

14.1.2011

ZRCADLO ČESKÉ VĚDY V BRITSKÝCH LISTECH

## Od ubikvitinu k antabusu

**Boris Cvek**

V rámci projektu *Inovace studia molekulární a buněčné biologie* (tento projekt je součástí Operačního programu *Vzdělávání pro konkurenceschopnost* a je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem ČR, registrační číslo CZ.1.07/2.200/07.0354) na Přírodovědecké fakultě v Olomouci připravuje tým pod vedením prof. Zdeňkem Dvořákem neprodejný učební text *Vybrané kapitoly z buněčné biologie*. Při psaní mé části, věnované objevu tzv. ubikvitin-proteazomového systému (Nobelova cena 2004) a vývoji protinádorových léků, založených na blokaci tohoto systému (lék proti mnohočetnému myelomu VELCADE), jsem si uvědomil, že nikde v češtině tyto informace nejsou dosud dostupné. A přitom reflektují úžasný pokrok, uskutečněný na pomezí buněčné biologie, medicíny a farmaceutického byznysu.



Původní anglicky psaná literatura, ze které jsem vycházel, je citovaná na konci příspěvku...

Tento zdroj informací může být důležitý pro všechny studenty i vyučující v biomedicínských oborech, farmaceuty a farmakology, lékaře, onkologické pacienty nebo prostě pro všechny zájemce o nové, vzrušující a přelomové objevy. Po poradě s prof. Dvořákem jsem tedy tuto část našeho společného neprodejného skriptu nabídl Janu Čulíkovi k vydání v *Britských listech*, kde bude k dispozici zdarma pro všechny zájemce. Pevně věříme, že tímto způsobem skutečně prospějeme naší společnosti ve vzdělávání pro konkurenceschopnost.

Stránky projektu *Inovace studia molekulární a buněčné biologie*, jehož je prof. Dvořák hlavním řešitelem **ZDE**

### 1. Degradace proteinů v buňce

Tradičním tématem molekulární a buněčné biologie, jemuž rozumíme se stále více ohromující detailností, je proteosyntéza a její regulace. Od dob formulace „centrálního dogmatu molekulární biologie“ F. Crickem v roce 1958 jsou biologové a biochemici dodnes zaujatí studiem replikace DNA, transkripce a translace, což je patrné snad ze všech učebnic, jež se nějak věnují fungování buňky. Tématem naopak dlouho ignorovaným a teprve v současnosti hlouběji docenovaným je to, jak jsou v buňce degradovány již syntetizované proteiny, které jsou z nějakého důvodu buď defektní nebo nepotřebné. Do biologických učebnic téma degradace proteinů v buňce proniká jenom velmi zvolna a v češtině snad ani žádná učebnice s podrobným pojednáním této látky neexistuje (i proto citujeme v následujícím textu poměrně extenzivně původní časopiseckou literaturu, z níž jsme vycházeli). Nabízíme tedy v tomto učebním textu shrnutí celé problematiky pro studenty biologických, chemických a lékařských oborů s uvedením pozoruhodné aplikace inhibitorů degradace proteinů v onkologii (lék VELCADE a nová generace inhibitorů proteazomu).

### Jak mohou být proteiny v buňce degradovány?

V eukaryotních buňkách existují dva hlavní způsoby, jimiž dochází k rozkladu proteinů na peptidové zbytky. Prvním z nich je autofagie (z řečtiny „sebepojídání“), při níž se odstraňují proteiny s dlouhou životností nebo větší struktury, jako jsou organely, jejich transportem do lyzozomu, kde jsou rozštěpeny <sup>[1]</sup>.

Proteiny, které mají kratší dobu životnosti, a to je drtivá většina (cca 90%) všech degradovaných proteinů, nejsou rozkládány v nějaké membránové organelle, jakou je lyzozom, nýbrž volně v cytozolu nebo v jádře pomocí multiproteinového komplexu, zvaného proteazom. Prostřednictvím proteazomů jsou také degradovány defektní proteiny, které se buňce nepodařilo syntetizovat správně (asi 30% všech nativních proteinů v buňce) a jejichž likvidace probíhá ihned během translace nebo krátce po ní <sup>[2]</sup>. Jsou-li nově syntetizované defektní proteiny umístěny v endoplazmatickém retikulu (ER), a zde jde především o proteiny špatně poskládané do terciárních

struktur, podléhají procesu, v němž proteazomy spolupracují s ER a který se nazývá ERAD (endoplasmic reticulum-associated degradation). Během ERADu je nesprávně poskládaný protein nejprve označen specifickým kódem (jedná se o glykany), pak je transportován přes membránu ER do cytozolu a degradován přílehlými proteazomy<sup>[9]</sup>. V případě nenativních proteinů, které jsou špatně poskládané a agregovány, dochází k jejich vychytávání v cytozolu pomocí dvou kompartmentů zvaných JUNQ (juxta-nuclear quality control) a IPOD (insoluble protein deposit). I tyto proteiny jsou nakonec degradovány v proteazomech<sup>[4]</sup>. Proteazomy ovšem zdaleka nedegradují pouze defektní proteiny, nýbrž se také významnou měrou podílejí na zpracování funkčních proteinů ve smyslu ovlivňování jejich funkce. Degradace nějakého proteinu může být důležitou součástí různých signalizačních dějů v buňce, jak uvidíme níže.

Proteazomy jsou obsaženy v cytoplazmě i v jádře, kde se volně a rychle pohybují. Přenos proteazomů z cytoplazmy, kde je jich více, do jádra (opačným směrem to nejde) je naopak pomalý. Během mitózy se obě oddělené populace proteazomů, jaderná a cytoplazmatická, mohou spojit a promísit<sup>[5]</sup>. Celkové množství proteazomů v buňce je ve stovkách až tisících nanogramů na miligram všech buněčných proteinů s tím, že v rakovinových buňkách může být výrazně větší než ve zdravých buňkách<sup>[6]</sup>. Bližší podrobnosti o lokalizaci proteazomů v cytoplazmě a jádru lze najít v literatuře<sup>[7]</sup>.

