

DERIVÁTY ELIPTICINU S CÍLENÝM PROTINÁDOROVÝM ÚČINKEM

MARIE STIBOROVÁ^a a EVA FREI^b

^aKatedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 2030, 128 40 Praha 2, ^bInstitut für Molekulare Toxikologie, Deutsches Krebsforschungszentrum, Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg
e-mail: stiborov@prfdec.natur.cuni.cz

Došlo dne 6.II.2001

Klíčová slova: elipticin, mechanismus působení, cíleně směřovaná protinádorová léčiva

Obsah

1. Elipticiny a jejich protinádorové účinky
2. Derivatizace molekuly elipticinu
3. Charakterizace cíleně směřovaných derivátů elipticinu
 - 3.1. Konjugát derivátů elipticinu s heptagastrinem
 - 3.2. Konjugáty elipticinu a 9-hydroxyelipticinu s enkefaliny
 - 3.3. Konjugáty elipticinu s estradiolem
 - 3.4. Konjugáty elipticinu se sacharidy
 - 3.5. Komplexy esterů elipticinu s lipoproteiny
 - 3.6. Konjugát elipticinu s lidským sérovým albuminem
4. Závěr

1. Elipticiny a jejich protinádorové účinky

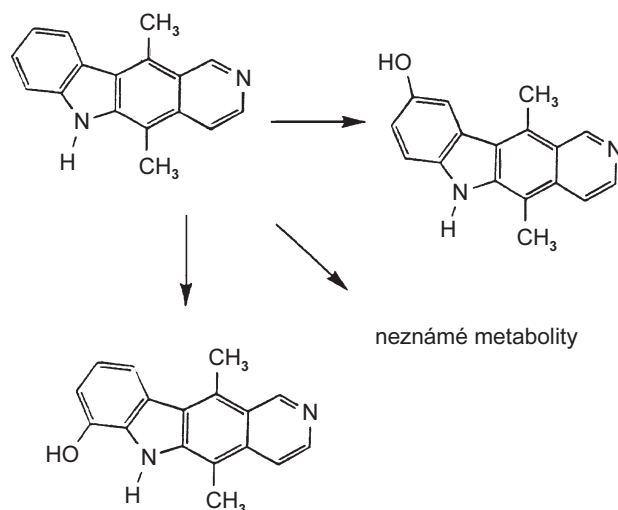
Elipticin (5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]karbazol, obr. 1) a některé jeho deriváty jsou alkaloidy rostlin čeledi *Apocynaceae* vykazující významnou protinádorovou aktivitu¹⁻⁴. Elipticin samotný a jeho deriváty 9-hydroxyelipticin a 9-hydroxy-2-methylelipticin (ve formě acetátu) jsou užívány zejména k léčení pokročilého karcinomu prsu s kostními metastázami, akutní myeloblastické leukémie, sarkomů ledvin a karcinomu štítné žlázy⁵⁻¹⁰. Důvody zájmu o klinické využití elipticinu jsou dva: 1) vysoká účinnost proti nádorovým onemocněním (elipticin je cytotoxický vůči nádorovým buňkám již v koncentracích řádově rovných 0,1–1 μM) a 2) jeho relativně nízké vedlejší toxické účinky. Limitující toxicitou je xerostomie (asialie), která může vyvolávat další nežádoucí účinky (monilázy, anorexie)⁹. Až na nefrotoxicitu podobnou svým mechanismem vzniku nefrotoxicitě cisplatiny, jsou další vedlejší toxické účinky elipticinu minimální. Hematologická toxicita je dokonce prakticky nulová^{9,11}.

V organismu potkana je elipticin metabolizován oxidačními reakcemi za tvorby 9-hydroxyelipticinu a 7-hydroxyelipticinu jakožto majoritních metabolitů¹² (obr. 1). C-Hydroxylace elipticinu v poloze C9 přitom vede ke zvýšení farmakologického účinku parentální molekuly, naopak v poloze C7

k jeho snížení¹³. Cytochromy P450 (CYP) jsou stěžejními enzymy, které elipticin či jeho deriváty metabolizují; CYP1A1 ev. CYP1A2 jsou přitom považovány za enzymy oxidující elipticiny nejefektivněji. Nelze však vyloučit, že se na metabolismu elipticinu mohou podílet i další, dosud nezjištěné isoenzymy cytochromu P450. Zda jsou elipticiny oxidovány uvedenými enzymy i v lidském organismu, nebylo dosud potvrzeno; k objasnění této problematiky je třeba dalších, detailnějších studií. Důležitým poznatkem ve vztahu k cytochromům P450 je rovněž skutečnost, že elipticin působí jako induktor jeho dvou isoenzymů, CYP1A1 a CYP1B1 (cit.^{17,18}).

Elipticin a jeho 9-hydroxyderivát jsou silnými mutageny vykazujícími mutagenní aktivitu vůči kmenům *Salmonella typhimurium*, *Neurospora crassa*, *Escherichia coli* a jsou mutagenní i vůči buňkám savcům¹⁹.

Elipticiny patří do skupiny protinádorových léčiv, jejichž mechanismus účinku není ještě přesně rozluštěn. Předpokládá se, že převládajícími mechanismy protinádorového účinku jsou i) interkalace do dvojšroubovicové struktury DNA, která vyplývá z velikosti a tvaru molekuly elipticinu a ii) jeho působení jako inhibitor topoisomerasy II (cit.¹³). Interkalace elipticinu je způsobena slabými reverzibilními hydrofobními interakcemi mezi spárovanými bázemi molekuly DNA (cit.¹³). Interakce mezi methylovou skupinou elipticinu a thyminem v interkalačním místě je určující pro orientaci této sloučeniny v DNA (cit.²⁰). Vzhledem ke svým fluorescenčním vlastnostem slouží elipticin i v řadě studií řešících obecné principy interkalace jako modelová sloučenina^{20,21}. Poznání mechanismu působení elipticinu jako inhibitoru topoisomerasy II je rovněž předmětem intenzivního výzkumu²²⁻²⁴. Elipticin, oproti jiným inhibitorům topoisomerasy II, interaguje buď s molekulou DNA nebo s proteinem topoisomerasy II za tvorby ternárního komplexu. Vzniklý ternární komplex, který je katalyticky inaktivní, pak výsledně vede ke stimulaci tvorby řetězových zlomů v DNA (cit.²⁴).



