

CÍLENÝ TRANSPORT PLATINOVÝCH CYTOSTATIK

JAN SVOBODA, KAMILA SYSLOVÁ a PETR KAČER

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
Petr.Kacer@vscht.cz

Došlo 8.9.16, přijato 12.11.16.

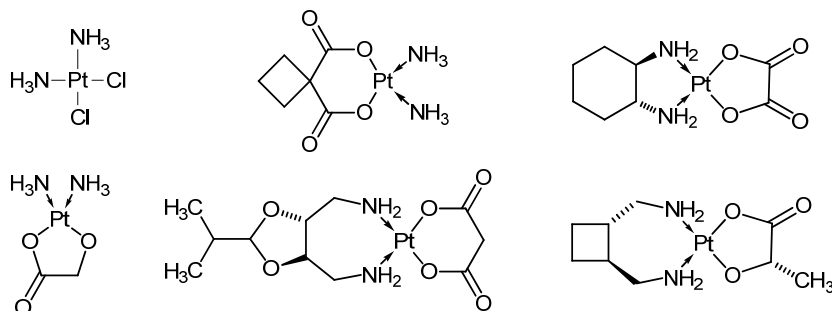
Klíčová slova: platinová cytostatika, rakovina, cílený transport, cisplatina, oxaliplatina, lipozomy, nanočástice, micely

Obsah

1. Úvod
2. Cílený transport platinových cytostatik
 - 2.1. Aktivní transport
 - 2.1.1. Nosiče na bázi estrogenu
 - 2.1.2. Sacharidy
 - 2.1.3. Peptidy a proteiny
 - 2.2. Pasivní transport
 - 2.2.1. EPR efekt
 - 2.2.2. Polymerní platinové konjugáty
 - 2.2.3. Lipozomy
 - 2.2.4. Polymerní micely
 - 2.2.5. Nanočástice
3. Závěr

1. Úvod

Nádorová onemocnění představují v současné době druhé nejzávažnější civilizační onemocnění na světě hned po nemocech kardiovaskulárního systému. Ročně na toto onemocnění umírá celosvětově více jak 8 miliónů obyvatel a u více jak 14 milionům obyvatel je nově diagnostikováno¹. Rakovina plic je co do počtu úmrtí nejzávažnější, které ročně podlehnou více jak 1,6 milionů obyvatel. Nejrozšířenějším typem rakoviny u mužů je rakovina tlustého střeva následována rakovinou prostaty. U žen má nejvyšší incidenci rakovina prsu². Příčiny vzniku zhoubných nádorů jsou zcela individuálního charakteru a převážně závisí na genetické predispozici jedince. V současné době je tak léčba nádorových onemocnění koncipována individuálně pro každého pacienta zvláště, v závislosti na stádiu, typu a rozšíření rakoviny, věku a stavu pacienta. Léčba nádorů obvykle spočívá v kombinaci více léčebných metod (např. chemoterapie, radioterapie, chirurgický zákrok, imunoterapie, hormonální terapie). Jako nejčastěji využívaná léčba je chemoterapie, která spočívá v podávání pacientům chemických látek (= cytostatik) za účelem zastavení buněčného dělení či úplného zničení nádorového bujení³. V současné době bylo vyvinuto mnoho druhů chemoterapeutik, které byly zařazeny do skupin podle mechanismu účinku – např. alkylační činidla, antimetabolity, inhibitory topoisomerasy I a II. Klinicky nepoužívanější skupinou chemoterapeutik jsou alkylační činidla, jejichž cytostatický účinek spočívá ve vnesení alkylové popř. jiné funkční skupiny na řetězec DNA, čímž dojde k jejímu poškození, které ve většině případů vede k buněčné smrti (apoptóze)⁴. Jednou z nejvýznamnějších skupin alkylačních činidel je skupina platinových cytostatik, která patří mezi nejúčinn-



Obr. 1. Přehled klinicky používaných platinových cytostatik

nější cytostatika. Prvním klinicky používaným platinovým cytostatikem byl komplex *cis*-diamindichloroplatinatan běžně označovaný jako cisplatina. Ačkoliv cisplatina vykazovala proti celé řadě nádorových linií výborné cytostatické účinky, projevil se u ní i četné závažné nežádoucí účinky (nevolnost, zvracení, neurotoxicita a nefrotoxicita). Od zavedení cisplatinu do klinické praxe bylo testováno více než 700 nových platinových komplexů, ale pouze pět dalších komplexů bylo schváleno pro léčbu nádorových onemocnění, a to karboplatina, oxaliplatina, nedaplatina, heptaplatina a lobaplatina^{6,7} (viz obr. 1).

V současné době se platinová cytostatika pro svůj velký protinádorový účinek a synergické efekty velmi často používají v kombinované terapii, zejména při léčbě solidních nádorů. Jejich nevýhodou je malá specifita na nádorovou tkáň, projevující se velkými nežádoucími účinky a v poslední době i projevy rezistence na některé nádory. Současný vývoj se orientuje do dvou směrů. Prvním směrem je vývoj nových platčítých komplexů (platinová cytostatika čtvrté generace), které mají oproti dosud používaným platnatým komplexům oktaedrální strukturu, způsobenou změnou oxidačního stavu centrálního atomu platiny z +II na +IV, a to vnesením obvykle karboxylátových ligandů do axiálních poloh komplexu. Tuto skupinu látek reprezentují dvě nové klinicky testované látky – satraplatina a komplex LA-12. Tyto platčité komplexy vykazovaly v preklinickém vývoji nižší toxicitu, vyšší protinádorový účinek na celé řadě nádorových linií a zároveň nevykázaly buněčnou rezistenci. V klinických zkouškách ale ani jeden z těchto komplexů dosud nepotvrdil velmi dobré preklinické výsledky. Druhý směr vývoje se zabývá přípravou lékových forem, vhodných pro cílený transport stávajících, klinicky používaných cytostatik přímo k nádoru^{5,7,8}.

