

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra biochemie

Bakalářská práce



Využití karboranů v biomedicíně

Aneta Sajdová

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Praha 2007

Ráda bych poděkovala svému školiteli Doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc. a RNDr. Milanu Kožíškovi za cenné rady a připomínky k mé práci. RNDr. Milanu Kožíškovi také za trpělivost, ochotu a pomoc nejen s prací v laboratoři.

Poděkování také patří mé rodině za nemalou podporu při studiu a lékařce, bez níž bych nemohla tuto práci dokončit.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Doc. RNDr. Jana Konvalinky, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 6. 6. 2007

Aneta Sajdlová

Obsah

1 Úvod	2
1.1 Záměr práce	2
2 Teoretická část	
2.1 Karborany	3
2.2 Neutronová terapie	5
2.3 Nosiče bóru zkoumané pro využití v BNCT	
2.3.1 Sacharidy	7
2.3.2 Porfyriny	9
2.3.3 Složky nukleových kyselin	10
2.3.3.1 Nukleosidy	10
2.3.3.2 Nukleotidy	11
2.3.4 Aminokyseliny	12
2.3.5 Interkalátory	13
2.3.6 Polyaminy	13
2.3.7 Protilátky	14
2.3.8 LDL.....	16
2.3.9 Klosomery	16
2.3.10 Liposomy.....	17
2.4 Protinádorová aktivita karboranů	18
2.5 Cílená radionuklidová terapie	19
2.6 Karborany jako farmakofory	
2.6.1 Agonisti a antagonisty estrogenu	20
2.6.2 Retinoidy	22
2.6.3 Modulátory protein kinázy C	24
2.7 Inhibice HIV proteázy	
2.7.1 HIV proteáza	24
2.7.2 Inhibice tetrafenylporfyriny	26
2.7.3 Inhibice metalokarborany	26
3 Cíl práce	29
4 Praktická část	
4.1 Materiály	29
4.2 Metody.....	29
4.2.1 Určení IC_{50}	32
4.2.2 Určení mechanismu inhibice	32
4.3 Výsledky	
4.3.1 IC_{50}	33
4.3.2 Mechanismus inhibice	33
5 Závěr	34
6 Použitá literatura	35
7 Seznam zkratk	38

1. Úvod

Karborany jsou látky známe od počátku minulého století. Jsou tvořeny atomy uhlíku, bóru a vodíku. Vytvářejí prostorové struktury podobné klecím. Mají řadu zajímavých fyzikálně-chemických vlastností, jsou silně hydrofobní, stabilní chemicky, tepelně i světelně. Dají se snadno pozměňovat a značit radionuklidy, což umožňuje syntetizovat množství variant. Jsou využívány k tvorbě supramolekulárních materiálů, koordinačních částic, katalyzátorů, ale především v posledních desítkách let nacházejí vědci jejich nové možnosti pro využití v biomedicíně. Tyto látky jsou používány při bórové neutronové záchytové terapii využívající jádra bóru k jaderné reakci, při níž je uvolňováno radioaktivní záření cíleně hubící nádorové buňky. Je snahou nalézt vhodné nosiče bóru, které budou cíleně začleňovány do rakovinových buněk, jež mají být zničeny a to jen s minimálním poškozením okolní tkáně. Karborany jsou navrhovány jako biologické a farmakologické sondy, mají protinádorový účinek, v poslední době se ukázalo, že inhibují životně důležitý enzym viru HIV, proteázu.

1.1 Záměr práce

Práce je koncipovaná jako rešerše a má shrnout poznatky o skupině látek, zvaných běžně karborany, jejich vlastnostech a možnostech použití v biomedicíně.

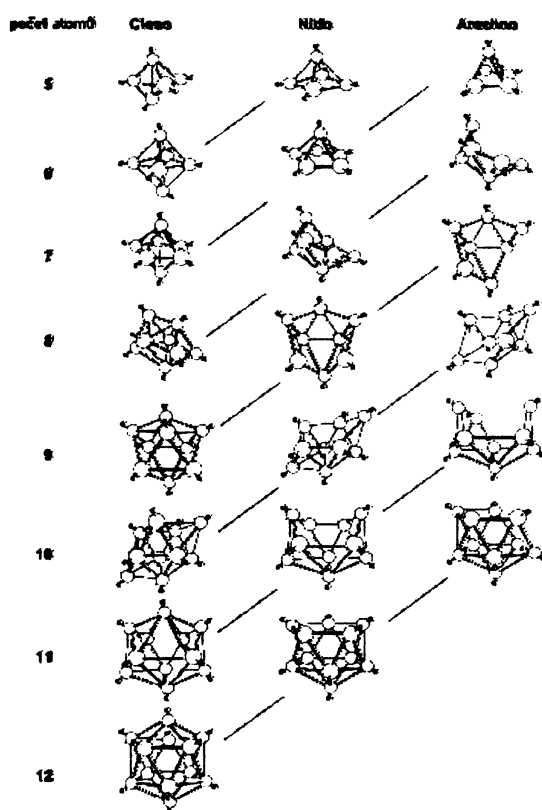
Cílem praktické části je enzymologická charakterizace inhibitoru HIV proteázy, metalokarboranu označeného GB-128.

2 Teoretická část

2.1 Karborany

Karborany jsou sloučeniny, které jsou v posledních desítkách let studovány pro jejich možné využití v různých odvětvích chemie, jako např. supramolekulární materiály a polymery [1] v makrochemii, katalyzátory a koordinační částice pro syntézy, ale především také v biochemii a biomedicině. Některé z nich se již používají při léčbě rakoviny metodou bórové neutronové záchytové terapie BNCT [2]. Výzkum na poli medicínských odvětví směřuje k vývoji farmaceutických a biologických sond a radiofarmak [3]. Fyzikální a chemické vlastnosti karboranů, jako tepelná, chemická a fotochemická stabilita, hydrofobicita a snadné značení radionuklidy spolu se syntetickou dostupností umožňují vědcům zkoumat jejich budoucí využití [3,2].

Karborany jsou látky tvořené z atomů bóru, uhlíku a vodíku. Je to podskupina souboru látek, nazývaného polyhedrální heteroborany, který je předmětem zkoumání přes 40 let [3]. Do tohoto souboru patří množství sloučenin, s různými počty atomů bóru a uhlíku, např. $\{C_2B_7\}$, $\{C_2B_3\}$, $\{C_3B_3\}$, $\{CB_9\}$ atd. (obr.1) [3].

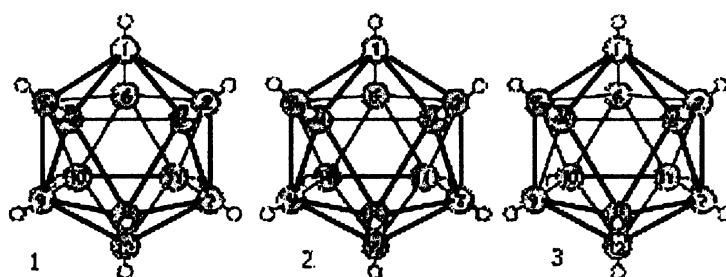


obr.1: příklady struktur polyhedrálních boranů, převzato z [4]

Nejdůležitější skupinu tvoří 1,2-dikarba-*closo*-dekarborany (*closo*=klec), běžně nazývané jako karborany (karboran je zkrácený výraz pro název karbaboran dle IUPAC), obecného vzorce $C_2B_{10}H_{12}$ [5]. Každá klec má pseudosférickou geometrii, 20 stěn a 12 vrcholů. CH skupiny jsou ve vrcholech mnohostěnu. Struktura karboranu je elektronefektivní, tzn. že je zde více valenčních orbitalů než elektronů a vazba, která vzniká mezi B-B a C-B se nazývá tříšťed'ová dvouelektronová. Elektrony tvořící vazby C-B a B-B jsou rozprostřeny po celé molekule [5]. Kromě zmíněných *closo*-karboranů existují také *nido*-karborany a *arachno*-karborany (obr.1)[5]. Všechny tři struktury vycházejí z boranů obecného vzorce: *closo*-borany $[B_nH_n]^{2-}$, *nido*-borany $[B_nH_{n+4}]$, *arachno*-borany $[B_nH_{n+6}]$, kde n je počet atomů. Liší se vzájemně tvarem klecí (*nido*=hnízd, *arachno*=pavučina) [6].

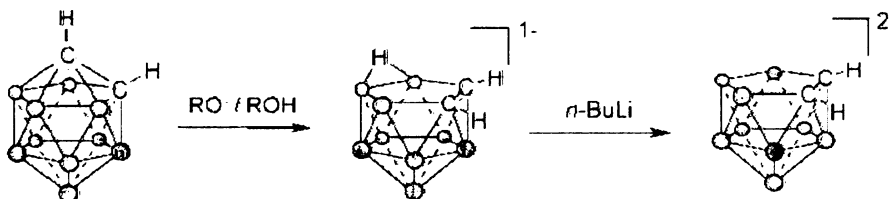
Karborany jsou pseudoaromatické systémy, jejichž aromaticita je narušena od běžných rovinných aromatických sloučenin trojrozměrná [5]. Jak bór tak uhlík se zapojují do substitučních reakcí, aniž by charakter klece byl změněn [3]. Rentgenografickou studií bylo změřeno, že objem, který zaujímá *closo*-karboran v prostoru, je srovnatelný s objemem fenylové skupiny rotující kolem své dvoučetné osy symetrie [3,5]. *Closo*-karboranová klec není opticky aktivní, narušena od klece *nido*-karboranů, které existují ve dvou enantiomerech [5].

Existují tři izomery 1,2-dikarba-*closo*-dekarboranu - *ortho*, *meta* a *para* (obr.2), které se vzájemně liší relativní pozicí uhlíku v molekule. Tyto tzv. klastry mají téměř ikosahedrální geometrii, která se běžně v chemii uhlovodíků nevyskytuje, a každý uhlík a bór je zde šestkrát koordinován [3,5]. Jsou izoelektronově a geometricky identické s boranovým *closo*- $B_{12}H_{12}^{2-}$ aniontem. CH skupiny jsou slabě kyselé a mohou být snadno deprotonizovány za tvorby nukleofilů. Naproti tomu atomy bóru ve vrcholech klastru reagují s elektrofilu, což celkově dává možnost syntetizovat velké množství derivátů [3,5].



obr.2: izomery dikarba-*closo*-dekarboranu , 1-*ortho*(1,2), 2-*meta*(1,7), 3-*para*(1,12) (atomy uhlíku fialově , bóru oranžově, vodíku žlutě), upraveno podle [7]

Ortho-karborany nesoucí skupiny odtahující elektrony, např. estery či aldehydy, se snadno přeměňují na odpovídající *nido*-karborany, v důsledku deprotonace vyvolané silnou bází (obr.3). Vzniklé *nido*-karborany jsou rozpustnější ve vodě (hlavně ve formě svých Li^+ , Na^+ , K^+ solí) a mají charakter vytvářet tzv. „sandwichové“ struktury. Díky rozpustnosti ve vodě a elektrolytické povaze se izomerní *nido*-karborany používají v roztocích pufrů [2].



obr.3: degradace *ortho*-karboranu na *nido*-karboran, převzato z [8]

Karborany podporují hydrofobní reakce mezi léky a jejich receptory a přispívají tak ke zvýšení stability a biologické dostupnosti těchto léčiv *in vivo* [3]. Karborany mohou být zkoumány pomocí rentgenové krystalografie. Monitorování průběhu reakce karboranu lze provést s pomocí tenkovrstvé chromatografie a pro zjištění čistoty karboranových derivátů se používá HPLC [3].

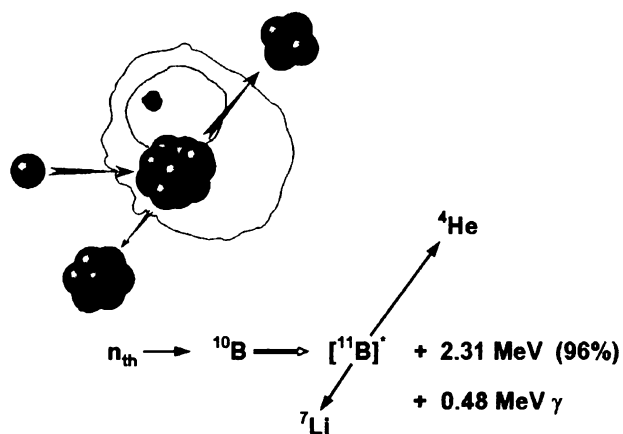
Karborany mají množství zajímavých strukturních, chemických a fyzikálních vlastností, umožňujících jejich výzkum v různých oblastech přírodních věd.