Obr. 1. Schéma metabolické oxidace elipticinu

Zajímavým zjištěním, které může k vysvětlení mechanismu protinádorového působení elipticinu také přispět, je poznatek, že elipticin a 9-hydroxyelipticin způsobují selektivní inhibici fosforylace produktu tumorového supresorového genu, proteinu p53 (cit.²⁵). Inhibice fosforylace proteinu p53 je pravděpodobně způsobena inhibicí specifické cyklin-dependentní kinasy (cit.²⁵). Nahromadění defosforylovaného proteinu p53 pak může vyústit v indukci apoptózy. Vedle uvedených mechanismů může elipticin fungovat i mechanismem dalším. Inhibuje oxidační fosforylaci, která vede ke drastickému snížení obsahu ATP v buňkách, což rezultuje v jejich zánik²⁶. Působí také jako inhibitor telomerasy¹³.

Všechna uvedená vysvětlení mechanismu protinádorové aktivity elipticinů jsou založena na nespecifickém působení. Tato skutečnost však ostře kontrastuje s poměrně úzkou specifitou jejich účinku vůči nádorovým onemocněním. Jsou specifické pouze k určitým typům neoplasie. Velmi důležitým aspektem pozorovaným při terapii užívající elipticiny je navíc individuální variabilita v odpovědi pacientů na podané léčivo. Účinek elipticinů je tedy specifický i pro individuální osoby (pacienty). Je tudíž nanejvýš pravděpodobné, že specifické působení elipticinu musí vycházet (být odvozeno) ještě z principů jiných, dosud neodhalených. Jedním z vysvětlení specifity chemoterapeutického účinku i selektivní odpovědi na podané léčivo může být rozdílná enzymová výbava lidského organismu takovými enzymy, které jsou důležité pro biotransformaci elipticinu. Příslušné enzymy mohou aktivovat léčivo na terapeuticky účinnější derivát, který pak buňky novotvaru poškozuje efektivněji, popř. způsobí až jejich likvidaci.

Souvislostí mezi metabolickou aktivací elipticinu a jeho působením jako protinádorového léčiva se dosud nikdo detailně nezabýval. Interkalovány jsou totiž samotný elipticin či jeho majoritní metabolit 9-hydroxyelipticin (nebo další terapeuticky užívané deriváty), a to bez jejich aktivace. Také vazba těchto sloučenin na DNA a topoisomerasu II vedoucí k tvorbě řetězových zlomů v DNA nevyžaduje jejich metabolické změny. Zda protinádorová chemoterapeutika na bázi elipticinů působí také prostřednictvím mechanismu, který je podmíněn jejich metabolickou aktivací, řešíme v grantovém projektu podporovaném GA ČR (grant 203/01/0996).

V předkládaném článku shrnujeme poznatky o nových trendech využití elipticinových derivátů jako kancerostatik. V tomto případě se jedná o poznatky informující o vývoji účinnějších elipticinových protinádorových léčiv, která jsou cíleně specifická vůči nádorovým buňkám.

2. Derivatizace molekuly elipticinu

V řadě laboratoří byla připravena široká škála derivátů základního skeletu elipticinu. Účelem takových úprav molekuly elipticinu bylo především: *i*) zvýšení protinádorového účinku, *ii*) modulace hydrofobicity molekuly ve smyslu zvýšené rozpustnosti, ale i účinnější absorpce léčiva nádorovými buňkami a *iii*) zvýšení selektivity léčiva pro nádorové buňky, tedy příprava cíleně směřovaného protinádorového léčiva na bázi elipticinu.

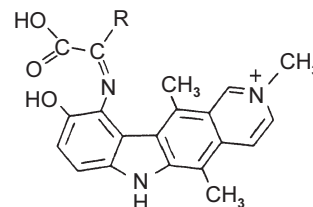
Významným místem pro derivatizaci elipticinového skeletu je atom uhlíku v poloze 9 molekuly léčiva. Zvýšený protinádorový účinek vykazují deriváty elipticinu substituované v této poloze, a to hydroxylovaný derivát, který je rovněž

majoritním metabolitem elipticinu v lidském organismu, dále pak 9-methoxyelipticin a 9-chlorelipticin. Další místo důležité pro derivatizaci molekuly elipticinu je atom dusíku v poloze 2. 9-Hydroxy-2-methylelipticinium (ve formě acetátu) je proti nádorům prsu s kostními metastázami i jako léčivo protileukemické nejučinnějším derivátem elipticinu. Další derivát, 9-methoxy-2-methylelipticinium-acetát, je cytotoxický vůči buněčným liniím nádorů mozku, experimenty *in vivo* však neprokázaly jeho účinnost vůči pevným nádorům²⁷. Naproti tomu 9-chlor-2-methylelipticinium-acetát je vůči pevným nádorům mozku vysoce efektivní.