2. Cílený transport platinových cytostatik

2.1. Aktivní transport

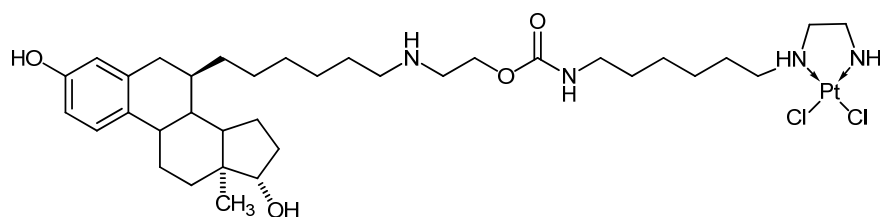
Aktivní transport je založen na specifické biomolekulární interakci mezi látkou a buňkou nebo tkáňovým elementem. Tento způsob může být aplikován na nádory obsahující biochemické subjekty (receptory), jejichž množství nebo funkčnost se liší od normálních tkání. Typickým příkladem aktivního transportu je navázání příslušného farmakoforu (protilátky) na léčivo pomocí kovalentní spojky nazývané spacer nebo linker. Následně pak dochází ke

specifické interakci mezi tímto systémem a cílovou buňkou za pomoci specifické vazebné afinity farmakoforu na cílový receptor. Bioaktivní látky (hormony, sacharidy, aminokyseliny, proteiny, a bis-fosfonáty) jsou běžně používány pro plnění směrovací funkce. Další látky používané k aktivnímu transportu jsou založeny na bázi biodegradovatelných molekul – polysacharidů, polyaminokyselin a ve vodě rozpustného polyethylenglykolu (PEG)^{9,10}.

2.1.1. Nosiče na bázi hormonu

Hormony na bázi estrogenů mohou jednoduše přestupovat buněčnými membránami pasivní difuzí díky své vysoké lipofilítě tak, že se naváží na estrogenový receptor (ER) v cytoplasmě a poté jsou transportovány do buněčného jádra. Díky této schopnosti patří mezi atraktivní nosiče pro aktivní cílený transport. Buňky exprimované na ER jsou považovány za estrogen receptory ER(+). Zároveň bylo zjištěno, že estrogenový receptor α (ER α) a nově objevený estrogenový receptor β (ER β) jsou zodpovědné za růstovou modulaci benigních i maligních nádorů prsu. Na rozdíl od ER α , který způsobuje proliferaci estrogenu v prsních nádorových buňkách, vykazuje nově objevený receptor ER β antiproliferační účinek. Využitím těchto receptorů je pravděpodobně možné řešit cílený transport cytostatik k nádoru. Distribuce těchto dvou ER receptorů není stejná, čímž hormonální deriváty vykazující antagonistické i agonistické biologické účinky mohou regulovat růst nádoru. ER β je velice zajímavý jako terapeutický cíl při léčbě nádorů rakoviny prsu^{9,10}.

Pro cílený transport Pt^{II} cytostatik je to jeden z možných námětů, jak nové komplexy navrhovat. V současné době byl vyvinut komplex [Pt(ethyldiamin)Cl₂] (viz obr. 2), na který je navázán pomocí karbamátového linkeru steroidní zbytek. Tento ligand má o 28 % vyšší relativní vazebnou afinitu vůči ER ve srovnání s 17 β -estradiolem. Po kovalentním navázání na synteticky připravenou DNA duplex 16-mer byla afinita vůči receptoru ER zachována. Tento komplex vykázal vyšší cytotoxicitu na nádorové linii vaječníků (CAOV3) oproti kontrolnímu vzorku. Vyšší toxicitu vykazoval tento komplex i na linii ER(+) MCF-7 oproti ER(-) nádorové linii prsu (MDA-MB-231). Navázání estradiolu na klinicky používaná cytostatika karboplatinu i oxaliplatinová analoga vykázal antiproliferační aktivitu na buněčných liniích MCF-7 a MDA-MB-231. Testované deriváty měly vyšší aktivitu než samotná platinová cytostatika, ale nižší účinnost než cisplatina^{10,11}.



Obr. 2. Estrogenový nosič pro platinové cytostatikum

2.1.2. Sacharidy

Sacharidy jako mono- a polysacharidy tvoří základy glykolipidů, glykoproteinů a jsou základními kameny nukleotidů. Nádorové buňky pro svůj rychlý růst a vývoj potřebují nezměrné množství živin a energie, kterou získávají zvýšeným příjmem glukosy. Díky tomu se tak sacharidy jeví jako ideální nosiče pro platinová cytostatika. Přírodní sacharidy i jejich syntetické deriváty mají dobrou schopnost interakce s platinovými komplexy. Na rozdíl od řady běžných ligandů se vyznačují dobrou biokompatibilitou, membránovou propustností, velmi malou toxicitou, enantiomerní čistotou a rozpustností ve vodě. Obzvláště nespornou výhodou je existence specifických receptorů pro sacharidy exkluzivně aktivované některými rakovinnými buňkami, což může vést ke zvýšenému rozeznání platinových cytostatik. V současné době bylo připraveno mnoho platinových komplexů se sacharidy, vhodných k interakci s mono- a bidentátními aminovými ligandy nebo s P-, S- nebo Se-donorovými ligandy i alkoholy^{9,10}.