2.2 Neutronová terapie

Neutronovou terapii lze rozdělit na přímou *terapii rychlými neutrony* (málo využívanou pro špatnou možnost řízení svazku) a na *neutronovou záchytovou terapii*, která využívá vysokého účinného průřezu některých jader pro pomalé neutrony a následnou jadernou reakci spojenou s uvolněním energie v okolí terče [9].

Bórová neutronová záchytová terapie (BNCT) je léčebná metoda, kterou poprvé navrhl v roce 1936 *Locher* [2]. Tato terapie je založena na jaderné reakci (obr.4), kde je ^{10}B vystaven termálním neutronům (n_{th}), po jejichž záchytu se tvoří radioaktivní izotop ^{11}B , který se rozpadá na vysoce reaktivní izotop lithia a alfa částici. Jednotlivé složky reakce samy o sobě

nejsou účinné, ale v kombinaci vytvářejí vysoce účinnou a selektivní terapii, protože alfa částice a lithiový ion prostupují vzdáleností jen 10 μm - o málo menší než je velikost buňky [3]. Při tomto průchodu se uvolňuje energie a kolem trajektorie částic vzniká pro buňku zničující záření [3,2]. Okolí buňky je ničeno jen minimálně, i když ne zanedbatelně. V ideálním případě je ^{10}B připojen na lék specificky vyhledávající rakovinné buňky. ^{10}B sám o sobě není radioaktivní ani cytotoxický a struktura jádra umožňuje při reakci zachycení dostatečného množství neutronů [10].

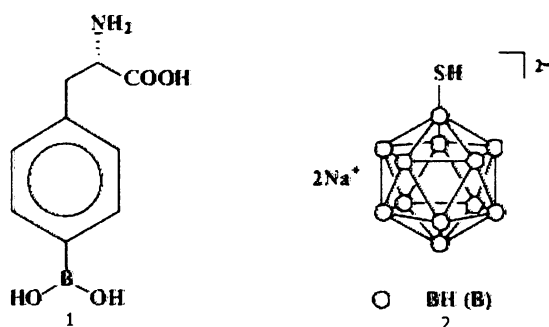


obr.4: schéma reakce využívané v BNCT, rozpadem ^{11}B vznikají vysoce reaktivní částice ^7Li a ^4He (α) s krátkým poločasem rozpadu, převzato z [11]

Zdrojem neutronů může být reaktor či kombinovaný zdroj alfa zářič/berylium, jsou však kladeny vysoké požadavky na kvalitu svazku, zvláště pak na jeho čistotu (např. gama záření má zcela jiné účinky) [9].

Buňky určené pro zneškodnění touto terapií musí být schopny obsáhnout dostatečné množství ^{10}B . Cílem studií je proto najít vhodnou sloučeninu, která snadno projde buněčnou membránou a která nebude z podstatné části odbourána či zničena imunitním systémem organismu. Bylo již určeno, že na zničení gramu nádorové tkáně je potřeba 10 – 30 μg ^{10}B [3,9]. Toto množství je ale značně sníženo, pokud se bór nachází vně nebo velmi blízko buněčného jádra. Včleněním látky nesoucí bór do chromosomu nebo navázáním přímo na DNA se velmi zvýší úspěšnost terapie. Je ale nežádoucí, aby látka zůstávala v krevním řečišti a způsobovala nekrózu v žilách. Optimální poměr nádor:krev je 5:1 [3]. Dalším důležitým požadavkem je nízká toxicita sloučeniny. Díky studiu radioznačení a farmakokinetiky a také díky snaze dobře léčit např. okrajové nádory je vývoj nových prostředků pro BNCT značně urychlován. V současnosti se v klinické praxi využívají dva léky.

- L-BPA (L-*p*- dihydroxyborylfenylalanin)
- BSH ($\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$, thio-*closo*-dodekaborát sodný) [2,10]



obr.5: 1 - L-BPA, 2 – BSH, upraveno podle [10]

Uvedené látky se používají pro terapeutické účely. Důležité je také studium biodistribuce a farmakokinetiky, které objasňuje osud látky v organismu. V *in vivo* studiích mohou být teoreticky použity metody NMR a MRI, díky přítomnosti jader ^{10}B a ^{11}B . V praxi se ale v závislosti na typu radionuklidu používá převážně tzv. jednofotonová emisní počítačová tomografie (SPECT) a pozitronová emisní tomografie (PET) [3]. Např. metodou PET se sleduje biodistribuce a farmakokinetika BPA v přítomnosti izotopu ^{18}F , pro studium BSH metodou PET je častěji používán izotop ^{131}I [10].

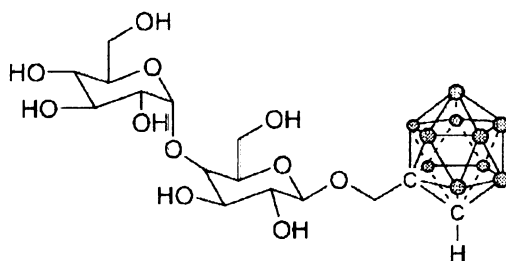
2.3 Nosiče bóru zkoumané pro využití v BNCT

2.3.1 Sacharidy

Sacharidy jsou se záměrem využití v BNCT studovány již řadu let. První syntéza sacharidu s připojeným karboranem byla popsána před 25 lety [10]. Jedním z důležitých hledisek výzkumu sacharidů s navázanými karborany je snaha o snížení hydrofobicity karboranů a zvýšení rozpustnosti karboranových biomolekul ve vodě [3,10]. Další výhodou je možnost interakce se sacharidovými receptory umístěnými na povrchu všech, i nádorových buněk [10]. V neposlední řadě oligosacharidy vykazují nízkou toxicitu.

Je mnoho cest, jak syntetizovat karboranyl-sacharidy. Přeměnou karboranové klece z *closo* do *nido* formy lze dle potřeby zvyšovat hydrofilitu karboranyl sacharidu. Byla připravena řada karboranyl-glykosidů, v níž byly např. sloučeniny glukosy, maltosy a laktosy. Většina

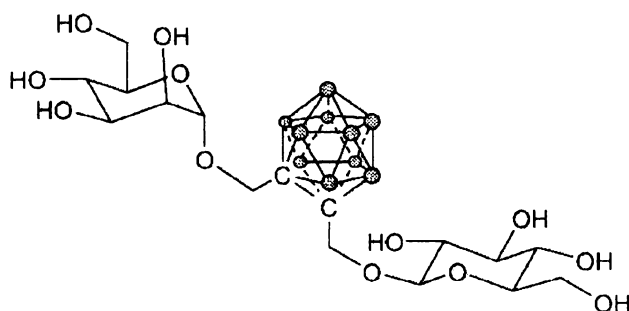
uvedených látek byla připravena z odpovídajících alkyl-glykosidů. S uvedenými glykosidy byly provedeny testy, jež měly zjistit, jak jsou tyto látky přijímány buňkami nádorové tkáně. Nejvyšší buněčný příjem vykazovala karboranyl-maltosa (obr.6). Obdobná koncentrace jako v nádorových buňkách byla také v krvi [3].



obr.6: karboranyl-maltosa, převzato z [3]

Ve snaze zvýšit schopnost přechodu přes buněčnou membránu u karboranyl-glukosy a karboranyl-laktosy byly připraveny karboranyl-sacharidy se zabudovaným bočním lipofilním alifatickým řetězcem, připojeným ke zbývající volné skupině CH karboranu. Detekce takovéto molekuly pomocí NMR byla možná díky atomu fluoru ^{19}F , navázanému na konci bočního řetězce, jehož jádro má vysokou pohltivost a široký chemický posun [3]. V živé tkáni se téměř neobjevuje, je tedy snadno identifikovatelný, a proto vhodný jako značka pro MRI. Toxicita těchto derivátů nesoucích fluor byla nízká ve srovnání s molekulami, které nesly v pozici fluoru alkoholovou skupinu [3].

V současnosti stále vznikají nové alternativní syntézy glykosidů. Je to podmíněno snahou získat co nejlepší látky pro BNCT, které se budou snadno vázat na konkrétní lektiny buněk nádoru [10]. Byly syntetizovány tzv. bis-glykosidy (obr.7), molekuly, jež jsou tvořeny dvěma cukernými zbytky, které jsou k sobě připojeny pomocí karboranové klece. Tyto látky téměř nejsou toxické, ale také se jen málo zabudovávají do cílových buněk [3]. Tyto struktury však mohou být využity jako přenašeče karboranů. Po odštěpení jednoho nebo obou cukerných zbytků v blízkosti nádoru se umožní selektivní buněčný příjem lipofilnějšího katabolitu [3].

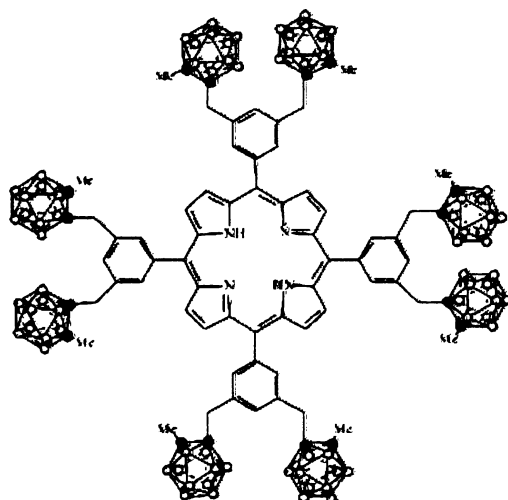


obr.7: bis-glykosidový *o*-karboran mannosy, převzato z [3]

2.3.2 Porfyriny

Porfyriny jsou cyklické molekuly složené ze čtyř molekul pyrrolu. Často mají uvnitř molekuly koordinační vazbou navázán atom kovu. Vyskytují se např. v krevním hemoglobulinu [12,13]. Porfyriny byly jako možné sloučeniny pro BNCT hojně zkoumány, poprvé, obdobně jako u předchozích sacharidů, před více než 25 lety. Existuje mnoho zpráv o jejich syntézách a biologických vlastnostech. Ve 20. století bylo syntetizováno přes 60 nových struktur. Výzkum porfyrinů není zaměřen pouze na BNCT, ale také na tzv. fotodynamickou nádorovou terapii (PDT), ve které se karboranyl-porfyriny jeví jako slibné podpůrné prostředky [10,14]. Porfyriny vykazují upřednostněné hromadění v nádorové tkáni, kde jsou navíc zadržovány poměrně dlouhou dobu [10]. Bylo zjištěno, že tzv. protoporfyrin pozměněný navázáním několika karboranových klecí vyhledává specificky nádorové buňky, poměr nádorová buňka : zdravá buňka byl 400, což ukazuje velkou selektivitu k nádorovým tkáním. Ale také byla naměřena značná toxicita. Lepší výsledky než uvedený protoporfyrin měla jeho kombinace s již používaným L-BPA. Tyto dvě látky spolu vykazují dobrou nádorovou selektivitu při léčbě pacientů metodou PDT [10]. Struktury porfyrinu se 4 nebo 8 karboranovými klecemi a koordinovaným atomem zinku byly také zkoumány se stejným cílem jako předchozí. Bylo zjištěno, že tetra(4-*nido*-karboranylfenyl)porfyrin má nízkou toxicitu a po ozáření světlem vyvolá zničení DNA *in vitro* [3,10].

Porfyriny obsahující 40 až 80 atomů bóru (obr.8) jsou symetrické a stabilní, jejich větší rozpustnost ve vodě je podmíněna přetvořením *closo* do *nido* formy. Porfyriny ve vodě rozpustnější jsou více toxické, než jejich formy ve vodě nerozpustné [3,14]. Jsou slibné jak pro BNCT, tak pro PDT. Kromě uvedených látek byly prozkoumány komplexy karboranyl-porfyrinů s různými atomy kovů (Mn, Cu) [10]. Výsledky distribuce a toxicity byly publikovány [15].



