

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Úloha nových taxanů v indukci apoptosy u rezistentních
nádorových buněk**

Veronika Podzimková

Školitel: RNDr. Julie Fidlerová

Praha 2010

Děkuji své školitelce RNDr. Julii Fidlerové za odborné konzultace a trpělivost. Zároveň bych chtěla poděkovat panu Prof. RNDr. Janu Kovářovi, DrSc. za nabídnuté téma bakalářské práce.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně z uvedené literatury a na základě konzultací se svou školitelkou.

Praha 2010

Veronika Podzimková

Osnova

1. Abstrakt	5
2. Abstract	6
3. Seznam zkratek	7
4. Úvod	8
5. Nádorové bujení	8
5.1. Léčba.....	9
6. Taxany	10
7. Mechanismus protinádorového účinku taxanů	11
7.1. Programovaná buněčná smrt neboli apoptosa.....	11
7.1.1. Morfologie apoptosy.....	12
7.1.2. Biochemie apoptosy.....	13
7.1.2.1. Kaspasy	13
7.1.2.2. Apoptotické dráhy	13
7.1.2.3. Závěrečná fáze	14
7.2. Mikrotubuly	14
7.2.1. Stabilizace mikrotubulů	15
7.2.2. Molekulární cíl taxanů	16
8. Toxicita a rozpustnost paclitaxelu a docetaxelu	16
9. Rezistence k taxanům	17
9.1. β -tubulinové mutace	17
9.2. α -tubulinové mutace	17
9.3. β -tubulinové izotypy.....	18
9.4. Proteiny asociované s mikrotubuly.....	18
9.5. Mnohočetná rezistence.....	19
10. Nové taxany	19
10.1. Perorální taxany	20
10.1.1. Tesetaxel (DJ-927)	20
10.1.2. Docetaxel 100 mg s OC144-093.....	21
10.1.3. BMS-275183.....	21
10.1.4. Paclitaxel poliglumex	21
10.1.5. Paclitaxel s emulzí vitamínu E.....	21
10.2. Nové taxany zaměřené na mutace β I-tubulinu	22
10.3. IDN5390 působí při expresi třídy III β -tubulinu	23
10.4. Překonání mnohočetné rezistence novými taxany	23
10.4.1. Cabazitaxel (XRP6258) a larotaxel (XRP9881).....	24

10.4.2. Paclitaxel vázaný na albumin (ABI-007).....	25
11. Závěr.....	27
12. Použitá literatura	29

1. Abstrakt

Úspěšná léčba onkologických pacientů je ovlivněna několika faktory. Kromě včasné diagnostiky nebo volby vhodné terapie hraje významnou roli i toxicita aplikovaných preparátů a vznik resistantních nádorových klonů.

Taxany jsou jednou z často aplikovaných skupin chemoterapeutik. Mechanismus jejich účinku spočívá ve stabilizaci tubulární dynamiky, poruchách buněčného cyklu a nakonec v indukci apoptosy.

Nejzávažnějšími nežádoucími účinky taxanů je právě vysoká toxicita pro organismus a vznik rezistence k těmto preparátům. Nové taxanové preparáty se snaží zmírnit tyto nežádoucí účinky několika způsoby.

Nové analogy původních látek si zachovávají svou cytotoxickou aktivitu, zároveň jsou však odolné vůči mechanismům rezistence. V současné době testované látky jsou například IDN5390, taxany 19, 14i, 14g, larotaxel a cabazitaxel. Jejich hlavní přínos je v léčbě metastazujících nádorových onemocnění.

Další možnost na zlepšení terapeutického efektu poskytují preparáty založené na původních taxanech, které se liší zejména způsobem aplikace. U perorálně podávaných taxanů je sníženo riziko nežádoucích účinků souvisejících s použitím nevhodných rozpouštědel. Mezi tyto preparáty patří zejména tesetaxel, docetaxel s OC144-093, BMS-275183, paclitaxel poliglumex a paclitaxel s emulzí vitamínu E.

Dalším způsobem vedoucím ke snížené resistenci je aplikace paklitaxelu vázaného na albumin. Tato kombinace zajišťuje vyšší koncentrace paklitaxelu v nádorovém intersticiu a tím zvyšuje expozici nádorových buněk této látce.

Klíčová slova: nádorové onemocnění, taxany, rezistence

2. Abstract

Effective therapy of cancer patients is influenced by several factors. In addition to the early diagnostic or choice of the best therapy regimens, the toxicity of applied drugs and the development of resistant cancer cells play crucial role.

Taxanes represent one group of widely used chemotherapeutic agents. The mechanism of their action is based on the destabilization of tubules dynamics, disorders in the cell cycle and finally on the induction of apoptosis.

The most serious side effects of taxanes are just severe toxicity and the development of resistance to this type of anticancer drugs. Treatments employing novel taxanes try to eliminate these side effects by several ways.

Newly synthesized analogs of the original compounds retain their cytotoxic activity and simultaneously they are able to overcome the resistance. Taxanes analogs called IDN539019, 14i, 14g, larotaxel and cabazitaxel are examples of the novel taxane molecules tested in this time. These molecules mainly contribute to the therapy of metastatic cancers.

Further possibility to improve therapeutic effect is provided with formulations derived from the primary taxanes however, this preparations particularly differ in the application way. For example perorally applied taxanes decrease risk of side effects related to the usage of the inappropriate dissolving agents. Tasetaxel, docetaxel with OC144-093, BMS-275183, paclitaxel poliglumex and paclitaxel applied with vitamin E emulsion belongs to this type of anticancer medication.

Additionally, the application of paclitaxel bound to the albumin molecule leads to the decrease of resistance. This combination provides higher paclitaxel concentration within the cancer intersticium and subsequently increases the exposure of tumor cells to this anticancer agent.

Key words: cancer, taxanes, resistance

3. Seznam zkratek

ABC	ATP-binding cassette – ATP vazebné proteiny
Apaf-1	apoptotic protease activating factor-1 – apoptosové proteasy aktivující faktor 1
USA	United States of America – Spojené státy americké
ATP	adenosintrifosfát
Bcl-2	B-cell Chronic lymphocytic Leukemia 2 – člen Bcl-2 rodiny proteinů regulujících přežívání buněk
CrEL	Crenophor [®] EL; polyethyl ricinový olej
DEPH	di-2-ethylhexyl ftalát
DNA	deoxyribonucleic acid – deoxyribonukleová kyselina
Cdc2	cell-division control protein 2 – kontrolní protein 2 buněčného cyklu
GDP	guanosindifosfát
gen <i>BRCA</i>	breast cancer gen – gen rakoviny prsu
gen <i>HM40</i>	gen pro β 1-tubulinový izotyp
gen <i>MDR1</i>	multiple drug resistance gen 1 – gen mnohočetné rezistence
gp60	glykoprotein 60
GTP	guanosintrifosfát
G2 fáze	gap 2 phase – růstová fáze 2 buněčného cyklu
M fáze	mitotic phase – mitotická fáze buněčného cyklu
MAPs	microtubule-associated proteins – proteiny asociované s mikrotubuly
MDR	multiple drug resistance – mnohočetná rezistence
nm	nanometr
PP2A	protein phosphatase 2 – proteinová fosfatasa 2
PAKs	protein 21-activated kinase – proteinkinasy aktivované p21
P-gp	P-glykoprotein; fosfoglykoprotein
p53	protein 53
ÚZIS ČR	Ústav zdravotnických informací a statistiky; Česká republika
ZN	zhoubný novotvar

4. Úvod

Nádorové bujení patří mezi nejčastější letální onemocnění a to jak ve světě tak v České republice. Hlavním problémem úspěšné léčby a případného úplného vyléčení je zejména pozdní diagnostika. Většina nádorových onemocnění je v současné době diagnostikována v pozdním stadiu, kdy již v těle pacienta došlo k vytvoření metastáz. Metastázující ložiska se většinou nedají úspěšně odstranit chirurgickou léčbou. Pomocí chemoterapie je možno protinádorová léčiva dopravit i k metastázujícím nádorovým buňkám a tak je eliminovat. Výzkum nových cytostatik je proto jednou z hlavních oblastí výzkumu léčby onkologických onemocnění.

Jednou z často aplikovaných skupin protinádorových léčiv jsou taxany. Jedná se o látky izolované z tisu s vysokou terapeutickou účinností. Mechanismus účinku této skupiny látek spočívá ve stabilizaci mikrotubulů v buňce, následované porušením mikrotubulární dynamiky s dopadem na důležité buněčné pochody. Konečnou fází působení taxanů je indukce programované buněčné smrti buněk.

Stejně jako většina protinádorových léků mají i taxany své nežádoucí vedlejší účinky. Taxany jsou látky hydrofobní a k jejich aplikaci do těla pacienta je nutno používat rozpouštědla na bázi lipidů. S tím se pojí jejich vysoká toxicita pro organismus. Vedlejší nežádoucí účinky jsou natolik závažné, že často nemůže být léčba dokončena. Další komplikací je vznik rezistencí na podávané léky. Při taxanové léčbě se časem vždy vyvinou odolné buněčné linie, které na další podávání léku nereagují. Rezistencí existuje celá řada, jedná se zejména o bodové mutace v β 1-tubulinu a α -tubulinu, změny výskytu izotypů β -tubulinu v buňkách, nadměrná exprese fosfoglykoproteinu a změny v expresi proteinů asociovaných s mikrotubuly.

Tyto dva hlavní nedostatky, toxicita a rezistence, vedou ke snaze vytvořit nové taxany, které si zachovávají cytotoxický efekt na mikrotubuly první generace taxanů, ale zároveň budou šetrnější k organismu a budou překonávat buněčnou rezistenci.

5. Nádorové bujení

Zhoubné nádorové bujení neboli rakovina je onemocnění, které postihuje osoby stále mladšího věku. Spolu s kardiovaskulárními chorobami je jednou z nejčastějších příčin úmrtí ve světě i v České republice (Daňková 2007).

V roce 2006 bylo do Národního onkologického registru České republiky nově hlášeno celkem 71 913 případů zhoubných novotvarů (ZN) a novotvarů *in situ*, z toho 36 682 případů u mužů a 35 231 u žen. U mužů počet nově zjištěných nádorů poprvé od roku 1990

meziročně klesl (nepatrně o 0,4 %), u žen pokračoval dlouhodobý stoupající trend. Nejčastěji diagnostikovaným zhoubným novotvarem, kromě zhoubného novotvaru kůže, je u mužů od roku 2005 ZN předstojné žlázy (96,3 případů na 100 tisíc mužů), ten vystřídal do té doby nejpočetnější ZN průdušnice, průdušky a plíce. U žen je dlouhodobě nejčetnější ZN prsu (112,0 případů na 100 tisíc žen). Celkově na zhoubný novotvar zemřelo 27 895 osob, z toho 15 354 mužů a 12 541 žen (ÚZIS ČR 2009).