## 1.2 Objev ubikvitin-proteazomového systému (UPS), ubikvitinace proteinů

Degradace proteinů pomocí proteazomů je velice sofistikovaný proces, který se děje v rámci tzv. ubikvitin-proteazomového systému (UPS) neboli tzv. ubikvitin-proteazomové cesty (cesta = pathway, tedy zkratka UPP). Významnou roli v tomto procesu hraje malý (76 aminokyselin, 8,5 kDa) protein ubikvitin, který byl objeven už v roce 1975, aniž by byla známa jeho funkce. Již z názvu však plyne, že tento protein se hojně vyskytuje ve všech eukaryotních buňkách (je „ubikvitní“ čili „všude se vyskytující“). Dnes už víme, že ubikvitin slouží ke značení proteinů v ději, jemuž říkáme ubikvitinace nebo ubikvitinylace proteinu. Význam, rozmanitost a komplexní kontext označování proteinů ubikvitinem dnes dosahuje úrovně dosud nejméně významnější posttranslační modifikace proteinů, kterou je fosforylace<sup>[8]</sup>. Přesto je ubikvitin stále spojený především s objevem mechanismu degradace proteinů, který učinili na začátku 80. let minulého století Avram Hershko, Aaron Ciechanover a Irwin Rose. Všichni tři tito vědci obdrželi za svůj objev v roce 2004 Nobelovu cenu v oboru chemie. Z nobelovské přednášky profesora Hershka budeme v dalším textu vycházet při líčení historie objevu UPS<sup>[9]</sup>.

Hershko byl v letech 1969-1971 na postdoktorálním pobytu v laboratoři prof. G. Tomkinse v Kalifornii, kde si všiml při experimentální práci, že degradace proteinu, který byl předmětem jeho studia, vyžaduje energii (spotřeba ATP). Tento tajemný proces, vyžadující energii, byl vysoce specifický (došlo k degradaci jen toho určitého proteinu) a zaujal Hershka natolik, že se mu rozhodl věnovat svou pozornost i po návratu do Izraele. V té době už byl znám ATP-dependentní proteolytický systém z lyzátů retikulocytů, popsáný harvardskými vědci J. D. Etlingerem a A. L. Goldbergem<sup>[10]</sup>. Hershko, jeho student Ciechanover a jejich přítel Rose z Fox Chase Cancer Center (Pensylvánie) se pustili do biochemické frakcionace tohoto systému, aby mohli popsat jeho složky. Zjistili, že ATP-dependentní degradace proteinů vyžaduje právě řetězce ubikvitinů. Tyto ubikvitiny jsou jeden po druhém připojeny k proteinu, který má být degradován (takové proteiny nazýváme zkratkou PDG), jako „polibek smrti“, čili oznamují proteazomům, že tento protein má být zničen. Jak jsou ovšem ubikvitinové řetězce k proteinům připojovány? Mezi lety 1980 až 1990 našla Hershkova skupina odpověď i na tuto otázku (do historie tohoto objevu se vrací i C. M. Pickart v<sup>[11]</sup> z pohledu výzkumné skupiny A. Varshavského, jemuž podle mínění mnoha vědců<sup>[12]</sup> neprávem unikla Nobelova cena, udělená Hershkově skupině).

Ubikvitin je v buňce nejprve vázán (aktivován) za spotřeby ATP tzv. ubikvitin-aktivujícím enzymem E1, potom je přenesen na ubikvitin-přenášející (nebo ubikvitin-konjugující) enzym E2. Další přesun ubikvitinu na PDG (nebo na vytvářející se řetězec ubikvitinů na PDG) je podmíněn ubikvitin-ligázou E3, která dokáže specificky rozpoznat proteiny, jež mají být degradovány. Jinými slovy, enzymy E1 a E2 slouží převážně pouze k transportu ubikvitinů, naopak enzymy E3 obsluhují jejich konečné navázání na PDG, rozpoznávají právě těmito enzymy. Nejprve je tedy na PDG navázán první ubikvitin, na něj pak druhý, na druhý třetí atd. Z toho, že E3 enzymy specificky rozpoznávají různé PDG, plyne také to, že v buňkách je málo různých E1 (podle<sup>[13]</sup> existují v lidských buňkách přinejmenším dva E1 enzymy, totiž Uba6 a Ube1) a E2 enzymů, zatímco E3 enzymů existuje rozmanité množství

(stovky) pro různé skupiny proteinů, určených k degradaci. Rozeznáváme základní dva rody ubikvitin-ligáz, které se liší přítomností aktivní domény: buď obsahují doménu HECT (homologous to E6-Associated Protein C-Terminus), nebo doménu RING (really interesting new gene) <sup>[14-15]</sup>. Navíc kromě klasické kaskády E1-E2-E3 dnes už známe také tzv. E4 enzymy, které se mohou podílet na prodlužování polyubikvitinového řetězce <sup>[16]</sup>.

Klíčovou otázkou je také to, jakým způsobem jsou ubikvitiny v řetězci navzájem spojeny. Nikoli každý polyubikvitinový řetězec je totiž prima facie polibkem smrti. Nejběžnější způsob vazby dvou ubikvitinů v polyubikvitinovém řetězci je přes lysin 48 (tzv. K48 řetězce) nebo lysin 63 (tzv. K63 řetězce), existují však i řetězce ubikvitinů vázané přes lysin 6, 11, 27, 29 či 33, výjimečně bývají tyto řetězce i rozvětvené <sup>[17]</sup>. Dnes neumíme přesně říci, jaký je význam celé pestrosti těchto signálů. Za „polibek smrti“ jsou považovány zejména K48 řetězce, zatímco K63 řetězce hrají především jiné role v buněčné signalizaci. Nedávno se však ukázalo, že také proteiny označené K63 řetězci mohou být rozpoznány proteazomy a degradovány v nich <sup>[18]</sup>. Existuje dokonce možnost, že K63 řetězce mohou být přeměněny přímo na označeném proteinu na K48 řetězce <sup>[19]</sup>.

V eukaryotní buňce dochází kromě ubikvitinace proteinů také k jejich deubikvitinaci. Enzymy zodpovědné za tento proces se nazývají deubikvitinázy a označují se zkratkou DUB. Můžeme je rozdělit do následujících pěti skupin: 1. ubikvitin C-terminální hydrolázy, 2. ubikvitin specifické proteázy, 3. proteázy s doménou Machadovy-Josephovy nemoci, 4. proteázy z vaječnickových tumorů a 5. proteázy s JAMM doménou <sup>[20]</sup>. Dnes je známo 75 DUBů, které interagují se stovkami proteinů a hrají v eukaryotní buňce nesmírné množství různých rolí <sup>[21]</sup>. Pro náš další výklad je dobré poznamenat, že jedna z JAMM doménových deubikvitináz, označovaná v lidských buňkách jako Poh1, je součástí eukaryotního proteazomu a hraje klíčovou roli při jeho správném fungování.

