

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Petra Pejković

PAKLITAKSEL – OD BILJKE DO LIJEKA

Specijalistički rad

Zagreb, 2016.

PSS studij: Razvoj lijekova

Mentor rada: prof. dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević

Specijalistički rad obranjen je dana 7. srpnja 2016. godine na Zavodu za farmakognoziju

Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Jelena Filipović Grčić
2. Prof. dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević
3. Dr. sc. Dubravko Jelić

Rad ima 85 listova.

PREDGOVOR

Ovaj specijalistički rad izrađen je u okviru Poslijediplomskog specijalističkog studija Razvoj lijekova na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Sande Vladimir-Knežević.

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Sandi Vladimir-Knežević na pomoći i uloženom vremenu pri izradi ovog specijalističkog rada.

Mom suprugu i roditeljima hvala za podršku tijekom specijalističkog studija.

SAŽETAK

Bioaktivne tvari biljnog podrijetla dragocjen su ishodni materijal za razvoj novih lijekova. Brojna znanstvena istraživanja usmjerena su otkrivanju novih lijekova antitumorskog djelovanja budući da je karcinom rastući svjetski zdravstveni problem i drugi glavni uzrok smrtnosti nakon kardiovaskularnih bolesti. Paklitaksel je otkriven upravo u sklopu jednog takvog znanstvenog projekta u kori pacifičke tise (*Taxus brevifolia* Nutt.). Danas je paklitaksel dio standardne terapije u liječenju različitih vrsta karcinoma, bilo u početnom ili uznapredovalom stadiju. Odobrene terapijske indikacije obuhvaćaju karcinom dojke, jajnika i pluća te Kaposijev sarkom povezan s AIDS-om.

Cilj ovog specijalističkog rada bio je prikupiti i obraditi relevantna znanstvena istraživanja te pružiti pregled odnosa molekulske strukture i djelovanja paklitaksela, biosintetskog i sintetskog puta dobivanja, mehanizma djelovanja te farmakokinetičkog i kliničkog profila. Posebna pozornost posvećena je razumijevanju mehanizama rezistencije na paklitaksel i neželjenih učinaka, što je veliki poticaj razvoju suvremenih formulacija lijeka povećane selektivnosti i djelotvornosti te smanjenih toksičnih učinaka. U razvoju novih formulacija paklitaksela najčešće se koriste nanočestice, liposomi, ciklodekstrini, analozi te prolijekovi. Dosadašnje znanstvene spoznaje ukazuju na velik potencijal primjene novih formulacija paklitaksela te potiču buduća istraživanja.

SUMMARY

Bioactive substances derived from plants are a valuable source of medicines. Numerous scientific research projects are focused on discovery of new anticancer agents since cancer is a growing world health problem and the second major cause of death after cardiovascular diseases. In one such scientific project paclitaxel was discovered as the major substance in the bark of pacific yew (*Taxus brevifolia* Nutt.). Today paclitaxel is a standard therapy in the treatment of different types of carcinoma, both in early and advanced stages. It is approved for treatment of breast cancer, ovarian cancer, lung cancer and AIDS-related Kaposi's sarcoma.

The aim of this work was to collect and analyse the relevant scientific research and give overview of molecular structure and activity relationship of paclitaxel, biosynthetic and synthetic pathways, mechanism of action, pharmacokinetic and clinical profiles. Special focus was put on understanding of resistance mechanisms to paclitaxel as well as adverse events which are the important impulses for development of new formulations with enhanced selectivity and efficiency, and reduced toxic effects. The most used approaches for developing new formulations of paclitaxel are nanoparticles, liposomes, cyclodextrins, analogues and prodrugs. Current scientific data indicate a great potential for the use of new paclitaxel formulations and encourage further research.

SADRŽAJ

1.	UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA	3
3.	MATERIJALI I METODE	4
4.	REZULTATI I RASPRAVA	5
4.1.	Otkriće i povijest paklitaksela	5
4.2.	Paklitaksel u vrstama roda <i>Taxus</i> L.	9
4.3.	Biosinteza paklitaksela	11
4.4.	Proizvodnja paklitaksela u biljnim staničnim kulturama	13
4.5.	Sintetski put dobivanja paklitaksela	15
4.6.	Polusintetsko dobivanje paklitaksela	17
4.7.	Odnos strukture i djelovanja paklitaksela	18
4.8.	Mehanizam djelovanja paklitaksela	24
4.9.	Mehanizmi rezistencije na paklitaksel	31
4.10.	Terapijske indikacije paklitaksela	39
4.11.	Farmakokinetički profil paklitaksela	40
4.12.	Toksični učinci paklitaksela	43
4.13.	Formulacije lijeka	47
4.14.	Novi pristupi u formulaciji lijeka	54
5.	ZAKLJUČCI	75
6.	LITERATURA	77
7.	ŽIVOTOPIS	83

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Svakodnevno se bilježi porast oboljelih od karcinoma koji je danas, uz kardiovaskularne bolesti, glavni uzrok smrtnosti u svijetu. Da bi ukazala na taj rastući globalni zdravstveni problem, Svjetska zdravstvena organizacija je 2005. godine na svom 58. zasjedanju u Ženevi usvojila *Rezoluciju o prevenciji i kontroli karcinoma*. Prema procjeni Svjetske zdravstvene organizacije u sljedećih 20 godina broj novih slučajeva raka porasti će najmanje za 50% (1). Stoga se posebna pozornost posvećuje otkriću novih lijekova antikancerogenog djelovanja, posebice onih iz prirodnih izvora. Od 1960-ih godina u borbi protiv karcinoma služe nam sekundarni metaboliti mikroorganizama te kopnenih i morskih organizama (2).

Paklitaksel je jedan od najpoznatijih i najprimjenjivanih antitumorskih lijekova današnjice. Nije otkriven slučajno već je rezultat istraživanja više od 12000 prirodnih supstancija. Uspješan razvoj paklitaksela je rezultat dugogodišnjeg napornog rada brojnih istraživača u znanstvenim ustanovama i farmaceutskoj industriji. Povijest paklitaksela započela je u SAD-u u sklopu velikog znanstvenog projekta Nacionalnog instituta za rak, s ciljem da se istraži antitumorski potencijal velikog broja različitih biljnih ekstrakata i napravi probir najučinkovitijih biljnih sastavnica (3). Godine 1962. prikupljeni su uzorci kore vrste *Taxus brevifolia* Nutt. i podvrgnuti testiranju antitumorskog djelovanja. Konačna struktura paklitaksela kao glavne aktivne sastavnice pacifičke tise objavljena je 1971., a prva klinička istraživanja započeta su 1984. godine (4). Unatoč uspješnim kliničkim istraživanjima, nedostatak prirodnih resursa značajno je usporio proizvodnju lijeka koji se tek 1992. godine počeo koristiti u liječenju karcinoma jajnika (5). Ustanovljena su strukturalna obilježja molekule ključna za antitumorsko djelovanje paklitaksela (6) te je razjašnjen mehanizam djelovanja. Paklitaksel potiče stvaranje mikrotubula od dimera tubulina te stabilizira mikrotubule sprječavanjem depolimerizacije. Ta stabilnost

rezultira inhibicijom normalne dinamičke reorganizacije mreže mikrotubula koja je ključna za vitalnu interfazu i mitotske funkcije stanice. Pored toga, paklitaksel inducira abnormalne nizove ili "snopove" mikrotubula kroz stanični ciklus te umnaža astere mikrotubula tijekom mitoze (7, 8).

Struktura paklitaksela, zbog kompleksnosti stereokemije i strukture prstenova, predstavlja jedan od najvećih izazova u pogledu sintetiziranja neke prirodne molekule. Iako je sinteza provedena, paklitaksel se dobiva polusintetski. Danas se istražuju nove mogućnosti dobivanja lijeka, a među novijim istraživanjima ističe se uloga endofitskih gljiva u biosintezi paklitaksela (4). Do danas su provedena brojna pretklinička i klinička istraživanja paklitaksela koja su dovela do njegove terapijske primjene, uz najmanje moguće neželjene učinke, što podrazumijeva i razvoj novih formulacija lijeka (9).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Istraživanja prirodnih produkata dovela su do razvoja važnih antitumorskih lijekova koji se danas opsežno primjenjuju u liječenju različitih vrsta karcinoma. Otkriće i razvoj paklitaksela pokazuje svu kompleksnost dobivanja lijeka iz prirodnih resursa. Primjenjuje se u liječenju karcinoma dojke, jajnika i pluća te Kaposijevog sarkoma. Iako je prvotno izoliran iz kore pacifičke tise (*Taxus brevifolia* Nutt.), dobiva se polusintetski iz listova europskih tisa. Danas se ulažu veliki naponi u otkrivanje drugih mogućnosti dobivanja ovog lijeka te u istraživanje novih formulacija. Stoga je cilj ovog rada dati sveobuhvatan pregled znanstvenih spoznaja o paklitakselu.

3. MATERIJALI I METODE

Istraživanja u okviru ovoga specijalističkog rada teorijskog su karaktera i uključuju pregled dostupne literature o povijesnom razvoju paklitaksela i suvremenim znanstvenim istraživanjima. U pretraživanju su korištene dostupne elektronske bibliografske baze podataka kao što su: Current Contents, ScienceDirect, Scopus, PubMed, Medline i dr. Prikupljeni podaci su proučeni i sistematično prikazani, a obuhvaćaju strukturna i biološka svojstva molekule, mehanizam antitumorskog djelovanja, odnos strukture i učinka, biosintezu, dobivanje lijeka iz prirodnih resursa, farmakokinetički profil, formulacije, terapijske indikacije i doziranje, neželjene učinke te nove formulacije lijeka.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Otkriće i povijest paklitaksela

Povijest paklitaksela započela je u SAD-u u sklopu velikog znanstvenog projekta Nacionalnog instituta za rak (*National Cancer Institute*, NCI), s ciljem da se istraži antitumorski potencijal velikog broja različitih biljnih ekstrakata i napravi probir najučinkovitijih biljnih sastavnica. Godine 1962. skupina botaničara na čelu s dr. Arthurom Barclayem u državi Washington sakupila je uzorke vrste *Taxus brevifolia* Nutt. (slike 1 i 2). Konačna struktura paklitaksela kao glavne aktivne sastavnice objavljena je 1971. godine, za što su zaslužni znanstvenici dr. Monroe Wall, dr. Mansukh Wani i dr. Andrew McPhail (3). Kompleksna struktura ovog polioksigeniranog diterpena prikazana je na slici 3.