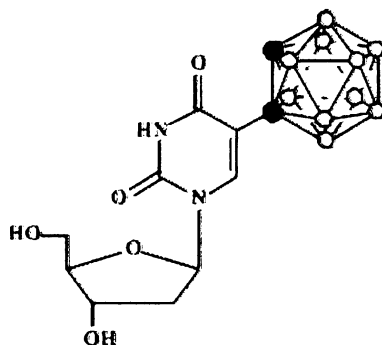
obr.8: porfyrin s 80 atomy bóru, upraveno podle [10]

2.3.3 Složky nukleových kyselin

Protože ideální molekulou pro fúzi s BNTC stále zůstává taková, která by se navázala přímo do jádra nádorové buňky, resp. do DNA, byly převážně zkoumány složky nukleových kyselin nukleosidy a nukleotidy [3,5,10].

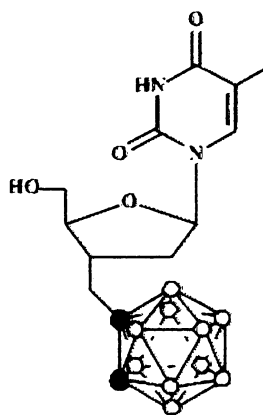
2.3.3.1 Nukleosidy

Jedním ze zkoumaných nukleosidů je karboranyl-nukleosid β -5-*ortho*-karboranyl-2'-deoxyuridin (CDU) (obr.9) [2]. Kromě této molekuly byl vytvořen např. také karboranyl-thiouracil [10].



obr.9: CDU, (atomy uhlíku černě, bóru bíle), upraveno podle [10]

Tato sloučenina je selektivně přijímána nádorovými buňkami a je málo cytotoxická. Pokusy byly prováděny s nádorovými mozkovými buňkami z důvodu, že tyto buňky produkují mnohem více DNA než buňky centrálního nervového systému [16]. Při dalších pokusech se zjistilo, že izomery L a D látky CDU jsou upřednostňovány stejně [17,18]. Shromažďování CDU uvnitř buňky lze považovat za výsledek fosforylace nukleosidu thymidin kinázou [19]. Byly syntetizovány i thymidinové analogy nesoucí *ortho*-karboranové substituenty v poloze N3 [10]. Měly navíc připojeny různě dlouhé postranní řetězce mezi karboranem a thymidinovou bází a některé také alkoholovou skupinu, z důvodu zvýšení rozpustnosti látky ve vodných roztocích. Zjistilo se, že aktivita thymidin kinázy 1 je největší v přítomnosti alkoholových skupin. Aktivita thymidin kinázy 2 nebyla pozorována [19]. V nedávné době byl vytvořen nukleosid s navázaným karboranem na sacharidové složce (ribose) vazbou C-C (obr.10) z důvodu zabránění ztráty karboranové klece vinou hydrolyzy [10].



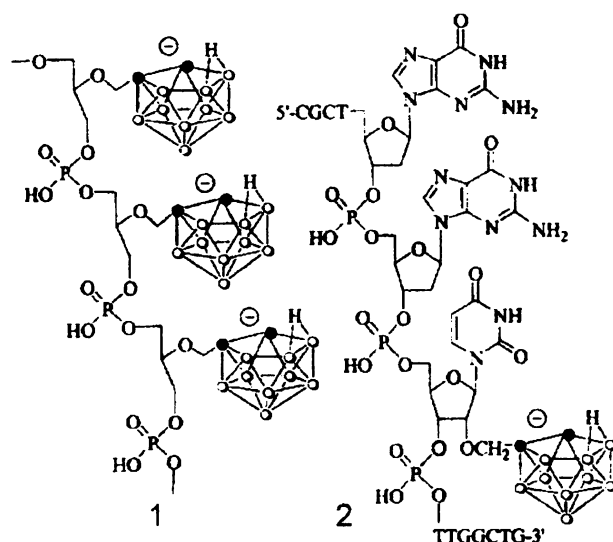
obr.10: karboranyl-deoxythymidin s vazbou C-C mezi deoxyribosou a karboranem, (atomy uhlíku černě, bóru bíle) převzato z [10]

2.3.3.2 Nukleotidy

V současné době existují dva typy oligonukleotidů obsahujících bór [3]. První typ je pozmeněn boranovou nebo kyanoboranovou skupinou $-BH_3$ resp. $-BH_2CN$, tzn. jeden atom bóru na molekulu. Druhý typ obsahuje vysoce lipofilní karboranylovou skupinou $-C_2B_{10}H_{11}$, takže na jednu molekulu připadne 10 atomů bóru [5].

Nukleotidy mohou být modifikovány karborany na všech třech strukturních složkách, tzn. na cukerném zbytku, bázi nebo na zbytku kyseliny fosforečné. Umožňuje to měnit fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti oligomeru [5]. Za podmínek fyziologického pH je vždy nejstabilnější *nido* varianta karboranu. Oligonukleotidy lišící se vzájemně místem vazby karboranu (báze, cukr, kyselina fosforečná) jsou dobrými substráty polynukleotidové kinázy (enzymu katalyzujícího adici fosfátu na 5' konec nukleové kyseliny) a jsou z části netečné vůči exonukleázám, především díky umístění karboranové klece v oligomerním řetězci [5].

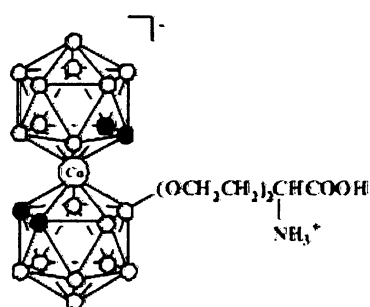
Modifikovaným oligonukleotidům (obr.11), které mohou být vytvářeny s použitím stejné chemie a automatizovaných DNA-syntetizátorů jako při syntéze běžných nukleových kyselin, jsou strukturně podobné oligomerní fosfodiesteru s navázanými karboranovými klecemi [20].



obr. 11: 1-struktura oligomerních fosfodiesterů
2 – příklad struktury karboranyl-oligonukleotidu,
upraveno podle [5]

2.3.4 Aminokyseliny

Nejúspěšnější karboranyl-aminokyselina L-BPA se používá v klinické praxi (viz str.6). Byly vytvořeny mono- až tetrahydroxy- L-BPA z důvodu objasnění vztahu mezi strukturou a biologickými vlastnostmi. Rozpustnost rostla v řadě směrem k tetrahydroxy- L-BPA, cytotoxicita ve stejném směru klesala, ale také buněčný příjem v tomto směru klesal. [21]. Kromě této látky, u níž byly zkoumány obě formy D i L, bylo připraveno množství jiných aminokyselin s karborany, včetně umělých, které se v přírodě nevyskytují [10]. Např. 1-aminocyklobutankarboxylová kyselina je netoxická a je přednostně zadržována v nádorech mozku [22,23]. Její *meta*-karboranový protějšek i polárnější *nido*-derivát ale mají omezené využití v BNCT [3]. Zajímavou skupinou jsou aminokyseliny s připojeným bis(dikarbollidem) kobaltu (obr.12). Tyto látky zvyšují účinnost BNCT hlavně díky většímu množství atomů bóru. Jsou ve vodě rozpustné ve formě sodných solí a zároveň dostatečně hydrofobní díky karboranu, což jim umožňuje pronikat fosfolipidovou membránou [10].

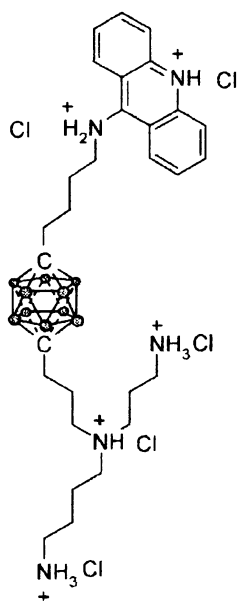


obr.12: kobalt bis(dikarbollid)-bis(ethylenoxid)alanin, (atomy uhlíku černě, bóru bíle)upraveno podle [10]

Velký důraz je kladen na vytvoření karboranyl-aminokyseliny s volnou α -aminoskupinou, která by umožnila zapojení karboranu do rostoucího peptidového řetězce [3].

2.3.5 Interkalátory

Interkalátory jsou látky různé chemické povahy, které se včleňují mezi dvě molekuly nebo skupiny molekul. Mohou se vázat také do závitů dvoušroubovice DNA. Výsledky studií ukázaly, že nejlipofilnější látky byly cytotoxické a vázaly se přednostně do vnější oblasti DNA s malou pronikavostí do vnitřních oblastí. Nejhydrofilnější látky (obr.13) měly nižší cytotoxicitu a vázaly se do vnitřních oblastí molekuly DNA. Tyto sloučeniny však nebyly specifické pro rakovinné buňky [3].

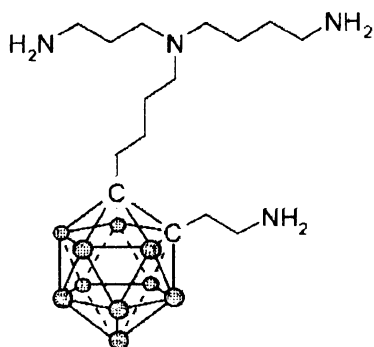


obr.13: příklad struktury hydrofilního interkalátoru, převzato z [3]

2.3.6 Polyaminy

Polyaminy nesoucí karborany (obr.14) byly již posuzovány jako látky s možnou vazbou na DNA v *in vitro* studiích. Vykazují však značnou toxicitu. Ve snaze tomuto zabránit byly připraveny polyaminové deriváty karboranů nesoucí skupiny podporující rozpustnost v polárních rozpouštědlech, především ve vodě. Takto upravené molekuly byly značně

přijímány nádorovými buňkami na úrovni srovnatelné s ostatními klinicky užívanými látkami, ale přitom v menších koncentracích, a to 10-100 krát méně. Přídavkem substituentů rozpustných ve vodě sice klesla toxicita, ale také biodistribuce *in vivo*. Není možné takto dostat do buněk dostatečné množství bóru pro BNCT [3].

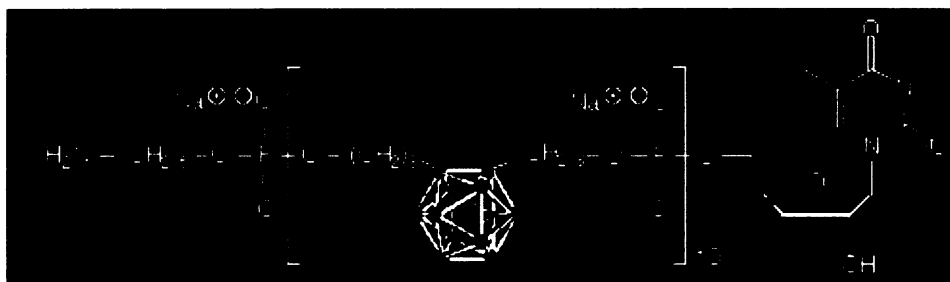


obr.14: karboranyl-polyamin, převzato z [3]

2.3.7 Protilátky

Hledání molekul, které se nachází na povrchu rakovinných buněk (nádorové antigeny) a zároveň nejsou přítomny u zdravých buněk, nebo jsou přítomny v menší míře, je velmi důležité pro vývoj látek, které by specificky vyhledávaly nádorové buňky. Takovými sloučeninami jsou protilátky a léčiva na ně navázána tvořící tzv. imunokonjugáty. S nápadem navázat chemickou sloučeninu obsahující ^{10}B na protilátku přišel už v roce 1952 *Locher* [2,10]. Studie ukázaly, že množství potřebné pro BNCT je 10^3 atomů ^{10}B , tj. přibližně 100 karboranových klecí na molekulu protilátky [10]. Problémem k řešení je najít způsob, jak dostat takové množství bóru na molekulu protilátky bez ztráty nádorové specifity (imunoreaktivity) a bez omezení dalších fyzikálně-chemicko-strukturních požadavků na molekulu protilátky [10].