Výše uvedené derivatizace molekuly elipticinu vedou nejen ke zvýšení protinádorové účinnosti, ale derivatizací je silně pozměněn i hydrofobní charakter léčiva. U léčiva musí být zachován optimální poměr mezi jeho hydrofobními a hydrofilními vlastnostmi. Nízká rozpustnost snižuje možnost jeho distribuce v organismu, a ovlivňuje se tak i jeho farmakokinetika a farmakodynamika. Vysoká polarita pak naopak snižuje transport léčiva přes buněčnou membránu do buněk. Elipticin je efektivně transportován přes buněčnou membránu, a to prostou, pasivní difuzí. Derivatizace na dusíku v poloze 2 vytváří z molekuly elektricky nabitou částici, uvedené deriváty elipticinu jsou proto používány ve formě solí, nejčastěji ve formě acetátu. Zmíněnou derivatizací dochází sice k lepší distribuci léčiva v organismu, naopak však k výraznému zhoršení transportních vlastností léčiva přes buněčnou membránu. Takto velká nabitá a hydrofilní molekula je přes buněčnou membránu transportována mnohem hůře než elipticin samotný. Pro odstranění tohoto jevu byly připraveny konjugáty 9-hydroxy-2-methylelipticina s hydrofobními aminokyselinami glycinem, alaninem, kyselinou α -aminomáselnou, valinem, leucinem a isoleucinem navázanými na uhlík 10 molekuly léčiva^{28,29}. Struktura takových derivátů je uvedena na obr. 2. Všechny konjugáty s aminokyselinami byly do nádorových buněk transportovány efektivněji (podobně jako elipticin pasivní difuzí), většina konjugátů (vyjma konjugátu s isoleucinem) však vykazovala nižší protirakovinnou účinnost^{28,29}.

Ke zvýšení rozpustnosti elipticinu byly rovněž využity komplexy elipticinu (a jeho 9-hydroxyderivátu) s γ - a β -cyklodextriny. Elipticiny nekovalentně vázané do cyklodextrinů však nebyly testovány z hlediska jejich transportních vlastností (distribuce) v organismu ani z hlediska jejich kancerostatických účinků³⁰.

Optimálním řešením úpravy molekuly protirakovinného léčiva ve smyslu změny jeho vlastností nejen fyzikálně-chemických, ale i biologických a terapeutických, je příprava cíleně směřovaných derivátů léčiv. Takové úpravy léčiva vedou ke zlepšení jeho distribuce v lidském organismu, op-



Obr. 2. Struktura konjugátů 9-hydroxy-2-methylelipticina (NMHE) s aminokyselinami: Gly-NMHE, R = H; Ala-NMHE, R = CH₃; Val-NMHE, R = CH(CH₃)₂; Lue-NMHE, R = CH₂CH(CH₃)₂

timálně bez vlivu na zdravé buňky a k selektivnímu příjmu léčiva pouze nádorovými buňkami.

3. Charakterizace cíleně směřovaných derivátů elipticinů

Většina kancerostatik jsou nízkomolekulární látky, které nepůsobí místně specificky a relativně rychle se vylučují z organismu. Protože je třeba zajistit působení léčiva ve vhodné terapeuticky účinné koncentraci po delší dobu, je nezbytné podávat vhodnou dávku léčiva opakovaně, v určitých časových intervalech. I v takovém případě však léčivo nepůsobí pouze v místě požadovaného terapeutického efektu, tedy pouze na nádorové buňky. S tím je spojeno riziko vedlejších, často toxických účinků léčiva, které jsou právě u kancerostatik velmi závažným problémem. To vše platí i pro elipticin a jeho deriváty. I když jsou vedlejší toxické účinky elipticinu nižší než u jiných protirakovinných léčiv, je jejich snížení pro zdravé buňky organismu stále vysoce žádoucí a aktuální.

Jeden ze směrů přípravy cíleně směřovaných kancerostatik využívá jejich navázání na nosič obsahující tzv. determinantu cíleného transportu (cíleného účinku)^{31,32}. Výsledkem je konjugát léčiva s determinantou. Determinantou cíleného účinku je molekula, která je schopná rozpoznat povrchové receptory nádorových buněk, a k těmto receptorům celou molekulu (konjugát) specificky zavést. Kancerostatikum je v tomto případě dopravováno organismem ve své, v ideálním případě biologicky neaktivní formě, a k jeho vlastní aktivaci dochází až po průniku konjugátu do cílových nádorových buněk.

Úspěšně cíleně směřované léčivo musí splňovat následující kritéria:

- 1) Léčivo musí být cíleně směřované k receptoru, který je v nádorových buňkách přítomný v signifikantně vyšším množství než v buňkách zdravých tkání. Determinanta cíleného účinku musí mít navíc k receptorům, které jsou přítomné na povrchu nádorových buněk, vysokou afinitu.
- 2) Receptor se po rozštěpení konjugátu v nádorové buňce uvolní a měl by být zpětně recyklován do buněčného povrchu, aby mohl být opět léčivem rozpoznán. Je třeba, aby působil jako „pumpa“, která transportuje větší množství léčiva do buněk. Tento požadavek je obzvlášť důležitý, neboť počet molekul receptorů v cílové buňce zřídka přesahuje hodnotu 10^6 (cit.³³).
- 3) Konjugát musí být v průběhu cirkulace (transportu) léčiva v organismu stabilní; naproti tomu musí být snadno hydrolyzován lysosomálními hydrolytickými enzymy.
- 4) Účinná složka konjugátu (vlastní nemodifikované kancerostatikum) musí vykazovat extrémně vysokou toxicitu uvnitř nádorových buněk s hodnotami IC_{50} v rozmezí nM–μM.
- 5) Konjugát nesmí vykazovat imunogenní aktivitu (musí být neimmunogenní).