Společným rysem těchto onemocnění je buněčná populace, která se vymkla kontrole a začala relativně autonomně růst. Nádory mohou vznikat v jakékoli tkáni. Nejčastěji však k tomu dochází na místech častého dělení buněk (epitel trávicí a dýchací soustavy) nebo v oblastech ovlivňovaných hormonálním působením (prsy, vaječníky, prostata). Za projev zhoubnosti nádoru se považuje jeho infiltrativní růst do okolní tkáně a schopnost zakládání vzdálených ložisek v různých místech organismu, tzv. metastáz. Nádorové buňky se tvoří u každého člověka, ale imunitní systém je schopen je rozpoznat a zničit. Pokud se však tyto buňky vymaní kontrole a přelstí imunitní systém, dojde k jejich nekontrolované proliferaci a vzniku nádoru.

Příčin onemocnění rakovinou je mnoho. V dětském věku převažují nádory podmíněné vrozenou poruchou některého z opravných mechanismů DNA, u dospělých je většina nádorů způsobena kombinací vlivů prostředí a životního stylu. Roli může hrát také dědičnost, například mutace genů *BRCA1* a *2* u karcinomu prsu a ovaria (Floretová, Macháčková 2003).

5.1. Léčba

Mnoho nádorových onemocnění lze v dnešní době zcela vyléčit. U značné části pacientů je díky moderním metodám diagnostiky a terapie šance na dlouhodobou remisi s dobrou kvalitou života. Nicméně některé typy nádorů jsou stále neléčitelné a významnou roli při cestě za úspěchem hraje včasná diagnosa.

Léčba je v současné době prováděna třemi základními způsoby. Jsou to chirurgický zákrok, radioterapie a chemoterapie. Ve většině případů se využívá komplexní přístup, kdy se tyto metody vzájemně kombinují.

Chemoterapie neboli cytostatická léčba je nejmladší, její rozvoj začal v 50. letech 20. století a dnes je základní léčebnou metodou. Jejím cílem je omezení buněčné proliferace nádorových buněk. Cytostatika jsou látky působící na dělící se buňky. Jejich účinek je sice směřován na nádor, ale v těle existují i další skupiny buněk, u nichž dochází k neustálému fyziologickému dělení. U dospělého člověka se jedná zejména o buňky kostní dřeně, kde dochází ke krvetvorbě a buňky epitelu trávicí trubice. Z toho vyplývá značná toxicita

chemoterapie, jelikož snížením počtu tělu vlastních fungujících buněk vede v organismu k řadě nežádoucích vedlejších účinků. Nízký výskyt leukocytů a trombocytů znamená vyšší riziko výskytu infekcí a krvácivých komplikací. Ztráta epiteliálních buněk zase způsobuje řadu potíží s funkcí důležitých tělních soustav (trávicí, dýchací). Tento problém je částečně řešen podáváním dalších látek např. růstových faktorů, které podporují obnovu krvevotvorby během terapie.

Cytostatika jsou schopna zničit 99 % proliferujících buněk. Nejmenší diagnostikovatelný nádor čítá přibližně 10^9 buněk. Většinou jsou však nádory diagnostikovány ve velikosti 10^{12} buněk. S 99% účinností léků je konečná populace velká 10^{10} buněk. Taková redukce je zcela nedostatečná, a proto je nutné chemoterapii opakovat v několika cyklech, aby došlo k celkové eliminaci nádoru. Intervaly mezi jednotlivými cykly jsou důležité pro obnovu tělu vlastních dělících se buněk, jejichž buněčný cyklus je kratší než u buněk nádorových. Nádor se tak nestihne zvětšit na původní velikost a postupně dochází k jeho likvidaci (Klener 1994). Je zde ale další významný faktor bránící úspěšné léčbě a tím je vznik rezistence na podávaná chemoterapeutika. Protože chemoterapie je dnes nepostradatelnou součástí léčby zhoubných nádorů, je nutné se na tyto problémy zaměřit.

Taxany patří mezi účinná cytostatika, bohužel s vysokou toxicitou. Dnešní výzkum těchto látek se proto zaměřuje nejen na jejich zdokonalení v oblasti účinnosti, ale také v oblasti snížení toxicity na minimální možnou hladinu.

6. Taxany

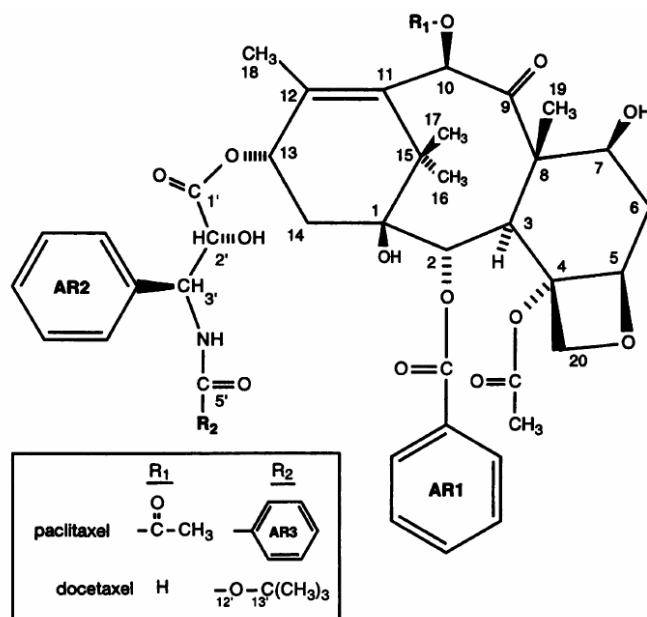
Taxany jsou antimikrotubulární částice, které se využívají v klinické praxi pro léčbu solidních nádorů.

Paclitaxel (obr. 1) byl poprvé izolován z kůry pacifického tisu *Taxus brevifolia* v roce 1971 (Jordan 2002). Patří do tzv. první generace taxanů.

První taxany byly v USA schváleny US Food and Drug Administration (Správa potravin a léčiv, USA) v roce 1992 pro léčbu rakoviny vaječníku a v roce 1994 pro léčbu metastatické rakoviny prsu (Grueritte 2001). Od té doby se jejich využití dramaticky zvýšilo. Staly se základem léčby rakoviny prsu, vaječníků, plic, prostaty a mnoha dalších podtypů rakoviny (Obasaju, Hudes 2001, Henderson et al. 2003, Piccart et al. 2000, Greco 1999, 2001).

Taxany používané v současné terapii jsou připravovány semi-synteticky z neaktivního taxanového prekurzoru 10-deacetylbaaccatin III, který se vyskytuje v evropském tisu, *Taxus baccata*. Tato skupina je označována jako taxany tzv. druhé generace a jejím zástupcem je např. docetaxel (obr. 1).

Přestože paclitaxel i docetaxel jsou silně protinádorové látky, bylo prokázáno, že léčba je často doprovázena nežádoucími vedlejšími účinky a rozvinutím rezistence k lékům.



Obr. 1: Chemická struktura paclitaxelu a docetaxelu s číslováním schématu (Mastro Paolo et al. 1995)

7. Mechanismus protinádorového účinku taxanů

Taxany jsou látky stabilizující mikrotubulární cytoskelet. Důsledkem jejich působení je zastavení buněčného dělení a spuštění programované buněčné smrti.

7.1. Programovaná buněčná smrt neboli apoptosa

Termín apoptosa (z řec. *apoptosis* - padání) byl pro označení buněčné smrti, která je morfologicky odlišná od nekrosy, poprvé použit v roce 1972 (Kerr, Wyllie, Currie). Některé její složky ale byly jednoznačně popsány již dříve a samotný výraz *apoptosa* používali už ve starověku Hippokratés nebo Galénos pro označení „plešatění“ nebo „řídnutí kostí“.

K apoptose dochází většinou během vývoje a stárnutí organismu. Je také zodpovědná za normální obrat buněčných populací ve tkáních. Odhaduje se, že pro udržení vnitřní homeostasy v dospělém lidském těle, umírá denně apoptosou asi 10 miliard buněk. Je to také obranný mechanismus v imunitních reakcích, při poškození buněk nemocí nebo působením škodlivých látek.

Proces programované buněčné smrti je pečlivě regulovaný. Abnormality v regulaci apoptosy mají významnou úlohu u vzniku řady patologií včetně vývojových vad,

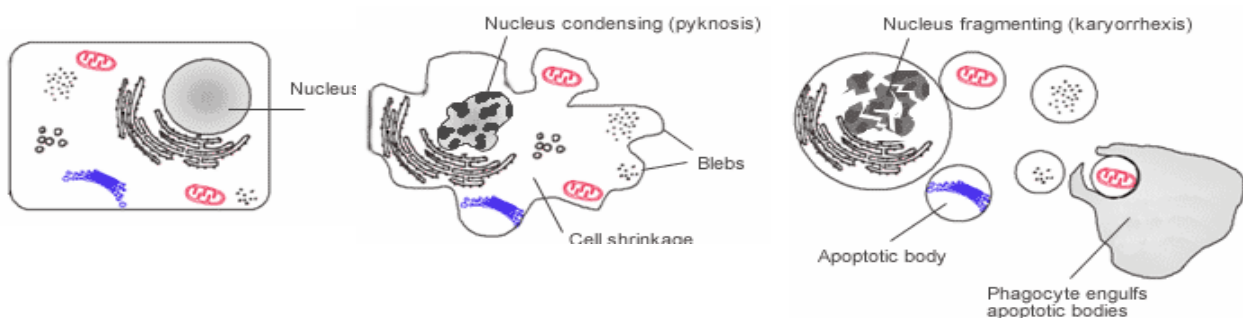
autoimunitních a mnoha dalších onemocnění, mezi které patří i rakovina. Velmi často se v těchto případech jedná o nadměrnou nebo naopak nedostačující úroveň apoptosy.

Rakovina je příkladem onemocnění, jež je podmíněno poruchou regulačních mechanismů buněčného cyklu. Může jít o extrémní proliferaci buněk, nebo o jejich nedostatečnou eliminaci z organismu.

Díky výzkumu hlístice *Caenorhabditis elegans* jsou dnes známy mechanismy zapojené do procesu apoptosy u savčích buněk. Při vývoji dospělého jedince hlístice totiž dochází k redukci přesně 131 somatických buněk z celkových 1090. Tyto buňky umírají na konkrétních místech geneticky podmíněnou buněčnou smrtí - apoptosou (Horvitz 1999).

7.1.1. Morfologie apoptosy

Apoptosa je charakterizována typickými morfologickými změnami buňky a biochemickými mechanismy závislými na energii. V průběhu apoptosy se buňka zmenšuje, srašťuje se jí jádro a dochází k pyknose - kondenzaci chromatinu do kompaktních shluků. Později se rozkládá jaderný obal a jaderná DNA je fragmentována na malé úseky, což je odborně nazýváno jako karyorrheze. Je degradován cytoskelet a buňka je separována do apoptotických tělísek, která jsou fagocytována makrofágy nebo okolními buňkami. Tělíška obsahují ztuhlé organely se zachovalou integritou, zbytky jádra a jsou obalena plazmatickou membránou, která zabraňuje uvolnění buněčného obsahu a chrání tak mezibuněčný prostor před kontaminací a tvorbou zánětu. Tomu zabraňuje také rychlá fagocytosa tělísek okolními buňkami (Elmore 2007).