### 1.3 Struktura a funkce proteazomu v eukaryotní buňce

Jakmile protein na sobě nese K48 polyubikvitinový řetězec, může být rozpoznán tzv. 26S proteazomem a degradován v něm. 26S proteazom je běžný typ proteazomu, obsažený v našich buňkách. Skládá se ze dvou základních částí <sup>[22]</sup>: a) z 20S proteazomu čili hlavní partikule (core particle), která má tvar válce a v níž probíhá samotná proteolýza PDG, b) z 19S proteazomu čili regulační partikule (regulatory particle), která se také nazývá PA700. 20S proteazom se skládá celkem ze čtyř prstenců: dva vnější jsou tvořeny sedmi  $\alpha$  podjednotkami a dva vnitřní sedmi  $\beta$  podjednotkami. Aktivní místa štěpící proteiny jsou v  $\beta$  prstencích a jsou obráceny dovnitř válce 20S proteazomu, konkrétně se jedná o  $\beta$ 1 podjednotku s aktivitou podobnou kaspázám,  $\beta$ 2 podjednotku s aktivitou podobnou trypsinu a  $\beta$ 5 podjednotku s aktivitou podobnou chymotrypsinu. Kromě běžného 20S proteazomu existují v našich buňkách také inducibilní proteazomy s jinými aktivními místy ( $\beta$ 1i,  $\beta$ 2i a  $\beta$ 5i), jež se nazývají imunoproteazomy nebo směsné proteazomy a hrají roli v imunitní odpovědi buněk na cizorodé látky <sup>[23]</sup>. Zcela speciální typ proteazomů existuje v brzlíku, jde o tzv. thymoproteazomy, jež obsahují  $\beta$ 5t podjednotku s neobvyklou katalytickou aktivitou. Jejich role souvisí s pozitivní selekcí CD8+ T buněk <sup>[24]</sup>.

Regulační částice se vážou na vnější, tedy  $\alpha$  prstence 20S proteazomu. Kromě 19S proteazomu to mohou být i jiné komplexy, jako jsou PA28 či PA200, nebo dokonce proteiny, které se reverzibilně připojují k 20S proteazomu v substechiometrických množstvích <sup>[25]</sup>. I když uspořádání proteazomů se různě dynamicky mění, bylo prokázáno, že 26S proteazom zůstává během degradace proteinů intaktní <sup>[26]</sup>. Regulační částice 26S proteazomu (PA700) obsahuje dvě základní, navzájem spojené, oblasti: bázi a víko. V bázi můžeme najít šest rozdílných AAA+ ATPáz a další čtyři podjednotky. Jejím hlavním posláním je regulovat vstup do nitra 20S proteazomu <sup>[27]</sup>. Víko obsahuje devět ne-ATPázových podjednotek <sup>[28]</sup> a jeho základní funkcí je deubikvitinace ubikvitinovaných proteinů pomocí JAMM doménové DUB Poh1 před jejich vstupem do nitra 26S proteazomů <sup>[29]</sup>.

Ačkoli typický protein, degradovaný v eukaryotní buňce proteazomy, musí být ubikvitinován, podle nedávného zjištění asi 20% všech proteinů, štěpených proteazomy v eukaryotních buňkách, nemusí mít ubikvitinové značení – takové proteiny obsahují špatně uspořádaná místa ve svých strukturách a taková místa potom slouží jako nespecifický signál pro degradaci v proteazomech bez nutnosti ubikvitinace daného proteinu <sup>[30]</sup>. My se však zaměříme na mechanismus degradace ubikvitinovaných PDG v 26S proteazomech. V rozpoznání ubikvitinovaného proteinu hrají klíčovou roli některé podjednotky z báze (ubikvitinové receptory) a také některé proteiny, které se jen přechodně asociují s 26S proteazomy <sup>[31]</sup>. Jestliže je ubikvitinovaný protein již navázán na 26S proteazom, jeho polyubikvitinový řetězec může být proteazomem různě štěpen a znovu syntetizován pomocí deubikvitináz a ubikvitin-ligáz <sup>[32]</sup>. Bylo také ukázáno, že snížení intenzity degradace samotných ubikvitinů v

proteazomu souvisí s činností specifické DUB, nazývané Ubp6, která není stálou podjednotkou 26S proteazomů [33].

Před samotnou degradací PDG je však polyubikvitinový řetězec zpravidla odštěpen en bloc pomocí Poh1 a dále je odstraňován jinými DUBy [34]. Rozplétání proteinu do primární struktury a jeho přesunutí do otvoru proteazomu je pak spojeno s hydrolýzou ATP AAA+ ATPázami [35]. Rozpletený protein může být „skladován“ v  $\alpha$  prstencích, pokud  $\beta$  prstence jsou ještě vytíženy degradací předchozího PDG [36]. Proteiny mohou přitom vcházet do 20S proteazomu z obou stran [37]. Degradace probíhá tak dlouho, dokud vzniknuvší oligopeptidy nejsou dostatečně malé, aby mohly samovolně difundovat ven [38]. Jakmile se oligopeptidy dostanou ven z 26S proteazomů, jsou v buňce dále štěpeny jinými peptidázami až na aminokyseliny, použitelné pro další proteosyntézu [39], nebo jsou použity v rámci imunitního systému jako antigeny [40]. Některé proteiny jsou 26S proteazomy degradovány neúplně, nýbrž jsou vlastně aktivovány, a to tak, že dojde k degradaci jiných proteinů, které jsou na ně vázány a inhibují je. Typickým příkladem je aktivace tzv. jaderného faktoru- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), který se běžně v cytoplazmě vyskytuje v komplexu se svým inhibítorom I- $\kappa$ B. Jakmile je tento I- $\kappa$ B ubikvitinován a degradován, NF- $\kappa$ B se translokuje do jádra a spouští transkripční příslušných genů [41]. Funkce 26 proteazomů je tedy spojena nikoli jen s regulací množství daného proteinu v buňce, nýbrž i s regulací aktivity různých proteinů. Není proto divu, že UPS hraje klíčovou roli v mnoha terapeuticky významných procesech, jako jsou zánětlivá onemocnění, neurodegenerativní procesy, svalové dystrofie, virové infekce nebo karcinogeneze [42-43].