Otkriće strukture paklitaksela nije odmah pobudilo interes farmaceutske industrije, što je i bilo za očekivati s obzirom na predvidljive poteškoće u razvoju i proizvodnji. Naime, paklitaksel je prisutan u vrlo maloj količini samo u kori vrste *T. brevifolia* koja je prilično tanka. Stoga se činilo gotovo nemogućim izolirati dovoljnu količinu čiste tvari za pretklinička i klinička istraživanja te kasnije za kliničku primjenu. Pacifička tisa je sporo rastuće drvo koje primarno nastanjuje zapadna obalna područja Sjeverne Amerike. Iznimno složena struktura kočila je razvoj sintetskog puta dobivanja, što je također značajno usporavalo daljnji razvoj paklitaksela kao lijeka. U ranoj fazi istraživanja antitumorski učinak bio je potvrđen samo na KB staničnim kulturama, različitim vrstama leukemije te jednoj vrsti karcinosarkoma, te nije bilo jasno hoće li biti djelotvoran i kod solidnih tumora. Put pretkliničkom ispitivanju i toksikološkim studijama otvoren je zahvaljujući izolaciji dovoljnih količina paklitaksela za potrebe ispitivanja na životinjama te otkriću djelovanja na različite solidne tumore. Važna prekretnica u istraživanju bilo je otkriće dr. Susan Horwitz o mehanizmu djelovanja paklitaksela koji pospješuje

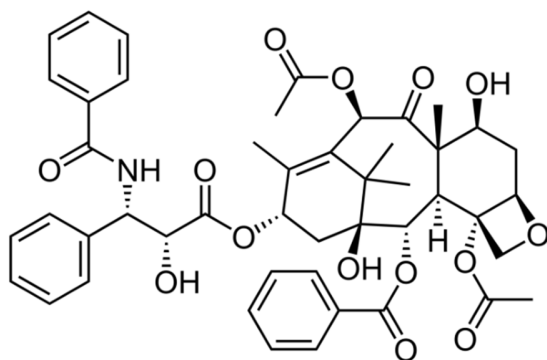
polimerizaciju tubulina. Unatoč uspješnim kliničkim rezultatima, veliku prepreku brzom razvoju i dalje su predstavljale ograničene količine kore kao jedinog prirodnog izvora lijeka. Početni postupak sakupljanja kore i ekstrakcije kasnije je zamijenila polusinteza iz 10-deacetylbatatina III dobivenog iz europske tise *Taxus baccata* L., koja se sve do danas koristi kao standardni postupak za proizvodnju paklitaksela (10).



Slika 1. Pacifička tisa sa zrelim i nezrelim plodovima



Slika 2. Kora pacifičke tise koja sadrži paklitaksel



Slika 3. Paklitaksel

Empirijska formula: $C_{47}H_{51}NO_{14}$

Kemijski naziv prema IUPAC-u: (2 α , 5 β , 7 β , 10 β , 13 α)- 4,10-diacetoksi-13-[[[(2R, 3S)-3-(benzoilamino)-2-hidroksi-3fenilpropanoil]oksi]-1,7-dihidroksi-9-okso-5,20-epoksitaks-11-en-2-il benzoat

Molekulska masa: 853.906 g/mol

Prosječna masa: 853,9 Da

Agregatno stanje: kristalni prašak

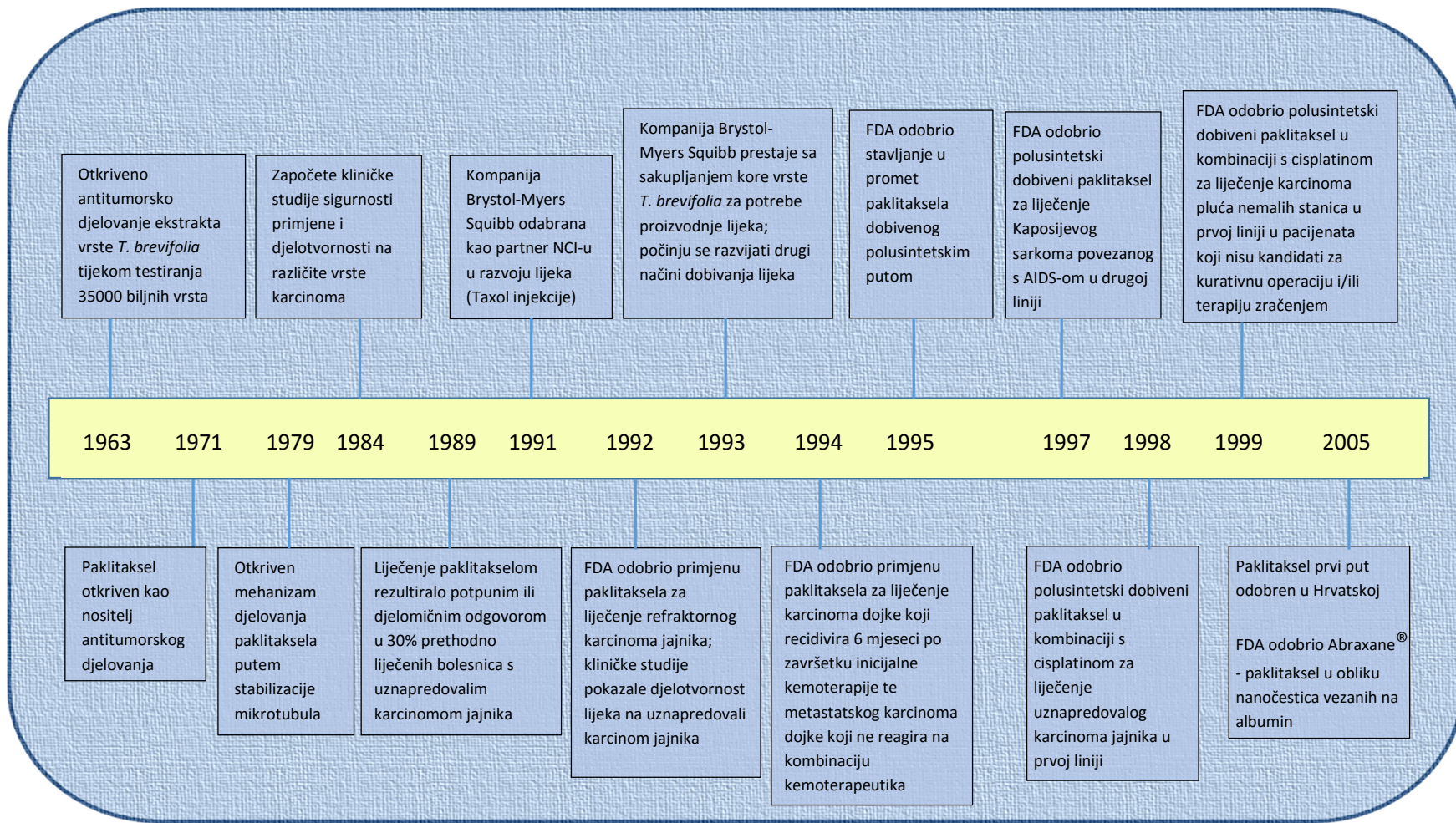
Boja: bijela

Talište: 216-217 °C

Godine 1984. započela su klinička ispitivanja faze I. Alergijske reakcije koje su bile posljedica formulacije u obliku emulzije s polioksietiliranim ricinusovim uljem umalo su zaustavile daljnja istraživanja, uzrokujući najmanje jedan smrtni slučaj. Veliki potencijal paklitaksela ipak je nadvladao početne probleme koji su riješeni produljenjem trajanja infuzije te premedikacijom, čime je ujedno povećana citotoksičnost i aktivnost *in vivo*. Već sljedeće godine započela je druga faza kliničkih ispitivanja, a prvi rezultati dobiveni 1989. godine potvrdili su djelotvornost kod karcinoma jajnika, a potom i karcinoma dojke. Godine 1992. FDA je odobrila stavljanje u promet paklitaksela za liječenje refraktornog karcinoma jajnika. Dvije godine kasnije odobren je i za liječenje refraktornog ili na antraciklin rezistentnog karcinoma dojke. Američka farmaceutska kompanija Bristol-Myers Squibb prva je razvila formulaciju lijeka paklitaksela pod nazivom Taxol (slika 4). Sažeta povijest paklitaksela prikazana je na slici 5 (11).



Slika 4. Prvi paklitaksel na tržištu zaštićenog naziva Taxol® (Bristol-Myers Squibb)



Slika 5. Paklitaksel kroz povijest (prilagođeno prema 15)

4.2. Paklitaksel u vrstama roda *Taxus* L.

Pacifička tisa, *Taxus brevifolia* Nutt., prvi je poznati izvor paklitaksela. Njegov udio u kori i iglicama prilično je nizak i varijabilan, a u osušenoj kori iznosi svega 0,01%, odnosno 0,002% u osušenim igličastim listovima. Jedno stogodišnje stablo tise može dati tek 300 mg supstancije. Stoga je za 1 kg paklitaksela potrebno oko 10 000 kg kore, što drugim riječima znači da je za tu količinu ljekovite supstancije potrebno posjeći nekoliko tisuća stabala. Problemu niske koncentracije treba nadodati spori rast biljke i ograničenost populacije.

U svrhu pronalaska boljeg izvora ljekovite tvari proučavane su druge vrste roda *Taxus* iz različitih dijelova svijeta. Vrste toga roda uglavnom su rasprostranjene u vlažnim šumama umjerenog pojasa na sjevernoj hemisferi, a rastu također u suptropskim i tropskim krajevima jugoistočne Azije i Srednje Amerike. U Sjevernoj i Srednjoj Americi rasprostranjene su četiri izvorne vrste tise karakteristične za pojedina geografska područja. Pacifička tisa (*T. brevifolia*) široko je rasprostranjena u zapadnim dijelovima Kanade i Sjedinjenih Američkih Država. Raste u područjima od Aljaske do planina Sierra Nevade u Kaliforniji, posebice u Washingtonu i Oregonu. Meksička tisa (*T. globosa*) karakteristična je za Meksiko, El Salvador, Honduras i Gvatemalu, dok je floridska tisa (*T. floridiana*) endemska vrsta sjevernog dijela Floride. Kanadska tisa (*T. canadensis*), raste na području od Newfoundlanda do Manitobe te južno od Iowe do Sjeverne Karoline. Za Europu i sjevernu Afriku karakteristična je europska (engleska) tisa (*T. baccata*), dok u istočnim područjima Azije koja uključuju Kinu, Japan, Koreju te dijelove Rusije izvorno raste japanska tisa (*T. cuspidata*). Himalajska tisa (*T. wallichiana*) rasprostranjena je na prostoru od istočnog Afganistana do Tibeta i Kine (11).

Varijabilnost u sadržaju taksana promatrana je s obzirom na paklitaksel, 10-deacetiltaksol, cefalomanin, bakatin III i taksol C. Uočene su razlike ovisno o geografskom položaju, okolišu,