Obr. 2: Apoptosa: morfologické změny, vznik apoptotických tělísek a jejich fagocytosa okolními buňkami (převzato z <http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Apoptose-german.png>)

7.1.2. Biochemie apoptosy

Apoptotické buňky vykazují biochemické změny, které jsou společným rysem jejich strukturální patologie. Dochází při nich ke štěpení proteinů, zlomům DNA a procesům vedoucím k fagocytárnímu rozpoznání. Všechny tyto pochody jsou řízeny buňkou (Elmore 2007).

7.1.2.1. Kaspasy

V průběhu apoptosy jsou aktivovány kaspasy - proteasy, které štěpí proteiny na N-konci v místě kyseliny asparagové. Kaspasy se v buňce vyskytují v neaktivní formě (prokaspasy) a aktivace jediné kaspasy může uvést v činnost další prokaspasy. Tato proteolytická kaskáda, kdy jedna kaspasa spouští další, zesiluje apoptotickou signální dráhu a tím vede k rychlé smrti buňky.

Hlavní kaspasy dnes dělíme do dvou základních skupin na kaspasy iniciační (kaspasa-2,8,9,10) a efektorové (kaspasa-3,6,7). Dále jsou známé kaspasy-11,12,13 a 14, které mají každá svou specifickou funkci. Například kaspasa-14 je exprimována pouze v embryonální tkáni (Kang et al. 2002).

Iniciační kaspasy jsou aktivovány jako první a spouští kaspasy efektorové. Ty potom štěpí klíčové buněčné proteiny (proteiny cytoskeletu, proteiny řídící opravu DNA, proteiny zabraňující apoptose), a tak buňku rychle a uspořádaně zabíjejí (Elmore 2007).

7.1.2.2. Apoptotické dráhy

Apoptosa může probíhat vnější a vnitřní dráhou. Vnější dráhu spouští molekuly z okolního prostředí (např. toxiny, cytokiny, hormony, růstové faktory, oxid dusnatý), které interagují s transmembránovými receptory, tzv. „receptory smrti“. Dochází k aktivaci iniciační kaspasy-8 a kaspasy-10 a k následnému spuštění apoptotické kaskády. Většinou dochází i ke spuštění vnitřní dráhy, která je spojená s mitochondriemi. Vnitrobuněčná cesta se spouští v okamžiku, kdy je buňka vystavena stresu, jako je např. působení radiace, glukokortikoidů, tepla, nedostatku živin či kyslíku nebo poškození DNA. Dochází při ní k zapojení stimulů nezávislých na „receptorech smrti“, které vyvolají intracelulární signály působící přímo na cíle v buňce. Tyto podněty způsobují změny na vnitřní mitochondriální membráně a vedou k otevření kanálů, ztrátě membránového potenciálu a vylití cytochromu c z mezimembránového prostoru do cytosolu. Cytochrom c se poté podílí na tvorbě tzv. apoptosomu a aktivaci iniciační kaspasy-9. Apoptosom je komplex, který obsahuje Apaf-1

protein, extramitochondriální holo-cytochrom c, deoxyadenosintrifosfát a prokaspasu 9 (Chinnaiyan 1999).

Obě dráhy končí v místě exekuční fáze, kdy dochází ke spuštění efektorových kaspas, které aktivují cytoplasmatické endonukleasy degradující DNA a cytoskeletární proteiny.

Na řízení a regulaci apoptosy se podílí proteiny rodiny Bcl-2 a významnou úlohu má také protein p53. Nedostatečná či naopak zvýšená funkce nebo exprese těchto proteinů se v nemalé míře podílí na vzniku nádorového bujení (Elmore 2007).

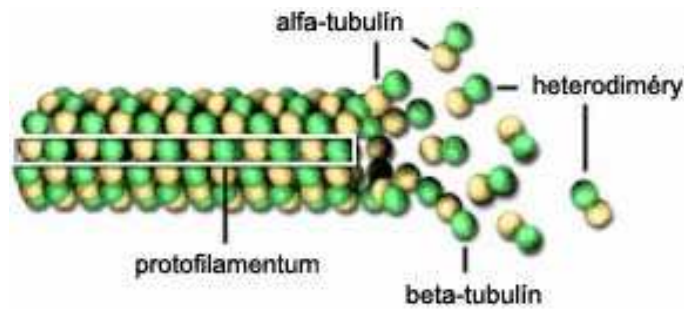
7.1.2.3. Závěrečná fáze

Pro buňky, které postoupily do závěrečné fáze apoptosy a změnily se na apoptotická tělíška, je typická exprese buněčných povrchových markerů, které vedou k časně fagocytose okolními buňkami a makrofágy. Nejznámějším ligandem pro makrofágy je glykoprotein fosfatidylserin, který se za normálních podmínek vyskytuje ve vnitřní vrstvě plazmatické membrány. Při programované buněčné smrti je enzymem scramblasou přemístěn do vrstvy vnější a následně rozpoznán (Elmore 2007).

7.2. Mikrotubuly

Mikrotubuly jsou zahrnuty v celé řadě buněčných funkcí včetně buněčné motility, intracelulárního transportu, udržování buněčného tvaru a mitosy, kdy vytváří dělicí vřeténko, které zabezpečuje rovnoměrný rozchod chromosomů do dceřiných buněk.

Jsou tvořeny dimery proteinů α a β -tubulinu, které jsou schopny nekovalentně vázat makroergický guanosintrifosfát (GTP) a v této formě asociovat v protofilamenta a dále v polymery formující duté, cylindrické trubice – tubuly o průměru 25 nm. Protofilamenta jsou složena z dimerů α / β -tubulinu vázaných za sebou. Na příčném řezu je pak patrné 13 tubulinových podjednotek. Mikrotubuly jsou dynamicky nestabilní struktury s plus koncem (β -tubulin), na kterém rostou, a minus koncem (α -tubulin), kde dochází k odbourávání. Neustále tak oscilují mezi fází prodlužování a zkracování. Tento přechod probíhá přednostně na plus konci a je koordinován syntesou a hydrolysou GTP. GTP se váže na α - i β -tubulin, ale na α -podjednotce je vázané stabilně a nedochází tam k jeho hydrolyse. Enzymatickou aktivitou β -tubulinu se GTP štěpí na fosfát a guanosindifosfát (GDP), čímž dochází ke změnám prostorové struktury molekul a jejich vazba do vláken se uvolňuje. Ve volných dimerech je GDP opět nahrazeno GTP a znovu dochází k polymerizaci tubulů.



Obr. 3: Mikrotubulus (převzato z www.bioweb.genezis.eu/.../mikrotubulus.jpg)

Mikrotubuly jsou organizovány plus koncem volně v cytoplasmě směrem k periferii buňky a minus koncem asociují s mikrotubulárním organizačním centrem nebo centrosomem. Centrosom je charakterizován dvěma centriolami, ve kterých se vyskytuje γ -tubulin. Ten vytváří prstenec a ukotvuje vlákno mikrotubulu v centrosomu.

α - a β -tubulinové jednotky mohou mít množství izotypických forem a také mohou podléhat rozdílným posttranslačním modifikacím. Složitější mnohobuněčné organismy mají až sedm různých izoform α - a β -tubulinů. Některé izotypy se vyskytují jen v jisté části těla, nebo jsou přítomné jen v určité fázi životního cyklu.

S mikrotubuly a volnými tubulinovými dimery interagují četné proteiny, které mohou ovlivňovat jejich dynamiku. Tyto proteiny se označují jako Microtubule associated proteins (MAPs) (Chien, Mark 2008, McGrogan et al. 2008).

7.2.1. Stabilizace mikrotubulů

Taxany mají schopnost polymerovat tubulin bez přítomnosti GTP, který je za normálních podmínek k polymerizaci nezbytný. Takto vystavěné mikrotubuly jsou neobvykle stabilní a odolné vůči depolymerizaci a dochází k porušení jejich dynamické rovnováhy (Schiff, Horwitz 1981).

Působení taxanů má na buňku největší dopad v době mitosy, kdy omezuje pohyb mitotického vřeténka. V buňce nemůže správně proběhnout navázání chromosomů na kinetochory, což negativně ovlivňuje jejich rozchod k pólům buňky. Za kontrolu tohoto procesu zodpovídá kontrolní mitotický bod, který je aktivován při každém vstupu buňky do mitosy a zamezuje anafázi, dokud nejsou všechny chromosomy správně připojeny k dělicímu vřeténku. Signály kontrolního bodu jsou generovány z nepřipojených kinetochorů, které posilují četné proteiny. Při zastavení buněčného cyklu v této fázi dojde k tzv. uzamčení buňky v mitose, většinou na přelomu G2 a M fáze (McMorgan et al. 2008). Řada studií naznačuje, že právě tento krok je nezbytný pro zahájení apoptosy.

7.2.2. Molekulární cíl taxanů

Paclitaxel se váže na β -tubulinovou podjednotku a významně zvyšuje další polymerizaci tubulů (Manfredi et al. 1982, Nogales et al. 1995). Váže se v T-konformaci v oblasti M-smyčky v kontaktu s valin₂₃, arginin₂₈₂ a histidin₂₂₇ / asparagin₂₂₄ kapsou. T-konformace stabilizuje laterální interakci s přilehlými α - , β -tubulinovými molekulami (Rao et al. 1999, Snyder et al. 2001, Nogales 2000). Zatímco GDP-vázaný β -tubulin je nestabilní a řídí svou depolymerizaci, paclitaxel jej stabilizuje a zabraňuje zkracování (Schiff, Fant a Horwitz 1979).