## 1.4 VELCADE (bortezomib): příběh jednoho úspěchu

Úspěšná aplikace inhibitoru proteazomu bortezomibu (podává se jako lék pod názvem VELCADE) proti mnohočetnému myelomu je považována, např. na stránkách amerického National Cancer Institute (NCI), za exemplární „příběh úspěchu“, dodnes neuvěřitelný. Žádný jiný zásah do UPS, kromě využití bortezomibu, nebyl zatím schválen jako terapeutický přístup, aplikovatelný na lidských pacientech v běžné klinické praxi. O detailech objevu a vývoje bortezomibu se zmíníme níže, přičemž budeme vycházet ze třech hlavních zdrojů (kde není uvedeno jinak): z rozhovoru s Julianem Adamsem pro časopis Myeloma Today (6.5.2003), z článku The Velcade Story v Boston Globe (6.5.2007) a z článku Velcade: First in a New Class of Cancer Drug na stránkách Science Progress (Harvard Medical School).

Jak už bylo zmíněno výše, Hershko a jeho skupina navazovali na práci skupiny prof. Goldberga z Harvardu, který také vymyslel název „26S proteazom“ pro entitu degradující v savčích buňkách proteiny nelyzozomální cestou. Goldbergova skupina postupně zjistila, že tyto proteazomy jsou ve všech eukaryotních buňkách a že v každé buňce jsou jich desítky tisíc. Goldberg si velice brzy uvědomil, že tyto objevy by mohly mít terapeutickou hodnotu, např. v léčení svalové atrofie, která má různé příčiny – hladovění, rakovinu, AIDS, TBC –, a ústí do nadbytečné degradace proteinů proteazomy ve svalu. S dalšími třemi harvardskými profesory, kteří báдали v této oblasti, konkrétně s T. Maniatisem, M. Rosenblattem a K. Rockem, založil v roce 1993 Goldberg společnost MyoGenics, jež měla dosažené poznání komercializovat v podobě nových léčiv. Zde byl také připraven první známý inhibitor proteazomu, nazvaný podle jména společnosti MG132. Ve spolupráci s K. Rockem se Goldbergovi podařilo prokázat roli, jakou hrají proteazomy v imunitním systému, a spolu s Maniatisovou laboratoří objevili význam proteazomu pro aktivaci NF- $\kappa$ B. Na základě Maniatisova směru výzkumu se společnost MyoGenics přejmenovala na ProScript se zaměřením nyní už ne na svalovou atrofii, nýbrž na vztah mezi proteazomy (Pro) a regulací transkripce (Script). V té době Goldberg a jeho společníci zaměstnali chemika J. Adamse, který měl už zkušenosti s prací na vývoji nových léků ve velkých farmaceutických firmách. Adams na podzim 1994 vyvinul specifický a velmi silný inhibitor proteazomu pod názvem PS-341, pro nějž se později vžilo jméno bortezomib. V té době již Adams po konzultaci s A. Hershkem a za podpory T. Maniatisa věřil, že se ProScript musí zaměřit na aplikaci bortezomibu v léčbě rakoviny. A rok poté se poprvé podařilo ukázat, že bortezomib in vivo (v myších) potlačuje rakovinné bujení. Goldberg, většina zaměstnanců ProScriptu a také lidé zvenčí však byli přesvědčeni, že masivní aplikace bortezomibu u lidských pacientů bude mít fatální vedlejší účinky a Adamsovo směřování nepodpořili.

Klíčovým bodem obratu byl příchod D. Livingstona do vědecké rady ProScriptu a také Adamsovo navázání spolupráce s E. Sausvillem z NCI. První klinický test bortezomibu, podávaného intravenózně jako lék VELCADE, byl tak zahájen v říjnu 1998 pod vedením R. Orlowského na University of North Carolina, která celý test také

financovala. V té době totiž ProScript už neměl peníze. V roce 1997 umřel bohatý filantrop W. Steinberg, jehož společnost Health Care Ventures vlastnila všechny akcie ProScriptu. Steinbergovi nástupci Adamsovu směru nevěřili a nakonec v červnu 1999 prodali ProScript za 2,7 milionů USD firmě LeukoSite, jež byla o tři měsíce později koupena firmou Millenium Pharmaceuticals za 635 milionů USD. Všechny tyto obchody se děly v rámci Cambridge v Massachusetts, kde sídlí také Harvardova univerzita (a za Charles River v Bostonu je zase Harvard Medical School a k ní přidružené kliniky jako např. Dana-Farber Cancer Institute). Millenium Pharmaceuticals nekupovala LeukoSites kvůli VELCADE, nýbrž jako konkurenta, jenž se podílel na vývoji protizánětlivých léčiv. Adams a jeho směr byli zcela bezvýznamnou součástí firmy LeukoSite.

Mezitím klinický výzkum v Severní Karolíně ukázal, že VELCADE nemá vážné vedlejší účinky a může mít veliký potenciál pro léčbu některých rakovin. V roce 2000 tým R. Orłowského při aplikaci nízkých dávek VELCADE, které bývají používány pouze pro ověření bezpečnosti léku, pozoroval naprosté vymizení mnohočetného myelomu u 47-leté pacientky. Za těchto okolností šéf onkologického oddělení v Millenium Pharmaceuticals, J. Bolen, již pochopil důležitost dalšího vývoje léku VELCADE a stejně pozitivně byl Adamsovým snahám nakloněn také management, vedený M. Levinem. Adams se spojil s K. Andersonem, odborníkem na mnohočetný myelom z Dana-Farber Cancer Institute, a spolu přesvědčili Levina, aby Millenium zaplatilo náklady spojené s dalšími klinickými testy léku. Zásadní důležitost pro prosazení VELCADE měly dvě další okolnosti. Jednak se Adams a Anderson spojili s organizacemi pacientů, trpících mnohočetným myelomem. Pro tento druh rakoviny tehdy nebyla prakticky žádná fungující terapie, a proto zájem na povolení VELCADE k běžnému klinickému použití byl obrovský. Druhou zásadní okolností byla úzká spolupráce lidí z Millenium Pharmaceuticals s americkým úřadem pro povolování léčiv FDA (Food and Drug Administration). Výsledky dalších klinických testů byly tak úžasné, že dne 13. května 2003 FDA povolil VELCADE pro léčbu pacientů s relapsujícím mnohočetným myelomem, a to ještě předtím, než byla dokončena 3. fáze klinických testů, která je obvykle pro takové povolení nezbytná.