Návrh a syntéza nadějných přípravků s cíleným kancerostatickým účinkem vychází z využití receptorů pro i) růstové faktory^{34–36}, ii) cytokiny^{37,38}, iii) steroidní i peptidové hormony^{39,40} nebo iv) monoklonální protilátky⁴¹ či využití lektinů – tedy ve všech případech domén přítomných na povrchu určitých typů nádorových buněk. Jinou možností je využití skutečnosti, že některé typy nádorových buněk vyžadují pro svůj růst a vývoj či proliferaci určité sloučeniny (nízko- i vy-

sokomolekulární) v daleko vyšších koncentracích než buňky zdravých tkání. Takové sloučeniny pak mohou být využity jako nosiče protinádorově účinné látky.

Elipticin a některé jeho deriváty se jeví jako kancerostatika vhodná pro přípravu cíleně směřovaných protinádorových léčiv. Jak již bylo uvedeno, jedná se o silně hydrofobní sloučeninu s výraznou cytotoxicitou pro nádorové buňky a poměrně nízkými vedlejšími účinky.

Do současnosti byla popsána příprava několika konjugátů elipticinu, které byly testovány jako potenciální cíleně směřovaná protirakovinná léčiva.

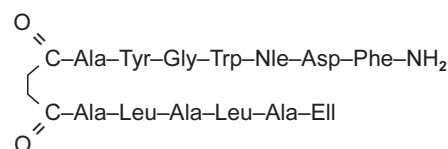
3.1. Konjugát derivátu elipticinu s heptagastrinem

V roce 1998 bylo Michejdou a jeho spolupracovníky⁴² popsáno, že gastrointestinální (GI) hormon, gastrin, stimuluje růst některých gastrointestinálních nádorů. Receptor typu B pro uvedený hormon (gastrin) a eventálně rovněž pro cholecystokinin je exprimován v mnoha druzích uvedených nádorů. Tento receptor patří do rodiny receptorů spojených s G proteinem, pro něž je charakteristická přítomnost sedmi transmembránových domén. Gastrin cirkulující v organismu je peptid, u něhož je pro vazbu na jeho specifický receptor absolutně nezbytný C-terminální tetrapeptid. Na bázi výše uvedených poznatků byl Michejdovou pracovní skupinou připraven konjugát C-terminálního heptapeptidu gastrinu (heptagastrin Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH₂), který byl připojen k derivátu elipticinu, 1[3-[N-(3-aminopropyl)-N-methylamino]propyl]amino-(9-methoxy-5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]karbazolu, prostřednictvím sukcinylovaného pentapeptidu Ala-Leu-Ala-Leu-Ala (obr. 3). Elipticin je vázán k terminálnímu alaninu přes atom dusíku v poloze 2 elipticinového skeletu.

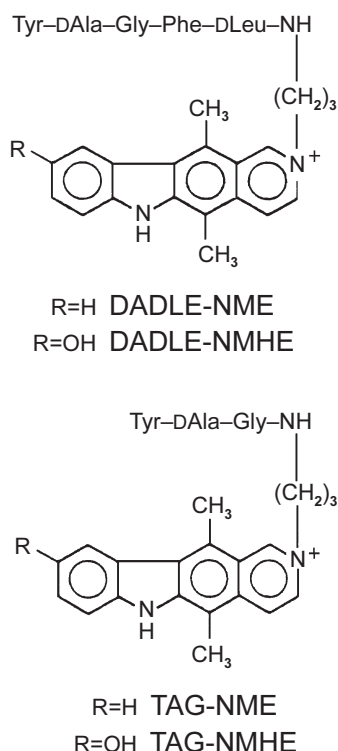
Syntetizovaný konjugát se specificky váže na receptor pro gastrin/cholecystokinin přítomný v NHI/3T3 buňkách, zatímco s povrchem divokého typu těchto buněk (neobsahujících receptor) neinteraguje. Endocytosou (pinocytosou) je komplex konjugátu s receptorem transportován do buněk a ukládán do endosomů. Receptor je s velkou efektivitou recyklován do buněčného povrchu, zatímco peptidový ligand (konjugát) dosahuje lysosomy. Pravděpodobně právě v lysosomech je pak konjugát degradován, a volný elipticin pak může v nádorové buňce působit jako cytotoxické agens⁴².

3.2. Konjugáty elipticinu a 9-hydroxyelipticinu s enkefalinou

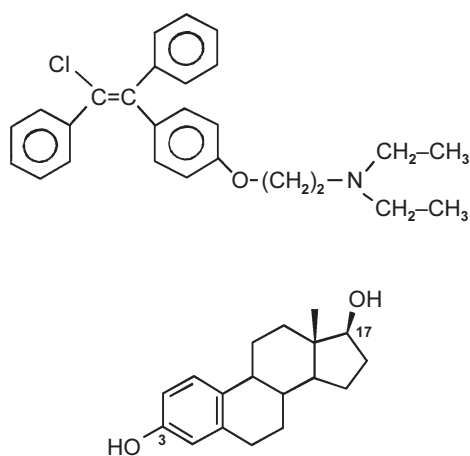
Enkefaliny (Leu-enkefalin, Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu, a Met-enkefalin, Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) patří spolu s β-endorfinem mezi peptidové hormony, které působí na centrální nervovou soustavu podobně jako opiáty. Jsou proto někdy označovány jako opioidní (opiátové) peptidy. Vážou se na opiátové receptory mozkových buněk, jsou jejich fyziologickými agonisty.