8. Toxicita a rozpustnost paclitaxelu a docetaxelu

První a druhá generace taxanů jsou vysoce hydrofobní látky vyžadující rozpouštědla na bázi lipidů k překonání jejich slabé rozpustnosti. Pro paclitaxel se používá směs 50 : 50 polyethyl ricinového oleje - Cremophor[®]EL (CrEL) a ethanolu a pro docetaxel směs polysorbate80 (Tween[®]80) s etanolovým ředidlem (Rowinski et al. 1990, ten Tije et al. 2003). Před infuzí se oba roztoky musí naředit 5-20x fyziologickým roztokem nebo 5% roztokem glukosy (Rowinski et al. 1990). Je prokázáno, že obě rozpouštědla jsou biologicky a farmakologicky aktivní látky, které mohou vyvolat řadu nežádoucích, život ohrožujících účinků. CrEL uvolňuje změkčovadlo ze standardních intravenózních hadiček. Jedná se o di-2-ethylhexyl ftalát (DEHP), který po infuzi indukuje uvolňování histaminu a následné hypersenzitivní reakce. Způsobuje tak akutní přecitlivělost včetně dušnosti, návalů horka, periferní neuropatie, vyrážky nebo obecné kopřivky. CrEL paclitaxelová forma tudíž vyžaduje speciální infuzní soupravy, aby se minimalizovala expozice DEHP. Hypersenzitivní reakce může vyvolat také polysorbate80, i když v menší míře. Hlavně bývá spojován s někdy závažnými a nevratnými sensorickými a motorickými neuropatiemi. Navíc mění fluiditu membrán, což vede k zadržování tekutin (Miele et al. 2009). Celková četnost mírných reakcí u podávání těchto látek je odhadována na 44 %, s velkými problémy se pak potýká 1,5 – 3 % pacientů (van Zuylen et al. 2001). Lehkým projevům přecitlivělosti nezabraňuje ani předléčba kortikosteroidy a histaminem (ten Tije et al. 2003).

Taxany s rozpouštědlem vyžadují intravenózní podávání. Existují důkazy o tom, že syntetická rozpouštědla při podávání s taxany snižují účinnost léčby. Konkrétně CrEL vyvolává tvorbu micel, které obalují molekuly paclitaxelu a s ním pak cirkulují v systémovém oběhu. Snižuje se tak distribuce paclitaxelu a jeho biologická dostupnost nádorovým buňkám. Bylo také *in vitro* prokázáno, že polyethyl ricinový olej blokuje endoteliální transcytosu paclitaxelu, která je zprostředkována albuminovým receptorem (Aapro, Minckwitz 2008).

9. Rezistence k taxanům

Účinnost léčby ovlivňuje i vznik rezistence (odolnosti) na podávaná cytostatika. Nelze přehlížet tzv. přirozenou (primární) rezistenci neboli sníženou citlivost nádorů k chemoterapii, která vyplývá z biologických vlastností nádorů a liší se podle jejich histogeneze. Některé nádory (např. karcinom ledvin, pankreatu) jsou k chemoterapii téměř necitlivé, u jiných typů (choriokarcinom, nádor varlat, nádory u dětí) vede terapie cytostatiky k úplnému vyléčení (Klener 1994).

Druhým typem rezistence je rezistence získaná (sekundární), která je navozena *de novo* jako reakce na prvotní léčbu. Může být způsobena vznikem skutečné rezistentní subpopulace buněk. Taxanová rezistence zahrnuje celou řadu faktorů, které se podílejí na jejím vzniku. Nejstudovanějšími jsou mutace v tubulinech (α i β), rozdílná stavba u β -tubulinových izotypů, změny v expresi proteinů asociovaných s mikrotubuly a P-glykoproteinu (Perez 2009).

Překonání rezistence vůči chemoterapii je dnes v popředí zájmu klinického i experimentálního výzkumu.

9.1. β -tubulinové mutace

Většina tubulinových mutací, které byly dodnes identifikovány, se vyskytují v genu *HM40* β 1-tubulinového izotypu, v oblasti exonu 4, pouze 2 mutace byly nalezeny v exonu 1 (Berrieman et al. 2004). Například byly *in vitro* nalezeny změny u leucinového zbytku v oblasti H6-H7 smyčky blízko místa vazby paclitaxelu (Wang et al. 2006). Díky této změně dochází k omezení připojení taxanu, destabilizaci skládání mikrotubulu, a následnému vzrůstu rezistence k cytostatiku. Těchto mutací je celá řada, jen ve studii ke karcinomu plic bylo pomocí sekvenční analýzy exonu 1 a 4 nalezeno 19 β -tubulinových mutací u 16 ze 49 pacientů (Monzo et al. 1999). Většina těchto mutací snižuje vnitřní stabilitu cytoskeletárního proteinu a kompenzuje tak stabilizační účinek paclitaxelu.

9.2. α -tubulinové mutace

Paclitaxelová rezistence má také spojitost s mutacemi v α -tubulinu, ale v menším rozsahu. Je možné, že tyto mutace ovlivňují vazbu MAPs na tubulin a tím podmiňují vznik rezistence (McGrogan et al. 2008).

9.3. β -tubulinové izotypy

β -tubulin je kódován velkou rodinou genů. V C-terminální doméně proteinu se nachází variabilní úsek, podle kterého se dělí do sedmi tříd (β I, β II, β III, β IVA, β IVB, β V a β VI). Skupiny se vyznačují rozdílnými vlastnostmi skládání, mikrotubulární dynamiky a interakcí s léky. β I a β IVB jsou základní izotypy, které jsou v buňkách tvořeny, zatímco další skupiny se vyskytují pouze ve specifických tkáních, např. β III-tubulin je vytvářen pouze v neuronech a v mozku. Třída III a IV má pomalejší skládání a polymerizaci ve srovnání s třídou I a II (McGrogan et al. 2008). Studie ukázaly, že mikrotubuly složené z čistého β III-nebo β IV-tubulinu jsou podstatně méně citlivé k účinku paclitaxelu než mikrotubuly z β II-tubulinu (Derry et al. 1997).

9.4. Proteiny asociované s mikrotubuly

Proteiny asociované s mikrotubuly (MAPs), které regulují mikrotubulární dynamiku při interakci s tubulinovými polymery a mikrotubuly, hrají roli v buněčné citlivosti k antimitotickým lékům.

Jedním z MAPs je protein Tau, který se převážně nachází v neuronech. Může se ale také vyskytovat v gliových a epiteliálních buňkách. Jeho hlavní funkcí je shlukování tubulinu a stabilizace mikrotubulů. Protein se podélně váže k vnitřní i vnější straně mikrotubulu mezi dvěma sousedními tubulinovými dimery na protofilamentech. Bylo zjištěno, že vazebné místo na vnitřní straně mikrotubulu se shoduje s vazebným místem pro paclitaxel.

Dalším příkladem proteinu asociovaného s mikrotubuly je rakovinný protein 18 (stathmin), což je fosfoprotein destabilizující mikrotubuly. Váže se k tubulinovým dimerům a stimuluje mikrotubulární kritický bod, čímž dochází k náhlé změně z růstu mikrotubulů v jejich zkracování. Mění dynamiku mikrotubulů během interfáze buněčného cyklu a mitosy. Stathmin je exprimován ve všech buněčných typech. Protože jeho účinek vede k rozpadu mikrotubulů, působí proti stabilizační funkci taxanů a podílí se tak na vzniku rezistence.

Významným proteinem schopným asociovat s mikrotubuly je i protein MAP4. Je přítomný ve všech buňkách a stabilizuje mikrotubuly při růstu a zapojuje se do regulace jejich dynamiky během mitosy. Když je MAP4 fosforylován (inaktivován), dochází k jeho uvolnění z mikrotubulů a dovoluje tak buňce pokračovat v mitose. Nedostatečná regulace nebo inaktivace MAP4 zvyšuje dynamiku mikrotubulů a může podporovat vznik rezistence.

Všechny tyto proteiny jsou kontrolovány fosforylací proteinovými kinasami (např. PP2A, Cdc2, PAKs). Změny jejich exprese v nádorových buňkách vedou ke zněmám stability mikrotubulů a navození odolnosti k taxanům (McGrogan et al. 2008).

9.5. Mnohočetná rezistence

Jedná se o zvláštní druh rezistence společné pro různá, strukturně odlišná cytostatika. Klíčovým fenoménem mnohočetné rezistence (multiple drug resistance; MDR) je nadměrná exprese fosfoglykoproteinu (P-glykoproteinu; P-gp) buněčné membrány, který patří do ABC (ATP-binding cassette) proteinové rodiny (Gottesman 2002). Tento glykoprotein je na energii závislá pumpa, která odčerpává cytostatika do extracelulárního prostoru a eliminuje tím jejich toxické působení v buňce. P-glykoprotein je produktem genu *MDR1* lokalizovaném na 7. chromozomu. Při vazbě substrátu v buňce na P-gp je aktivována jedna ATP-vázací doména, dochází k hydrolyze ATP (spotřeba energie), změně konformace proteinu a uvolnění substrátu ven z buňky. P-gp může vázat širokou škálu hydrofobních léčiv včetně paclitaxelu (McGrogan et al. 2008).

V lidských nádorech dochází k nadměrné produkci těchto ABC transportérů, které zabraňují efektivnímu účinku podávaných léků.

Paclitaxel se do buňky dostává pasivní difuzí, je však substrátem pro P-glykoprotein, který ho aktivně odčerpává ven z buňky. Jeho koncentrace v buňce je tedy limitována množstvím membránových pump. Podle meta-analýzy bylo odhadnuto, že přibližně 40 % všech nádorů vykazuje tento typ rezistence (Trock et al. 1997).

10. Nové taxany

Díky své účinnosti v nádorové tkáni se taxany staly nedílnou součástí léčby rakoviny. Jejich toxické působení na organismus a vznik rezistentních buněčných linií však velmi silně ovlivňuje úspěšnost terapie, a proto se výzkum zaměřil na hledání a vytváření nových forem taxanů. Takových, které dokáží obejít rezistenci a které budou šetrnější k organismu z hlediska nežádoucích vedlejších účinků.

Rezistence k chemoterapeutikům je velmi složitým komplexem mechanismů probíhajících v jediné buňce. Studie se zaměřují na překonání jednotlivých problémů, a tak vzniká celá řada nových taxanových variant.

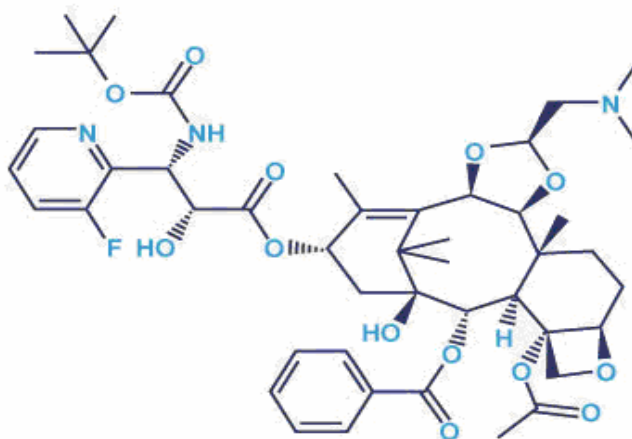
Všechny formy taxanů využívají stejnou strategii pro navození buněčné smrti. Vždy se jedná o podporu růstu a stabilizaci mikrotubulů, která u dělících se buněk zabraňuje dokončení buněčného cyklu. Pokud se tedy novým taxanům podaří obejít problémy s rezistencí, jsou schopny indukovat buněčnou apoptosu zablokováním buňky v mitose.