Dalšími možnými sacharidy jsou oligosacharidy, mezi kterými jsou nejpoužívanější cyklodextriny (CDX). Jde o cyklické oligosacharidy rozpustné ve vodě, typicky složené z 6–8 glukopyranozových jednotek uspořádaných do toroidní prstencové struktury. Ačkoliv vnější část toroidu není hydrofobní, zároveň je méně hydrofilní než vodné prostředí, a tak může poskytovat místo hydrofobním molekulám. CDX jsou tak vhodné pro farmaceutickou aplikaci, protože jejich sloučeniny mohou být dobře modifikovány pro zlepšení jejich fyzikálních i chemických vlastností (zejména se jedná o rozpustnost ve vodě). Uvolňování bioaktivních komponent z inkluzních sloučenin je zprostředkováno změnami pH nebo enzymy. Jedním způsobem použití CDX pro cílený transport je zakotvení modifikované karboplatiny s adamantylovým ligandem do kavit β-CDX. Tento inkluzní komplex má vyšší cytotoxicitu pro nádorové linie neuroblastomu SK-N-SH a vyšší vaznost na plasmid pBR322 DNA než samotná karboplatina. Na druhou stranu je biologická dostupnost do nádorových buněk u karboplatiny čtyřikrát vyšší, než u její inkluze s β-CDX, tudíž se do nádoru dostane méně účinné látky. Vyšší cytotoxicita inkluze i přesto vede k vyšší účinnosti. Faktory jako je buněčný transport, receptorové navázání a heterogenní distribuce uvnitř buňky hrají patrně důležitější roli ve výsledném cytostatickém efektu protinádorových léčiv, než je vlastní buněčné vychytávání léčiva⁹.

2.1.3. Peptidy a proteiny

Nádorový růst a jeho metastazování je řízeno angiogenezi. Integriny jako αvβ3 a αvβ5 a aminopeptidy N (APN) se ve zvýšené koncentraci vyskytují v endoteliálních buňkách. Tyto buněčné povrchové proteiny lze použít jako cíle v chemoterapii. Intergriny αvβ3 a αvβ5 a APN mohou rozeznat peptidové sekvence RGD (Arg-Gly-Asp) a NGR (Asn-Gly-Arg). Z toho důvodu sekvence obsahující RGD, NGR, cyklický pentapeptid (CRGDC)c nebo (RGDFK) mohou být připojeny do série mono-platinových (IV) komplexů, a tak specificky zaměřit nádorovou vaskulaturu. Cyklické peptidy byly vybrány, protože se lépe

zaměřují na angiogenní endoteliální buňky než jejich lineární protějšky. Výsledky buněčné inhibice ukázaly, že Pt^{IV}-RGD konjugáty jsou více a specificky cytotoxické na buněčné linie obsahující integriny. Platinové konjugáty v oxidačním stavu (IV) obsahující NGR sekvenci jsou méně aktivní než Pt^{IV} komplexy s RGD sekvencí, ale za to jsou více aktivní než nespecifické Pt-peptidy (cit.⁹).

Jedním z příkladů je chlorotoxin (CTX), což je aminokyselina obsahující 36 jednotek se 4 disulfidickými můstky. Tento peptid se váže přednostně do buněk gliomu a do mnoha non-gliomových nádorových buněčných linií včetně melanomů. Zároveň se ale neváže do normálních buněk. CTX může být navázán na platinové komplexy, kde působí jako směrovací činidlo pro specifickou chemoterapii nádorů. Většina Pt^{IV} konjugátů vykazuje menší cytotoxicitu na buněčné linie ve srovnání s cisplatinou, ale na druhou stranu vykazují větší účinnost než jejich prekurzory na několika nádorových buněčných liniích^{10,11}.

2.2. Pasivní transport

Pasivní transport je především založen na využití výhody efektu EPR (Enhanced Permeability and Retention = zvýšená propustnost a retence), vyskytujícím se v nádorových tkáních. Díky rychlému a nerovnoměrnému růstu cévního řečiště v nádoru je cévní řečiště na rozdíl od normální tkáně nepravidelné a méně organizované a více porézní. Cévní endotelium v nádoru se šíří a roste velice rychle a přerušovaně, což vede k většímu množství uzlů, spojení a děr – oken o velikostech od 200 nm do 1,2 μm než v normálních cévách. Díky tomu mohou malé částice, obvykle v řádu několika set nanometrů, pasivně procházet skrz nádorové endoteliální bariéry pomocí těchto oken. Kromě toho nedostatek funkčnosti lymfatické sítě v nádorových buňkách zabraňuje přebytečnému odstranění tekutin a živin z nádoru. Kombinace těchto dvou efektů vede k nadměrnému propouštění a k zvýšené cirkulaci makromolekul, které se akumuluji v nádorové tkáni díky nefunkčnosti drenáže lymfatického systému. Pro pasivní cílený transport protinádorových léčiv na bázi platinových komplexů jsou využívány nosiče obvykle obsahujících donorové skupiny schopné se navázat na funkční skupiny platiny^{8,12}.

2.2.1. EPR efekt

EPR efekt je jev vyskytující se v nádorových buňkách a je založený na zvýšené schopnosti propouštění makromolekul (např. proteinů z krevní plasmy) a léčiv na bázi makromolekul (např. mikročástice lipidů). To je umožněno díky zvýšené propustnosti krevních cév v nádoru s absencí lymfatické drenáže vracející přebytečné látky ven z nádoru. Takto si nádor kumuluje velké množství látek potřebných ke svému růstu. Většina polymerních látek je akumulována v nádorové tkáni o koncentraci 5–10× větší než je koncentrace v krevní plazmě 24 hodin po intravenózním podání. Jako jeden z hlavních faktorů ovlivňujících EPR efekt je molekulová hmotnost větší než 40 kDa a velikost jeho částic menší než 200 nm (cit.¹¹).