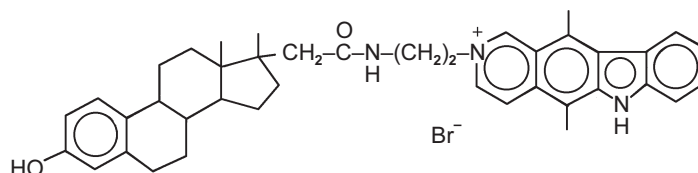
Obr. 3. Konjugát elipticinu s heptagastrinem



Obr. 4. Chemická struktura konjugátů elipticinů s enkefalinem (DADLE, D-Ala²-D-Leu⁵-enkefalin, Tyr-D Ala-Gly-Phe-D Leu-NH-(CH₂)₃-elipticin, NME, N²-methylelipticin, NMHE, 9-hydroxy-N²-methylelipticin)



Obr. 5. Struktura (*E*)-clonifenu a estradiolu



Obr. 6. Konjugát elipticinu s estradiolem

Zajímavé je zjištění, že lidské kolo-rektální karcinomy^{43,44} a malobuněčné plicní karcinomy⁴⁵, které jsou silně chemo-rezistentní, obsahují vysoké koncentrace enkefalinů a jejich receptorů. Těchto poznatků bylo využito Rigaudem se spolupracovníky^{41,46}, kteří připravili konjugáty uvedených peptidů s elipticinem a jeho 9-hydroxyderivátem. Struktura syntetizovaných konjugátů je uvedena na obrázku 4.

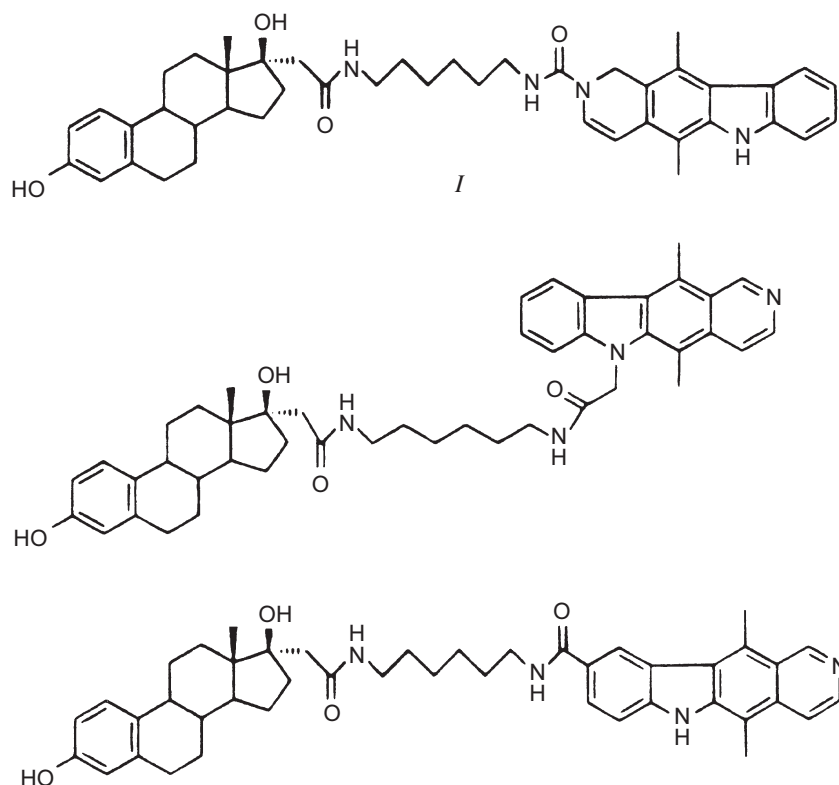
Připravené konjugáty, kterým zůstala zachována schopnost tvořit interkaláty s DNA, interagují s enkefalinovými receptory *in vitro* a jsou transportovány do nádorových buněk obsahujících uvedené receptory. Interakce s receptory je však velmi slabá a konjugáty vstupují i do buněk, které enkefalinové receptory neobsahují. Pro úspěšné cíleně směřované léčivo, které je připraveno na bázi směřování pro určitý receptor, je důležité, aby ta část molekuly konjugátu (kovalentního komplexu), která je vlastní aktivní složkou léčiva (elipticin) nehrála dominantní úlohu v transportu konjugátu. V případě konjugátů elipticinů s enkefaliny je pravděpodobné, že ztratily vlastnosti nezbytné pro rozpoznání receptorem. Elipticinová část molekuly převažuje z hlediska významu pro transport konjugátu do buněk, který je právě touto složkou zprostředkován pasivní difúzí (hydrofobní povaha molekuly léčiva)^{41,46}. Uvedené konjugáty tedy nemohou být využity jako cíleně směřovaná kancerostatika.

3.3. Konjugáty elipticinu s estradiolem

Růst endometria a téměř 30 % nádorů prsu je stimulován estrogény. Z klinických studií vyplývá, že antagonisté estrogenů, antiestrogeny, mohou být užity k léčení nádorů závislých na estrogenech. Buňky některých nádorů prsu (např. karcinomu prsu) obsahují receptory pro estrogény (jsou estrogen-receptor pozitivní) a významně koncentrují estrogény v buněčném jádře^{47,48}. Mechanismus působení estrogenů a ev. také antiestrogenů je vysvětlován především jejich interakcí s celulárními receptory, které jsou pravděpodobně lokalizované v cytoplazmě i jádře buněk. Jak vyplývá z výše uvedeného, estrogény a jejich antagonisté, antiestrogeny, by mohly být rovněž potenciálně dobrými přenašeči kancerostatik do buněk a dále do jader bohatých na receptory. Konkrétně kancerostatik, jejichž cílem jsou molekuly DNA.

K syntéze konjugátů elipticinů s estrogény a antiestrogeny bylo použito antiestrogenu (*E*)-clomifenu [1-[4-[2-(diethylamino)ethoxy]-phenyl]-1,2-diphenyl-2-chloroethylen, obr. 5] a estrogenního hormonu estradiolu^{47,48} (obr. 5). Z mnoha syntetizovaných konjugátů pouze jediný (obr. 6) vykazoval stejnou cytotoxickou aktivitu jako elipticin⁴⁸. Jeho využití jako cíleně směřovaného léčiva na bázi elipticinu je však omezené. Transport uvedeného aktivního derivátu do nádorových buněk totiž není zprostředkován receptory pro estrogény⁴⁸.