10.1. Perorální taxany

Ústní podávání taxanových léčiv je slibnou alternativou nabízející více pohodlí než intravenózní infuze a delší, nebo kontinuální plány pro dávkování a jejich podávání. Orální forma také eliminuje nutnost syntetických rozpouštědel při podání, které jsou spojeny se závažnou toxicitou a sníženým účinkem taxanů. Účinek paclitaxelu je však ohrožen nízkou absorpcí a aktivním vylučováním P-glykoproteinovými transportéry, které ve střevě zabraňují vstřebávání taxanu do krve. Úsilí o zlepšení využití orální formy paclitaxelu se zaměřilo na současnou léčbu s inhibitory P-glykoproteinu (Aapro, Minckwitz 2008).

10.1.1. Teseaxel (DJ-927)

Teseaxel (obr. 4) byl jednou z prvních orálních forem paclitaxelu, který prokázal protinádorové účinky v II. etapě klinických studií (Syed et al. 2004). Teseaxel se váže na β -tubulinovou podjednotku ve složených mikrotubulech a tím je stabilizuje. Působí silně cytotoxicky v široké škále typů nádorových buněk. V testech vykazoval mnohem vyšší účinnost proti buněčným liniím s mnohočetnou rezistencí než paclitaxel (Genta Incorporated Website, 2010). Klinické zkoušky byly ale pozastaveny pro komplikace s neutropenií (Syed et al. 2004).



Obr. 4: Teseaxel: chemická struktura (převzato z Genta Incorporated Website: http://www.genta.com/Products_and_Pipeline/Teseaxel/Mechanism_of_Action.html)

10.1.2. Docetaxel 100 mg s OC144-093

OC144-093 je silný inhibitor P-glykoproteinů, který umožnil lepší průnik docetaxelu k nádorové tkáni. Při studii byl pacientům nejdříve podán docetaxel ústně spolu s inhibitorem a o dva týdny později následovala intravenózní infuze docetaxelu. Relativní dostupnost docetaxelu aplikovaného perorálně byla 26 % a tento úspěch byl připsán OC144-093. Pacienti prošli většinou prvním a druhým stupněm nežádoucích účinků a projevila se u nich velká farmakokinetická variabilita v reakci na obě formy docetaxelu (Kuppens et al. 2005).

10.1.3. BMS-275183

BMS-275183 je perorální forma C-4 methyl uhličitánového analogu paclitaxelu, která má potenciál k léčbě různých typů nádorových onemocnění (Bröker et al. 2006). Jeho účinnost a bezpečnost byla hodnocena v I. etapě klinických zkoušek u pacientů s pokročilými metastázujícími karcinomy plic. Dávka léku byla limitována periferní neuropatií (Aapro, Minckwitz 2008).

10.1.4. Paclitaxel poliglumex

Jedná se o biologicky odbouratelný, ve vodě rozpustný polyglutamátový polymer s protinádorovým účinkem. Polyglutamátové zbytky zvyšují rozpustnost paclitaxelu a posilují jeho dostupnost nádoru přes hyperpermeabilitu cév (Aapro, Minckwitz 2008). Paclitaxel poliglumex je tak přednostně distribuován do nádoru. Jakmile se dostane do buňky, proteinový polymer je rozštěpen enzymy a paclitaxel začne fungovat jako mikrotubuly stabilizující částice. V současné době probíhá 9 studií ve II. a III. etapě klinických testů u různých typů rakoviny např. vaječníků, jícnu, tlustého střeva či prostaty (Aapro, Minckwitz 2008).

10.1.5. Paclitaxel s emulzí vitamínu E

Na vitamínu E založená emulze umožňuje bolusové infuze bez steroidní předléčby a může snížit riziko přecitlivělosti. Dále pomáhá zvýšit penetraci léku do nádorové tkáně inhibicí P-glykoproteinů (National Cancer Institute 2010). V současné době probíhá II. etapa klinické studie, která hodnotí bezpečnost a účinnost emulze (Aapro, Minckwitz 2008).

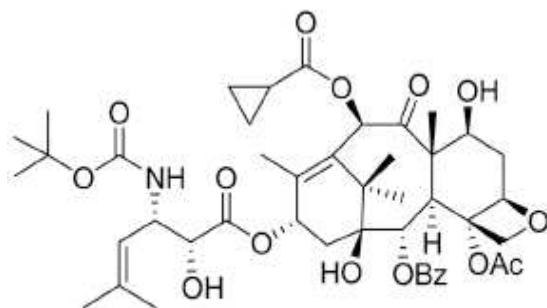
Bylo také zjištěno, že v B-buňkách leukémie 2 tato částice indukuje programovanou buněčnou smrt vazbou na protein Bcl-2, jehož funkcí je inhibice apoptosy (National Cancer Institute 2010).

10.2. Nové taxany zaměřené na mutace β l-tubulinu

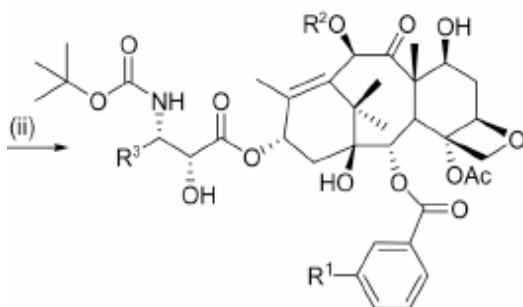
Během studií bylo zjištěno, že C3'-fenylová skupina není nezbytnou složkou pro silnou aktivitu taxanů a změny na C10 nebo C3' pozici vytvořily sloučeniny o jeden až dva řády silnější, než byla mateřská látka (Ojima et al. 2009). Označují se jako taxany druhé generace (Ojima et al. 1996). Také zavedení substituentů (např. CH_3O , N_3 , Cl , F) v meta pozici C2-skupiny u druhé generace taxanů zvýšilo účinnost látky dvakrát až třikrát u rezistentních buněčných linií karcinomu prsu (Ojima et al. 1999/6, Ojima et al. 1999/9).

Byly syntetizovány taxany druhé generace se systematickou modifikací na C10, C12 a C3'N pozici a byla studována jejich strukturní afinita. Řada těchto taxanů vykazovala mimořádně vysoký potenciál vůči buněčným liniím s mnohočetnou rezistencí a některé neměly prakticky žádné rozdíly v účinnosti na citlivé nebo rezistentní buněčné linie. Tyto výjimečně účinné taxany se označují jako tzv. taxany třetí generace (Ojima et al. 2009).

19 (SB-T-1214), 14g (SB-T-121303) a 14i (SB-T-1213031) jsou schopny účinně obejít paclitaxelovou rezistenci plynoucí z bodových mutací v β l-tubulinu (Giannakakou et al. 1997). Mají totiž vysokou afinitu k tubulinu a podporují kompletování a formování početných, velmi krátkých mikrotubulů v nepřítomnosti GTP a to dokonce rychleji než paclitaxel. Navíc 19 a 14g předvedly dobrý toxický účinek u čtyř buněčných linií rakoviny pankreatu s mnohočetnou rezistencí (Ojima et al. 2009).



Obr. 5: Taxan 19 (SB-T-1214) – chemická struktura (převzato z Ojima et al. 2009)

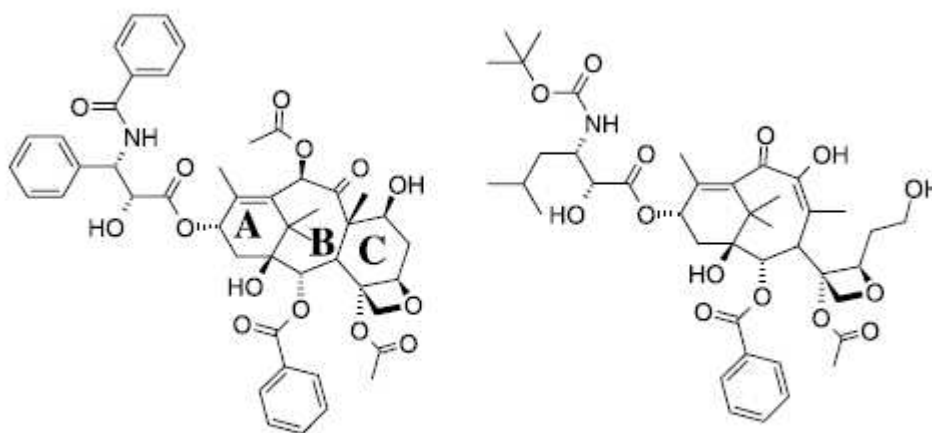


Obr. 6: Taxan 14a-p – chemická struktura; $\text{R}^3 = \text{CH}_3\text{OC}=\text{CH}-$, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2-$, $(E)\text{-CH}_3\text{OCH}=\text{CH}-$, $\text{CH}_2=\text{CH}(\text{CH}_2)_2-$, $(S)\text{-2,2-CH}_3\text{O-cyklopropyl}$ (převzato z Ojima et al. 2009)

10.3. IDN5390 působí při expresi třídy III β -tubulinu

Taxan druhé generace IDN5390 (obr. 7) byl vybrán pro svou selektivní činnost v paclitaxel rezistentních buňkách s nadměrnou expresí β III-tubulinu. Jeho specifitu lze vysvětlit s ohledem na složení β -tubulinového vazebného místa pro taxany. Serin₂₇₇ v M-smyčce β -tubulinu, který interaguje s paclitaxelovou C skupinou u třídy I, je ve třídě III β -tubulinu vyměněn za arginin₂₇₇. Konformační změny této oblasti zabraňují interakci paclitaxelu s β III-tubulinem (Ferlini et al. 2005). IDN5390 je taxan, který má otevřenou strukturu 6-C kruhu baccatinu (Appendino et al. 1997). Díky ní je schopen vázat se na β III-tubulin a tím ho stabilizovat.

Tato sloučenina byla původně vybrána pro svou schopnost ovlivnit motilitu endoteliálních buněk (Taraboletti et al. 2002). Má však také příznivou biologickou dostupnost, je dobře snášena a vykazuje významnou protinádorovou aktivitu na nádorových modelech včetně nádorů s rezistencí k paclitaxelu (Pratesi et al. 2003; Petrangolini et al. 2004).



Obr. 7: Paclitaxel a IDN5390 – chemická struktura, u IDN5390 je vidět otevřenou strukturu 6-C kruhu (převzato z Ferlini et al. 2005)

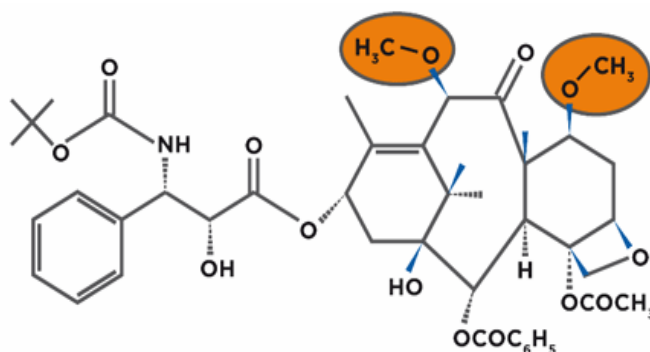
10.4. Překonání mnohočetné rezistence novými taxany

Výzkum se v této oblasti zaměřuje na taxanové formy, které překonávají nadměrnou expresi ABC transportérů. Cabazitaxel a larotaxel nejsou substráty pro P-gp, a proto nemohou být z buňky touto proteinovou pumpou odčerpávány. Další cestou, jak obejít mnohočetnou rezistenci, bylo vytvořením nanočástice paclitaxelu vázaného na albumin. Albumin jako nosič umožnil transport léku do nádorové tkáně ve znatelně větším množství, než je tomu u pasivní difúze paclitaxelu.