Jedním z parametrů ovlivňující EPR efekt je i lumínální povrch cév. Ten je znám svým záporným nábojem, který je zajišťován mnoha sulfátovými a karboxylovými skupinami. Tato skutečnost zajišťuje polymerním látkám s kladným nábojem nespecifické navázání na lumínální povrch cévních stěn, což způsobuje rychlejší vychytávání z krevního řečiště. Částice s vysokým nábojem jsou vychytávány v játrech. Částice s záporným nábojem jsou vychytávány spouští koagulační kaskádu. Tato krevní koagulace může v nejhorším případě vést i ke klinické smrti. Dalším z parametrů ovlivňujících EPR efekt je hydrofobicita látky, jelikož zvýšení hydrofobicity nanočástice může vést k vyšší afinitě k buněčné membráně, což vede k rychlejší endocytóze. Další výhodou hydrofobních polymerů je tvorba mastného (olejovitého) produktu, který vykazuje daleko vyšší absorpci při orálním podání¹² (až 17× vyšší).

2.2.2. Polymerní platinové konjugáty

Polymerní konjugáty patří bezesporu mezi nejvýznamnější a nejdůležitější skupinu protinádorových nanoléčiv v kategorii pasivního cíleného transportu pro platinové komplexy. Princip jejich funkce je založen na kovalentním navázání léčivé látky na hydrofilní polymer. Výhodou těchto konjugátů je hlavně zvýšená buněčná propustnost způsobená EPR efektem a dynamickou endocytózou vyskytující se v nádoru. Díky tomu je umožněna delší cirkulace v krevním řečišti, zvýšená vazebná kapacita a vyšší rozpustnost ve vodě. Polymerní konjugáty mohou být modifikovány s látkou pro aktivní cílený transport do nádoru. Tyto vlastnosti jsou tak nápomocné k překonání buněčné rezistence a systémové toxicity, která je největší nevýhodou léčby platinovými cytostatiky. Polymerní nosiče používané pro cílený transport musí být biodegradovatelné a netoxické. Biokompatibilita tohoto systému spočívá v navázání vhodné skupiny na léčivo se schopností zvýšit biologickou dostupnost a zacílení systému k místu určení. Navázaná skupina je kovalentně spojena s platinovým komplexem a s přidanou skupinou pro zacílení látky k nádoru má tento systém větší biodostupnost. Cílová skupina může být například protilátka, protein, peptid nebo různé malé molekuly. Polymery obsahující donorové skupiny s dusíkem (aminy) nebo kyslíkem (karboxylové nebo hydroxylové skupiny) mohou být navázány na platinové komplexy. Tyto skupiny mohou být také přítomny v polymerním řetězci jako terminální skupiny⁸.

Mezi nejvíce využívané polymery při přípravě polymerních Pt^{II}-konjugátů patří PHPMA (poly-*N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamid; dříve využívaný jako látka zvyšující osmotický tlak krve). Pro přípravu polymerních konjugátů byly jako první použity cytostatika paklitaxel a doxorubicin. Velikost polymerního konjugátu HPMA byla optimalizována tak, aby konjugát mohl využít EPR efektu nádorových buněk a zároveň podléhal renální eliminaci. První konjugát s platinovým cytostatikem (cisplatinou) je označován kódem AP5280. Biologické testy AP5280 ukázaly, že konjugát vykazuje 20× nižší cytotoxicitu v *in vivo* testech, ale 19× vyšší akumulaci v nádoru myši. Tento konjugát byl úspěšně testován v první a druhé fázi klinic-

kého testování, avšak jeho následná formulace a výzkum byl pozastaven kvůli slibnější třetí generaci těchto konjugátů (AP5326) založených na interakci s DACHPt (cit.¹¹).

Konjugát AP5326 (ProLindac) o molekulové hmotnosti 25 kDa obsahuje ve své struktuře platinový komplex DACHPt („z poloviny fragment“ oxaliplatinu), který je navázan na hydrofilní biokompatibilní polymer aminomalonátovou skupinou citlivou na změnu pH. Tato skupina je s navázaným platinovým cytostatikem stabilní ve fyziologickém prostředí, ale zároveň nestabilní v prostředí s nižším pH vyskytujícím se v okolí nádoru. ProLindac v klinických testech vykázal podobnou efektivitu jako oxaliplatin na panelu různých buněčných liniích (linie rakoviny prsu, vaječnicků, prostaty a rakoviny plic). V preklinickém testování ProLindac ukázal vysokou inhibici nádorového bujení, snížení toxicity DACHPt na zdravých buňkách a zvýšení koncentrace platinového komplexu v krevní plasmě, které tak umožnilo 14× zvýšit platinovou distribuci k nádoru. Na třech buněčných nádorových liniích (Colo-26, HT-29 a HCT116) vykázal vyšší protinádorovou aktivitu. V současné době je ProLindac v druhé fázi klinického testování společně s několika dalšími cytostatiky (paklitaxel a gemcitabin) na pacientech s nádorem tlustého střeva a vaječniku^{8,10,12}.