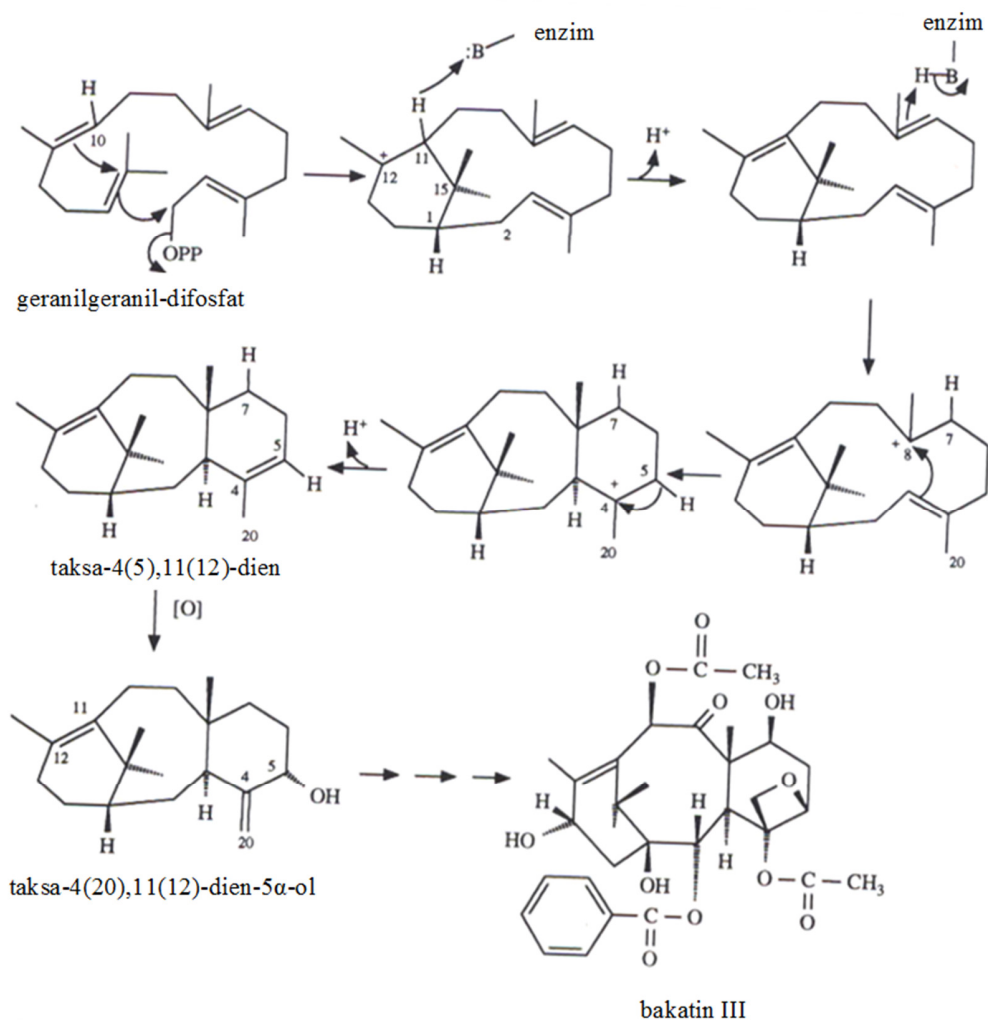
načinu uzgoja, vremenu sabiranja biljnog materijala te uvjetima čuvanja (12). Istražen je udio paklitaksela u pojedinim organima različitih vrsta roda *Taxus* (tablica 1). Udio paklitaksela bio je između 0,00003-0,0690% (13).

Tablica 1. Usporedni udjeli paklitaksela u vrstama roda *Taxus* (13)

<i>Taxus</i> sp.	Biljni materijal	Broj uzoraka	Raspon masenog udjela (%)
<i>T. brevifolia</i>	Kora	15	0,0001-0,0690
	Korijenje	8	0,0008-0,0100
	Stablo	7	0,0001-0,0120
	Stablo s korom	5	0,00003-0,0040
	Grane	8	0,0001-0,0050
	Listovi/iglice	6	0,00003-0,0030
	Grančice	6	0,0002-0,0034
	Mladice	14	0,0007-0,0150
<i>T. baccata</i>	Deblo	1	0,0009-0,0010
	Grančice	2	0,0004-0,0009
	Listovi	1	0,0030
<i>T. media</i>	Deblo	1	0,0020
	Grančice	2	0,0090
	Listovi	1	0,0020
<i>T. cuspidata</i>	Grančice	1	0,0002-0,0009

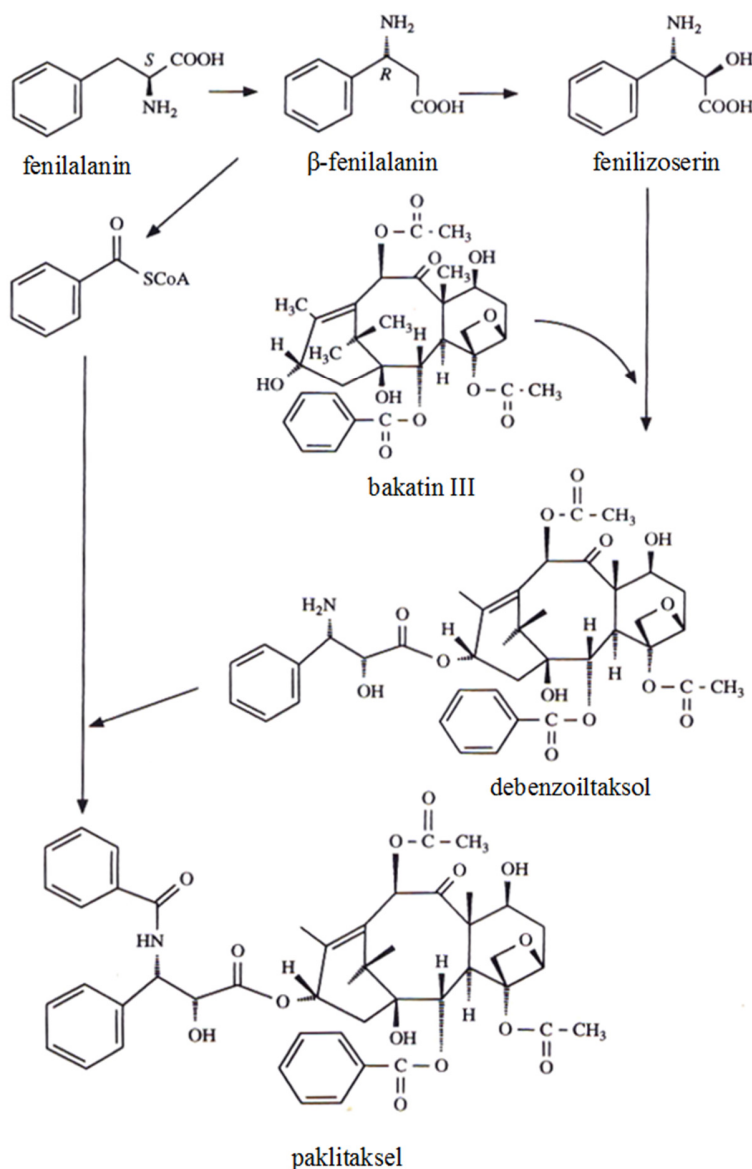
4.3. Biosinteza paklitaksela

Važan prekursor u biosintezi paklitaksela je geranilgeranil-difosfat (GGPP) koji se pomoću enzima taksadien sintaze prevodi u taksadien. Sljedeći važni koraci su oksidacija na C-5 i stvaranje dvostruke veze između C-4 i C-20 kada nastaje taksadien-5-ol, uz enzim taksadien-5-hidroksilazu. Put do bakatina III uključuje sedam koraka oksigeniranja (slika 6a), a postrani lanac nastaje iz fenilalanina.



Slika 6a. Biosinteza bakatina III (14)

Ustanovljena je intramolekularna migracija aminoskupine u fenilalaninu iz α u β položaj pomoću enzima fenilalanin-aminomutaze. Iz β -fenilalanina oksidacijom nastaje fenilizoserin. Fenilizoserin se veže s bakatinom III i nastaje debenzoiltaksol, posljednji međuprodukt u biosintezi paklitaksela (slika 6b). Na kraju se stvara amidna veza između benzojeve kiseline i fenilizoserinskog ostatka (14).



Slika 6b. Biosinteza od bakatina III do paklitaksela (14)

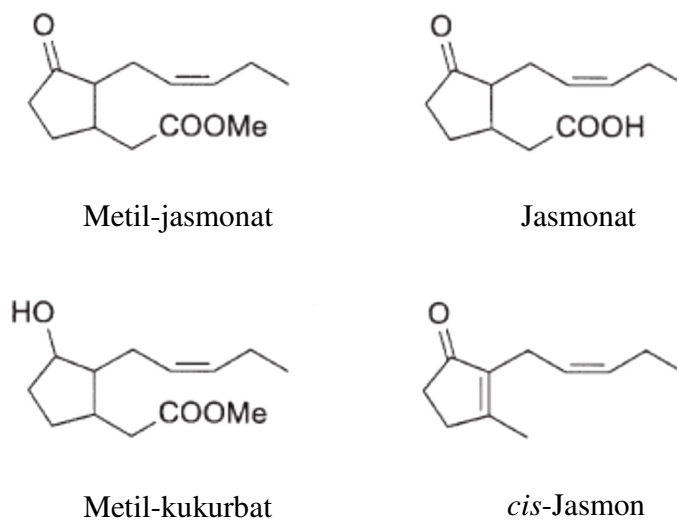
4.4. Proizvodnja paklitaksela u biljnim staničnim kulturama

Uobičajena reakcija biljaka na promjenu okolišnih uvjeta je biološki odgovor putem specifičnih mehanizama prijenosa signala. Nakupljanje paklitaksela i srodnih taksana u vrstama roda *Taxus* zapravo je biološki odgovor na specifične vanjske podražaje poput prirodnih hormona, nutrijenata, kemijskih agensa, svjetlosti te ozljeđivanja tkiva. Upravo se na tom principu zasniva i proizvodnja paklitaksela u biljnim staničnim kulturama. Praćenjem utjecaja različitih prijenosnika podražaja utvrđeno je da metil-jasmonat (MeJA) snažno stimulira proizvodnju taksana. Jasmonati inače imaju važnu ulogu u signalnim procesima koji reguliraju obrambene odgovore u biljkama. Fenil-alanin-amonij liaza ili inhibitori proteinaze, kao osnovni proteini povezani s patogeneozom, uglavnom sudjeluju u cijeljenju ozlijeđenih tkiva i u zaštiti neozlijeđenih tkiva od infekcija patogenima ili djelovanja proteaza insekata. Njihova aktivacija pomoću jasmonata događa se i u ozlijeđenom i neozlijeđenom tkivu. Razina endogene jasmonične kiseline (JA) raste kao odgovor na vanjske podražaje poput ozljeđivanja, djelovanja mehaničke sile te napada patogena. Ispitivanja su pokazala da metil-jasmonat stimulira proizvodnju paklitaksela, srodnih taksana i biosintetskog intermedijera bakatina III jače od cefalomanina. Ostali stimulatori, poput abscisinske i salicilatne kiseline, nisu pokazali učinak na stanični rast i proizvodnju taksana. Nasuprot tome, MeJA stimulira proizvodnju taksana i inhibira stanični rast. Akumulacija paklitaksela ovisna je o dozi, a najveća stimulacija uočena je pri koncentraciji MeJA od $100 \mu\text{molL}^{-1}$, a prinos paklitaksela dostiže vrijednost od 110mgL^{-1} u 14 dana.

Usporedi li se stanični prinos i proizvodnja paklitaksela u staničnim kulturama *T. baccata*, *T. brevifolia* i *T. x media* nakon obrade s MeJA, uočava se povišeni sadržaj taksana u svim staničnim kulturama, međutim, stupanj odgovora na MeJA je različit. U kontrolnim kulturama

koje ne sadržavaju MeJA najviše razine taksana proizvela je kultura *T. x media*, dok su istovremeno kulture *T. baccata* i *T. brevifolia* proizvele malo taksana. Kulture *T. x media* obrađene sa $100 \mu\text{molL}^{-1}$ MeJA proizvele su najviše razine paklitaksela i bakatina III. Istovremeno je porast paklitaksela u obrađenim kulturama *T. baccata* bio nešto niži, dok je najniži porast uočen u kulturama *T. brevifolia*.