Dalšími konjugáty elipticinů s estrogény jsou tři sloučeniny, které byly syntetizovány z elipticinu a estradiolu Devrajem



Obr. 7. Struktura konjugátů elipticinu s estradiolem

se spolupracovníky⁴⁷ (obr. 7). Ani v tomto případě nebyly připravené konjugáty úspěšnými cíleně směřovanými kancerostatiky. I když jeden z konjugátů (sloučenina *I* na obrázku 7) je dobrým inhibitorem topoisomerasy II a jeho cytotoxicita vůči nádorovým buňkám je vysoká, tento konjugát nevykazuje selektivitu k estrogen-pozitivním buněčným liniím. Uvedená skutečnost pravděpodobně vyplývá ze slabé afinity konjugátu k estrogenním receptorům, která je způsobena modifikací molekuly estradiolu derivátem elipticinu⁴⁷.

3.4. Konjugáty elipticinu se sacharidy

Podrobná studie konjugátů velké skupiny monosacharidů s elipticinu (elipticin, 9-hydroxyelipticin, 9-methoxyelipticin) (49 konjugátů) provedená Hondou se spolupracovníky⁴⁹ prokázala, že cukerná složka zvýšila terapeutickou účinnost léčiva. Všechny studované konjugáty mají cukernou složku vázanou na atom dusíku v poloze 2 elipticinového skeletu, jde tedy o kvarterní glykosidy. Dva ze studovaných glykosidů (L-arabinopyranosid a D-xylofuranosid 9-hydroxyelipticinu) jsou velmi slibnými kancerostatiky, jejichž účinnost vůči některým modelovým buněčným nádorovým liniím (L1210 leukemická linie, P388 leukemická linie, buňky B16 melanomu) je několikanásobně vyšší, než je účinnost elipticinu samotných⁴⁹. Mechanismus zvýšené účinnosti syntetizovaných glykosidů ani selektivita sorpce těchto látek nádorovými buňkami (cílové receptory) nebyly dosud studovány. O dalších preklinických studiích s uvedenými glykosidy, které byly autory v citované literatuře⁴⁹ slibovány, však dodnes nejsou informace.

3.5. Komplexy esterů elipticinu s lipoproteiny

Příprava dalších cílově směřovaných léčiv na bázi elipticinu vychází ze zcela jiného principu, než jsou principy výše popsané. Nádorové buňky, které se rychle replikují a nekontrolovaně proliferují, vyžadují pro syntézu buněčné membrány značná množství cholesterolu. Cholesterol musí být buď syntetizován z dvouhlíkatých jednotek *de novo* nebo může být dodán z degradovaných plazmatických lipoproteinů (low-density lipoprotein, LDL), jejichž je součástí. Nádorové buňky přitom obsahují receptory pro LDL a metabolizují tyto lipoproteiny daleko rychleji, než jsou lipoproteiny metabolizovány buňkami zdravými^{50–52}. LDL tedy mohou být využity jako nosič protirakovinných léčiv. Částice LDL s léčivými jsou komplexy, do kterých jsou léčiva inkorporována nekovalentními (hydrofobními) interakcemi. Hydrofobicita léčiva musí tedy být výrazná. Samotné komplexy LDL s léčivem jsou značně stabilní při transportu organismem, a dosahují tak cílové buňky v nezměněné podobě.

Derivát elipticinu (9-hydroxy-2-methylelipticinium-acetát) byl použit jako kancerostatická součást komplexů s LDL. Jeho polarita však neumožňovala inkorporaci do LDL. Proto byly z této sloučeniny syntetizovány estery s kyselinou stearovou, palmitovou a oleovou (estery kyselin s hydroxylovou skupinou v poloze 9 elipticinového skeletu). Jejich hydrofobicita pak již byla pro inkorporaci do LDL dostatečná. Z připravených esterů se do LDL nelépe inkorporoval oleát. Jeho komplex s LDL byl efektivně transportován po interakci s re-

ceptorem do nádorových buněk endocytosou, jeho cytotoxicita byla vyšší, než byla cytotoxicita volného léčiva⁵¹. Rovněž experimenty *in vivo* na myších melanomech B16 byly úspěšné⁵².

3.6. Konjugát elipticinu s lidským sérovým albuminem

Strategickým postupem ve zvýšení protirakovinné selektivity cancerostatik je využití transportních proteinů. Vhodným proteinem pro cíleně směřovanou cancerostatika se jeví sérový albumin. Lidský sérový albumin je vysokomolekulární látka o molekulové hmotnosti 66500. Již sama skutečnost, že jde o sloučeninu o vysoké molekulové hmotnosti, má určitý význam pro její využití jako nosiče cancerostatik. U konjugátů cancerostatik s vysokomolekulárním nosičem má totiž již samotná vysoká molekulová hmotnost proteinového nosiče pozitivní vliv na distribuci léčiva v organismu. Vede k až několikanásobnému zvýšení koncentrace konjugovaného léčiva v pevných nádorech ve srovnání s volným léčivem. Jde o tzv. pasivní směřování (passive tumor targeting) v důsledku EPR efektu (enhanced permeability and retention effect)⁵³. Vedle toho je lidský sérový albumin (HSA) vhodný jako proteinový přenašeč ještě z dalších důvodů.