10.4.1. Cabazitaxel (XRP6258) a larotaxel (XRP9881)

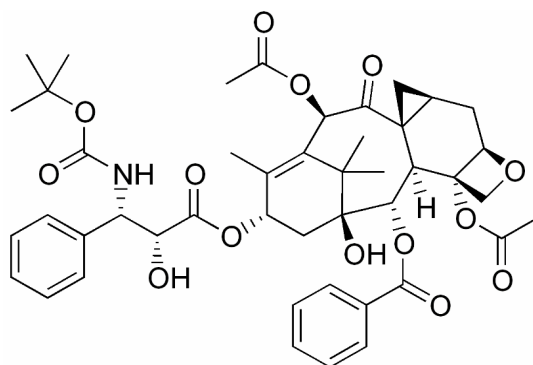
Cabazitaxel (obr. 8) a larotaxel (obr. 9) jsou nové semisyntetické taxany odvozené z 10-deacetylbaaccatin III (Diéras et al. 2008, Atard et al. 2006), proto se více podobají docetaxelu než paclitaxelu. Podobně jako ostatní taxany vyvolávají cytotoxický účinek podporou stavby mikrotubulů a jejich stabilizací, což nakonec vede k indukci apoptosy a smrti buňky. Obě látky vykazují nízkou afinitu k P-glykoproteinu (Gelmon et al. 2000; Aller et al. 2000), a tak byly vybrány k léčbě nádorů s mnohočetnou rezistencí (Pivot et al. 2008). Protože nejsou z buněk odčerpávány pomocí P-glykoproteinového transportéru, jejich účinnost neovlivňuje jeho nadměrná exprese. Obě látky vykazují *in vivo* protinádorový účinek na většině modelů, např. B16/TXT melanomu (Gelmon et al. 2000; Bissery et al. 2000) a mají schopnost překračovat hematoencefalickou bariéru mozku, což může souviset s nízkou afinitou k P-gp (Archimbaud et al. 2000; Kurata et al. 2000).

Předklinické studie prokázaly, že cabazitaxel byl toxický pro nádorové buňky se získanou rezistencí k docetaxelu a paclitaxelu a také k některým dalším lékům, např. doxorubicinu, vinkristinu, vinblastinu (Bissery et al. 2000). V současné době je ve III. etapě klinických testů u pacientů s hormon-refrakterním karcinomem prostaty po terapii založené na docetaxelu.



Obr. 8: Cabazitaxel – chemická struktura (převzato z <http://www.sanofi-aventisoncology.com/wps/portal/oncology/home/pipeline/cabazitaxel>)

II. etapa klinických zkoušek larotaxelové léčby byla provedena u žen s rakovinou prsu léčenou taxany (Diéras et al. 2008). Larotaxel je v současné době ve III. etapě výzkumu u pacientů s pokročilým nádorem pankreatu a u pacientů s pokročilým karcinomem močového měchýře.



Obr. 9: Larotaxel – chemická struktura (převzato z <http://en.wikipedia.org/wiki/Larotaxel>)

Bezpečnostní profil obou léků je srovnatelný s ostatními taxany (Pivot et al. 2008; Diéras et al. 2008). Odpověď na léčbu u nádorů rezistentních k taxanové léčbě byla 19 % u larotaxelu a 14 % pro cabazitaxel. Oba léky jsou podávány intravenózně a je nutná premedikace antihistaminiky a kortikosteroidy (Pivot et al. 2008; Diéras et al. 2008).

10.4.2. Paclitaxel vázaný na albumin (ABI-007)

Albumin je přirozený nosič endogenních hydrofobních molekul (jako jsou vitaminy, hormony a další ve vodě nerozpustné látky), které váže reverzibilní nekovalentní vazbou (Hawkins et al. 2008). Navíc pomáhá endoteliální transcytose vázaných látek.

Z krve se ke tkáni dostává cévami se zvýšenou propustností, které obklopují nádor. V intersticiu tumoru se pak albumin akumuluje, protože poruchy v odvodu lymfatické tekutiny z rakovinné tkáně zabraňují jeho návratu do oběhové soustavy (Maeda et al. 2000; Tirupathi et al. 1997).

Albumin je ligandem pro 60kDa membránový glykoprotein (gp60; albondin) epiteliálních buněk. Gp60 interaguje s plazmatickým proteinem caveolinem-1, zprostředkovávajícím tvorbu transcytotických váčků = kaveolů. Také protein osteonectin díky homologii s gp60 váže albumin. Osteonectin a caveolin-1 jsou proteiny vyskytující se v některých typech nádorů (prsů, plic, prostaty). S jejich pomocí se látky vázané na albumin dostávají do buněk (John et al. 2003, Minshall et al. 2003, Vogel et al. 2001; Tirupathi et al. 1997).

Na základě těchto vlastností albuminu byly vytvořeny nové systémové preparáty pro taxany, které jsou bez lipidových rozpouštědel (Crenophoru).

ABI-007 je biologicky interaktivní nanometrová částice, která využívá unikátní vlastnosti albuminu k bezpečnému podávání vyšších dávek paclitaxelu s kratší dobou infuze (Wiedenmann et al. 2007). Preparát neobsahuje žádné rozpouštědlo. Je používán jako koloidní suspenze z lyofilizovaného paclitaxelu a lidského albuminového séra naředěná

fyziologickým roztokem (0,9% NaCl). Lidský albumin stabilizuje částice léku v průměrné velikosti 130 nm, která brání jakémukoliv riziku ucpání kapilár a nevyžaduje žádné speciální infúzní systémy nebo předléčbu steroidy či antihistaminiky (Desai et al. 2006).

Díky akumulaci ve tkáni dochází k dlouhodobému vystavení rakovinných buněk působícím lékům. Cílem je poskytnout vyšší koncentraci léčiva rakovinné tkáni a tím zvýšit účinek na nádor. Snižuje se tím také systémová toxicita (Maeda et al. 2000; Tirupathi et al. 1997).

Předklinické studie provedené na myších s lidským nádorem prsu ukázaly, že ABI-007 má vyšší penetraci do nádorových buněk a zvýšenou protinádorovou aktivitu ve srovnání se stejnou dávkou standardního paclitaxelu (Desai et al. 2006, Desai et al. 2002).

V I. etapě klinické studie, která se uskutečnila na 19 pacientech s pevným nádorem a rakovinou prsu ukázala maximální toleranci dávky ABI-007 o 70 % vyšší než u CrEL-paclitaxelové formy. Dávka byla limitovaná toxicitou (senzorické neuropatie, stomatitida, oční toxicity). U žádného z pacientů se neobjevila přecitlivělost (Ibrahim et al. 2002).

Významnou protinádorovou aktivitu ABI-007 u pacientů s metastázemi rakoviny prsu potvrdila II. etapa zkoušek. Nebyly zaznamenány žádné závažné vedlejší účinky a další obecné toxicity spojené s taxany byly méně časté a méně intenzivní (Ibrahim et al. 2005).

Ve velké studii III. etapy byly pozorovány přiměřeně toxické dávky ABI-007 (260 mg/m²) a CrEL-paclitaxelu (175 mg/m²) na 454 pacientech s rakovinou prsu s metastázemi. ABI-007 byl i v této studii účinnější (37 %) než CrEL-paclitaxel (15 %) a jeho toxicita byla opět výrazně nižší (10 % oproti 21 %) i přes dávku, která byla přibližně o 50 % vyšší. Pouze 3. stupeň senzorické neuropatie se ve skupině léčené ABI-007 vyskytoval častěji (20 % oproti 10 %) (Gradishar et al. 2005).

Navíc ABI-007 prokázal silnou protinádorovou aktivitu v kombinaci s radioterapií. Tyto účinky byly dosaženy bez zvýšené toxicity pro normální tkáň u dávky 1,5x vyšší, než je standard pro léčbu paclitaxelem (Wiedenmann et al. 2007).

Nedávno byla tato formulace léku schválena US Food and Drug Administration pro užití u pacientů s předléčenou metastatickou rakovinou prsu.

11. Závěr

Taxany jako cytostatické léky jsou dnes standardně používány v léčbě řady nádorových onemocnění. Přestože se většinou používá kombinovaná léčba a ani chemoterapie neobsahuje pouze jediné léčivo, ale většinou mix více léků, hrají stále nezanedbatelnou roli. A to už od devadesátých let, kdy byl paclitaxel jako lék schválen pro klinickou praxi. Bohužel i při jeho vysoké účinnosti dochází během léčby k řadě komplikací. Nejzávažnějším nežádoucím vedlejším účinkem je vznik rezistencí. Zatím jsou taxany jedním z nejúčinnějších léků rakoviny, proto je třeba jejich zdokonalování a hledání takových variant, které budou mít maximální účinnost a zároveň budou šetrné k organismu pacienta.

Konečným protinádorovým efektem je indukce apoptosy v nádorových buňkách. Detailní mechanismy indukce apoptosy taxany nejsou stále plně známy, je však jisté, že stabilizací mikrotubulů zabraňují vytvoření dělicího vřeténka během buněčného cyklu a následnému správnému rozchodu chromozomů k opačným pólům buňky. To má za následek zablokování buňky v mitose a následné spuštění mechanismů vedoucích k apoptose. Všechny formy taxanů fungují na stejném principu stabilizace mikrotubulární dynamiky. Proto je hlavním cílem vývoje nových taxanů zejména překonání problémů spojených s léčbou dvou nejčastěji aplikovaných taxanových preparátů - paclitaxelu a docetaxelu.

Jednou ze stále se rozvíjejících cest je vznik perorálních taxanů. Díky ústnímu podávání by mohlo být u této skupiny možné opustit od intravenózní infuze, což by bylo pohodlnější nejen pro pacienty, ale také pro lékaře. Další výhodou tohoto typu aplikace je eliminace rozpouštědel na bázi lipidů, které jsou zodpovědné za hypersenzitivní reakce u pacientů a snížení účinku léčby standardně podávaných dávek paclitaxelu. Je však nutné zároveň podávat inhibitory P-gp, aby se zajistila transcytosa léků přes střevní epitel do krevního oběhu. Mezi perorální preparáty založené na taxanech patří tesetaxel, docetaxel 100 mg s OC144-093, BMS-275183, paclitaxel poliglumex a paclitaxel s emulzí vitamínu E. Zatím nejlépe se z této skupiny osvědčil paclitaxel poliglumex u nějž probíhají klinické zkoušky III. etapy u různých typů nádorů. Kombinace paclitaxelu s emulzí vitamínu E je v současnosti v II. etapě zkoušek, kde se hodnotí jeho bezpečnost. Pro terapii pokročilého metastazujícího karcinomu plic je v současné době v testování perorálně aplikovaný taxanový derivát BMS-275183.