V roce 2008 byl VELCADE v USA povolen jako lék první volby proti mnohočetnému myelomu a dnes se používá zejména v kombinaci s jinými léčivými <sup>[44]</sup>. VELCADE je indikován k léčbě mnohočetného myelomu běžně i v Evropě, v Japonsku a jinde na světě. Pro Millenium Pharmaceuticals se tento lék stal velmi významným zdrojem příjmů (podle zmíněného článku v Boston Globe jde asi o třetinu všech zisků firmy). Ve mnoha případech VELCADE ovšem nepředstavuje úplnou léčbu nemoci, nýbrž „jen“ prodloužení života v řádu měsíců. Podle jedné z nedávných studií <sup>[45]</sup> ze 64 pacientů s mnohočetným myelomem, kteří brali VELCADE, 9% bylo vyléčeno a 41% dosáhlo aspoň částečného potlačení nemoci. Medián trvání citlivosti nemoci na lék byl 8,4 měsíců a medián doby, než došlo k další progresi nemoci, byl 17,3 měsíců. V současné době existují stovky klinických testů VELCADE proti mnohočetnému myelomu i dalším typům rakoviny. V zásadě se ukazuje, že VELCADE selhává v případech pevných nádorů, zatímco některé krevní nádory (lymfomy) jsou na něj citlivé (podrobnosti jsou v tabulce, více informací k jednotlivým klinickým testům lze najít na PubMedu).

Přes stovky studií a publikací o působení VELCADE na celý organismus i na buněčné kultury stále nevíme, proč vlastně tento lék přednostně zabíjí rakovinné buňky a zdravé buňky nechává žít. Jisté je, že inhibice proteazomů představuje simultánní zásah do obrovského množství buněčných dějů najednou a ne ve všech typech rakovinných linií in vitro vyvolává tytéž změny. Některé ze základních mechanismů smrtícího účinku VELCADE na rakovinné buňky byly shrnuty v publikaci <sup>[46]</sup> z podzimu 2008. V této publikaci se stále ještě opakuje počáteční dogma (přejaté v mnoha stovkách článků), že jedním z klíčových mechanismů, které jsou zodpovědné za účinek VELCADE na buňky mnohočetného myelomu, je inhibice NF-κB, a to přes tehdy už známá data z různých studií, která v roce 2008 shrnuli v přehledném článku autoři tohoto učebního textu <sup>[47]</sup>. Přelomová práce potom vyšla v červenci 2009 v časopise Blood z týmu profesora Andersona z Dana-Farber Cancer Institute. Autoři prokázali, že VELCADE nejenže neinhibuje NF-κB v buňkách mnohočetného myelomu, odebraných z pacientů, nýbrž tento transkripční faktor dokonce aktivuje, a tím snižuje svůj vlastní smrtící efekt na tyto buňky (který je posílen přidáním specifického inhibitoru NF-κB) <sup>[48]</sup>. V roce 2009 se tedy správná odpověď na otázku, jak VELCADE zabíjí rakovinné buňky v lidském těle, stala ještě záhadnější. Limitace může být i v tom, že drtivá většina publikovaného výzkumu na toto téma se děje v nádorových liniích in vitro a nereflexuje tak dostatečně realitu procesů v těle léčených pacientů.

## Výsledky klinických testů VELCADE (bez kombinace s jinými léčivými)

## do roku 2010

### typ onemocnění

mnohočetný myelom  
lymfom plášťových buněk  
lymfom kožních T-buněk  
MALT lymfom  
Waldenströmova makroglobulinemie  
chronická lymphocytární leukemie  
dětská leukemie  
sarkomy měkkých tkání  
malobuněčný karcinom plic  
kolorektální karcinom  
melanom  
neuroendokrinní nádory  
rakovina prsu  
nemalobuněčný karcinom plic  
karcinom žaludku a jícnu

### výsledky klinických testů

v klinické léčbě  
v klinické léčbě  
signifikantní aktivita ve 2. fázi testů\*  
signifikantní aktivita ve 2. fázi testů  
signifikantní aktivita ve 2. fázi testů  
biologická aktivita ve 2. fázi testů  
nízká aktivita v 1. fázi testů  
nízká aktivita ve 2. fázi testů  
nízká aktivita ve 2. fázi testů  
žádná aktivita ve 2. fázi testů  
žádná aktivita ve 2. fázi testů  
žádná aktivita ve 2. fázi testů  
žádná aktivita ve 2. fázi testů  
žádná aktivita ve 2. fázi testů  
žádná aktivita ve 2. fázi testů

\* Klinické testy nových léčiv se klasicky rozdělují do tří fází. V první fázi (20-100 pacientů) se ověřuje bezpečnost používané látky, její farmakokinetika a farmakodynamika a vhodné dávkování pro další testy. Ve druhé fázi klinických testů (20-300 pacientů), do níž nové léčivo zpravidla postupuje až po zjištění, že je dostatečně bezpečné, se ověřuje zejména jeho schopnost dosáhnout žádoucího účinku proti dané nemoci. Samozřejmě se stále monitorují všechny nežádoucí vedlejší účinky. Je-li nové léčivo dostatečně efektivní, postupuje do třetí fáze klinických testů (300-3000 i více pacientů), která je nejdražší, nejdelší a nejnáročnější. Jde o randomizované, multicentrické studie, jejichž cílem je zjistit, zda nové léčivo (či jeho kombinace s jinými léčivy) je účinnější proti dané nemoci než současný zlatý standard léčby. Teprve na základě výsledků třetí fáze klinických testů dochází k povolení nového léčiva pro léčbu dané nemoci v běžné klinické praxi. Třetí fáze může ovšem probíhat pro různé kombinace daného léčiva s jinými léčivy i po jeho povolení pro běžnou klinickou léčbu, např. v současnosti lze najít na stránkách NCI 24 klinických testů VELCADE ve třetí fázi, všechny proti mnohočetnému myelomu. Cena klinických testů jednoho nového léčiva od začátku první fáze testů až po jeho uvedení do běžné klinické péče se odhaduje <sup>[49]</sup> na půl miliardy USD (1 USD v hodnotě z roku 2000). Díky výrazné variabilitě v lidské populaci se však musí sledovat bezpečnost a účinnost daného léku i při jeho běžném používání, což bývá označováno za čtvrtou fázi klinických testů. Nedávno bylo navrženo <sup>[50]</sup>, aby se během této fáze sledovaly i případné nečekané pozitivní účinky daného léku na jiné nemoci, jimiž pacient trpí zároveň.