2.2.3. Lipozomy

Lipozomy patří mezi lipidické dvouvrstevné útvary obvykle připravované s hydrofilním jádrem. Tyto látky jsou připravované z různých amfifilních fosfolipidů. Od jejich objevení roku 1965 biofyzikem dr. Banghamem a jeho kolegy lipozomy vstoupily do farmaceutického využití jako nosiče v mnoha praktických aplikacích. Mnoho lipozomálních lékových formulací bylo připraveno, vyzkoušeno a velké množství z nich je právě nyní v klinickém testování. Lipozomy jsou sférické částice s hydrofilním jádrem a s jednou či více dvouvrstevnými lamelami (vrstvami), složenými z fosfolipidů o průměru od 30 nm po řádově několik mikrometrů. Lipozomy mohou být rozděleny na několik podtypů podle velikosti a struktury vrstev. Multilamelární lipozomy obvykle mají průměr od 500 nm do 10 μm, zatímco malé unilamelární lipozomy většinou mají méně než 50 nm a velké unilamelární lipozomy jsou větší než 50 nm. Lipozomy jsou utvářeny tehdy, když je tenký lipidický film hydratován vodným pufrčním roztokem s následnou sonifikací nebo opakovaným extrudováním skrz 100 nm polykarbonovou membránu pro zredukování jejich velikosti a snížení distribuce velikosti lipozomů. Fyzikální a chemické vlastnosti lipozomů (např. povrchový náboj, velikost a stabilita) jsou závislé na složení lipozomu. Pro kontrolu náboje na povrchu lipozomů lze použít různé nabitě lipidy. Výhodou lipozomů je biokompatibilita a možnost zakotvit do své struktury jak hydrofilní, tak lipofilní látky ve svém vodném vnitřním prostředí nebo v membráně. Zakotvením hydrofobních léčiv uvnitř lipozomu významně zvýší jejich rozpustnost ve vodných roztocích. Velikost, povrchový náboj a vlastnosti povrchu vysoce ovlivňují farmakokinetický profil zakotveného léčiva. Tyto vlastnosti lze dobře měnit v závislosti na po-

žadovaných vlastnostech přidáním pomocných látek do lipidické směsi před přípravou lipozomu nebo vhodným upravením reakčních podmínek. Díky tomu je možné zvýšit systémovou cirkulaci cytostatik a zvýšit tak jejich biodostupnost vedoucí k vyšší akumulaci protinádorového léčiva v nádoru a snížit nežádoucí účinky cytostatik^{13,14}.

Jedno z prvních připravených a již schválených cytostatik zabalených v lipozomu je doxorubicin v polyethylenglykolové lipozomální struktuře pod názvem DoxilTM. DoxilTM vykazuje daleko delší cirkulaci v krevním řečišti, vyšší AUC (=Area Under the Curve) (až 300×) a mnohonásobně vyšší akumulaci doxorubicinu v nádoru než při podání samotné látky^{15,16}.

LipoplatinTM je první lipozomální formulace obsahující platinové cytostatikum – cisplatinu. Tento lipozom je složen z dipalmitoylfosfatidylglycerolu (DPPG), sójového fosfatidylcholinu a methoxypolyethylenglykoldistearoyl-fosfatidylethanolaminu (cisplatin 8,9 %, lipidy 91,1 %, w/w) o průměru 110 nm. V preklinickém testování na myších se LipoplatinTM projevil daleko nižšími nežádoucími účinky (zejména malou nefrotoxicitou) než u samotné cisplatinu. LipoplatinTM se akumuluje pomocí EPR efektu a zvýšené fagocytózy nádorových buněk v primárních nádorech a metastázách, a tím zvyšuje až 200× účinnost cytostatika. V klinickém testování LipoplatinTM (samotný nebo v kombinaci s 5-fluorouracilem nebo gemcitabinem) vykazoval snížení systémové toxicity a zvýšení účinnosti oproti samotné cisplatině. V současné době LipoplatinTM prošel třetí fází klinického testování proti nemalobuněčné rakovině plic^{16,17}.

Dalším výsledkem lipozomální formulace je lipozom AroplatinTM, což je lipozom obsahující strukturní analog oxaliplatinu – *cis*-bis(neodekanoato)-(trans-*R,R*-1,2-amino-cyklohexan)platičtý komplex (NDDP). Tento lipozom je formulován z dimyristoylfosfatidylcholinu a dimyristoyl-fosfatidylglycerolu (DMPG). Je též zajímavý tím, že samotný nosič hraje velkou roli ve výsledné cytotoxicitě, přestože komplex NDDP má velmi nízkou cytotoxicitu, ale ve spojení s lipidy se jeho účinnost značně zvyšuje. Preklinická data ukázala rozdílnou biodistribuci a toxicitní profil lipozomu na rozdíl od cisplatinu nebo karboplatinu. Lipozomy také nevyvolávají buněčnou rezistenci. Cytostatická aktivita byla prokázána proti nádorovým buňkám leukémie (L1210), která je rezistentní vůči cisplatině, melanomu (B16) a retikulosarkomu u myší (M5076). V současné době je testování lipozomu AroplatinTM pozastaveno v druhé fázi klinického testování na neoplazmatický nádor tlustého střeva^{17,18}.

2.2.4. Polymerní micely

Polymerní micely jsou agregující bloky kopolymeru s jádrovitou strukturou, do které mohou být ukotveny léčivé látky. Snadnost přípravy micel a navázání účinné látky do struktury spolu s možností měnit chemické složení, délku bloku kopolymerů, řídit velikost a morfologii micel umožňuje jejich široké farmaceutické využití. Polymerní micely předpokládají ve svém účinku akumulaci platinového