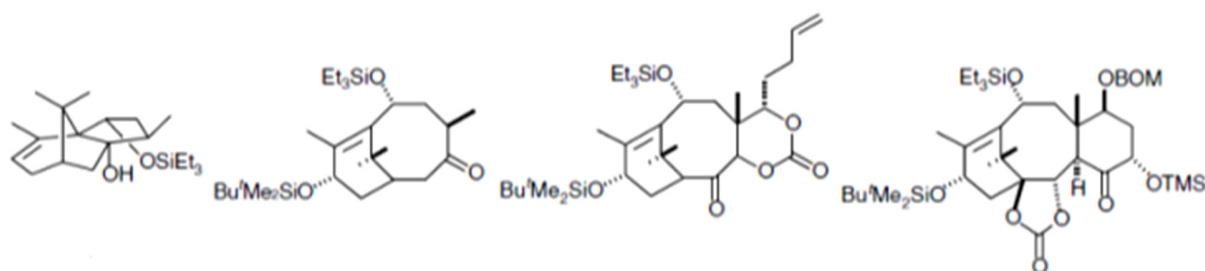
Kako bi se utvrdila strukturna obilježja bitna za stimulaciju proizvodnje paklitaksela, spojevi srodni metil-jasmonatu (slika 7) dodani su odvojeno u kulture *T. x media*. Metil-kukurbat i *cis*-jasmon imali su manji učinak na stanični prinos od MeJA-e, uz slab stimulatívni učinak na proizvodnju paklitaksela. Suprotno tome, (\pm)-jasmonat imao je najjači učinak, po intenzitetu usporediv s učinkom MeJA-e. Na temelju dobivenih podataka zaključeno je da su najmanje dva strukturna dijela MeJA-e važna za aktivnost: supstitucija octenom kiselinom ili njenim esterom na poziciji C-1 te keto skupina na poziciji C-3 (15).



Slika 7. Metil-jasmonat i srodni spojevi (15)

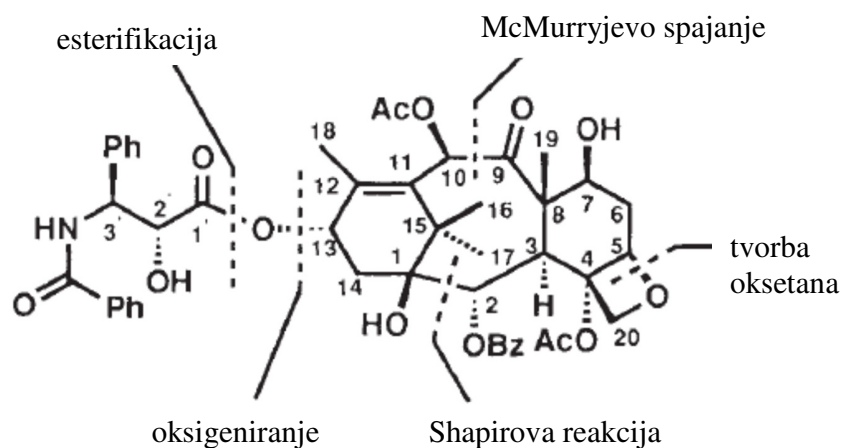
4.5. Sintetski put dobivanja paklitaksela

Struktura paklitaksela, zbog kompleksne stereokemije i jedinstvene strukture prstenova, predstavlja jedan od najvećih izazova u pogledu sintetiziranja nekog prirodnog produkta. Godine 1994. predložena su prva dva sintetska puta paklitaksela. U sintezi po Holtonu ishodna supstancija je prirodni spoj β -pačulen iz kojeg se dobivaju prstenovi A i B (16). Zatim dolazi do ciklizacije C prstena, uvođenja oksetanskog D prstena, a zatim do oksidacije na C-9 i usklađivanja stereokemije na C-9 i C-10 (17). Sinteza slijedi obrazac: $AB \rightarrow ABC \rightarrow ABCD$, kao što je prikazano na slici 8. Korištenjem komercijalno dostupnog β -pačulena dobiva se neprirodni enantiomer (+)-paklitaksel, dok bi se prirodni (-) enantiomer paklitaksela mogao dobiti uz korištenje (-)-borneola.

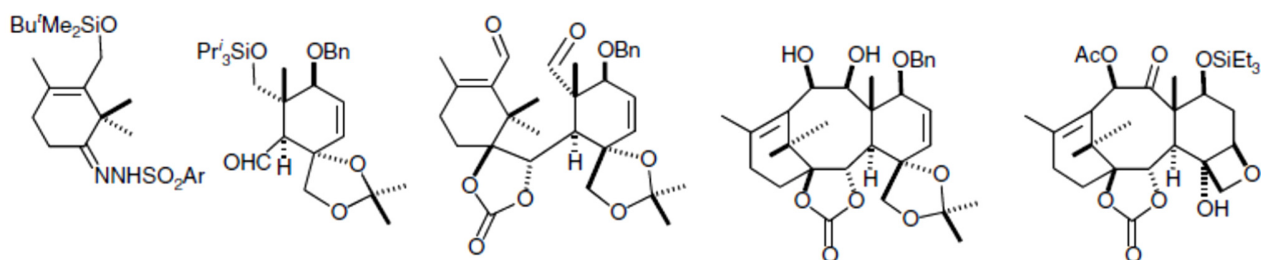


Slika 8. Prikaz sinteze prema Holtonu (3)

Drugi sintetski put (18) slijedi obrazac: $A+C \rightarrow A-C \rightarrow ABC \rightarrow ABCD$. Princip korišten u ovoj sintezi je retrosintetska analiza koja je uključila praćenje razaranja postojećih veza (slika 9). Dva fragmenta koji čine prekursore prstenova A i C spajaju se pomoću Shapirove reakcije i McMurryjevog spajanja te formiraju skelet ABC prstena na koji se nadograđuje oksetanski prsten i supstituenti na udaljenim pozicijama prstenova B i C. Zatim dolazi do oksigenacije na C-13 i konačno esterifikacije kojom se dodaje postranični lanac (slika 10).



Slika 9. Prikaz razaranja veza u molekuli paklitaksela (18)
(Ph-fenil, Obz-benzoil, Oac-acetil)



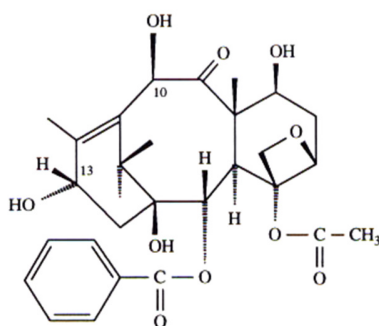
Slika 10. Prikaz sinteze prema Nicolaou (3)

Od ostalih sinteza valja istaknuti one koje su proveli Danishefsky i Wender. Danishefskyjeva sinteza (19) specifična je po tome što se oksetanski prsten formira u vrlo ranoj fazi te prolazi sve korake sinteze. Wenderova sinteza po linearnom obrascu tipa $A \rightarrow AB \rightarrow ABC \rightarrow ABCD$ podsjeća na Holtonovu. Polazna supstancija je verbenon, a potrebnih 37 koraka čini je najkraćom poznatom sintezom paklitaksela.

Zbog kompleksnosti svih dosad poznatih putova potpune sinteze paklitaksela, ekonomske neisplativosti i niskog iskorištenja, niti jedan od njih nije se nametnuo kao put izbora za komercijalnu proizvodnju te ljekovite supstancije.

4.6. Polusintetsko dobivanje paklitaksela

Početna supstancija za polusintezu paklitaksela je 10-deacetilbakatin III (10-DAB) izoliran iz igličastih listova i grančica europske tise (slika 11). Potrebno je acilirati molekulu preko hidroksilne skupine na C-10 i izvršiti esterifikaciju hidroksilne skupine na C-13 s (2'R-3'S)-N-benzoil-3'-fenilizoserinom. Najznačajniji put dobivanja s komercijalnog aspekta je onaj temeljen na metodi s β -laktamom koju su nezavisno razvili znanstvenici Holton i Ojima, a koristila ga je tvrtka Bristol-Myers Squibb (11, 14).

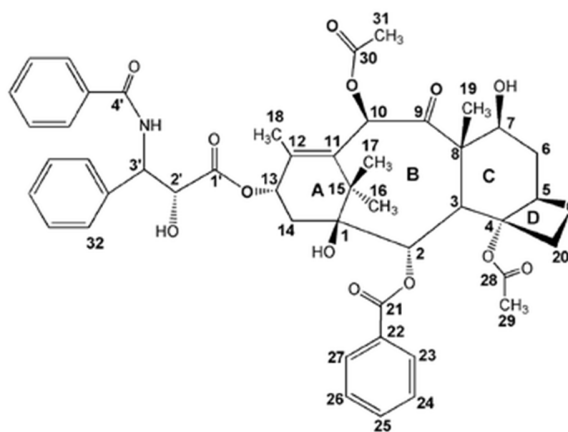


Slika 11. Struktura 10-deacetilbakatina III (14)

4.7. Odnos strukture i djelovanja paklitaksela

Za antitumorsko djelovanje paklitaksela ključan je postranični lanac na C-13. Hidroksilna skupina je esterificirana s (2'R-3'S)-N-benzoil-3'-fenilzoserinom (slika 12). Ukoliko se zaštititi hidroksilna skupina na C-2' djelotvornost se višestruko smanjuje, međutim, ako se zaštita provodi labilnom grupom, aktivnost *in vivo* bit će slična onoj ishodne strukture budući da će se protektivna skupina hidrolizirati zbog svoje nestabilne prirode. Takve se modifikacije koriste za dobivanje prolijekova paklitaksela. Istraživanja su pokazala sljedeće:

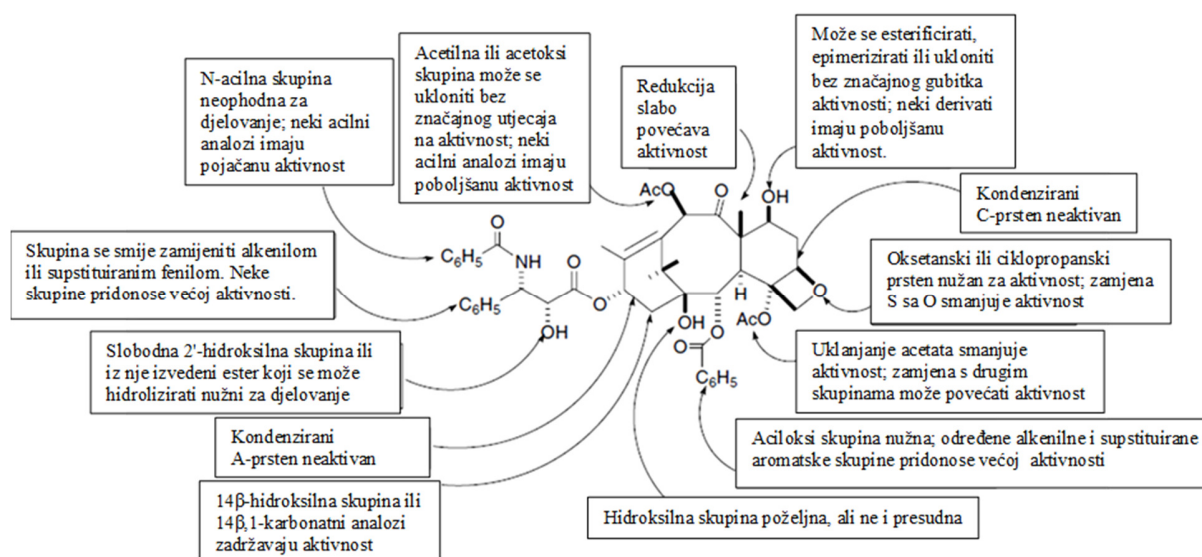
1. C-3' arilna skupina ključna je za djelovanje, dok se amidna arilna skupina može zamijeniti sličnom arilnom ili alkilnom skupinom;
2. C-3' arilna skupina neophodna je za bolju aktivnost, a zamjenom s metilnom skupinom aktivnost se smanjuje 19 puta;
3. zamjena dušika vezanog na C-3' kisikom moguća je bez značajnijeg gubitka aktivnosti;
4. stereokemija na C-2' i C-3' snažno utječe na aktivnost; 2'S,3'R izomer pokazuje značajnije manju aktivnost od prirodnog 2'R,3'S izomera, dok je aktivnost izomera 2'S,3'S i 2'R,3'R slična prirodnom (20, 21).