## 1.5 Nové klinicky testované látky zasahující UPS

Lék VELCADE má některé nevýhody: podává se injekčně, není příliš účinný, nefunguje v pevných tumorech a i pacienti s mnohočetným myelomem si na něj vytvářejí zpravidla rezistenci. Existuje proto značná poptávka po dalších, nových inhibitorech proteazomu, jež by mohly přinést onkologickým pacientům větší užitek a farmaceutickým firmám nové zisky. Zmíníme se nejprve o tzv. druhé generaci inhibitorů 20S proteazomu a budeme vycházet z publikace, vydané vědci z Millenium Pharmaceuticals <sup>[51]</sup>.

V současnosti jsou v klinických testech následující látky: MLN9708 (Millenium Pharmaceuticals), CEP-18770 (Cephalon & Cell Therapeutics Europe), Carfilzomib (Proteolix) a NPI-0052 (Nereus Pharmaceuticals). MLN9708 je chemicky podobný bortezomibu a podobně jako bortezomib inhibuje 20S proteazom reverzibilně (po nějaké době se uvolní z místa navázání na 20S proteazom). Oproti bortezomibu je účinný také při perorálním podání. Na stránkách NCI lze najít čtyři právě probíhající klinické testy (fáze 1-2) této látky (mnohočetný myelom, pevné nádory, lymfomy). CEP-18770 je také reverzibilní inhibitor 20S proteazomu (opět chemicky podobný bortezomibu), podává se však intravenózně. V současné době probíhá pouze jeden klinický test této látky (fáze 2, mnohočetný myelom). Obě další látky jsou ireverzibilní inhibitory 20S proteazomu a patří do zcela jiných chemických skupin: na rozdíl od bortezomibu, který je odvozen od kombinace monoalkylborité kyseliny a dipeptidu, carfilzomib je kombinací epoxyketonu a tetrapeptidu a NPI-0052 je bicyklický  $\gamma$ -laktam- $\beta$ -laktan. NPI-0052 je znám také jako salinosporamid A a byl původně izolován z jedné mořské bakterie. Pro tuto látku lze najít na stránkách NCI čtyři probíhající klinické testy (intravenózně, fáze 1, mnohočetný myelom, pevné nádory, lymfomy). Carfilzomib je testován v osmi klinických testech (intravenózně, fáze 1-2, lymfomy, leukemie, pevné

nádory), v kombinaci s jinými léky dokonce už ve fázi 3 u pacientů s mnohočetným myelomem. VELCADE (bortezomib) však zatím zůstává stále jediným klinicky používaným inhibitorem proteazomu.

Původní Hershkova idea při jeho rozhovoru s Adamsem však nespočívala v tom zastavit degradaci proteinů jako takovou. Inhibitory 20S proteazomu zasahují příliš mnoho buněčných dějů najednou. Hershko uvažoval spíše o tom, jak ovlivnit degradaci konkrétních vybraných proteinů, o nichž se ví, že hrají významnou roli ve vzniku a progresi rakoviny. Pro takový přístup je nutné inhibovat konkrétní E3 ligázy, jež rozhodují o ubikvitinaci a degradaci těchto proteinů. První takový inhibitor (MLN4924) vstoupil do klinických testů zcela nedávno a pochází z produkce Millenium Pharmaceuticals <sup>[52]</sup>. Ve skutečnosti nejde o inhibitor přímo nějaké E3 ligázy, nýbrž o inhibitor enzymu NAE (NEDD8-activating enzyme), který reguluje jednu skupinu E3 ligáz. V tom smyslu MLN4924 představuje zcela unikátní přístup k léčbě rakoviny, jenž dosud nebyl vůbec vyzkoušen. Na stránkách NCI lze najít čtyři klinické testy této látky (intravenózně, fáze 1, melanom, leukemie, lymfomy, mnohočetný myelom a také pevné nádory).

Další dosud „exotickou“ možností, jak ovlivnit UPS, je inhibování deubikvitináz. V roce 2007 vědci z Millenium Pharmaceuticals navrhli jako jeden z nadějných cílů protinádorové terapie už výše zmíněnou Poh1 ve víku 26S proteazomu <sup>[53]</sup>. Je docela možné, že jeden starý lék, používaný desítky let proti alkoholismu (antabus neboli disulfiram), je schopen Poh1 a jiné JAMM doménové DUBy inhibovat, a tím velmi efektivně potlačovat rakovinu. V dalším textu se pokusíme ukázat, co je o tom už známo. Je to jedno z hlavních výzkumných témat našeho pracoviště. Přehled celé problematiky lze najít v publikaci <sup>[54]</sup>.

## 1.6 Příběh antabusu

Pro možnost, že antabus je schopen potlačovat některá onkologická onemocnění, svědčí několik roztroušených klinických pozorování. V jednom zapadlém článku z roku 1977 <sup>[55]</sup> doktor E. F. Lewison z Johns Hopkins Hospital popisuje případ ženy, která v roce 1956 ve svých 35 letech byla operována kvůli agresivní rakovině prsu. O tři roky později se u ní objevila vážná bolest zad, čehož příčinou se ukázaly rozsáhlé metastázy v páteři, žebrech a pánevní kosti. V roce 1961 se pacientka stala alkoholičkou a musela užívat antabus. Během následujících deseti let došlo k úplnému vymizení všech metastáz. Žena umřela v roce 1971 díky pádu z okna v těžké opilosti, z hlediska onkologického však naprosto zdravá. Lewison spekuloval o protirakovinné aktivitě antabusu v důsledku jeho základní schopnosti inhibovat enzym acetaldehyd dehydrogenázu.

Na přelomu 80./90. let se stala populární látka, nazývaná ditiocarb nebo také immuthiol. Tato látka vzniká v těle z antabusu po jeho požití a vyznačuje se vysokou reaktivitou, mj. je schopna reagovat s mědí, obsaženou v krvi, a vytvářet komplex, který si označme zkratkou CuEt. Věřilo se, že ditiocarb je schopen mít příznivý vliv na imunitu a mohl by tedy být vhodným lékem proti HIV/AIDS. Některé klinické testy publikované v prestižních lékařských časopisech (Lancet, JAMA) ukázaly na podivuhodnou účinnost ditiocarbu proti tomuto onemocnění. Další klinické testy však selhaly a když se zjistilo, že ditiocarb nemá na imunitu pacientů s HIV/AIDS žádný vliv, upadl celý příběh do zapomnění. Úspěch klinických testů ditiocarbu proti HIV/AIDS zůstal dodnes nevysvětlen. Zdá se však, že jeho účinnost mohla být výrazně ovlivněna množstvím mědi ve stravě pacientů a vůbec nesouvisela s vlivem na imunitu, nýbrž se schopností CuEt inhibovat proteazom <sup>[56]</sup>. Pro nás je však podstatné, že ditiocarb byl ještě v době své slávy využit také v klinickém testu na 64 pacientkách (fáze 2) s rakovinou prsu (nezávisle na Lewisonovi). Výsledky byly velmi pozitivní: po šesti letech žilo ve skupině, beroucí ditiocarb, 81% pacientek, zatímco ve skupině s placebem pouhých 55% pacientek <sup>[57]</sup>. Autoři vycházeli v tomto testu z předpokladu, že ditiocarb příznivě ovlivňuje imunitní systém. Když se tento předpoklad však ukázal mylný, získaná data přestávala dávat smysl a další výzkum byl opuštěn.