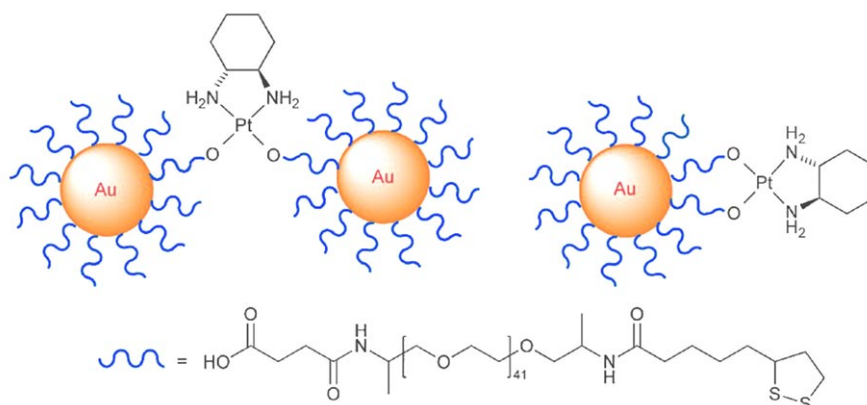
léčiva v nádorové tkáni pomocí EPR efektu. Pro preventivní zabránění procházení micel skrz zdravé cévy jsou micely připravovány o velikosti od 20 do 100 nm, což napomáhá redukcii nežádoucích účinků platinových cytostatik. Polymerní micely tak mohou chránit platinové komplexy proti degradaci a dosáhnout řízeného doručení látky do místa působení. Polymerní micely v kompozici s různými léčivými byly zkoumány pro parenterální, orální, nasální i oční aplikace. Mnohé z těchto studií prokázaly jasné výhody, včetně zvýšení biologické dostupnosti nebo snížení nežádoucích účinků. Nejběžněji používanými kopolymery pro platinová léčiva jsou na bázi polyaminokyselin (např. poly(asparagová kyselina) nebo poly(glutamová kyselina)). Kataoka a jeho kolegové jako první popsali komplexaci cisplatinu s PEG-PAsp kopolymerem, která vedla ke spontánní formulaci stabilní polymerní micely s vysokou vazebnou kapacitou pro léčivou látku^{8,10}.

Příkladem polymerních micel jako transportního systému pro platinová cytostatika (cisplatinu) je pod označením NC-6004 blokovaný kopolymer PEG a poly(glutamové kyseliny). Hydrofilní PEG řetězec se nachází na vnější části micely a PGLu-Pt komplexový řetězec vyplňuje vnitřní jádro micely. Molekulová hmotnost PEG-b-PGLu ve formě sodné soli je 18 kDa s obsahem platinového komplexu 19,6–47,6 % v závislosti na době přípravy. Klinické testy NC-6004 prokázaly lepší toleranci (tj. méně nežádoucích účinků), než kterou vykazoval samotný komplex cisplatinu (jedná se zejména o nefrotoxicitu). V současné době je tento systém ve třetí fázi klinického testování^{8,10}.

2.2.5. Nanočástice

Zlaté nanočástice

Nanočástice zlata byly dlouho dobu široce využívány pro katalýzu, bioanalýzu a v zobrazovacích technikách. Výhodou zlatých nanočástic je jejich inertnost, zanedbatelná toxicita, biokompatibilita a snadnost přípravy. Zlaté nanočástice mohou být také snadno modifikovány skupinami pro cílený transport i pro zlepšení biodostupnosti, a tudíž mají velký potenciál v cíleném transportu jak neplatinových léčiv, tak i Pt^{IV} komplexů. Vstup zlatých nanočástic do buněk je zprostředkován endocytózou. V současnosti bylo připraveno několik typů zlatých nanočástic s platinovými komplexy (cisplatinu i oxaliplatinu), kde platinový komplex byl zakotven na povrchu zlatých nanočástic, které se vyskytovaly ve formě Au-Au₂S. Příprava různých velikostí nanočástic zlata, které jsou v rozmezí 13–60 nm, je proveditelná redukcí solí zlata ve vodě. Díky tomu je možné dosáhnout velkého povrchu pro navázání platinových cytostatik. Vytvořené konjugáty zlatých nanočástic v *in vitro* testech vykazovaly vyšší cytotoxickou aktivitu vůči nádorovým liniím rakoviny plic (EGFR(+)) A549) a vaječnicků (OVCAR5) oproti samotnému cytostatiku. I modifikované nanočástice zlata (modifikace provedena s využitím sulfidického PEG) (viz obr. 3) s imobilizovanou oxaliplatinou více inhibovaly linii rakoviny plic (A549) a několik typů buněčných linií rakoviny tlustého střeva^{10,19}.

Obr. 3. Modifikované zlaté nanočástice pro cílený transport oxaliplatin¹⁰

Železité magnetické nanočástice

Magnetické nanočástice jsou nadějným nosičem pro cílený transport léčiv do místa působení, protože mají schopnost cíleně vést léčivou látku k biologickému cíli za použití magnetického pole. Tato vlastnost magnetických nanočástic je již využívána při diagnostickém vyšetření magnetickou rezonancí, kde se magnetické nanočástice využívají jako kontrastní látka. Navíc lze modifikovat povrch nanočástic různými činidly pro cílený transport k nádoru, jako jsou monoklonální protilátky, peptidy nebo malé molekuly schopné ulehčit vstup magnetických nanočástic do nádoru. Povrchová modifikace tzv. superparamagnetického oxidu železitého (SPION) je jednou z variant pro nosič léčiv, kdy se dosahuje biokompatibility, biodegradability a schopnosti tvořit disperzní roztoky se zachováním magnetických vlastností, čímž lze dosáhnout přesnějšího transportu do cílového nádoru. V současnosti jsou léčiva na bázi SPION-konjugátů navrhována tak, že léčivá látka je zakotvena mezi dvouvrstvu v hydrofobním prostředí nebo uvnitř jádra v SiO₂ matrici. Také tyto konjugáty tvoří stabilní disperzní konjugáty a jejich relativní velikost je poměrně velká (cca 200 nm) oproti ostatním anorganickým nanočásticím. Látky s takovými rozměry mohou být vyloučeny z těla retikuloendoteliálním systémem nebo mohou být vpraveny do intersticiálního prostoru nádoru, což vede ke krátké době cirkulace nebo snížení akumulace v nádoru. Magnetická síla vyvinutá na nanočástice o rozměrech 50 nm a menších není dostatečná pro překonání Brownova pohybu, což má za následek špatnou akumulaci SPION nanočástic v nádoru^{10,20}.