Protože je mnoho typů *de novo* vzniklých rezistentních nádorů, je i výzkum nových taxanů zaměřen více směry. Hledají se takové formy látek, které dokáží účinně reagovat na nově vzniklé situace v nádorových buňkách.

Nový taxan IDN5390 je účinný v buňkách, kde je častější třída I β -tubulinu nahrazena expresí β III-tubulinu. Díky otevřenému 6-C kruhu ve struktuře taxanu je schopen se vázat na vazebné místo β III-tubulinu. V nádorech, kde díky změnám v expresi tubulinových izoform

vznikla rezistence k paclitaxelu, je potom účinným cytostatikem a může úspěšně nahradit standardní taxanovou léčbu. Zatím však nebyl klinicky testován.

Nadměrná exprese P-gp nebo mutace v β I-tubulinu jsou dalšími důležitými problémy léčby rakoviny. Bodové mutace v β -tubulinu nejčastěji způsobují jeho větší dynamickou nestabilitu, která pak kompenzuje stabilizační účinek taxanů. Nové taxany druhé a třetí generace 19, 14i, 14g jsou schopny několikanásobně účinněji než paclitaxel formovat krátké mikrotubuly za nepřítomnosti GTP. Jejich stabilizační účinek je tak značně intenzivní a od něj se odvíjí větší toxicita pro nádorové buňky.

Jedním z hlavních úkolů dnešního výzkumu léků rakoviny je najít způsob, jak obejít mnohočetnou rezistenci u populací nádorových buněk. Tato odolnost totiž není směřována pouze proti jednomu typu léků, např. taxanům, ale proti celé řadě dalších strukturně odlišných cytostatik. Hlavní příčinou mnohočetné rezistence je nadměrná exprese ABC transportérů, zejména P-glykoproteinu. S konkrétním cílem vyhnout se tomuto problému vznikly nové taxany larotaxel a cabazitaxel a nanometrová částice paclitaxelu vázaného na albumin. Larotaxel a cabazitaxel se zaměřují přímo na P-glykoprotein. Jejich hlavní výhodou je, že nejsou substrátem této velmi účinné proteinové pumpy. Nadměrná exprese P-gp tedy neovlivňuje jejich koncentraci a následný efekt v buňce. Obě léčiva jsou nyní ve III. etapě klinického zkoušení.

Paclitaxel vázaný na albumin využívá jinou strategii překonání mnohočetné rezistence. Albumin je zde využit jako nosič léku, který pro své vlastnosti umožňuje proniknout do nádoru mnohem vyšší koncentrací cytostatika než je možné dosáhnout standardní cestou infuze. Přestože je tedy paclitaxel substrátem P-gp a je stále z buněk odčerpáván, jeho vysoká vnitřní koncentrace zajišťuje dostatečný toxický účinek na mikrotubulární cytoskelet. Jako jediný z nových taxanů byl tento preparát pro léčbu rakoviny schválen US Food and Drug Administration (Správa potravin a léčiv, USA).

Nádorová onemocnění jsou celosvětovým problémem a i přes velké pokroky v oblasti terapie a diagnostiky je řada nádorů stále neléčitelná. Díky novým metodám jsou sice k dispozici prostředky, které nemocným dávají naději na dlouhodobou remisi, pokud se však nenajdou léky, které by zajistily úplné vyléčení, bude veřejnost brát diagnostikovanou rakovinu stále jako rozsudek smrti. Proto je důležité se této oblasti dále věnovat. Taxany jsou sice jen další z řady testovaných léčiv, ale své místo v terapii stále mají.

12. Použitá literatura

- Aapro, M.S., Minckwitz, G.V. (2008): Molecular basis for the development of novel taxanes in the treatment of metastatic breast cancer. *EJC Supplements* 6: 3-11.
- Aller, A.W., Kraus, L.A. a Bissery, M-C. (2000): *In vitro* activity of TXD258 in chemotherapeutic resistant tumor cell lines. *Proc Am Assoc Cancer Res* 41: 303 (Abstr. 1923).
- Appendino, G., Danieli, B., Jakupovic, J., Belloro, E., Scambia, G. a Bombardelli, E. (1997): Synthesis and evaluation of C-seco paclitaxel analogues. *Tetrahedron Letters* 38: 4273-4276.
- Archimbaud, Y., Geres, P., Pellerin, R., et al. (2000): Pharmacokinetics of a new taxoid 14C-TXD258, in blood, plasma and brain of mouse, rat and dog. *Proc Am Assoc Cancer Res* 41: 215 (Abstr 1375).
- Attard, G., Greystoke, A., Kaye, S. a De Bono, J. (2006): Update on tubulin-binding agents. *Pathol Biol* 54(2): 72-84.
- Berrieman, H.K., Lind, M.J. a Cawkwell, L. (2004): Do β -tubulin mutations have a role in resistance to chemotherapy? *Lancet Oncol.* 5: 158-164.
- Bissery, M-C., Bouchard, H., Riou, J.F., et al. (2000): Preclinical evaluation of TXD258, a new taxoid. *Proc Am Assoc Cancer Res* 41: 214 (Abstr 1364).
- Bröker, L.E., de Vos, F.Y.F.L., van Groeningen, C.J., Kuenen, B.C., Gall, H.E., Woo, M.H., Voi, M., Gietema, J.A., de Vries, E.G. a Giaccone, G. (2006): Phase I trial with BMS-275183, a novel oral taxane with promising antitumor activity. *Clin Cancer Res* 12: 1760–1767.
- Daňková, Š. (2007). Analýza: na co umíráme? *Demografický informační portál*, převzato z http://www.demografie.info/?cz_detail_clanku&artclID=463.
- Derry, W.B., Wilson, L., Khan, I.A., Luduena, R.F. a Jordan, M.A. (1997): Taxol differentially modulates the dynamics of microtubules assembled from unfractionated and purified beta-tubulin isotypes. *Biochemistry* 36: 3554-3562.
- Desai, N., Trieu, V., Yao, Z., Louie, L., Ci, S., Yang, A., Tao, R., Kabal, E., Hawkins, M. a Soon-Shiong, P. (2006): Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of Cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with Cremophor-based paclitaxel. *Clin Cancer Res.* 12: 1317–1324.
- Desai, N., Yao, Z., Trieu, V., et al. (2002): Evidence of a novel transporter mechanism for a Cremophorfree, protein-engineered paclitaxel (ABI-007) and enhanced *in vivo* antitumor activity in an MX-1 human breast tumor xenograft model. *25th Annual San Antonio Breast Conference Symposium, San Antonio TX; 2002 December* 11–14.
- Diéras, V., Limentani, S., Romieu, G., Tubiana-Hulin, M., Lortholary, A., Kaufman, P., Girre, V., Besnval, M. a Valero, V. (2008): Phase II multicenter study of larotaxel (XRP9881), a novel taxoid, in patients with metastatic breast cancer who previously received taxane-based therapy. *Ann Oncol.* 19: 1255-1260.
- Elmore, S. (2007): Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 35(4): 495-516.

Ferlini, C., Raspaglio, G., Mozzetti, S., Cicchillitti, L., Filippetti, F., Gallo, D., Fattorusso, C., Campiani, G. A Scambia, G. (2005): The seco-taxane IDN5390 is able to target class III β -tubulin and to overcome paclitaxel resistance. *Cancer Res* 65: 2397-2405.

Foretová, L. Macháčková, E. (2003): Dědičný syndrom nádoru prsu a/nebo ovaria. Molekulární analýza *BRCA1* a *BRCA2* genů.

Gelmon, K.A., Latreille, J., Tolcher, A., Génier, L., Fischer, B., Horand, D., D'Aloisio, S., Vernillet, L., Daigneault, L., Lebecq, A., Besenval, M. a Eisenhauer, E. (2000): Phase I dose-finding study of a new taxane, RPR 109881A, administered as a one-hour intravenous infusion days 1 and 8 to patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 18: 4098-4108.

Genta Incorporated Website (citováno 2010): Tesetaxel: clinical program Berkeley Heights. Převzato z <http://www.genta.com/tesetaxel.html>.

Giannakakou, P., Sackett, D.L., Kang, Y-K., Zhan, Z., Buters, J.T.M., Fojo, T. a Poruchynsky, M.S. (1997): Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant β -tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization. *J. Biol. Chem* 272: 17118–17125.

Gottesman, M.M (2002): Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu. Rev. Med.* 53: 615-627.

Gradishar, W.J., Tjulandin, S., Davidson, N., Shaw, H., Desai, N., Bhar, P., Hawkins, M., a O'Shaughnessy, J. (2005): Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *J Clin Oncol.* 23(31): 7794–7803.

Greco, F.A., Hainsworth, J.D. (1999): The evolving role of paclitaxel for patients with carcinoma of unknown primary site. *Semin Oncol* 26: 129-133.

Greco, F.A. (2001): Paclitaxel-based combination chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 34: 53-56.

Grueritte, F. (2001): General and recent aspects of the chemistry and structure-activity relationships of taxoids. *Curr. Pharmacol. Des.* 7: 1229-1249.

Henderson, I.C., Berry, D.A. a Demetri, G.D. Cirrincione, C.T., Goldstein, L.J., Martino, S., Angle, J.N., Cooper, M.R., Gates, D.F., Tkaczuk, K.H., Fleming, G., Holland, J.F., Duggan, D.B., Carpenter, J.T., Frei 3rd, E., Chilsky, R.L., Wood, W.C., Muss, H.B. a Bortin, L. (2003): Improved outcomes from adding sequential paclitaxel but not from escalating doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer. *J Clin Oncol* 21: 976-983.

Horvitz, H.R. (1999): Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res* 59: 1701–1706.

Hawkins, M.J., Soon-Shiong, P. a Desai, N. (2008): Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. *Adv Drug Deliv Rev.* 60: 876–885.

Chien, A.J., Mark, M. (2008): Cellular mechanisms of resistance to anthracyclines and taxanes in cancer: intrinsic and acquired. *Semin Oncol* 35: 1-14.

Chinnaiyan, A.M. (1999): The apoptosome: heart and soul of the cell death machina. *Neoplasia* 1: 5-15.