Slika 12. Strukturna obilježja paklitaksela (21)

Slika 13 detaljno prikazuje odnos strukture i aktivnosti paklitaksela. Postranični lanac paklitaksela kemijski je neaktivan, ali je važan za biološku aktivnost. Iako to još nije u potpunosti razjašnjeno, pretpostavlja se da ima bitnu ulogu kod vezivanja u hidrofobnu pukotinu veznog mjesta za paklitaksel, čime se stabiliziraju interakcije lijek-tubulin.

Izmjene na diterpenskom prstenu na atomima C-2, C-7 i C-10 imaju mali učinak na biološku aktivnost lijeka. Za razliku od toga, oksetanski prsten je ključan za citotoksični učinak. Radikali C-1 hidroksil, C-2 benzoiloksi i C-4 acetil također su važni za antitumorsku aktivnost. Ako se promatra gornja i donja polovica strukture paklitaksela, zaključuje se da su izmjene u gornjoj polovici bez značajnijeg utjecaja na biološki učinak, dok izmjene u donjoj polovici nisu preporučljive zbog krucijalne uloge koju taj dio molekule ima u vezanju mikrotubulina (20).



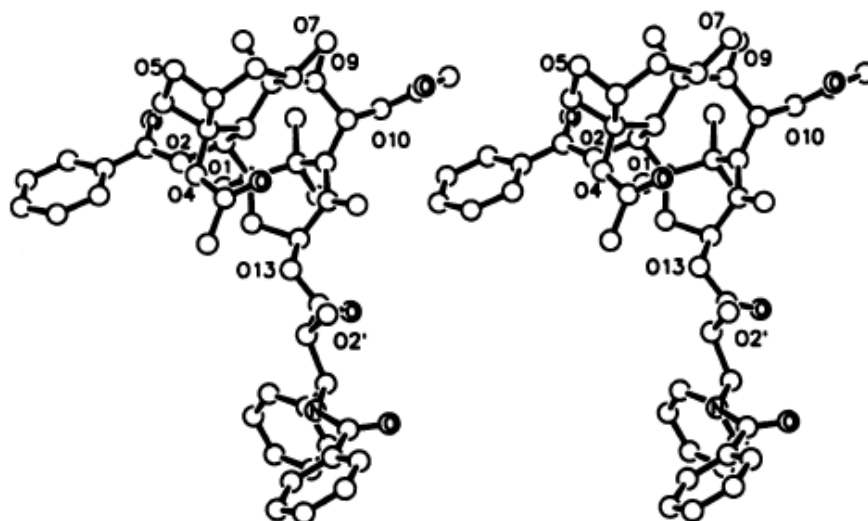
Slika 13. Odnos strukture i aktivnosti paklitaksela (3)

Sljedeći korak u istraživanju bio je otkrivanje trodimenzionalne strukture. Budući da je veza lijek-receptor uvjetovana trodimenzionalnom stereokemijom obiju komponenti, trodimenzionalna struktura lijeka važna je za njegovu biološku aktivnost. Kako bi se razjasnila trodimenzionalna struktura molekule paklitaksela korištena je NMR analiza, međutim, dobiveni su različiti rezultati o najizglednijoj konformaciji paklitaksela u otopini. Kristalografskom analizom dobiveni su nešto precizniji rezultati. Utvrđeno je da tanki pločasti kristali paklitaksela najčešće rastu na granici vodene i organske faze. Kristali su monoklinski, a dimenzije kristalne jedinice iznose $a = 9,661(1) \text{ \AA}$, $b = 28,275(3) \text{ \AA}$, $c = 19,839(2) \text{ \AA}$ te $\beta = 99,730(4)^\circ$. Kristali sadrže dvije nezavisne molekule paklitaksela u asimetričnoj jedinici te nekoliko molekula vode i otapala. Dvije nezavisne molekule paklitaksela oblikom su slične, a glavna razlika očituje se u konformaciji C-13 postranog lanca. Na slici 14 dan je stereoskopski prikaz svake molekule. Lanac C-13 nalazi se u izduženoj konformaciji u obje molekule, zbog čega su benzamidne skupine najudaljenije od grozda taksanskog prstena. Orijentacija benzoatne skupine na C-2 i acetatnih skupina na C-4 i C-10 atomima taksanskog prstena vrlo su slične u obje molekule: C-2 benzoatna skupina i C-10 acetatna skupina izdužene su u suprotnim smjerovima od taksanskog prstena i to otprilike okomito na C-13 postranični lanac. U obje je molekule acetat na C-4 usmjeren u suprotnom smjeru od benzoata na C-2 atomu, pri čemu je karbonilni kisik iz acetatne skupine smješten iznad džepa u obliku slova „U“ koji čini rigidna struktura prstena.

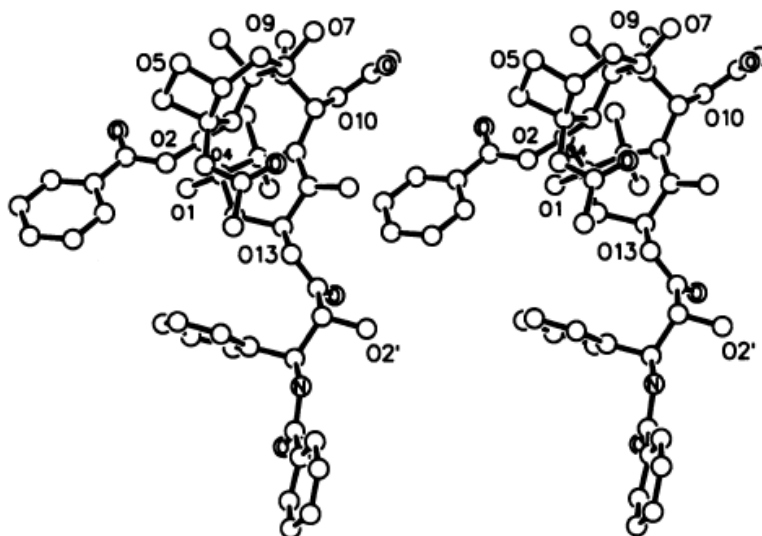
Stereokemija na C-13 atomu ključna je za biološku aktivnost paklitaksela, pa je stoga postranični fleksibilni lanac na C-13 bio cilj brojnih NMR analiza. Te studije upućuju da je u nepolarnim otapalima, poput kloroforma i metilenklorida, C-2 benzoilna skupina smještena bliže fenilamidnoj skupini nego C-3' fenilnoj. Za razliku od toga, u polarnijim otapalima C3' fenilna skupina smještena je blizu C-2 benzoilnoj i C-4 acetilnoj skupini. Kristalna struktura molekule B paklitaksela u otopini pokazuje sličan prostorni raspored strukturnih skupina kao onaj dobiven

pomoću NMR analiza u polarnim otapalima. Ovo podudaranje ukazuje da je molekula B vjerojatnija konformacija paklitaksela u odnosu na molekulu A, posebice u vodenom mediju (6).

molekula A

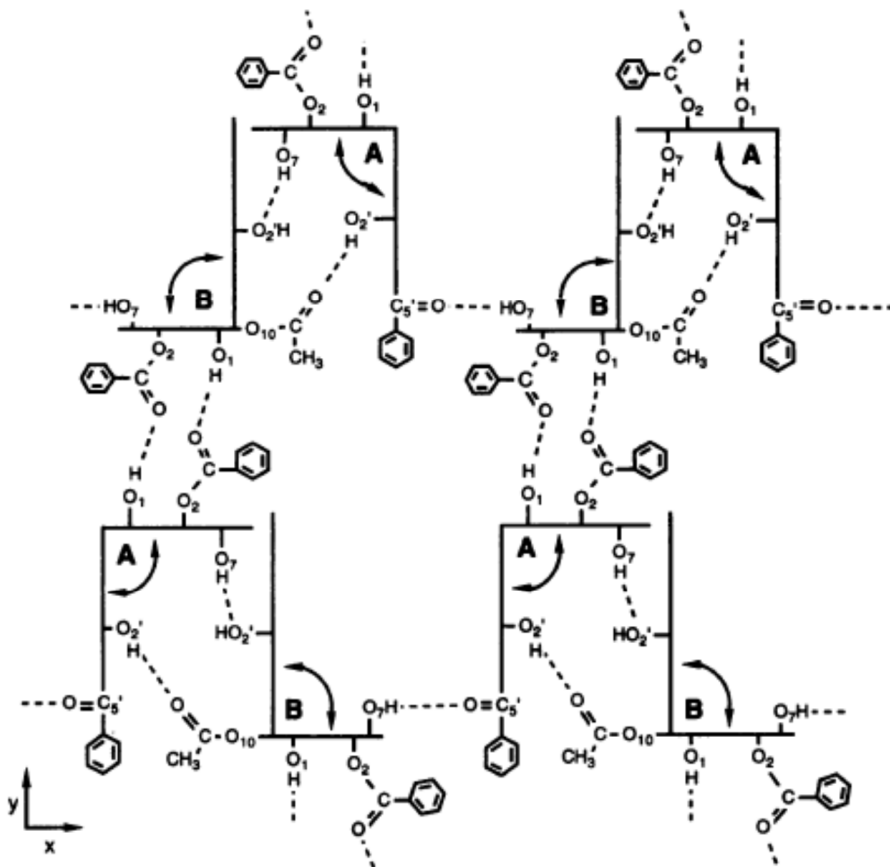


molekula B



Slika 14. Paklitaksel - stereoskopski prikaz molekula A i B (6)

Analiza mreže vodikovih veza u kristalu važan je pokazatelj na koji će se način molekula paklitaksela vezati za receptore mikrotubula. U kristalnoj strukturi paklitaksela vodikove veze uočavaju se između dviju molekula paklitaksela te između molekula paklitaksela i molekula medija. Na slici 15 dan je shematski prikaz vodikovih veza između molekula paklitaksela (6).



Slika 15. Shematski prikaz interakcija vodikovih veza između molekula A i B paklitaksela (6)

Svaka molekula simbolički je prikazana pomoću vertikalne i horizontalne linije koje označavaju rigidnu prstenastu strukturu (tzv. glava) i C-13 postranični lanac (tzv. rep). Strelice su usmjerene prema glavi i repu pojedine molekule. Vodikove veze prikazane su isprekidanim linijama.