Potom se antabus začal znovu vnučovat pozornosti lidských dějin na základě experimentů, jež provedla skupina profesora T. P. Kennedyho na University of Utah. Tito výzkumníci nezávisle na obou již zmíněných publikacích objevili, že antabus má silnou protinádorovou aktivitu, když vytváří komplexy s kovy, zejména se zinkem a mědí. Rozhodli se aplikovat své výsledky u beznadějně nemocné pacientky s velkou metastázou melanomu v játrech. Pacientka brala antabus a glukonát zinečnatý, každý zvlášť, denně. Po třech měsících metastáza zmizela a došlo k úplnému obnovení zdraví, takže nebylo již zapotřebí žádné hospitalizace. Až do publikování výsledků v roce 2004 žila žena s každodenní dávkou antabusu a zinku po dobu 55 měsíců bez zhoršení zdravotního stavu <sup>[58]</sup>. Důvod této pozoruhodné protinádorové aktivity bylo však obtížné najít až do

objevu, který udělal profesor Q. P. Dou v Detroitu (Michigan) se svým týmem. Při experimentování v jeho laboratoři se totiž ukázalo, že CuEt je silný inhibitor proteazomu, a to dokonce in vivo v myších, kde efektivně potlačoval xenografty odvozené od lidské prsní nádorové linie <sup>[59]</sup>. Z výsledků obou amerických týmů potom vyšel klinický test na Huntsman Cancer Institute v Utahu, zahájený v létě 2008 a trvajícím dodnes (investorem je University of Utah). V tomto testu (1. fáze) je pacientům s nádory jater (primárními i sekundárními, s určením původu i bez určení původu) perorálně a denně podáván antabus a glukonát měďnatý, každý zvlášť.

Působí-li antabus, potencovaný mědí, tak výrazně proti pevným nádorům, zdá se, že bude inhibovat proteazom nějakým jiným způsobem než VELCADE. Způsob inhibice proteazomu pomocí CuEt je nyní tou vskutku vzrušující otázkou. Ve spolupráci se skupinou profesora Doua jsme nedávno ukázali, že CuEt není schopen inhibovat 20S proteazom a jeho cílem je mnohem spíše Poh1 ve víku 26S proteazomu <sup>[60]</sup>. Mechanismus protinádorového účinku látky CuEt, která vzniká v našem těle po požití antabusu či ditiocarbu <sup>[61]</sup>, je však dnes ještě mnohem větší otázkou než mechanismus účinku bortezomibu.

---

## Literatura

- [1] Todde V et al. Autophagy: principles and significance in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792:3-13.
- [2] Schubert U et al. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 2000;404:770-774.
- [3] Hirsch C et al. The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum. *Nature* 2009;458:453-460.
- [4] Kaganovich D et al. Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. *Nature* 2008;454:1088-1095.
- [5] Reits EA et al. Dynamics of proteasome distribution in living cells. *EMBO J* 1997;16:6087-6094.
- [6] Kumatori A et al. Abnormally high expression of proteasomes in human leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7071-7075.
- [7] Wojcik C & DeMartino GN. Intracellular localization of proteasomes. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:579-589.
- [8] Komander D. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem Soc Trans* 2009;37:937-953.
- [9] Hershko A. The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell division cycle. *Cell Death Differ* 2005;12:1191-1197.
- [10] Etlinger JD & Goldberg AL. Soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:54-58.
- [11] Pickart CM. Back to the future with ubiquitin. *Cell* 2004;116:181-190.
- [12] Baumeistr W et al. Varshavsky's contributions. *Science* 2004;306:1290-1292
- [13] Jin J et al. Dual E1 activation systems for ubiquitin differentially regulate E2 enzyme charging. *Nature* 2007;447:1135-1138.
- [14] Rotin D & Kumar S. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:398-409.
- [15] Deshaies RJ & Joazeiro CA. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* 2009;78:399-434.
- [16] Hoppe T. Multiubiquitylation by E4 enzymes: "one size" doesn't fit all. *Trends Biochem Sci* 2005;30:183-187.
- [17] Ikeda F & Dikic I. Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. "Protein modifications: beyond the usual suspects" review series. *EMBO Rep* 2008;9:536-542.
- [18] Saeki Y et al. Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome. *EMBO J* 2009;28:359-371.
- [19] Newton K et al. Ubiquitin chain editing revealed by polyubiquitin linkage-specific antibodies. *Cell* 2008;134:668-678.
- [20] Komander D et al. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:550-563.
- [21] Sowa ME et al. Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape. *Cell* 2009;138:389-403.
- [22] Bedford L et al. Assembly, structure, and function of the 26S proteasome. *Trends Cell Biol* 2010;20:391-401.
- [23] Strehl B et al. Interferon- $\gamma$ , the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol Rev* 2005;207:19-30.