Byly připraveny imunokonjugáty oligofosfátů (obr.15) bohatých na obsah bóru s geneticky vyvinutým anti-dansyl IgG imunoproteinem [24]. Aktivity oligofosfátů byly zjišťovány *in vitro* a *in vivo*. Výsledky byly smíšené, u některých oligofosfátů zůstala aktivita protilátek zachována, jinde se snížila [3,24]. Obsah látky v organismu byl sledován s použitím radioaktivní značky. Ukázalo se, že větší část molekul imunokonjugátu byla po určité době převážně v játrech a ledvinách, ale nezanedbatelné množství zůstalo v krevním oběhu [3].

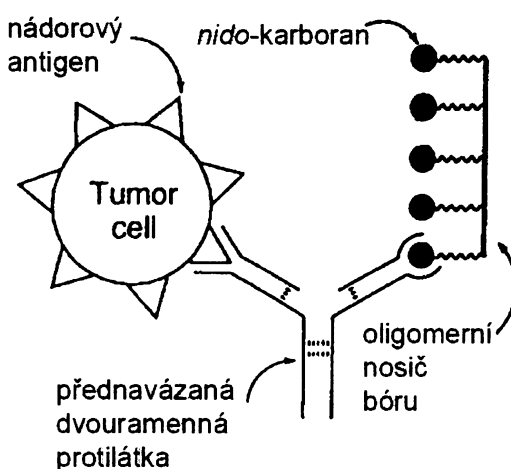


obr.15: příklad struktury oligomerního fosfodiesteru s *closo*-karboranem (atomy uhlíku černě, bóru růžově), převzato z [25]

Sloučeniny s *nido*-karboranem se cíleně začlenily do jádra buněk, narozdíl od *closo* obdoby, která se vyskytovala i v cytoplazmě a v jádře [3]. Z těchto studií je patrné, že *nido*-karboranyl oligomerní fosfodiester může fungovat jako vhodný přenašeč, doručující do buněčného jádra terapeutické množství bóru. Výhodou je, že neovlivňuje buněčný růst *in vitro* [23].

Studie se zaměřením na strukturní stabilitu protilátky nesoucí karboranové klece potvrdila odhady, že stabilnější je navázání oligomerního karboranového řetězce než množství jednotlivých klecí, které způsobují srážení protilátky. Není jisté, zda je srážení způsobeno prostorovou změnou tvaru molekuly anebo sníženou rozpustností vyvolanou karborany. Maximální počet klecí, který neovlivní negativně strukturu protilátky ani nádorovou specifitu je osm [2]. Při použití *nido* klece namísto *closo* byla naměřena pouze 10% specifická aktivita. Výhodou vazby oligomerního řetězce je možnost zachování části protilátky odkryté. Jinými slovy vazba proteinu s řetězcem zaujímá minimální plochu ve srovnání s vazbou jednotlivých klecí obklopujících molekulu protilátky ze všech směrů [2]. Bylo vyvinuto několik strategií používajících různé oligomery bohaté na obsah bóru jako např. polylysiny, polyornitiny a dextrany [26]. Jedním z původních omezení těchto oligomerních struktur bylo to, že tyto látky nebyly stejnorodé a jednotlivě oddělené [2]. *Hawthorne* jako první použil myšlenku shromáždit sérii oddělených pečlivě syntetizovaných oligomerních řetězců, z nichž každý nesl v průměru 200 atomů bóru. Ke každému oligomeru byla připojena karboxylová skupina k navázání na koncovou $-NH_2$ skupinu lysinu v molekule protilátky. Připojení v průměru pěti takových oligomerů na jednu molekulu protilátky poskytlo potřebné množství bóru (10^3) pro BNCT a navíc nebyla výrazně ovlivněna struktura protilátky jako v případě navázání množství malých karboranových klecí [2]. Bylo zjištěno, že nelze vytvořit peptid o dostatečné délce, pokud je pro syntézu použita aminokyselina nesoucí *nido*-karboran. S použitím aminokyseliny nesoucí *closo*-karboran to možné je. Výsledný „*closo*-peptid“ je až poté přeměněn na stabilnější „*nido*-peptid“ [2]. Nicméně všechny zmíněné oligomery ovlivňovaly

distribuci, zvyšovaly příjem a odbourávání játry a snižovaly dodání do nádorové tkáně, jako tomu bylo i v případě použití jednotlivých malých karboranových klecí. Proto byla uměle vyvinuta bispecifická protilátka (obr.16), která se samovolně váže na nádorový antigen i na oligomer. Bispecifická protilátka se nejdříve naočkuje do organismu, kde se naváže na antigen nádorové buňky. Po dosažení maximálního „označení“ nádoru protilátkou a vyčištění krevního řečiště je podán oligomer - nosič bóru. Následná vazba na volné rameno protilátky přivázané na povrchu rakovinné buňky umožní doručení terapeutického množství bóru (10^3) do nádorové tkáně [2].



obr.16: bispecifická protilátka, upraveno podle [2]

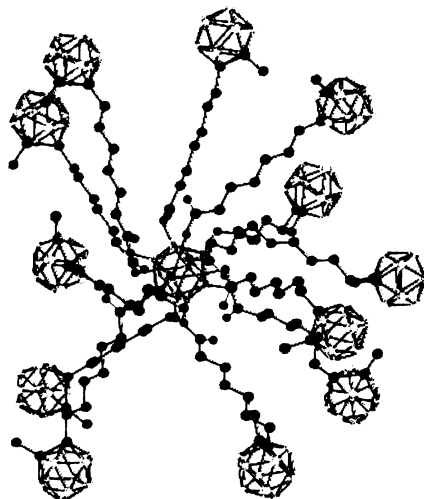
2.3.8 LDL

LDL je lipoprotein nízké hustoty. Nádorová buňka se od svého normálního protějšku liší tím, že tohoto lipoproteinu více využívá. LDL tvoří váčky složené z fosfolipidů a cholesterolu. Nádorová buňka potřebuje cholesterol na stavbu membrán. Receptor pro LDL je umístěn na povrchu nádorové buňky. Princip použití LDL v terapii spočívá v tom, že tyto útvary mohou přenášet nosiče bóru podobných fyzikálně-chemických vlastností jako je jejich běžný obsah (estery cholesterolu a glycerolu). LDL se naváže na svůj receptor, a tak se bór dostane do bezprostřední blízkosti rakovinné buňky [10].

2.3.9 Klosomery

Klosomery jsou látky vznikající substitucí polyhydroxy derivátů *closo*-boranů nebo *closo*-karboranů dvanácti substituenty. Vzniká tak pseudosférický útvar (obr.17), který neobsahuje

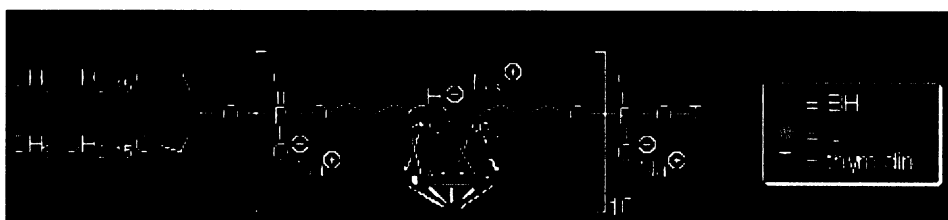
žádné B-H vazby a navenek se projevuje jako organická molekula se specifickými vlastnostmi. Obsah bóru v klosomerech přitom může být až 40 hm. % [3]. Klosomery mohou poměrně snadno přecházet na příslušné *nido*-formy. Pro BNCT jsou velice slibné, díky vysoké koncentraci bóru a protože mohou být využity k přípravě nanočástic od velikosti micel až po velikost liposomu [27]. V současné době probíhá výzkum klosomerů (*Hawthornova* skupina) a konkrétní výsledky zatím nebyly publikovány.



obr.17: příklad struktury klosomeru
(atomy bóru žluté a zeleně, uhlíku černě, kyslíku červeně), převzato z [28]

2.3.10 Liposomy

Liposomy jsou váčkovité útvary, které jsou běžně přítomny v organismech. Membránu tvoří fosfolipidy, které obklopují vodné jádro. Výhodou je, že mohou přenášet hydrofobní sodné soli polyhedrálních boranových aniontů stejně jako lipofilní látky (obr.18), a to uvnitř váčku i zabudované ve fosfolipidové dvojvrstvě [10]. Mají vhodnou velikost a stabilitu [29]. Do nádorové buňky doručí poměrně velké množství látky i skrz nezralé a nepevné žíly a cévky, které se typicky vyskytují v okolí rostoucího nádoru [3].

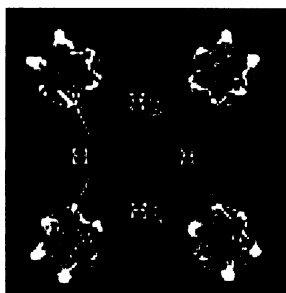


obr.18: příklad struktury lipofilního řetězce určeného pro zabudování membrány liposomu, převzato z [30]

Problém je s určením rakovinových buněk jako cílových buněk pro liposomy. Liposomy proto musí být navázány polyethylenovým řetězcem na biomolekulu s nádorovou specifitou, např. kyselinu listovou, epidermální růstový faktor, protilátku [10]. Byla zjištěna schopnost malých liposomů, obsahujících sadu různých polyhedrálních boranových aniontů ve vodném prostředí, doručit reálné množství bóru do nádorové tkáně. Pokus odhalil značnou selektivitu. (poměr nádor:krev byl 5:1) [3]. Též byly připraveny liposomy pro BNCT složené z distearoylfosfatidyl cholinu, cholesterolu a *nido*-karboranu [*nido*-7-CH₃(CH₂)₁₅-7,8-C₂B₉H₁₁]. Přítomnost cholesterolu v lipidové dvojvrstvě zvýšila maximální dosažitelný příjem bóru v porovnání s liposomy, které nesly pouze boranové soli ve vodném roztoku [27].

2.4 Protinádorová aktivita karboranů

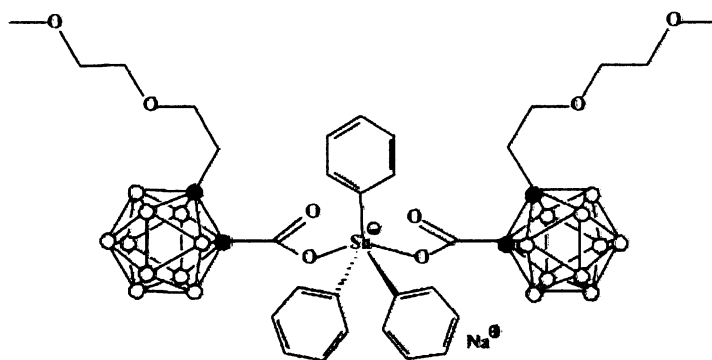
Po objevení protinádorové aktivity cisplatiny se výzkum zaměřil na další možné organokovové sloučeniny (obr.19) [10].



obr.19: příklad struktury organokovové sloučeniny, (atomy uhlíku černě, bóru růžově, vazby B-CH₃ žlutě), převzato z [31]

Byly provedeny testy *in vitro* s lidskými nádorovými buňkami a bylo zjištěno, že řada vyvinutých organokovových sloučenin má protinádorové účinky. Jednou ze skupiny těchto látek jsou i karborany obsahující kovové ionty – tzv. metalokarborany. Nejslibnějším zástupcem je látka odvozená od karboranu, který je v komplexu s cínem. Atom cínu může být připojen přímo na uhlík či bór karboranu, nebo pomocí řetězce CO₂, CH₂CO₂. Vzniká tak množství struktur, které mají různé vlastnosti a liší se v cytotoxicitě. Jejich možná protinádorová aktivita je srovnatelná s cisplatinou nebo doxorubicinem, látkami bránícími replikaci DNA, používanými v chemoterapii [3,10]. Látka s názvem trifenylstannát (obr.20)

má protinádorový účinek proti sedmi z osmi lidských rakovinných buněk, použitých v *in vitro* studii. Mimo to ale vykazuje vysokou cytotoxicitu [10].



obr.20: trifenylystannát, (atomy uhlíku černě, bóru bíle), upraveno podle [10]

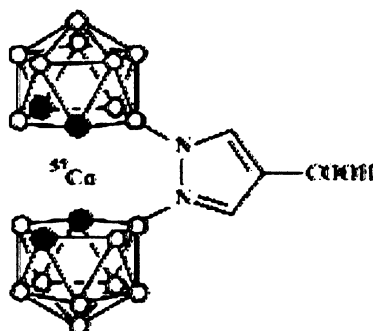
Kromě cínu byly použity i jiné atomy kovů, jako platina, niob, tantal, či železo [10]. Všechny zkoumané sloučeniny měly protinádorovou aktivitu a byly více či méně toxické. Mechanismus účinku buněčné smrti není přesně znám, ale je pravděpodobné, že jde o blokaci replikace v důsledku vytvoření komplexu DNA a zkoumané látky nebo komplexu DNA a části zkoumané látky [3,10].