Au-Fe₃O₄ nanočástice o průměru 32 nm byly použity jako multifunkční platforma pro specifický cílený transport cisplatin. Jako směrovací a zobrazovací skupina byla použita monoklonální protilátka Herceptin imobilizovaná pomocí PEG linkeru. Výhodou tohoto systému je to, že snížení pH vede k vyšší cytotoxicitě platinového komplexu na linii rakoviny prsu (Her2(+)-Sk-Br3), než samostatně podávaná cisplatin²⁰.

Titaničité nanočástice

Jednou z možných potencionálních cest je příprava nanočástic na bázi titanu. Pórovitý oxid titaničitý (TiO₂) nabízí mnoho možností využití díky vysoké fotokatalytické aktivitě či specifickému povrchu schopnému různých modifikací. Oxid titaničitý je typický semikonduktivní materiál, který má široké spektrum uplatnění jako je fotokatalýza, sensorika, úložiště energie či v medicíně (např. protinádorové léčivo a implantáty). TiO₂ nanočástice vykazují chemickou stabilitu, zanedbatelnou toxicitu a výbornou biokompatibilitu. V současné době byly připraveny hybridní nanočástice modifikované polyethyleniminem (PEI) se zakotveným léčivem na povrchu, kde je zabráněno uvolnění léčiva vytvořením hydrofilní vrstvy z PEI. Za následného použití UV záření dochází k destrukci hydrofilní PEI vrstvy pomocí OH• radikálů, a tím je umožněno uvolnění léčiva. Tato cesta se jeví jako potencionální pro cílený transport Pt^{II} cytostatik, ačkoliv do současné doby nebyl zaznamenán žádný pokus o aplikaci na Pt^{II} cytostatika^{10,21}.

Křemičité nanočástice

Aplikace porézních nanomateriálů-nosičů pro cílený transport je v současné době na poli předního zájmu. Jedním z dalších možných způsobů je využití mezoporézních nanočástic křemíku, které vykazují výborné chemicko-fyzikální vlastnosti, které jsou dány vhodným poměrem objemu k povrchu, kde povrch těchto nanočástic dosahuje až 700–1000 m² kg⁻¹, při velkém počtu pórů až 0,9 cm³ g⁻¹. Mezi další výhody křemičitých nanočástic patří vysoká tepelná, chemická a mechanická stabilita, homogenní stabilita, zanedbatelná toxicita, biodegradovatelnost a biokompatibilita, která byla prokázána *in vitro* i *in vivo* testy. U SiO₂ nanočástic lze stejně jako u titanových, zlatých a magnetických nanočástic ovlivňovat velikost od řádově desítek nanometrů až po sto nanometrů a různě modifikovat jejich povrch pro cílené využití ve farmacii. K imobilizaci léčiva může dojít buď uvnitř struktury nanočástic pomocí ne vazebných sil nebo na povrch modifikovaných SiO₂ nanočástic kovalentní vazbou pomocí polymerního

řetězce. K uvolnění léčiv obvykle dochází při degradaci nanočástic erozí, desorpčí, difúzí nebo v prostředí o nižším pH. Pro léčbu rakovinných onemocnění je důležité, aby léčivo bylo uvolněno v intersticiální tekutině, na povrchu nádorové tkáně nebo přímo v intracelulárním prostoru^{22–26}.

3. Závěr

Léčba nádorových onemocnění je v současné době jednou z prvořadých priorit vědců i lékařů po celém světě. Ačkoliv existuje celá řada léčebných metod (chemoterapie, radioterapie, chirurgie, imunoterapie ad.), stále je potřeba hledat nové látky a vyvíjet nové metody jak včasné diagnostiky, která v současné době hraje primární roli v boji s rakovinou, tak i nové způsoby léčby. Jednou z často používaných a dosud nejúčinnějších metod léčby rakoviny je chemoterapie pomocí platinových cytostatik, které v klinické praxi představují více jak 60% zastoupení.

První platinové cytostatikum cisplatina bylo zavedeno v roce 1978. Od zavedení první generace platinových cytostatik uplynulo téměř 40 let, a přestože vykazují závažné nežádoucí účinky, jsou stále používány pro léčbu celé řady zejména solidních nádorů (rakovina prostaty, vaječnicků, tlustého střeva aj.). Snahu najít nové platinové cytostatikum se stejnými nebo lepšími protinádorovými účinky a s nižšími nežádoucími účinky než stávající platinová cytostatika reprezentují nové platičité komplexy satraplatina a LA-12. Tyto látky vykazovaly ve vývoji a v preklinických testech lepší cytostatické vlastnosti, nulovou rezistenci a menší nežádoucí účinky než stávající platinová cytostatika, ale v klinickém testování nesplnily uvedené látky očekávání a nebyly dosud schváleny.

Dalším způsobem, jak zmírnit nežádoucí účinky, je použití lékových forem s cíleným transportem léčiva, které mají zajistit prolongaci léčiva v krevním oběhu a minimalizovat nežádoucí účinky zacílením léčiva k nádorovým buňkám. Další výhodou cíleného transportu je snížení koncentrace platinových léčiv v těle, jelikož působení platinových cytostatik je zpravidla nespecifické a postihuje i zdravé buňky. V současné době bylo pro cílený transport testováno mnoho systémů – např. micely, nanotrubice, biodegradovatelné proteiny, dendrimery, nanočástice, lipozomy. V preklinických i klinických testech se ukázalo, že enkapsulace platinového cytostatika razantně snížila nežádoucí účinky a dokonce i v některých případech (lipozom – DoxilTM) způsobila několikanásobně vyšší cytostatickou aktivitu. Nejčastěji používanými platinovými komplexy pro cílený transport jsou oxaliplatin, cisplatina a DACHPt, což je fragment oxaliplatinu. Ze všech doposud testovaných systémů se jeví nadějně lipozomální formulace, neboť tři léčiva (SPI-77, Aroplatin a MBP426) jsou ve druhé fázi klinického testování a léčivo Lipoplatin dokonce již ve třetí fázi na rakovinu prsu a gastrointestinálního traktu. Jako dalšími slibnými systémy se jeví micelární systém, kde dvě léčiva jsou v klinickém testování. Platinové konjugáty jsou reprezentovány léčivem ProLindac, který je ve druhé fázi klinického testování proti rakovi-

ně vaječnicků⁸.