Studije povezanosti strukture i aktivnosti na C-13 postraničnom lancu paklitaksela pokazale su da je C-2' hidroksilna skupina ključna za biološku aktivnost. C-2' hidroksilne skupine sudjeluju u vodikovim vezama i kao akceptori i kao donori. Dvije takve vodikove veze formiraju

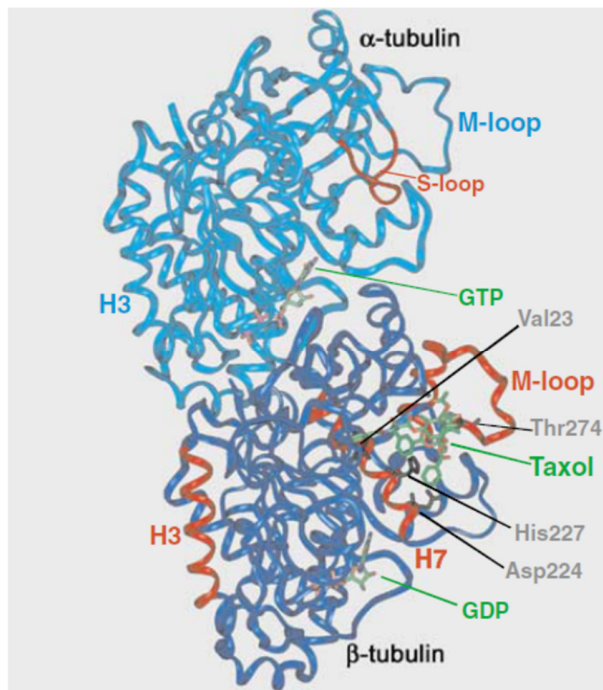
tzv. glava-rep dimernu asocijaciju između molekula paklitaksela, a treća služi za povezivanje s molekulom vode. Rezultati studija povezanosti strukture i aktivnosti te studija sposobnosti vezanja pomoću vodikovih veza ukazuju da se vezivanje paklitaksela na mikrotubule odvija upravo posredstvom vodikovih veza. Osim C-13 lanca, i C-2 benzoatna skupina pokazala se važnom za biološku aktivnost. Naime, svi aktivni derivati dobiveni iz sirovog biljnog ekstrakta sadrže benzoatnu grupu na C-2, a uklanjanje te skupine dovodi do značajnog smanjenja antitumorskog djelovanja. Hidrofobna priroda benzoata važna je kod stabilizacije orijentacije supstituenata na C-3'. To se posebice uočava kod molekule B paklitaksela, gdje blizina C-2 benzoata i C-3' fenila utječe na njihovu orijentaciju. Nadalje, vjeruje se da C-2 benzoat doprinosi biološkoj aktivnosti vezanjem na hidrofobni džep proteina tubulina (6).

4.8. Mehanizam djelovanja paklitaksela

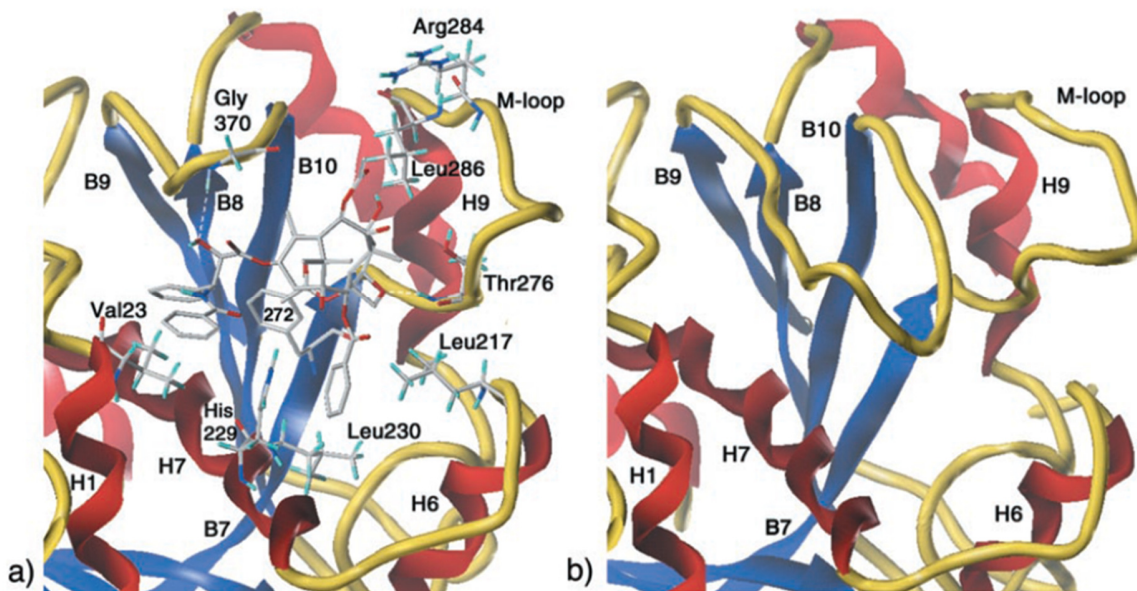
Mikrotubuli su šuplje cilindrične cjevčice koje nastaju povezivanjem heterodimera α - i β -tubulina u polimere. Tubulinski heterodimeri udružuju se u protofilamente. U uvjetima *in vivo*, mikrotubuli se u pravilu sastoje od 13 protofilamenata, a promjer im je 25 nm. Za razliku od toga, u prisutnosti paklitaksela uglavnom nastaju mikrotubuli koji se sastoje od 12 protofilamenata. Iako im je primarna uloga formiranje diobenog vretena tijekom stanične diobe, mikrotubuli su uključeni i u brojne vitalne funkcije stanice u interfazi, uključujući održavanje oblika stanice, pokretljivost, prijenos signala te unutarstanični transport. Iako monomeri α - i β -tubulina dijele samo oko 40% sekvencijske homologije, način njihova slaganja u trodimenzionalnu strukturu vrlo je sličan. Struktura svakog monomera može se podijeliti u tri glavne strukturne domene. N-terminalna domena (ostaci 1-206) sudjeluje u nukleotidnom vezivanju. Centralna domena (ostaci 207-384) je uključena u longitudinalne i lateralne kontakte između α - i β - monomera tubulina koji se ostvaruju u protofilamentima. Upravo se na hidrofobni džep unutar centralne domene veže paklitaksel (slika 16). C-terminalna domena sastoji se od dva antiparalelna heliksa koji se presavijaju preko druge dvije domene. C-terminalna domena sudjeluje u vezanju različitih regulatornih i motornih proteina, uključujući tau, MAP2 i kinezin. Vezno mjesto za paklitaksel nalazi se u dubokoj hidrofobnoj pukotini blizu površine β -tubulina, gdje se paklitaksel veže na protein pomoću tri moguće vodikove veze i višestrukih hidrofobnih veza. Zidovi pukotine sastoje se od više elemenata sekundarne strukture povezanih molekulom paklitaksela. Dijelovi heliksa H1, H6 i H7 te petlja između H6 i H7 usidreni su hidrofobnim vezama s 3'-benzamidofenilom, 3'-fenilom i 2-benzoilfenilom molekule paklitaksela (slika 17). Također, 3'-fenil je u bliskom kontaktu s B8 i B10 vrpčama β -podjedinice. NH okosnica petlje koja povezuje vrpce B9 i B10 vodikovim je vezama povezana na 2'-OH. C-4 acetat je smješten iznad

hidrofobnog utora na ostatku 10. C-8 metil je usmjeren prema M-petlji, povezujući je van der Waalsovima s dva ostatka blizu C-terminalnog završetka, Thr-276 i Gln-281. O-21 paklitaksela slabim elektrostatskim silama povezan je također s M-petljom preko Thr-276. C-12 metil smješten je u blizini Leu-371 na B9-B10 petlji. Iz svega navedenog, vidljivo je da oba postranična lanca kao i bakatinska jezgra paklitaksela sudjeluju u brojnim interakcijama prilikom vezanja na β -tubulin (7).

Kombiniranjem elektronske kristalografije i karte elektronske gustoće dobiven je prikaz na kojem se jasno uočava mjesto vezanja paklitaksela na β -tubulin, pri čemu paklitaksel zauzima tzv. konformaciju slova „T“ koja se još naziva i leptir konformacija (slika 18). Vezanje paklitaksela na β -tubulin ima za posljedicu promjenu hidrofobnih svojstava veznog mjesta (slika 19). Promjena boje do koje dolazi nakon vezanja paklitaksela i nastajanja kompleksa paklitaksel-tubulin jasno ilustrira da vezanjem paklitaksela dolazi do konverzije hidrofobne pukotine u hidrofилnu površinu (22).



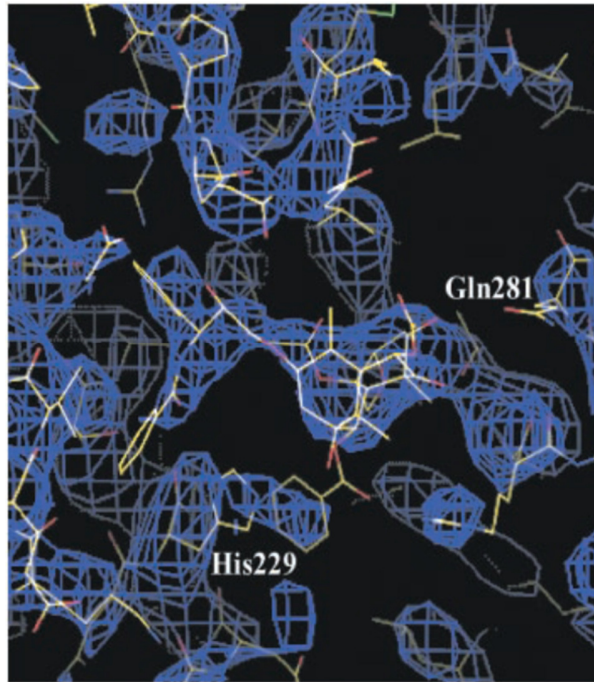
Slika 16. Trodimenzionalni model heterodimera α/β -tubulina te prikaz vezanja paklitaksela (22)



Slika 17. Prikaz sličnosti između veznog mjesta paklitaksela na β -tubulinu (a) i α B9-B10 petlje na α -tubulinu (b). α i β podjedinice imaju vrlo sličnu sekvencijsku homologiju kao i trodimenzionalni razmještaj (7)

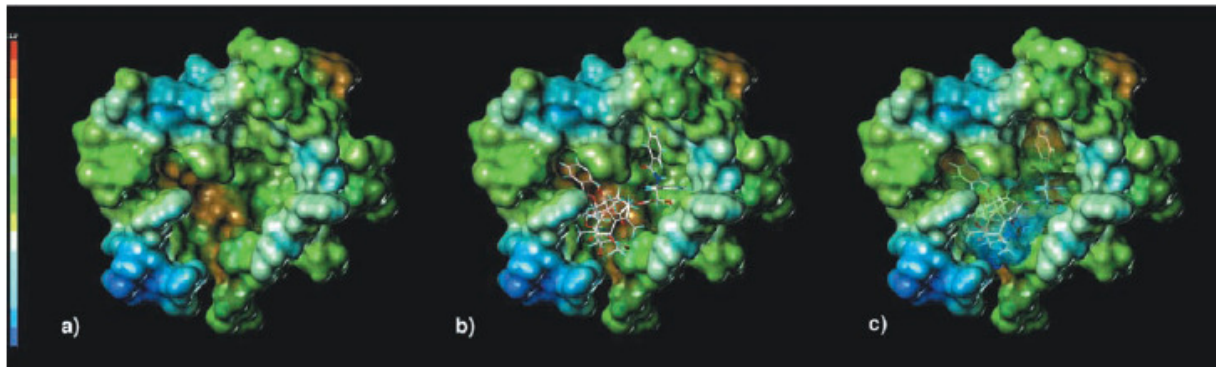
a) Prikaz vezanja paklitaksela na β -tubulin uz nastajanje kompleksa paklitaksel- β -tubulin

b) B9-B10 petlja na α -tubulinu



Slika 18. T-konformacija paklitaksela (7)

β His-229 proteina je smješten između C-3' benzamido i C-2 benzoilfenilnih prstenova molekule paklitaksela



Slika 19. Prikaz površine vezne pukotine za paklitaksel na β -tubulinu, obojane ovisno o stupnju hidrofobnosti (najhidrofobnije - crveno, najmanje hidrofobno - tamnoplavo) (7)

- a) prazno vezno mjesto za paklitaksel (narančasto)
- b) vezno mjesto zauzeto paklitakselom, uočava se dobra komplementarnost oblika molekule paklitaksela i veznog mjesta
- c) promjena boje do koje dolazi nakon vezanja paklitaksela ukazuje na konverziju hidrofobne pukotine u hidofilnu površinu