2.5 Cílená radionuklidová terapie

Radionuklidová terapie je léčba založená na cíleném dopravení radionuklidu do určeného místa nebo poblíž. Hlavním důvodem je vysoká toxicita radionuklidu pro organismus [10]. Cílovými buňkami jsou buňky rakovinné, které se vyznačují zvýšeným výskytem určitých antigenů nebo receptorů pro regulační peptidy. Proto jako přenašeče molekul nesoucích radionuklidy slouží protilátky nebo malé peptidy, např. epidermální růstový faktor (EGF) [2,10].

Klece karboranů mohou být snadno označeny různými radionuklidy (např. jódem, astatem, tritiem, kobaltem) [10,2]. Vznikající molekuly jsou stabilní, ale ty z nich, které nesou radioizotop kovu se vážou na transferin, a přitom přicházejí o svůj radionuklid. Tento problém byl vyřešen vytvořením vysoce stabilního systému karboranových klecí spojených pyrazolem, tato je látka označovaná jako VFC (obr.21) [10,2]. Na pyrazolovém kruhu je navíc karboxylová skupina, která slouží k navázání na molekulu protilátky. Radioaktivní nuklid je

navázán na stabilním VFC komplexu (nebo jiném karboranu), který je připojen pomocí karboxylové skupiny pyrazolu k molekule protilátky. Vazba protilátky na odpovídající receptor zajistí dopravení toxického radionuklidu do místa určení [10]. Výhodou této terapie oproti BNCT je daleko menší potřebná koncentrace radionuklidů v nádorové tkáni a s tím spojená menší změna ve struktuře přenašečové protilátky, která neztrácí nádorovou specifitu, jako v případě BNCT [10].



obr.21: VFC (z ang. venus flytrap complex) – molekula je složená ze dvou dikarboranových zbytků spojených pyrazolem s navázanou karboxylovou skupinou, (atomy uhlíku černě, bóru bíle), upraveno podle [10]

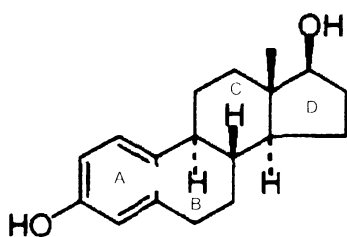
Použití epidermálního růstového faktoru (EGF) jako přenašeče je výhodné, protože EGF se specificky váže na svůj receptor - transmembránový glykoprotein s tyrosin kinázovou aktivitou. Tento receptor byl na nádorových buňkách zjištěn ve zvýšeném množství oproti buňkám zdravé tkáně. Byl vytvořen např. komplex *nido*-karboranu s EGF nesoucí radionuklid astatu ^{211}At s krátkým poločasem života, tento komplex však nebyl příliš stabilní. Slibným se v současnosti jeví použití dextranu jako spoje mezi radionuklidovým nosičem a EGF. Předpokládá se, že dextran spolu s karboranovým nosičem radionuklidu zůstanou začleněny uvnitř buňky zatímco peptidová část komplexu, tedy molekula EGF, bude enzymaticky odstraněna [2].

2.6 Karborany jako farmakofory

2.6.1 Agonisti a antagonisty estrogenu

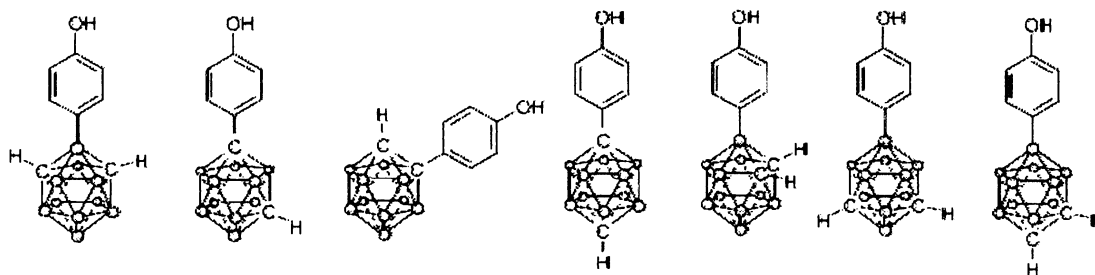
Estrogeny jsou spojovány s rakovinou prsu, proto ovlivnění jejich účinku na nádorovou tkáň je jedním z mechanismů hormonálního potlačení nádorového růstu. Karborany byly použity

jako základ ke konstrukci silných agonistů a antagonistů, látek aktivujících resp. tlumících cílové geny, estrogenových receptorů [32]. Estrogenový receptor patří mezi jaderné receptory nacházející se v cytosolu nebo na jádře buňky. Vysoká estrogenová afinita je způsobena fenolovým kruhem a k němu přilehlou vhodnou hydrofobní skupinou a správným rozmístěním vodíkových vazeb [3,33]. Deriváty karboranových klecí mohou být na místě C a D kruhů v 17- β -estradiolu (jednoho ze tří estrogenových hormonů, agonisty estrogenového receptoru, obr.22), které hrají důležitou roli ve vazbě steroidu na receptor [3].



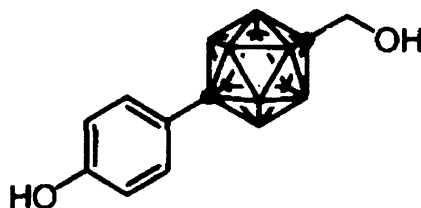
obr.22: 17- β -estradiol, upraveno podle [34]

Jako možné substituenty molekuly 17- β -estradiolu byly nejdříve navrženy *p*-karboranylfenoly. Doposud byla připravena série osmi karboranových derivátů obsahujících fenolové substituenty (obr.23). Pozice vazby mezi fenolem a karboranem a výběr karboranového izomeru byly obměňovány. Výsledkem bylo množství struktur, které se lišily aktivitou vůči estrogenovému receptoru, některé byly efektivnější než 17- β -estradiol [3, 33, 34].



obr.23: série karboranyl-fenolů, převzato z [35]

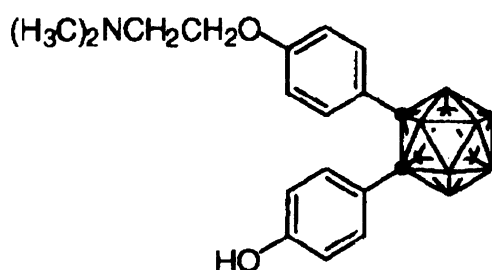
Kromě *p*-karboranylfenolů byly připraveny další látky, které se odlišovaly v přidáných funkčních skupinách na zbývajících CH- skupinách karboranů.. Neaktivnějším zástupcem agonistů byl 1-hydroxymethyl-12-(4-hydroxyfenyl)-1,12-dikarba-*closo*-dekarboran (obr.24), který byl aktivnější než 17- β -estradiol [36].



obr.24: 1-hydroxymethyl-12-(4-hydroxyfenyl)-1,12-dikarba-*closo*-dekarboran, upraveno podle [36]

Skutečnost, že karboranové deriváty byly účinnější než 4-alkylfenoly a 4-cykloalkylfenoly, potvrzuje, že hydrofobní karboranové jádro hraje důležitou roli ve zprostředkování vysoké vazebné afinity k receptoru. Tak byla ukázána další výhoda používání karboranů při vývoji léčiv [3,33].

Antagonisté estrogenových receptorů jsou v medicíně hojně využíváni při léčbě nádorů prsu závislých na vyplavení hormonů [3,45]. Podobně jako u agonistů byla připravena série karboranových analogů steroidových antiestrogenů. Nejvíce inhiboval *ortho*-karboranový derivát (obr.25) [36].

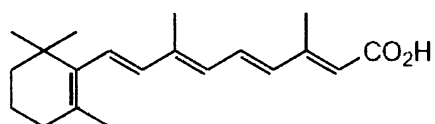


obr.25: 1-((4-(2-dimethylaminoethoxy)fenyl)-2-(4-hydroxyfenyl))-1,2-dikarba-*closo*-dekarboran, převzato z [34]

Pro budoucí možné využití v klinické praxi je potřeba upřesnit dosavadní údaje o vazbě na receptor, která je ovlivněna např. kyselostí karboranylfenolů [33].

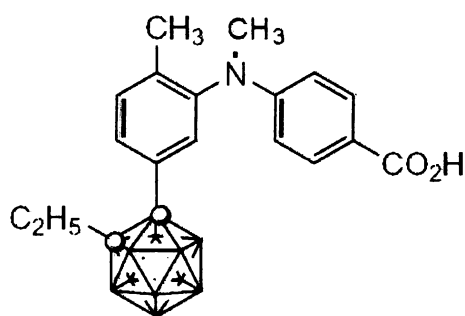
2.6.2 Retinoidy

Kyselina retinová má široké biologické využití. Je důležitá při buněčném diferenciaci a růstu. Analogy kyseliny retinové jsou zajímavými prostředky používanými hlavně v dermatologii a onkologii. Kyselina retinová (obr.26) se váže na své jaderné receptory RARs (retinoid acid receptors). Ovlivnění těchto receptorů má mnohé biologické užití.



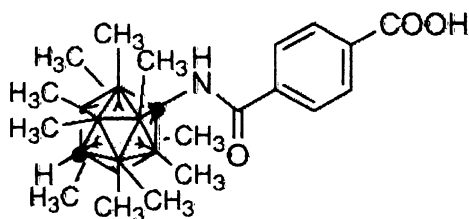
obr.26: kyselina retinová, převzato z [28]

Nedávné studie prokázaly, že pro dostatečnou afinitu k RAR je nutná přítomnost zbytku karboxylové skupiny a hydrofobní skupiny (např. retinobenzoová kyselina). Je známo, že zavedení objemných hydrofobních skupin do retinobenzoové kyseliny vede k antagonistické aktivitě [3,37,38]. Byla připravena skupina retinobenzoových derivátů obsahujících amidové a aminové jádro nesoucí *ortho*-karboranové substituenty [3,37]. Některé ze studovaných derivátů vykazovaly antagonistickou aktivitu, ale žádnou agonickou aktivitu, dokonce ani v přítomnosti silného synergisty (silně spolupůsobící látky). Jiné byly úplně neaktivní. Antagonický účinek je způsoben zavedením objemné hydrofobní skupiny na správné místo molekuly agonisty, která vyvolá změnu v uspořádání komplexu receptor-ligand [37]. Největší antagonický účinek měla látka na obr. 27 [38].



obr.27: antagonist RAR, převzato z [38]

Antagonický účinek měly také různé deriváty benzoové kyseliny substituované polymethylkarborany (obr.28). Tento účinek byl také ve smyslu inhibice mechanismu molekuly agonisty [37].

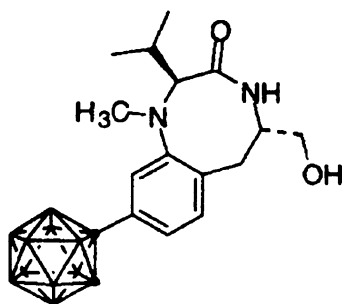


obr.28: příklad struktury derivátu polymethylkarboranu , převzato z [37]

Použití karboranů jako hydrofobních substituentů molekul agonistů retinového receptoru RAR nebo substituentů některých jiných látek, nesouvisejících s RARs, vede k antagonistickému účinku většímu než s použitím méně hydrofobních skupin. Biologické vlastnosti těchto látek, selektivita k receptoru a vztah mezi strukturou a aktivitou jsou předmětem zkoumání [38].

