symbolem *.