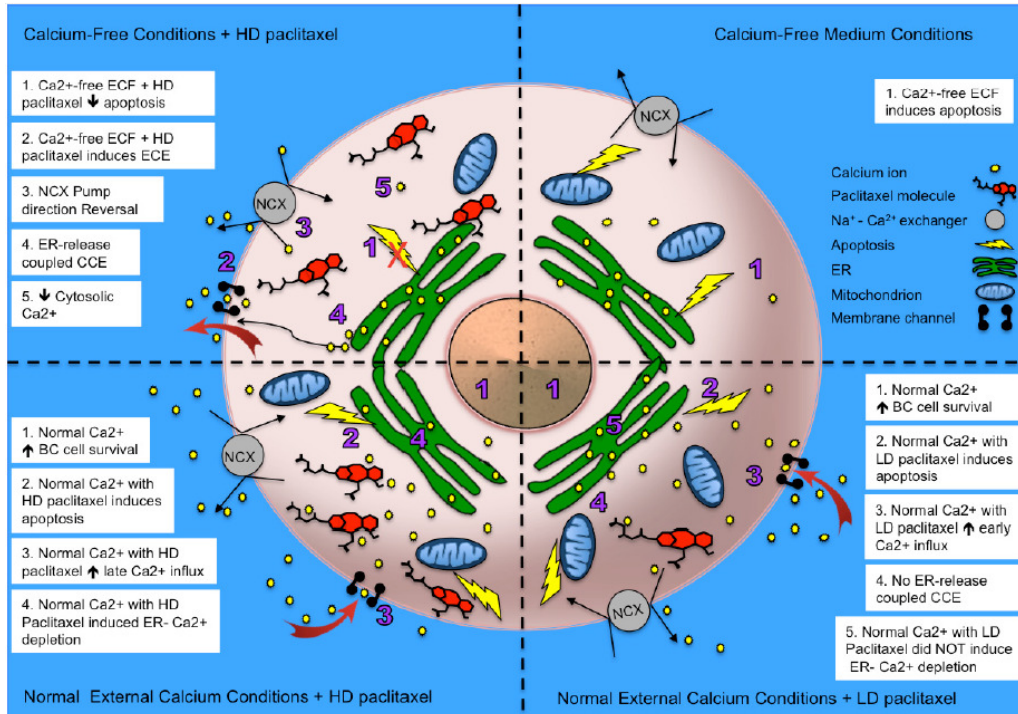
Kalcij se smatra vrlo važnim regulatorom staničnih funkcija. Normalna homeostaza kalcija nužna je za preživljavanje stanice, te ukoliko je ona poremećena imaće toksični učinak na stanicu, a može izazvati i staničnu smrt. Među različitim vrstama stanične smrti, apoptoza je glavni mehanizam kojim kemoterapeutici ubijaju stanice karcinoma. Stoga je veza između kalcija i apoptoze važna meta lijekova za liječenje karcinoma i optimiziranje terapije. Studije su pokazale da paklitaksel potiče oslobađanje apoptogenih čimbenika kao što je otpuštanje citokroma C u citosol, bilo na način da povećava propusnost mitohondrijske membrane ili putem mitohondrijskih tranzicijskih pora. No, još nije poznato na koji način paklitaksel aktivira te mehanizme, pa bi istraživanje kalcija u ulozi okidača moglo dovesti do novih spoznaja. Tako su eksperimenti na izoliranim mitohondrijima pokazali da iznimno visoke doze paklitaksela (2×10^{-5} M) izravno oštećuju unutarnju i vanjsku mitohondrijsku membranu, što dovodi do oslobađanja proapoptotičkih čimbenika iz mitohondrija. Posljedično, iz matriksa mitohondrija u citosol se oslobađa kalcij koji povoljno utječe na apoptozu. Oslobađanje kalcija iz mitohondrija najvjerojatnije je potaknuto stabilizacijom paklitaksela za mikrotubule povezane s vanjskom mitohondrijskom membranom (23).

Smatra se da endoplazmatski retikulum ima još važniju ulogu u djelovanju kalcija na apoptozu. No, niti taj mehanizam još nije u potpunosti razjašnjen. Studija Pana i Gollahona (24) pokazala je izravnu vezu između apoptoze inducirane paklitakselom, endoplazmatskog retikuluma i kalcija, u ovisnosti o dozi i vremenu izlaganja. Ista skupina znanstvenika proučavala je djelovanje paklitaksela na unos kalcija u stanicu iz izvanstaničnog medija te utjecaj istog na staničnu apoptozu kod stanica karcinoma dojke (25). Ustanovljeno je da paklitaksel potiče brzo otpuštanje kalcija iz endoplazmatskog retikuluma u citosol uzrokujući time smanjenje zaliha kalcija u endoplazmatskom retikulumu, što može biti okidač za povećani unos kalcija putem kanala i/ili nosača na plazmatskoj membrani. Ovaj unos kalcija u stanicu iz vanjskog medija,

udružen s oslobađanjem kalcija iz endoplazmatskog retikuluma (kapacitativni unos kalcija) ima za cilj osigurati kontinuirano povećanje razine kalcija u citosolu i napuniti ispražnjene zalihe kalcija u endoplazmatskom retikulumu. Otvara se, nadalje, pitanje o povezanosti unosa kalcija iz izvanstanične tekućine i paklitakselom inducirane apoptoze te koliko je izvanstanični kalcij neophodan za induciranje apoptoze.

Promatranjem utjecaja doze paklitaksela na unos ekstracelularnog kalcija utvrđeno je da visoka doza paklitaksela (10^{-6} M) značajnije potiče kapacitativni unos kalcija tek nakon 12 sati izlaganja. Pritom najprije dolazi do pojačanog otpuštanja kalcija iz endoplazmatskog retikuluma, što onda potiče unos kalcija u stanicu. Za razliku od učinka visoke doze, niža doza paklitaksela (10^{-7} M) već nakon 6 sati izlaganja izaziva povećani unos izvanstaničnog kalcija koji se dodatno povećava dužim vremenom izlaganja, međutim, niža doza paklitaksela tijekom 12 sati ne uzrokuje smanjenje zaliha kalcija u endoplazmatskom retikulumu.

Za održavanje stanica karcinoma na životu nužna je normalna vanjska koncentracija kalcija, a dugotrajni manjak izvanstaničnog kalcija može dovesti do apoptoze. Pritom je uočeno da paklitaksel i manjak vanjskog kalcija, kao dva pokretača apoptoze, mogu zasebno inducirati apoptozu. No, istodobnom primjenom nije ustanovljen aditivni niti sinergistički učinak, već se pokazalo da djeluju antagonistički. U mediju s normalnim vanjskim sadržajem kalcija paklitaksel dovodi do povećanog unosa kalcija u citosol koji dalje potiče apoptozu, dok u slučaju nedostatka izvanstaničnog kalcija paklitaksel ne može mobilizirati vanjski izvor kalcija, što posljedično dovodi do inhibicije o kalciju ovisne apoptoze. Na slici 20 prikazani su glavni učinci na stanicu ovisno o izvanstaničnoj razini kalcija i dozi paklitaksela. Iako se rezultati ne mogu izravno projicirati na kliničku sliku, izvanstanična razina kalcija u mediju dobar je pokazatelj razine kalcija u plazmi. Stoga bi prilikom procjene učinkovitosti kemoterapije trebalo uzeti u obzir plazmatsku razinu kalcija u bolesnika, osobito u slučajevima hipokalcijemije (25).



Slika 20. Glavni učinci na stanicu karcinoma dojke ovisno o izvanstaničnoj razini kalcija i dozi paklitaksela (25)

4.9. Mehanizmi rezistencije na paklitaksel

Kao i kod mnogih drugih lijekova za liječenje malignih bolesti, rezistencija na paklitaksel predstavlja ozbiljan problem pri liječenju. Neučinkovitost kemoterapije može biti povezana s vrstom tumora koja je sama po sebi otporna na lijek i/ili stjecanjem rezistencije tijekom liječenja. Iako je liječenje paklitakselom dovelo do poboljšanja u produljenju i kvaliteti života bolesnika, u velikom broju slučajeva bolest ipak s vremenom uznapreduje unatoč početnom dobrom odgovoru na lijek. Rezistencija je obično proces koji uključuje više čimbenika, a u slučaju paklitaksela mogući su različiti mehanizmi kojima bi se mogla objasniti rezistencija. Oni uključuju prenaplašenu ekspresiju transportera P-glikoproteina, promijenjen metabolizam lijeka, smanjenu osjetljivost na induktore apoptoze, promjene u dinamici mikrotubula te promijenjeno vezanje paklitaksela na staničnu metu tj. mikrotubul (22, 26).

Promjene u dinamici mikrotubula

Vezno mjesto za paklitaksel nalazi se samo na polimeriziranom tubulinu, ali ne i na dimerima. Stanične linije rezistentne na paklitaksel sadrže tzv. niskostabilne mikrotubule kod kojih je ravnoteža između dimera i polimera pomaknuta na stranu dimera. Stoga takve stanice pokazuju povećanu rezistenciju na lijekove koji se vežu na polimere te istovremeno povećanu osjetljivost na lijekove koji djeluju na dimere tubulina, poput vinblastina. Ovim bi se modelom mogao ujedno objasniti i fenomen da preživljavanje i normalan rast nekih staničnih linija rezistentnih na paklitaksel ovisi o prisutnosti niskih koncentracija paklitaksela. U tim je staničnim linijama stabilnost polimera toliko kompromitirana da je narušena normalna funkcija stanica te su za preživljavanje neophodne niske koncentracije paklitaksela. Budući da niske koncentracije lijekova koji stabiliziraju odnosno destabiliziraju mikrotubule inhibiraju dinamiku mikrotubula bez utjecaja na masu polimera, zaključuje se da je u rezistentnim staničnim linijama ravnoteža

između mikrotubula niske i visoke dinamike pomaknuta na stranu onih visoke dinamike. Dinamika individualnih mikrotubula označenih rodaminom u osjetljivim i rezistentnim staničnim linijama A549 dobivenim iz ljudskog karcinoma pluća kvantificirana je pomoću digitalne videomikroskopije. Stanične linije A549-T12 i A549-T24 koje pokazuju 9 odnosno 17 puta veću rezistenciju na paklitaksel, dobivene su na način da je roditeljska osjetljiva stanična linija kontinuirano izlagana sve većim koncentracijama paklitaksela. Pokazalo se da su tako nastale stanične linije ovisne o niskim koncentracijama paklitaksela (2-12 nM) koje su im nužne za normalan rast, te u slučaju nedostupnosti lijeka ostaju blokirane na prijelazu iz metafaze u anafazu staničnog ciklusa. Rezistentne stanične linije pokazuju povećanu dinamičku nestabilnost u usporedbi s roditeljskom osjetljivom staničnom linijom. Promjene dinamike mikrotubula u rezistentnim staničnim linijama mogu biti uzrokovane različitim mehanizmima koji uključuju promijenjenu ekspresiju izotipova tubulina, mutacije tubulina koje utječu na longitudinalne odnosno lateralne interakcije ili vezanje regulacijskih proteina, promjene na tubulinu zbog posttranslacijskih modifikacija koje uzrokuju promjene u vezivanju regulacijskih proteina, te promijenjenu ekspresiju ili posttranslacijske modifikacije regulacijskih proteina tubulina odnosno mikrotubula (27).