2.6.3 Modulátory protein kinázy C (PKC)

Protein kináza C je enzym, který katalyzuje přenos fosfátové skupiny z ATP na zbytky tyrosinu proteinu, čímž ho aktivuje. Inhibice PKC podpoří zánik nádorové buňky [39]. Karboranové deriváty byly studovány jako možné modulátory protein kinasy C [3]. Látky podporující aktivitu PKC kompetitivní vazbou na enzym mají základní strukturu odvozenou od benzolaktamového cyklu. Velikost a pozice hydrofobního zbytku na benzolaktamové kostře je určující pro aktivitu [40]. Byly syntetizovány benzolaktamy s karborany, jako slibné inhibitory PKC. Klec karboranu je v pozici č.9 na benzenovém kruhu benzolaktamového jádra (obr.29) [1,40]. Biologická aktivita byla zkoumána *in vivo*. Látka na obr.29 je dobrým inhibitorem PKC s hodnotou inhibiční konstanty K_i 2,0 nM [40].

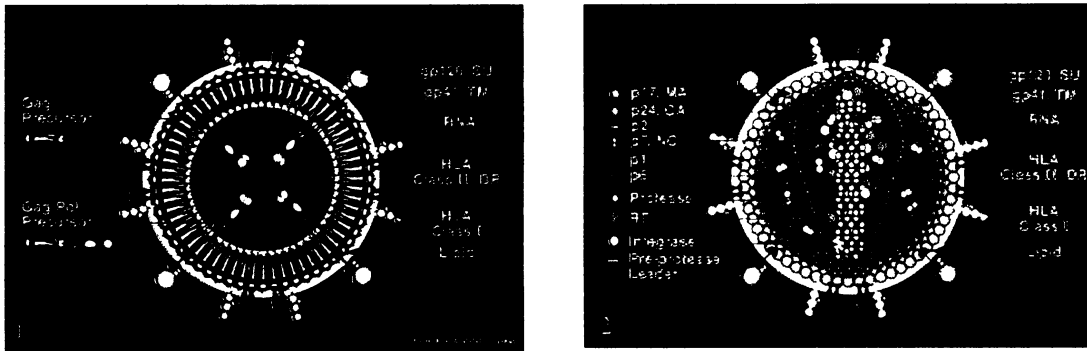


obr.29: inhibitor PKC, upraveno podle [40]

2.7 Inhibice HIV proteázy

2.7.1 HIV-1 proteáza (HIV PR)

HIV-1 proteáza je enzym uplatňující se při úpravách polyproteinů vzniklých přepisem virové mRNA. Pokud je aktivita této proteázy blokována, z nezralého virionu nevznikne infekční virová částice (obr.30) [41]. Inhibitory HIV PR jsou tedy účinnými virostatiky.



obr.30: 1 - nezralá částice, 2- zralý virus HIV, upraveno podle [42]

HIV PR je aspartátová proteáza (jako např. pepsin, chymosin, renin) V aktivním centru má triádu Asp-Thr-Gly. Aspartát se přímo účastní hydrolyzy peptidové vazby. HIV proteáza je dimer obsahující dvě identické, nekovalentně vázané podjednotky (obr.31). Každá z nich je složena z 99 aminokyselin [41].

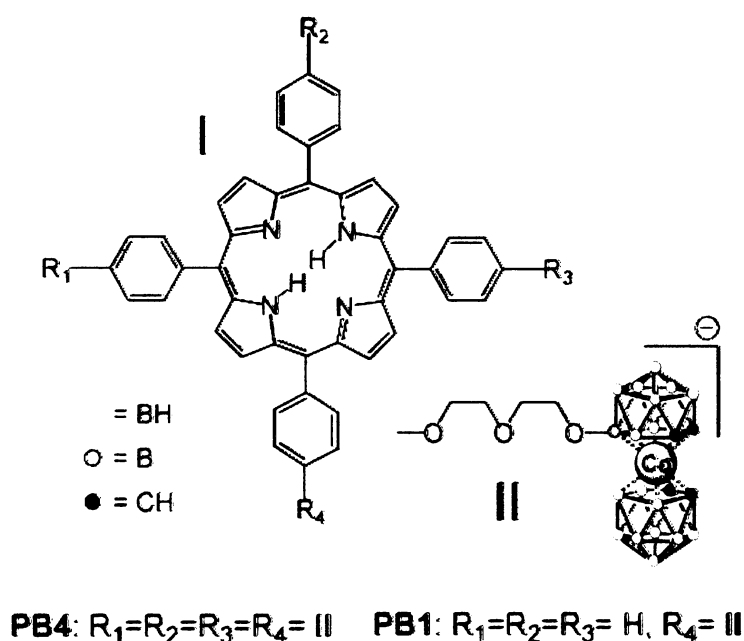


obr.31: model struktury HIV-1 PR proteázy, převzato z [43]

Zmíněná triáda aminokyselin Asp-Thr-Gly je ve smyčce na dně dutiny pro substrát. Celá struktura je stabilizována vodíkovými vazbami. Mimo vodíkových vazeb má i další zajímavý stabilizační prvek, a to tzv. „požárníkový chvat“ (z angl. fireman’s grip). Hydroxylová skupina threoninu triády tvoří vodíkovou vazbu s dusíkovým atomem threoninu v protilehlé smyčce [44,45].

2.7.2 Inhibice tetrafenylporfyriny

V literatuře je zmínka o inhibici HIV proteázy porfyriny nesoucími karborany [46]. Tetrafenylporfyriny s navázanými kobalt(III) bis(dikarbollidy) – jedním (PB1) nebo čtyřmi (PB4) (obr.32) jsou prvními publikovanými nekompetitivními inhibitory HIV proteázy založenými na karboranovém skeletu. Přítomnost většího počtu dikarbollidů zvyšuje inhibici vůči HIV PR. Oba typy se váží jak na volný enzym, tak na komplex enzym-substrát [46].

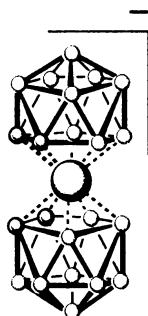


obr.32: I - struktura tetrafenylporfyrinu a
II – substituentů sloučenin PB1 a PB4, převzato z [46]

Skupina Jana Konvalinky, na ÚOCHB AV ČR zkoumala metalokarborany coby inhibitory HIV PR [47].

2.7.3 Inhibice metalokarborany

Ikosahedrální borany, kovové bis(dikarbollidy) tvarem připomínají burský ořech (obr.33). Jsou složeny ze dvou dikarbollidových klecí mezi nimiž je umístěn středový kovový atom. Jsou vysoce stabilní, hydrofobní, jejich elektrony jsou rovnoměrně rozprostřeny. Jsou synteticky dostupné a jejich možné vnější úpravy jsou četné [47].



obr.33: bis(dikarbollid) kovu (modře atom kovu), převzato z [47]

Bylo prozkoumáno množství struktur kobalt(III) bis(dikarbollidů), některé z nich jsou v tab.1. Kromě mechanismu inhibice, IC_{50} a inhibičních konstant K_i inhibitorů byla měřena také specifita a protivirová aktivita [47]. Bylo zjištěno, že jemné rozdíly ve struktuře výrazně ovlivňují vazbu v enzymu. Nejeftektivnějším inhibitorem byla látka č. 6 s hodnotou K_i 2,2 nM a EC_{50} 0,25 μ M (viz tab.1).

tab.1.struktury a aktivity metalokarboranových inhibitorů, převzato z [47]

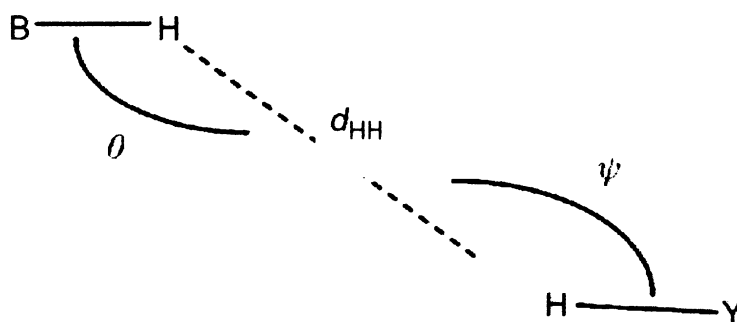
Compound no.	Structure	Molecular weight of anion	K_i , nM	EC_{50} , μ M
1		323.74	66 ± 30	6
2		339.74	$6,800 \pm 500$	20
3		427.85	$2,500 \pm 400$	6
4		624.09	20 ± 5	13
5		837.71	4.9 ± 2.1	3
6		893.82	2.2 ± 1.2	0.25

Zajímavým bylo zjištění způsobu vazby do enzymové dutiny. Byla objasněna struktura základní sloučeniny č.1 (tab.1). Z ní vyplývá, že dvě molekuly tohoto metalokarboranu se váží do vazebné dutiny dimerní HIV proteázy. Enzymová dutina se navázáním kobalt(III) bis(dikarbollidu) zcela neuzavírá, jako je tomu při vazbě klinicky používaných inhibitorů. Chlopně enzymu zůstávají z části pootevřené (obr.34)[47].



obr.34: struktura HIV PR komplexu s dvěmi molekulami látky č.1(Cb1,Cb2), převzato z [47]

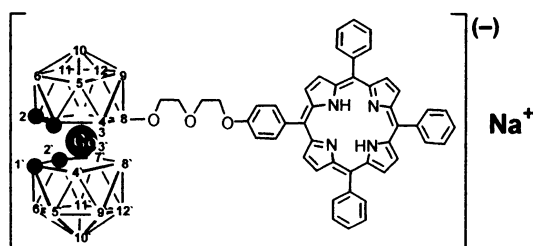
Testované inhibitory téměř neinhibují ostatní testované proteázy a amylázu [47]. Hlavní interakcí mezi karboranem a biomolekulou je vytvoření neobvyklých tzv. proton-hydridových vodíkových vazeb (dvouvodíkových vazeb), mezi nimiž je krátká vzdálenost. Karborany tvoří dvouvodíkové vazby s biomolekulami převážně ze strany protilehlé atomům uhlíku [48]. Vodíkové vazby se vyskytují mezi pozitivně nabitým atomem vodíku ve vazbách typu NH-, OH-, SH- a negativně nabitým atomem vodíku navázaném na akceptor protonů typu BH-. Stabilizace vazby H-H (obr.35) je dána hlavně elektrostatickou interakcí mezi opačně nabitými vodíky [48].



obr.35: dvouvodíková vazba, θ - úhel B-H..H, ψ - úhel Y-H..H, d_{HH} - délka vazby, převzato z [48]

3 Cíl práce

Metalokarborany, mezi které se řadí i GB-128 (obr.36), mohou být slibnými inhibitory HIV proteázy. Různé strukturní uspořádání molekul karboranů, jako např. počet kletcí, množství a druh bočních řetězců ovlivňuje mechanismus inhibice enzymové reakce. Cílem praktické části je enzymologická charakterizace inhibitoru HIV proteázy GB-128, stanovení hodnoty IC_{50} a mechanismu inhibice.



obr.35: chemická struktura inhibitoru GB-128:

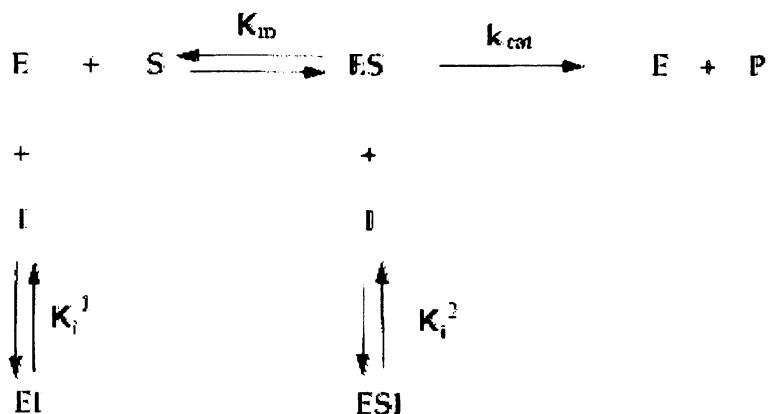
4 Praktická část

4.1 MATERIÁLY

Pro spektrofotometrická měření byl použit spektrofotometr UNICAM UV500 (Cambridge, UK). Inhibitor GB-128 (Cígler P., ÚOCHB AV ČR, ICT) byl zkoumán s pomocí enzymu wildtype HIV proteázy (Kožíšek M., Pokorná J., ÚOCHB AV ČR). Byl použit syntetický substrát enzymu HIV proteázy KARVNle*NphEANleNH₂ (Blechová M., ÚOCHB AV ČR).