- 1) Je pohlcován (absorbován) nádorovými buňkami specificky, zatímco k buňkám zdravých tkání má tento protein afinitu mnohonásobně nižší^{53,54}.
- 2) Je snadno dostupný protein, v organismu optimálně biologicky stabilní.
- 3) V nádorových buňkách je snadno degradován⁵³.
- 4) Pro lidský organismus je netoxický a neimunogenní⁵³.

Konjugát lidského sérového albuminu s elipticinem (HSA-elipticin) byl připraven teprve nedávno⁵⁵. Nádorovými buňkami (linie leukemických buněk Nalm6) je selektivně a efektivně přijímán a v buňkách pak hydrolyzován na volné léčivo a proteinový nosič⁵⁵. Vykazuje vysokou cytotoxicitu vůči testovaným nádorovým buňkám, obdobnou jako volný elipticin ($IC_{50} = 2 \mu M$). Ačkoliv jeho účinnost v experimentech *in vivo* nebyla prozatím studována, z testování na buněčných liniích *in vitro* se jeví jako nadějně cíleně směřované léčivo⁵⁶.

4. Závěr

Předkládaný článek ukazuje nové směry vývoje a přípravy cíleně směřovaných léčiv na bázi elipticinu a zobecňuje poznatky o vlastnostech, které taková léčiva musí splňovat. Zhodnocení kvality cíleně směřovaných derivátů elipticinu jako cancerostatik s cíleným účinkem je však v současnosti ještě poněkud obtížné. Z výše uvedených poznatků vyplývá, že nově syntetizovaných derivátů, které vykazují zvýšený protinádorový efekt a selektivitu, je doposud malý počet. Navíc, řada těchto derivátů nebyla ještě dostatečně testována ani v klinických studiích, ba ani v experimentech *in vivo*, na živočišných modelech. Nicméně terapeuticky slibné se zdají být především konjugáty elipticinu s heptagastrinem a elipticinu s lidským sérovým albuminem. Proto je příprava obou typů léčiv také předmětem patentních řízení^{42,56}. Vedle potenciálního terapeutického využití, předpokládáme jejich použití i k osvětlení mechanismu protinádorového účinku elipticinu, jehož podstatu v našich laboratorních detailně studujeme.

Autorky děkují za podporu Německému centru výzkumu rakoviny a grantům GA ČR (203/01/0996) a MŠMT ČR (MSM 1131 00001).

LITERATURA

1. Dalton L. K., Demerac S., Elmes B. C., Loder J. W., Swan J. M., Teitei T.: *Aust. J. Chem.* 20, 2715 (1967).
2. Le Pecq J. B., Dat Xuong N., Gosse C., Paoletti C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 5078 (1974).
3. Rouesse J. G., Le Chevalier T., Caille F., Mondesir J. M., Sancho-Ganier H., May-Levin E., Spielman M., DeJager R., Amiel J. L.: *Cancer Treat. Rep.* 69, 707 (1985).
4. Mathé G., Triana K., Pontiggia P., Blanquet D., Hallard M., Morette C.: *Biomed. Pharmacother.* 52, 391 (1998).
5. Juret P., Tanguy A., Girard A.: *Nouv. Presse Med.* 8, 1495 (1979).
6. Juret P., Heron J. F., Couette J. E., Delozier T., Letalaer J. Y.: *Cancer Treat. Rep.* 66, 1909 (1982).
7. Mathé G., Hayat M., De Vassal F., Schwarzenberg L., Schneider M., Schlumberger J. R., Jasmin C., Rosenfeld C.: *Rev. Eur. Etud. Clin. Biol.* 15, 541 (1970).
8. Caillé P., Monesir J. M., Droz J. P., Kebert P., Goodman A., Ducret J. P., Theodore C., Spelman M., Rouesse J., Amiel J. L.: *Cancer Treat. Rep.* 69, 901 (1985).
9. Klener P.: *Protinádorová chemoterapie*. Galén, Praha 1996.
10. Arguello F., Alexander M. A., Greene J. F. Jr., Stinson S. F., Jorden J. L., Smith E. M., Kalavar N. T., Alword W. G., Klabansky R. L., Sausville E. A.: *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 124, 19 (1998).
11. Diop B., Toure P., Sow M. T., Toure M., Halliez M. L., Castaigner J. P., Mondestr J. M., DeJaeger R.: *Med. Afr. Noire* 31, 107 (1984).
12. Lesca P., Monsarrat B., Cros S., Paoletti C.: *J. Natl. Cancer Inst.* 67, 871 (1981).
13. Auclair C.: *Arch. Biochem. Biophys.* 259, 1 (1985).
14. Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E.: *Chem. Listy* 93, 229 (1999).
15. Lesca P., Beauner P., Monsarrat B.: *Chem.-Biol. Interactions* 36, 299 (1981).
16. Tassaneeyakul W., Birkett D. J., Veronese M. E., McManus M. E., Tukey R. H., Gelboin H. V., Miners J. O.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265, 401 (1993).
17. Gasiewicz T. A., Kende R. S., Rucci G., Whitney B., Willey J. J.: *Biochem. Pharmacol.* 52, 1787 (1996).
18. Chang C.-Y., Puga A.: *Mol. Cell. Biol.* 18, 525 (1998).
19. De Marini D. M., Abu-Shakra A., Gupta R., Hender L. J., Levine J. E.: *Environ. Mol. Mutagen.* 20, 12 (1992).
20. Singh M. P., Hill G. C., Peoc'h D., Rayner B., Imbach J. L., Lown J. W.: *Biochemistry* 33, 10271 (1994).
21. Chu Y., Hsu M. T.: *Nucleic Acid Res.* 20, 4033 (1992).
22. Monnot M., Mauffret O., Simon V., Lescot E., Psaume B., Saucier J. M., Charra M., Belehadek J. Jr., Fermandjian S.: *J. Biol. Chem.* 25, 1820 (1991).
23. Fosse P., Rene B., Chrra M., Paoletti C., Saucier J. M.: *Mol. Pharmacol.* 42, 590 (1992).
24. Froelich-Ammon S. J., Patchan M. W., Osheroff N., Thopson R. B.: *J. Biol. Chem.* 270, 14998 (1995).
25. Ohashi M., Sugikawa E., Nakanishi N.: *Jpn J. Cancer Res.* 86, 819 (1995).