- Ibrahim, K.N., Desai, N., Legha, S., Soon-Shiong, P., Theriault, R.L., Rivera, E., Esmaeli, B., Ring, S.E., Bedikian, A., Hortobagyi, G.N. a Ellerhorst, J.A. (2002): Phase I and pharmacokinetic study of ABI-007, a Cremaphorfree, protein-stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel. *Clin Cancer Res* 8: 1038–1044.
- Ibrahim, N.K., Samuels, B., Page, R., Doval, D., Patel, K.M., Rao, S.C., Nair, M.K., Bar, P., Desai, N. a Hortobagyi, N. (2005): Multicenter phase II trial of ABI-007, an albumin-bound paclitaxel, in women with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 23(25): 6019–6026.
- John, T.A., Vogel, S.M., Tirupathi, C., Malik, A.B. a Minshall, R.D. (2003): Quantitative analysis of albumin uptake and transport in the rat microvessel endothelial monolayer. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 284: 187–196.
- Jordan, M.A. (2002): Mechanism of action of antitumour drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr. Med. Chem.* 2: 1-17.
- Kang, S.J., Wang, S., Kuida, K. a Yuan, J. (2002): Distinct downstream pathways of caspase-11 in regulating apoptosis and cytokine maturation during septic shock response. *Cell Death Differ* 9: 1115–1125.
- Kerr, J.F., Wyllie A.H. a Currie, A.R. (1972): Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257.
- Klener, P. (1994): Úspěšnost léčby nádorových onemocnění cytostatiky. *Vesmír* 73: 205.
- Kuppens, I.E., Bosch, T.M., van Maanen, M.J., Rosing, H., Fitzpatrick, A., Beijnen, J.H. a Schellens, J.H. (2005): Oral bioavailability of docetaxel in combination with OC144-093 (ONT-093). *Cancer Chemother Pharmacol* 55: 72–78.
- Kurata, T., Shimada, Y., Tamura, T., Yamamoto, N., Hyodo, I., H., Saeki, T., Takashima, S., Fujiwara, K., Wakasugi, H. a Kashimura, M. (2000): Phase I and pharmacokinetic study of a new taxoid, RPR 109881A, given as a 1-hour intravenous infusion in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 18: 3164-3171.
- Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. a Hori, K. (2000): Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* 65: 271–284.
- Manfredi, J.J., Parness, J. a Horwitz, S.B. (1982): Taxol binds to cellular microtubules. *J Cell Biol* 94: 688-696.
- Mastropaolo, D., Camerman, A., Luo, Y., Bayer, G.D. a Camerman, N. (1995): Crystal and molecular structure of paclitaxel (taxol). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6920-6924.
- McGrogan, B.T., Gilmartin, B., Carney, D.N. a McCann A. (2008): Review: taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1785: 96-135.
- Miele, E., Sponelli, G.P., Miele, E., Tamao, F. a Tamao S. (2009): Review: Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane® ABI-007) in the treatment of breast cancer. *Int. J Nanomedicine* 4: 99-105.
- Minshall, R.D., Sessa, W.C., Stan, R.V., Anderson, R.G. a Malik, A.B. (2003): Caveolin regulation of endothelial function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 285: 1179–1183.

Monzo, M., Rosell, R., Sanchez, J.J., Lee, J.S., O'Brate, A., Gonzalez-Larriba, J.L., Alberola, V., Lorenzo, J.C., Nunez, L., Ro, J.Y. a Martin, C. (1999): Paclitaxel resistance in non-small-cell lung cancer associated with beta-tubulin gene mutations. *J Clin Oncol* 17: 1786-1793.

National Cancer Institute (citováno 2010): Paclitaxel vitamin E based emulsion formulation. Převzato z <http://www.cancer.gov/Templates/drugdictionary.aspx?CdrID=474798>.

Nogales, E. (2000): Structural insights into microtubule function. *Ann Rev Biochem* 69: 277-302.

Nogales, E., Wolf, S.G., Khan, I.A., Luduena, R.F. a Downing, K.H. (1995): Structure of tubulin at 6.5 Å and location of the taxol-binding site. *Nature* 375: 424-427.

Obasaju, C., Hudes, G.R. (2001): Paclitaxel and docetaxel in prostate cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 15: 525-545.

Ojima, I., Chen, J., Sun L., Borella, Ch.P., Wang, T., Miller, M.L., Lin, S., Geng, X., Kuznetsova, L., Qu, Ch., Gallager, D., Zhao, X., Zanardi, I., Xia, S., Horwitz, S.B., Mallen-St. Clair, J., Guerriero, J.L., Bar-Sagi, D., Veith, J.M., Pera, P. a Bernacki, R.J. (2009): Design, synthesis and biological evaluation of new generation taxoids. *J Med Chem*. 51(11): 3203-3221.

Ojima, I., Lin, S. a Wang, T. (1999): The recent advances in the medicinal chemistry of taxoids with novel β -amino acid side chains." In "the chemistry and biology of β -amino acids". *Curr. Med. Chem* 6: 927-954.

Ojima, I., Slater, J.C., Michaud, E., Kuduk, S.D., Bounaud, P-Y., Vrignaud, P., Bissery, M-C., Veith, J., Pera, P. a Bernacki, R.J. (1996): Syntheses and structure-activity relationships of the second generation antitumor taxoids. Exceptional activity against drug-resistant cancer cells. *J. Med. Chem* 39: 3889-3896.

Ojima, I., Wang, T., Miller, M.L., Lin, S., Borella, C., Geng, X., Pera, P. a Bernacki, R.J. (1999): Syntheses and structure-activity relationships of new second-generation taxoids. *Bioorg. Med. Chem. Lett* 9: 3423-3428.

Perez, E.A. (2009): Review: impact, mechanisms, and novel chemotherapy strategies for overcoming resistance to anthracyclines and taxanes in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 114: 195-201.

Petrangolini, G., Cassinelli, G., Pratesi, G., Tortoreto, M., Favini, E., Supino, R., Lanzi, C., Belluco, S. a Zunino, F. (2004): Antitumor and antiangiogenic effects of IDN 5390, a novel C-seco taxane, in a paclitaxel-resistant human ovarian tumour xenograft. *Br J Cancer* 90: 1464-1468.

Piccart, M.J., Bertelsen, K., James, K., Cassidy, J., Mangioni, C., Simonsen, E., Start, G., Kaye, S., Vergote, I., Blom, R., Grimshaw, R., Atkinson, R.J., Swenerton, K.D., Trope, C., Nardi, M., Kaern, J., Tumolo, S., Timmers, P., Roy, J.A., Ohlas, F., Landvall, B., Bacon, M., Brit, A., Andersen, J.E., Zee, B., Paul, J., Baron, B. a Pecorelli, S. (2000): Randomized intergroup trial of cisplatin-paclitaxel versus cisplatin-cyclophosphamide in women with advanced epithelial ovarian cancer: three-years results. *J Natl Cancer Inst* 92: 699-708.

Pivot, X., Koralewski, P., Hidalgo, J.L., Chan, A., Goncalves, A., Schwartzmann, G., Assadourian, S. a Latz, J.P. (2008): A multicenter phase II study of XRP6258 administered as a 1-h i.v. infusion every 3 weeks in taxane-resistant metastatic breast cancer patients. *Ann Oncol*. 19(9): 1547-1552.

- Pratesi, G., Laccabue, D., Lanzi, C., Cassinelli, G., Supino, R., Zucchetti, M., Frapolli, R., D'Incalci, M., Bombardelli, E., Morazzoni, P., Riva, A. a Zunino, F. (2003): IDN 5390: an oral taxane candidate for protracted treatment schedules. *Br J Cancer* 88: 965-972.
- Rao, S., He, L., Chakravarty, S., Ojima, I., Orr, G.A. a Horwitz, S.B. (1999): Characterization of the Taxol binding site on the microtubule. Inedification of Arg(282) in beta-tubulin as the site of photoincorporation of a 7-benzophenone analogue of taxol. *J Biol Chem* 274: 37990-37994.
- Rowinsky, E.K., Cazenave, L.A. a Donehower, R.C. (1990): Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent. *J Natl Cancer Inst.* 82: 1247–1259.
- Schiff, P.B., Fant, J. a Horwitz, S.B. (1979): Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. *Nature* 277: 665-667.
- Schiff, P.B., Horwitz, S.B. (1981): Taxol assembles tubulin in the absence of exogenous guanosine 5'-triphosphate or microtubules-associated proteins. *Biochemistry* 20: 3247-3252.
- Snyder, J.P., Nettles, J.H., Cornett, B., Downind, K.H. a Nogales, E. (2001): The binding conformation of taxol in β -tubulin: a model based on electron crystallographic density. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 5312-5316.
- Syed, S.K., Beeram, M., Takimoto, J., Jakubowitz, J., Komára, M., Dumarche, M., Gadgeel, S., De Jager, R., Rowinsky, E. a Lorusso, P. (2004): Phase I and pharmacokinetics (PK) of DJ-927, an oral taxane, in patients (Pts) with advanced cancers. *J Clin Oncol* 22: 14.
- Taraboletti, G., Micheletti, G., Rieppi, M., Poli, M., Turatto, M., Rossi, C., Borsotti, P., Roccabianca, P., Scanziani, E., Nicoletti, M.I., Bombardelli, E., Morazzoni, P., Riva, A. a Giavazzi, R. (2002): Antiangiogenic and antitumor activity of IDN 5390, a new taxane derivative. *Clin Cancer Res* 8: 1182-1188.
- ten Tije, A.J., Verweij, J., Loos, W.J. a Sparreboom, A. (2003): Pharmacological effects of formulation vehicles. Implications for cancer chemotherapy. *Clin Pharmacokinet* 42: 665–685.
- Tiruppathi, C., Song, W., Bergenfeldt, M., Sass, P. a Malik, A.B. (1997): Gp60 activation mediates albumin transcytosis in endothelial cells by tyrosine kinase-dependent pathway. *J Biol Chem.* 272: 25968–25975.
- Trock, B.J., Leonessa, F. a Clarke, R. (1997): Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance. *J Natl Cancer Inst* 89: 917–931.
- Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, Národní onkologický registr ČR (2009): Novotvary 2006: 17.
- van Zuylen, L., Verweij, J. a Sparreboom, A. (2001): Role of formulation vehicles in taxane pharmacology. *Invest New Drugs* 19: 125–141.
- Vogel, S.M., Minshall, R.D., Pilipovic, M., Tiruppathi, C. a Malik, A.B. (2001): Albumin uptake and transcytosis in endothelial cells *in vivo* induced by albumin-binding protein. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 281: 1512–1522.
- Wang, Y., Yin, S., Blade, K., Cooper, G., Menick, D.R. a Cabral, F. (2006): Mutations at leucine 215 of beta-tubulin affect paclitaxel sensitivity by two distinct mechanisms. *Biochemistry* 45: 185-194.

Wiedenmann, N., Valdecanas, D., Hunter, N., Hyde, S., Buchholz, T.A., Milas, L. a Mason, K.A. (2007): 130-nm albumin-bound paclitaxel enhances tumor radiocurability and therapeutic gain. *Clin Cancer Res* 13: 1868–1874.