4.2 METODY

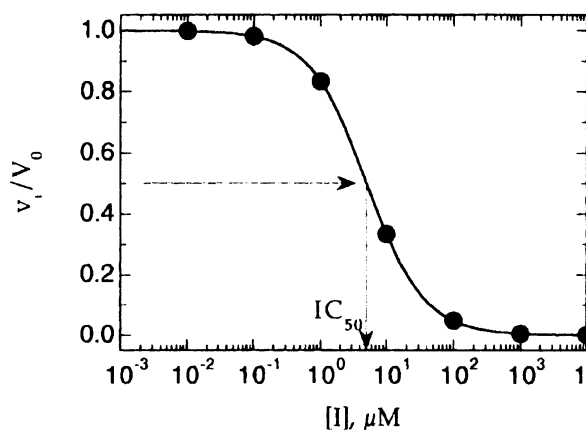
K popisu každého inhibitoru daného enzymu patří IC_{50} a mechanismus inhibice. Tyto údaje kvantifikují možnosti inhibice enzymu a umožňují jeho porovnání s jinými inhibitory. Schéma enzymové reakce v přítomnosti inhibitoru je uvedeno na obr.36.



obr.36 : rovnovážné reakční schéma enzymové reakce v přítomnosti inhibitoru, E-enzym, S-substrát, I-inhibitor, K_m - Michaelisova konstanta, $K_i^{1,2}$ -inhibiční konstanty, k_{cat} – katalytická konstanta přeměny ES, ES komplex enzym-substrát, upraveno podle [49]

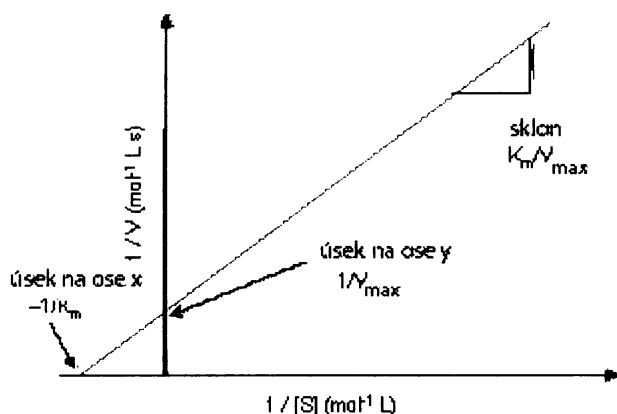
Hodnota IC_{50} udává koncentraci inhibitoru potřebnou k dosažení 50% inhibice. Čím je hodnota IC_{50} menší, tím je inhibitor silnější.

IC_{50} se určuje proměřením vlivu inhibitoru na rychlost enzymové reakce při konstantní koncentraci substrátu a enzymu. Stanovuje se z grafu závislosti relativní rychlosti na koncentraci inhibitoru (graf 1).



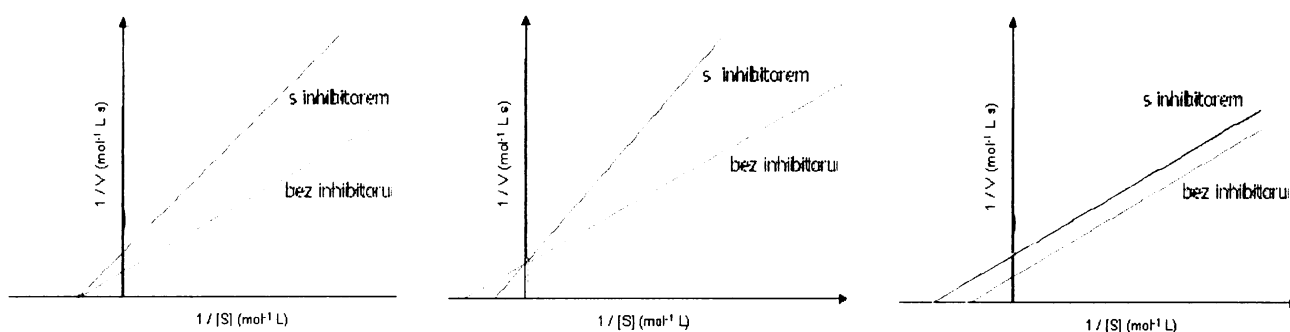
graf 1: závislost relativní rychlosti na koncentraci inhibitoru, znázorněno je odečtení hodnoty IC_{50} , převzato z [49]

K určení mechanismu inhibice se používá graf Lineweavera a Burka (graf 2), ve kterém je vynesena převrácená hodnota rychlosti reakce jako funkce převrácené hodnoty koncentrace substrátu. Měření se provádí při několika různých koncentracích inhibitoru.



graf 2: grafické vynesení rychlosti reakce jako funkce koncentrace substrátu dle Lineweaver-Burka

Inhibitor může být kompetitivní, nekompetitivní a akompetitivní v závislosti na K_i^1 a K_i^2 (graf 3)



graf 3: Lineweaver-Burkův graf pro (zleva doprava): kompetitivní, nekompetitivní, akompetitivní inhibici

Kompetitivní inhibitor soutěží o vazebné místo enzymu se substrátem. Hodnota K_i^2 je velká, inhibitor se neváže na komplex enzym-substrát. K_i^1 popisuje vazbu inhibitoru na enzym. V přítomnosti kompetitivního inhibitoru roste hodnota K_m , ale V_{max} se nemění.

Pro nekompetitivní inhibitor jsou hodnoty K_i^1 a K_i^2 stejné, inhibitor se tedy váže stejně na volný enzym i na komplex enzym-substrát. Nekompetitivní inhibitor tak nesoutěží se substrátem o vazebné místo enzymu. V přítomnosti takového inhibitoru klesá V_{max} a K_m je konstantní.

Akompetitivní inhibitor se váže jen na komplex enzym-substrát. Pro tento typ inhibice je rozhodující konstantou K_i^2 , protože hodnota K_i^1 je vysoká. Přítomnost tohoto inhibitoru způsobuje pokles obou konstant V_{max} i K_m , ale obě hodnoty klesají ve stejném poměru.

IC_{50} byla určena spektrofotometrickým měřením na spektrofotometru UNICAM UV500. Byl použit syntetický chromogenní substrát HIV-1 proteázy (KARVNle*NphEANleNH₂), který je štěpen mezi norleucinem a nitrofenylalaninem.

Pokles absorbance v čase po rozštěpení vazby (který je přímo úměrný poklesu rychlosti reakce v čase) byl měřen při vlnové délce 305 nm. Grafické vynesení relativní rychlosti v závislosti na koncentraci inhibitoru bylo použito k určení konstanty IC_{50} .

4.2.1 URČENÍ IC_{50}

puf: 0,1 M octan sodný, 0,3 M NaCl, pH 4,7

Změna absorbance v čase byla měřena při vlnové délce 305 nm a teplotě 37°C v kyvetě o délce hrany 1cm. Celkový objem reakční směsi byl 1 ml. Koncentrace enzymu byla konstantní (9 nM). Koncentrace substrátu byla konstantní blízka hodnotě K_m 15 μ M [50]. Inhibitor byl rozpuštěn v DMSO, jehož celková koncentrace ve výsledné směsi nepřesáhla 2,5%. DMSO v množství větším než 2,5% inhibuje HIV-proteázu. Inhibitor a proteáza byly společně po jednu minutu preinkubovány v pufru, poté byla reakce zahájena přidávkem substrátu.

Křivka byla proměřena pro 12 různých koncentrací inhibitoru (od 0 nM do 900 nM). Byla spočítána relativní rychlost: poměr rychlosti inhibované reakce ku rychlosti neinhibované reakce v_i / v_0 . Hodnota IC_{50} byla určena ze závislosti relativní rychlosti inhibované reakce na koncentraci inhibitoru (graf 4).

4.2.2 URČENÍ MECHANISMU INHIBICE

puf: 0,1 M octan sodný, 0,3 M NaCl, pH 4,7

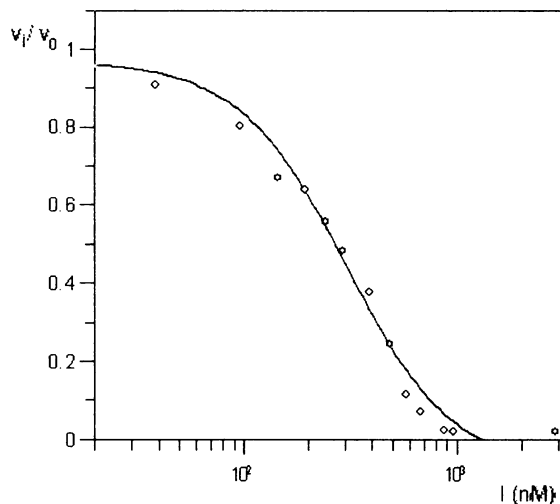
Změna absorbance v čase byla měřena při vlnové délce 305 nm a teplotě 37°C v kyvetě o délce hrany 1cm v celkovém objemu reakční směsi 1 ml. Koncentrace HIV-proteázy byla konstantní (9 nM). Závislost v_0 na [S] byla proměřena pro tři koncentrace inhibitoru: 0 nm, 100 nm, 200 nm. Koncentrace substrátu se pohybovala v rozmezí od 3,2 μ M do 41,6 μ M. Inhibitor a proteáza byly společně po jednu minutu preinkubovány v pufru, poté byla reakce zahájena přidávkem substrátu.

Z naměřených hodnot byl vynesěn graf dle Lineweavera-Burka pro tři koncentrace inhibitoru (graf 5).

4.3 VÝSLEDKY

4.3.1 IC₅₀

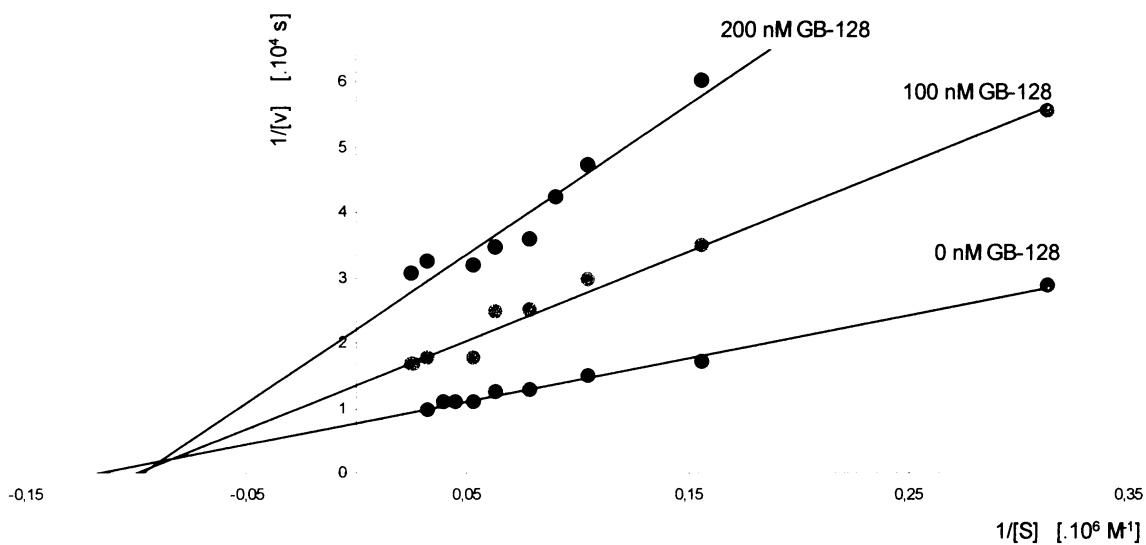
Ze získaných dat byl vytvořen graf závislosti relativní rychlosti na koncentraci inhibitoru.



graf 4 : závislost relativní rychlosti na koncentraci GB-128

Hodnota IC₅₀ byla určena pomocí programu software Graphit 5.0.4 (Erithacus Software Ltd. UK). Zjištěná hodnota konstanty IC₅₀ byla 290 ± 30 nM.