Tato práce se uskutečnila v rámci Národního programu udržitelnosti (NPU I LO1215) MŠMT – 34870/2013.

Seznam zkratk

APN	aminopeptid N
ARG	arginin
ASN	asparagin
AUC	Area Under Curve – plocha pod křivkou
CDX	cyklodextrin
DACH	diaminocyklohexan
DACHPt	diaminocyklohexanplatina (II)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EPR	Enhanced Permeability and Retention effect – zvýšená propustnost a zádrž
ER	estrogenový receptor
GLY	glycin
HPMA	<i>N</i> -(2-hydroxypropyl)methakrylamid
PEG	polyethylenglykol
PEI	polyethylenimin
PHPMA	poly- <i>N</i> -(2-hydroxypropyl)methakrylamid

LITERATURA

1. <http://www.who.int>, staženo 18. 7. 2016.
2. <http://www.cancerresearchuk.org>, staženo 18. 7. 2016.
3. Prokeš K., Lokajiček M., Kundrát P., Sedlák J., Honová H., Judas L., Konopásek B., Mareš P., Petruželka L., Spurný F., Štursa J., Řepa P., Vaňásek J., Čechák T.: *Onkologické centrum s hadronovou terapií*, Fyzikální ústav AV ČR, Praha 2002.
4. Hampl F., Rádl S., Paleček J.: *Farmakochemie*. VŠCHT Praha, Praha 2007.
5. Enzo A.: *Biorganic Medicinal Chemistry*. Wiley, Německo 2011.
6. Gibson D., Wexselblatt E.: *J. Inorg. Biochem.* 117, 220 (2012).
7. Foltinová V., Švihálková-Šindlerová L., Horváth V., Sova P., Hofmanová J., Janisch R., Kozubík A.: *Scripta Medica* 81, 105 (2008).
8. Oberoi H., Nukolova N., Kabanov A.: *Adv. Drug Delivery Rev.* 63, 1667 (2013).
9. Butler J., Sadler P.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 17, 175 (2013).
10. Wang X., Guo Z.: *Chem. Soc. Rev.* 42, 202 (2013).
11. Ganta S., Singh A., Patel N., Cacaccio J., Rawai Y., Davis B., Amiji M., Coleman T.: *Pharm. Res.* 31, 2490 (2014).
12. Maeda H., Nakamura H., Fang J.: *Adv. Drug Delivery Rev.* 65, 71 (2013).
13. Maeda H.: *Adv. Enzyme Regul.* 41, 189 (2001).
14. Liu D., He C., Wang A., Lin W.: *Int. J. Nanomed.* 8, 3309 (2013).
15. Bangham A. D., Standish M. M., Watkins J. C.: *J. Mol. Biol.* 13, 238 (1965).

16. Gregoriadis G., Swain C. P., Wills E. J., Tavill A. S.: *Lancet* 303, 1313 (1974).
17. Akbarzadeh A., Rezaei-Sadabady R., Davaran S.: *Nanoscale Res. Lett.* 8, 102 (2013).
18. Krasnici S., Werner A., Eichhorn M. E.: *Int. J. Cancer* 105, 561 (2003).
19. Brown S., Nativo P., Smith J., Stirling D., Edwards P., Venugopat B., Flint D., Plumb J., Graham D., Wheate N.: *J. Am. Chem. Soc.* 132, 4678 (2010).
20. Wang J., Wang X., Song Y., Wang J., Zhang C., Chang C., Yan J., Qiu L., Wu M., Guo Z.: *Chem. Sci.* 4, 2605 (2013).
21. Wang T., Jiang H., Wan L., Zhao Q., Jinag T., Wang B., Wang S.: *Acta Biomater.* 13, 234 (2015).
22. Shahbazi M., Herranz B., Santos H.: *Biomater.* 2, 1 (2012).
23. Li Z., Barnes J., Bosoy A.: *Chem. Soc. Rev.* 41, 2590 (2012).
24. He H., Xiao H., Kuang H., Xie Z., Chen X., Jing X., Huang Y.: *Colloids Surf.* 117, 75 (2014).
25. Kučírková L., Královec K., Havelek R., Brůčková L., Sedlák M.: *Chem. Listy.* 109, 693 (2015).
26. Dohnalová L., Dohnal V.: *Chem. Listy* 109, 444 (2016).

J. Svoboda, K. Syslová, and P. Kačer (*University of Chemistry and Technology, Prague*): **Target Delivery of Platinum Cytostatics**

Since their introduction in 1970's platinum complexes represent one of the most significant groups of chemotherapeutics. These drugs represented by Cisplatin and Oxaliplatin complexes exhibit high efficiency against many solid tumors. Serious side effects such as neurotoxicity, nephrotoxicity and gradual initiation cell resistance limit the use of platinum drugs in cancer treatment. Current research aims to mitigate these side effects through the introduction 4th generation platinum cytostatics and through the preparation of advanced dosage forms allowing for target delivery of current cytostatics. In this review, currently developed and clinically tested transport systems, prepared for the target delivery of platinum cytostatics either via active or passive transport, are summarized.