26. Schwaler M. A., Allard B., Lescot E., Moreau F.: J. Biol. Chem. 270, 22709 (1995).
27. Sriram K., Boyd M. R., Vistica D. T., Ravindranath V.: Neurotoxicology 18, 97 (1997).
28. Auclair C., Voisin E., Banoun H., Paoletti C., Bernadou J., Meunier B.: J. Med. Chem. 27, 1161 (1984).
29. Larsen A. K., Paoletti J., Belehradek J. Jr., Paoletti C.: Cancer Res. 46, 5236 (1986).
30. Sbai M., Ait Lyazidi S., Lerner D. A., de Castillo B., Martin M. A.: Biomed. Chromatogr. 11, 89 (1997).
31. Ulbrich K.: Chem. Listy 89, 30 (1995).
32. Gregoriadis G., Senior J., Trouet A.: *Targeting of Drugs*. Plenum Press, New York 1981.
33. Frucht H., Gazdar A. F., Park J.-A., Olie H., Jensen R. T.: Cancer Res. 52, 1114 (1992).
34. Kibara A., Pastau I.: Cancer Res. 55, 71 (1995).
35. Carpenter G.: Curr. Opin. Cell Biol. 5, 261 (1993).
36. Lemaistre C. F., Meneghetti C., Howes L., Osborne C. K.: Breast Cancer Res. Treat. 32, 97 (1994).
37. Strom T. B., Kelley V. R., Murphy J. R., Nichols J., Woodworth T. G.: Annu. Rev. Med. 44, 343 (1993).
38. Waldmann T. A., Pastau I. H., Gansow O. A., Junhans R. P.: Ann. Intern. Med. 116, 148 (1992).
39. Roth T., Tang W., Eisenbrand G.: Anticancer Drug Des. 10, 655 (1995).
40. Rink S. M., Yarema K. J., Solomon M. S., Paige L. A., Tadayoni-Rebek B. M., Essigmann J. M., Croy R. G.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 15063 (1996).
41. Rigaudy R., Garbay-Jaureguiberry Ch., Jacquemin-Sablon A., Le Pecq J.-B., Roques B. P.: Int. J. Pept. Protein Res. 30, 347 (1987).
42. Czerwinski G., Tarasova N. I., Michejda J.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 11520 (1998).
43. Alumets J., Falkmer S., Grimelius L., Hakanson R., Lundberg O., Sundler F., Wilander B.: Acta Pathol. Microbiol. Scand. 88, 103 (1980).
44. Davis W. G., Torney W. C., Kelaney C. W.: Gut 20, 865 (1980).
45. Roth K. A., Barchas J. D.: Cancer 57, 769 (1985).
46. Rigaudy P., Charcosset J.-Y., Garbay-Jaureguiberry Ch., Jacquemin-Sablon A., Roques B. P.: Cancer Res. 49, 1836 (1989).
47. Devraj R., Barret J. F., Fernandez J. A., Katzenellenbogen J. A., Cuzhman J.: J. Med. Chem. 38, 3367 (1996).
48. Debarre A., Oberlin R., Roques B. P., Borgna J.-L., Rocheford H., Le Pecq J.-B., Jacquemin-Sablon A.: J. Med. Chem. 28, 752 (1985).
49. Honda T., Kato M., Inoue M., Shimamoto T., Shima K., Nakanishi T., Yoshida T., Noguchi T.: J. Med. Chem. 31, 1295 (1988).
50. Gal D., MacDonald P. C., Porter J., Simpson E. R.: Int. J. Cancer 28, 315 (1981).
51. Samadi-Baboli M., Favre G., Bernadou J., Berg D., Soula G.: Biochem. Pharmacol. 40, 203 (1980).
52. Favre G.: C. R. Seances Soc. Biol. Fil. 186, 73 (1992).
53. Kratz F., Beyer U., Collery P., Lechenault F., Cazabat A., Schumacher P., Falken U., Unger C.: Biol. Pharm. Bull. 21, 56 (1998).
54. Sinn H., Schrenk H. H., Friedrich A., Schilling U., Maier-Borst W.: Int. J. Rad. Appl. Instrum. 17, 819 (1990).
55. Bieler C. A., Stiborová M., Breuer A., Sinn H., Schrenk H.-H., Frei E.: 7th Internat. Symposium on Molecular Aspects of Chemotherapy, Gdańsk 1999, Abstract str. 49.
56. Frei E., Bieler C. A., Stiborová M., Breuer A., Wiessler M., Sinn H.: Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 41, 765 (2000).

M. Stiborová^a and E. Frei^b (^a*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague,* ^b*Department of Molecular Toxicology, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany*): **Targeting of Ellipticine Drugs on Tumor Cells**

Ellipticines are potent antitumor agents whose mechanism of action is considered to be based mainly on DNA intercalation and/or inhibition of topoisomerase II. Targeting of the ellipticine drugs specifically on tumor cells has been the goal of many studies. A survey of such targeting of ellipticines on tumor cells and definition of the structural requirements for receptor-targeted drugs are given in the present article. Targeted cytotoxic drugs consisting of heptagastrin, modified enkephalin, estradiol, saccharides, lipoproteins and human serum albumin linked to ellipticines, designed and prepared by many authors, are shown and their efficiencies in tumors are discussed.