4.3.2 MECHANISMUS INHIBICE



graf 5: graf Lineweaver-Burka pro tři koncentrace GB-128: 0 nM, 100 nM, 200 nM

Z grafu je vidět, že hodnota Michaelisovy konstanty se nemění. S přidavkem inhibitoru roste $1/V_{\max}$, z toho plyne, že maximální rychlost klesá. Uvedené závislosti odpovídají nekompetitivnímu mechanismu inhibice. GB-128 je nekompetitivním inhibitorem.

5 Závěr

Karborany jsou molekuly složené s uhlíku, bóru a vodíku. Vytváří stabilní prostorovou strukturu zajímavých fyzikálně-chemických vlastností. Jsou to látky synteticky dostupné s možností četných obměn. V posledních desítkách let se výzkum zaměřil na využití karboranů v biomedicině. Tyto látky nalézají uplatnění v bórové neutronové záchytové terapii, radioimunologii, do budoucna se jeví jako slibné farmakofory a látky s protinádorovým účinkem, podobně jako např. cisplatina. V nedávné době se začaly zkoumat jako možné inhibitory proteázy viru HIV. V tomto směru jsou vyvíjeny mnohé struktury, neboť se zjistilo, že i jemné rozdíly ve stavbě molekuly mají rozhodující vliv na inhibici. Díky vazbě těchto látek na enzym HIV PR bylo objeveno zcela nové uspořádání chlopní proteázy, ve kterém se oproti běžně uznávanému modelu nezavírají chlopně úplně. Uvedený GB-128 je slibným nekompetitivním inhibitorem HIV PR s $IC_{50} = 290 \pm 30$ nM. Další studie jsou nutné k vylepšení vazby a vlastností budoucích efektivnějších inhibitorů HIV PR.

6 Použitá literatura

- [1] Jelliss, P. A.: *J. Organometallic Chem.* **32**, 104-123 (2005)
- [2] Hawthorne, F. M., Maderna, A.: *Chem. Rev.*, **99**, 3421- 3434 (1999)
- [3] Valliant, J. F., Guenther, K. J., King, A. S., Morel, P., Schaffer, P., Sogbein, O. O., Stepheson, K. A.: *Coordination Chem. Rev.* **232**, 173-230 (2002)
- [4] www.answers.com/topic/carborane, květen 2007
- [5] Lesnikowski, Z. J.: *Eur. J. Org. Chem.* **23** 4489-4500 (2003)
- [6] Lukeš I., Mička Z.: *Anorganická chemie II (systematická část)*, Karolinum (1998)
- [7] <http://www.britannica.com/ebc/art-905>, květen 2007
- [8] <http://lem.ch.unito.it/didattica/infochimica/BNCT/carborani.html>, květen 2007
- [9] <http://ipnp00.troja.mff.cuni.cz/~kvita/Medicine/Czech.htm>, duben 2006
- [10] Bregadze, V. I., Sivaev, I. B., Glazun, S. A.: *Anticancer. Agents Med. Chem.*, **6**, 75-109 (2006)
- [11] <http://www.ch.tum.de/oc1/PLemmen/BNCT-Web-2.gif>, květen 2007
- [12] Voet D., Voet J.: *Biochemistry*, 3rd edition. John Wiley & Sons, Inc., USA (2004)
- [13] Zdeněk Vodrážka: *Biochemie*, Academia (2002)
- [14] Renner, M. W., Miura, M., Easson, M. W., Vincente, M. G. H.: *Anticancer. Agents Med. Chem.* **6**, 145-157 (2006)
- [15] Rosenthal, M. A., Kavar B., Uren, S.: *J. Clin. Neurosci.* **10**, 425-427 (2003)
- [16] Schinazi, R. F., Goudgaon, N. M., Fulcrand, G. K., Lesnikowski, Z. J., Ullas, G., Moravek, J., Liotta, D. C.: *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **28**, 1113-1120 (1994)
- [17] Mourier, N. S., Eleuteri, A., Hurwitz, S. J., Tharnish, P. M., Schinazi, R. F.: *Bioorg. Med. Chem.* **7**, 2759-2766 (1999)
- [18] Hurwitz, S. J., Eleuteri, A., Wright, J., Moravek, J., Schinazi, R. F.: *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* **19**, 691-702 (2000)
- [19] Tjarks, W., Wang, J., Chandra, S., Zhuo, J., Lunato, A. J., Boyer, C., Li, Q., Usova, E. V., Eriksson, F., Morisson, G. H., Consquer, G. Y.: *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* **20**, 695-698 (2001)
- [20] Kane, R. R., Drechsel, K., Hawthorne, M. F.: *J. Org. Chem.* **58**, 8853-8854 (1993)
- [21] Nemoto, H., Cai, J., Asao, N., Iwamoto, S., Yamamoto, Y.: *J. Med. Chem.* **38**, 1673-1678 (1995)

- [22] Srivastava, R. R., Singhaus, R. R., Kabalka, G. W.: *J. Org. Chem.* **62**, 4476-4478 (1997)
- [23] Srivastava, R. R., Kabalka, G. W.: *J. Org. Chem.* **62**, 8730-8734 (1997)
- [24] Guan, L., Wims L. A., Kane, R. R., Smuckler, M. B., Morisson, S. L., Hawthorne, M. F.:
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 13206-13210 (1998)
- [25] <http://www.chem.ucla.edu/dept/Faculty/hawthorne/OPD/opd.htm>, květen 2007
- [26] Soloway, A. H., Tjarks, W., Bamum, B. A., Rong, F. G., Barth, R. F., Codogni, I. M.
Wilson, J. G.: *Chem. Rev.* **98**, 1515-1562 (1998)
- [27] Feakes, D. A., Shelly, K., Hawthorne, M. F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1367-1370
(1995)
- [28] pubs.rsc.org/ej/CC/2001/b105716m/, květen 2007
- [29] Ristori, S., Oberdisse, J., Grillo, I., Donati, A., Spalla, O.: *Biophys. J.* **88**, 535-547
(2005)
- [30] <http://www.chem.ucla.edu/dept/Faculty/hawthorne/liposome/liposome2.htm>,
květen 2007
- [31] <http://www.chem.ucla.edu/dept/Faculty/hawthorne/carboracycles/Carboracycles3.htm>,
květen 2007
- [32] <http://www.breastcancer.cz/main.php?section=prevence&page=clanek93>, květen 2007
- [33] Endo, Y., Yamamoto, K., Kagechika, H.: *Bioorg. & Medicin. Chem. Lett.* **13**, 4089-4092
(2003)
- [34] Endo, Y., Iijima, T., Yamakoshi, Y., Kubo, A., Itai, A.: *Bioorg. & Medicin. Chem. Lett.*
9, 3313-3318 (1999)
- [35] <http://lem.ch.unito.it/didattica/infochimica/BNCT/carborani.html>, květen 2007
- [36] Endo Y., Yoshimi T., Iijima T., Yamakoshi Y.: *Bioorg. & Medicin. Chem. Lett.* **9**, 3387-
3392 (1999)
- [37] Endo Y., Yaguchi K., Kawachi E., Kagechika H.: *Bioorg. & Medicin. Chem. Lett.* **10**,
1733-1736 (2000)
- [38] Ohta, K., Iijima, T., Kawachi, E., Kagechika, H., Endo, Y.: *Bioorg. & Medicin. Chem.*
Lett. **14**, 5913-5918 (2004)
- [39] <http://www.eyesight.org/Research/Research-Kinase/research-kinase.html>, květen 2007
- [40] Endo, Y., Yoshimi, T., Kimura, K., Itai, A.: *Bioorg. and Medicin. Lett.* **9**, 2561-2564
(1999)
- [41] Wlodawer, A., Miller, M., Jaskólski, M., Sathyanarayana, B. K., Baldwin, E., Weber, I.

- T., Selk, L. M., Clawson, L., Schneider, J., Kent, S. B. H.: *Science* 245, 616-621 (1989)
- [42] <http://www.microbiologybytes.com/virology/3035pics/HIVimmature.jpg>,
<http://www.microbiologybytes.com/virology/3035pics/HIVmature.jpg>, květen 2007
- [43] spin.niddk.nih.gov/.../amg_hiv-protease.html, květen 2007
- [44] Ingr, M., Uhlíkova, T., Strisovsky, K., Majerova, E., Konvalinka, J.: *Protein Sci.* 12, 2173-2182 (2003)
- [45] Strisovsky, K., Tessmer, U., Langner, J., Konvalinka, J., Krausslich, H. G.: *Protein Sci.* 9, 1631-41 (2000)
- [46] Kubát, P., Lang, K., Cígler, P., Kožíšek, M., Matějček, P., Janda, P., Zelinger, Z., Procházka, K., Král, V.: *J. Phys. Chem.* 111, 4539-4546 (2007)
- [47] Cígler, P., Kožíšek, M., Řezáčová, P., Brynda, J., Otwinowski, Z., Pokorná, J., Plešek, J., Grūnel, J., Kräusslich, H.-G., Král, V., Konvalinka, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 15394-15399 (2005)
- [48] Fanfrlík, J., Lepšík, M., Horinek, D., Havlas, Z., Hobza, P.: *ChemPhyschem* 7, 1100-1105 (2006)
- [49] Copeland R.A.: *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis*, 2nd edition, Wiley-VCH, Inc. (2000)
- [50] Weber, J., Mesters, J.R., Lepšík, M., Prejdová, J., Švec, M., Šponarová, J., Mlčochová, P., Stříšovský, K., Uhlíkova, T., Souček, M., Machala, M., Staňková, M., Vondrášek, J., Klimkait, T., Kraeusslich, H.-G., Hilgenfeld, R., Konvalinka, J.: *J. Mol. Biol.*, 324, 739-754 (2002)

7 Seznam zkratk

třípísmenné a jednopísmenné kódy aminokyselin

A	Ala	alanin	M	Met	methionin
C	Cys	cystein	N	Asn	asparagin
D	Asp	asparagová kyselina	P	Pro	prolin
E	Glu	glutamová kyselina	Q	Gln	glutamin
F	Phe	fenylalanin	R	Arg	arginin
G	Gly	glycin	S	Ser	serin
H	His	histidin	T	Thr	threonin
I	Ile	isoleucin	V	Val	valin
K	Lys	lysin	W	Trp	tryptofan
L	Leu	leucin	Y	Tyr	tyrosin

BNCT – bórová neutronová záchyťová terapie

BSH - thio-*closo*-dodekaborát sodný

DMSO- dimethylsulfoxid

E - enzym

EC₅₀ – molární koncentrace inhibitoru potřebná k dosažení 50% maximální odezvy

EGF – epidermální růstový faktor

ER – estrogenový receptor

IC₅₀ – *in vitro* koncentrace inhibitoru, při které klesá maximální rychlost enzymové reakce na 50%

HIV – Human Immunodeficiency Virus

HIV PR – proteáza viru HIV

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

I-inhibitor

IUPAC – mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii

K_i-inhibiční konstanta

K_M - Michaelisova konstanta

L-BPA - L-*p*- dihydroxyborylphenylalanin

LDL – lipoprotein nízké hustoty

MRI – zobrazení magnetickou rezonancí

m, μ, nM – mili, mikro, nanomolární

mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina

PDT – fotodynamická nádorová terapie

PET - a pozitronová emisní tomografie

RAR – retinový receptor

S – substrát

SPECT - jednofotonová emisní počítačová tomografie

UV – ultrafialové spektrum

v_i, v_0 - rychlost inhibované enzymové reakce, resp. počáteční rychlost neinhibované enzymové reakce

V_{\max} – maximální rychlost enzymové reakce

VFC – z ang. venus flytrap complex

wt – wild type