- [24] Murata S et al. Thymoproteasome: probable role in generating positively selecting peptides. *Curr Opin Immunol* 2008;20:192-196.
- [25] De Martino GN & Gillete TG. Proteasomes: machines for all reasons. *Cell* 2007;129:659-662.
- [26] Kriegenburg F et al. Mammalian 26S proteasomes remain intact during protein degradation. *Cell* 2008;135:355-365.
- [27] Li X & De Martino GN. Variably modulated gating of the 26S proteasome by ATP and polyubiquitin. *Biochem J* 2009;421:397-404.
- [28] Sharon M et al. Structural organization of the 19S proteasome lid: insights from MS of intact complexes. *PLoS Biol* 2006;4:1314-1323.
- [29] Verma R et al. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 2002;298:611-615.
- [30] Baugh JM et al. Proteasomes can degrade a significant proportion of cellular proteins independent of ubiquitination. *J Mol Biol* 2009;386:814-827.
- [31] Verma R et al. Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system. *Cell* 2004;118:99-110.
- [32] Crosas B et al. Ubiquitin chains are remodeled at the proteasome by opposing ubiquitin ligase and deubiquitinating activities. *Cell* 2006;127:1401-1413.
- [33] Hanna J et al. A ubiquitin stress response induces altered proteasome composition. *Cell* 2007;129:747-759.
- [34] Koulich E et al. Relative structural and functional roles of multiple deubiquitylating proteins associated with mammalian 26S proteasome. *Mol Biol Cell* 2008;19:1072-1082. [35] Striebel F et al. Controlled destruction: AAA+ ATPases in protein degradation from bacteria to eukaryotes. *Curr Opin Struct Biol* 2009;19:209-217.
- [36] Sharon M et al. 20S proteasomes have the potential to keep substrates in store for continual degradation. *J Biol Chem* 2006;281:9569-9575.
- [37] Hutschenreiter S et al. Two-substrate association with the 20S proteasome at single-molecule level. *EMBO J* 2004;23:2488-2497.
- [38] Kohler A et al. The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol Cell* 2001;7:1143-1152.
- [39] Vabulas RM & Hartl FU. Protein synthesis upon acute nutrient restriction relies on proteasome function. *Science* 2005;310:1960-1963.
- [40] Klotzel PM. Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat Immunol* 2004;5:661-669.
- [41] Rape M & Jentsch S. Productive RUPture: activation of transcription factors by proteasomal processing. *Biochim Biophys Acta* 2004;1695:209-213.
- [42] Rubinsztein DC. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* 2006;443:780-786.
- [43] Schwartz AL & Ciechanover A. Targeting proteins for destruction by the ubiquitin system: implications for human pathobiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2009;49:73-96.
- [44] San Miguel JF et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med* 2008;359:906-917.
- [45] Richardson PG et al. Single-agent bortezomib in previously untreated multiple myeloma: efficacy, characterization of peripheral neuropathy, and molecular correlations with response and neuropathy. *J Clin Oncol* 2009;27:3518-3525.
- [46] McConkey DJ & Zhu K. Mechanism of proteasome inhibitor action and resistance in cancer. *Drug Resist Updat* 2008;11:164-179.
- [47] Cvek B & Dvorak Z. The value of proteasome inhibition in cancer. Can the old drug, disulfiram, have a bright new future as a novel proteasome inhibitor? *Drug Discov Today* 2008;13:716-722.
- [48] Hideshima T et al. Bortezomib induces canonical nuclear factor- $\kappa$ B activation in multiple myeloma cells. *Blood* 2009;114:1046-1052.
- [49] DiMasi JA et al. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ* 2003;22:151-185.
- [50] Boguski MS et al. Repurposing with a difference. *Science* 2009;324:1394-1395.
- [51] Dick LR & Fleming PE. Building on bortezomib: second-generation proteasome inhibitors as anti-cancer



therapy. Drug Discov Today 2010;15: 243-249.

[52] Soucy TA et al. An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. Nature 2009;458:732-737.

[53] Gallery M et al. The JAMM motif of human deubiquitinase Poh1 is essential for cell viability. Mol Cancer Ther 2007;6:262-268.

[54] Cvek B. Targeting malignancies with disulfiram (antabuse): multidrug resistance, angiogenesis, and proteasome. Curr Cancer Drug Targets 2011;in press.

[55] Lewison EF. Spontaneous regression of breast cancer. Progr Clin Biol Res 1977;12:47-53.

[56] Cvek B. Failure of ditiocarb (diethyldithiocarbamate) therapy: was diet the reason? Curr HIV Res 2009;7:254.

[57] Dufour P et al. Sodium ditiocarb as adjuvant immunotherapy for high risk breast cancer: a randomized study. Biotherapy 1993;6:9-12.

[58] Brar SS et al. Disulfiram inhibits activating transcription factor/cyclic AMP-responsive element binding protein and human melanoma growth in a metal-dependent manner in vitro, in mice and in a patient with metastatic disease. Mol Cancer Ther 2004;3:1049-1060.

[59] Chen D et al. Disulfiram, a clinically used anti-alcoholism drug and copper-binding agent, induces apoptotic cell death in breast cancer cultures and xenografts via inhibition of the proteasome activity. Cancer Res 2006;66:10425-10433.

[60] Cvek B. et al. Ni(II), Cu(II), and Zn(II) diethyldithiocarbamate complexes show various activities against the proteasome in breast cancer cells. J Med Chem 2008;51:6256-6258.

[61] Suzuki Y et al. The origin of an EPR signal observed in dithiocarbamate loaded tissues. Copper(II)-dithiocarbamate complexes account for the narrow hyperfine lines. Biochim Biophys Acta 1997;1335:242-245.

---

Boris Cvek

(nar. 1976, Krnov) vystudoval anorganickou chemii na olomoucké univerzitě (Ph.D.), působil jako učitel na ZŠ Haškova v Uničově, na gymnáziu v Kojetíně a jako badatel i učitel na Lékařské fakultě UP. V současnosti je zaměstnán na Katedře buněčné biologie a genetiky téže univerzity, specializace: ubikvitin-proteazomový systém jako cíl protinádorové terapie. Odborně spolupracuje s týmy prof. Doua z Barbara Ann Karmanos Cancer Institute Detroit USA, prof. Deshaiese z California Institute of Technology Pasadena USA a prof. Bárta z Danish Cancer Society Kodaň Dánsko.

Přednáší buněčnou biologii a filozofii přírodních věd na PřF UP v Olomouci.

Odborně zatím publikoval v Journal of Medicinal Chemistry (USA), Drug Discovery Today (Anglie), Current Pharmaceutical Design (Nizozemí), Current HIV Research (Nizozemí), Journal of Hepatology (Nizozemí) a International Journal of Cancer (USA). Všude jako první nebo jediný autor. Je členem American Association for the Advancement of Science a také American Chemical Society.

Svou hlavní odbornou vizi (antabus jako levný a efektivní lék proti rakovině, srv. Cvek B. Antabuse as a pilot case of non-profit drug. Int. J. Cancer 2010) uskutečňuje za spolupráce s harvardským profesorem V. P. Sukhatmem a společností GlobalCures (Boston, USA), která vznikla za účelem podpory klinických testů léčiv, jež jsou nepatentovatelná.

články autora [O autorovi](#)  
Vytisknout [Poslat e-mailem](#)