Promijenjena ekspresija izotipova β -tubulina

Između pojedinih izotipova β -tubulina otkrivene su prirodene razlike u načinu sklapanja, dinamici mikrotubula i interakciji s lijekovima. Do danas je otkriveno šest izotipova β -tubulina u ljudi, koji se ovisno o svojoj COOH-terminalnoj promjenjivoj regiji klasificiraju u šest klasa: I, II, III, IVa, IVb i VI. *In vitro* analizom utvrđeno je da mikrotubuli sastavljeni od β III-tubulina imaju različit način sklapanja od β II-, β IV- ili nefrakcioniranog tubulina. β III-tubulin zahtijeva najvišu kritičnu koncentraciju tubulina za sklapanje, pokazuje značajno odgođenu nukleaciju te

manju brzinu sklapanja od ostalih izotipova. Budući da su razlike u sklapanju uočene u odsutnosti proteina vezanih uz mikrotubule tj. MAP-a, zaključuje se da različiti izotipovi tubulina mogu samostalno mijenjati dinamiku mikrotubula. Tako primjerice mikrotubuli koji sadrže samo β III-tubulin pokazuju više nego dvostruko veću dinamiku od mikrotubula sastavljenih od β II- i β IV-tubulina, te su stoga manje stabilni. Istraživanja su pokazala da su mikrotubuli sastavljeni od samo β III- ili β IV-tubulina značajno manje osjetljivi na supresivno djelovanje paklitaksela nego mikrotubuli sastavljeni od β II-tubulina ili nefrakcioniranog tubulina. Na temelju ovih *in vitro* podataka može se zaključiti da se dinamika mikrotubula, a samim time i učinak paklitaksela na nju, može mijenjati ovisno o sadržaju pojedinih izotipova β -tubulina. Upravo se promijenjena stanična ekspresija izotipova β -tubulina, posebice β III i β IV, smatra važnom odrednicom u staničnoj rezistenciji na paklitaksel.

Analiza izotipova β -tubulina u staničnim linijama rezistentnim na paklitaksel provedena je korištenjem primera specifičnih za određeni izotip za RT-PCR analizu, izotop-specifičnih antitijela za *Western blot* analizu i/ili imunofluorescenciju. U ranije spomenutim rezistentnim staničnim linijama karcinoma ne-malih stanica pluća, A549-T12 i A549-T24, RT-PCR analiza je pokazala da klase III i IVa β -tubulina, koja su jedva primijećene u roditeljskoj staničnoj liniji, rastu 2-3 puta u staničnoj liniji A549-T12, te četverostruko u liniji A549-T24. Analogno, u staničnoj liniji humanog karcinoma prostate, DU-145, koja je peterostruko rezistentna na paklitaksel, u prisustvu paklitaksela došlo je do promjena u razinama ekspresije i klase III i klase IVa β -tubulina, uz četverostruko povećanje klase III.

Opsežno istraživanje na 17 staničnih linija karcinoma pokazalo je da je glavni izotip tubulina β I, na koji otpada 85-99% ukupnog β -tubulina. Kada se apsolutne vrijednosti ekspresije različitih izotipova β -tubulina usporede s osjetljivošću prema lijekovima koji djeluju na mikrotubule (paklitaksel, vinkristin, vinblastin i rizoksin) uočava se da osjetljivost na paklitaksel,

no ne i na ostala tri lijeka, korelira s razinama β III-tubulina. Povećana ekspresija β III-tubulina povezana je s rezistencijom na paklitaksel u 17 ispitivanih staničnih linija. Korelacija između ostalih izotipova β -tubulina i spomenutih lijekova nije uočena (28).

Točkaste mutacije kao uzrok promjena u dinamici mikrotubula

Analizom mutacija na β -tubulinu klase I u staničnim linijama jajnika kineskog hrčka rezistentnima na paklitaksel, uočena je skupina mutacija na leucinu 215, 217 i 228. Rezistencija u tim stanicama posljedica je mutacija koje mijenjaju dinamiku mikrotubula na način da utječu na lateralne odnosno longitudinalne interakcije važne za sklapanje mikrotubula. Destabilizacijom mikrotubula ove se mutacije suprotstavljaju stabilizacijskom djelovanju paklitaksela (29). Drugo istraživanje provedeno je na staničnim linijama rezistentnima na epotilon (mitotički inhibitor sličnog djelovanja kao paklitaksel, izoliran iz miksobakterije *Sorangium cellulosum*) u A549 i HeLa stanicama. Te su stanične linije pokazale unakrsnu rezistenciju na taksane i ne pokazuju ekspresiju MDR1 gena. Sekvencijskom analizom klase I β -tubulina iz ovih staničnih linija otkrivene su točkaste mutacije na β 292 (Gln u Glu), β 173 (Pro u Ala) i β 422 (Tyr u Tyr/Cys). Mutacije se nalaze blizu tzv. M-petlje, veznog mjesta za nukleotide i C-terminalnog dijela, regija koje su uključene u stabilizaciju lateralnih veza između susjednih protofilamenata, hidrolizu GTP-a te vezanje MAP-ova. Smatra se da ove mutacije smanjuju endogenu stabilnost mikrotubula da bi se kompenziralo djelovanje lijekova koji izazivaju stabilizaciju mikrotubula. U skladu s tim je i činjenica o istovremenom povećanju osjetljivosti ovih rezistentnih linija na spojeve koji izazivaju destabilizaciju mikrotubula, poput vinblastina i kolhicina (22).

Posttranslacijske promjene regulatornih proteina tubulina i mikrotubula

Proteini koji reguliraju dinamiku mikrotubula stupajući u interakcije s dimerima ili polimeriziranim tubulinom imaju sposobnost promijeniti osjetljivost stanice na paklitaksel. Neki od tih proteina su statmin koji djeluje kao destabilizator mikrotubula te MAP4 koji, suprotno tome, djeluje kao stabilizator mikrotubula. Statmin je topljivi citoplazmatski protein koji se veže na dimere tubulina i stimulira tzv. katastrofe mikrotubula (prijelaz iz faze rasta u fazu sažimanja). Destabilizacijska aktivnost statmina je regulirana fosforilacijom te se gubi kada je statmin u potpunosti fosforiliran. MAP4 je glavni ne-neuronski MAP u čovjeka, a njegova je stabilizacijska aktivnost također regulirana fosforilacijom. MAP4 mijenja dinamiku mikrotubula povećavajući učestalost tzv. spašavanja (postupak suprotan katastrofi). Jednako kao kod statmina, MAP4 fosforilacijom gubi stabilizirajuće djelovanje na mikrotubule. Pojačana ekspresija/aktivacija statmina, odnosno snižena regulacija/inaktivacija MAP4 proteina povećat će dinamiku i smanjiti stabilnost mikrotubula. Takve promjene u stanicama karcinoma mogu dovesti do smanjenja stabilizacijskog potencijala paklitaksela te predstavljati mehanizam rezistencije na taj lijek. Suprotno tome, djelovanje vinka alkaloida s depolimerizirajućim djelovanjem bilo bi pojačano.

Provedena je kvantifikacija razine proteina statmina i MAP4 u rezistentnim i osjetljivim A549 staničnim linijama. Razine statmina u A549-T12 i A549-T24 rezistentnim linijama dvostruko su povećane u odnosu na roditeljsku staničnu liniju. Također, u roditeljskim A549 stanicama izlaganje povišenim koncentracijama paklitaksela uzrokovalo je pomak iz nefosforiliranog aktivnog oblika statmina u potpuno fosforilirani inaktivni oblik. Znakovito je da u rezistentnim linijama navedeni pomak nije uočen. Što se tiče MAP4, roditeljska stanična linija sadržava isključivo nefosforilirani aktivni oblik proteina, u A549-T24 liniji je pretežno fosforilirani inaktivni oblik, a nešto manje rezistentna A549-T12 linija ima oba oblika proteina.

Regulacija dinamike mikrotubula djelovanjem proteina vrlo je kompleksna, pa uz spomenute proteine, statmin i MAP4, uključuje i niz drugih (22).

Promjene u vezanju paklitaksela na mikrotubule

Promatrane su dvije nezavisne stanične linije humanog karcinoma jajnika, 1A9PTX10 i 1A9PTX22, kod kojih je 24 puta povećana rezistencija na paklitaksel. Ukupni sadržaj tubulina u rezistentnim i roditeljskim staničnim linijama je sličan i sve stanice imaju istu frakciju tubulina u polimeriziranom stanju, što ukazuje na to da dinamika mikrotubula u rezistentnim linijama nije promijenjena. No, tubulin izoliran iz rezistentnih stanica slabo se polimerizira u prisutnosti paklitaksela, sugerirajući tako da nastale mutacije onemogućavaju vezanje paklitaksela. Istovremeno, te su linije i dalje osjetljive na epotilon B i 2-*m*-azido-benzoil-paklitaksel koji su značajno snažniji stabilizatori tubulina od paklitaksela. Sekvencijskom analizom β I, glavnog izotipa β -tubulina u tim stanicama, otkrivena je supstitucija Phe₂₇₀-u-valin u 1A9PTX10 stanicama, te supstitucija Ala₃₆₄-u-treonin u 1A9PTX22 stanicama. Phe₂₇₀ je blizak regiji tubulina koja je važna za stvaranje veze s prstenastom taksanskom strukturom paklitaksela. Stoga je moguće da upravo zamjena fenilnog prstena na toj poziciji manje glomaznim postraničnim lancem valina onemogućuje vezanje paklitaksela na mutirani tubulin (22).

Promjene u signalnim putovima

Ključni proteini koji posreduju u različitim signalnim putovima često su smješteni na mikrotubulima. Stoga lijekovi koji djeluju na mikrotubule, poput paklitaksela, mogu mijenjati te putove. Jedan dobro opisani primjer takvog signalnog puta koji stupa u interakciju s mikrotubulima je izvanstanična signalom regulirana kinaza (ERK1 i ERK2) koja čini dio obitelji mitogenom-aktiviranih proteinskih kinaza (MAPK). Dokazana je aktivacija ERK signalne kaskade kao odgovor na poremećaj mikrotubula. Nadalje, studije su pokazale da stupanj

aktivacije ovog signalnog puta određuje hoće li interakcija između paklitaksela i inhibicije MEK-a (enzim u MAP kaskadi) imati aditivni/sinergistički ili antagonistički učinak. Mehanizam pojačanog citotoksičnog učinka paklitaksela u prisutnosti MEK inhibitora može biti povezan sa suzbijanjem funkcije signala preživljavanja ERK/MEK puta te s pojačanom polimerizacijom mikrotubula, budući da aktivacija MAPK inhibira stabilizaciju mikrotubula (22).

Rezistencija u uvjetima in vivo

Budući da paklitaksel kao antitubulinski lijek iskazuje svoje djelovanje preko vezanja na protein β -tubulin, genetske promjene koje uzrokuju promjene na proteinu utjecat će na osjetljivost prema lijeku. Ispitivanja na staničnim linijama pokazala su da takve mutacije na β -tubulinu postoje i mogu prouzročiti rezistenciju prema različitim lijekovima koji se vežu na tubulin. No, još nisu sa sigurnošću potvrđene mutacije na klasi I β -tubulinskog gena na kliničkim uzorcima. Tihe mutacije, polimorfizmi ili promjene baza izvan kodnih regija ne mijenjaju protein te stoga nije vjerojatno da takve promjene imaju važnu ulogu u rezistenciji. Istraživanja su pokazala da su polimorfizmi na β -tubulinskom genu rijetki te da i oni koji nastaju unutar kodne regije ne mijenjaju kodiranu aminokiselinu. Kako su stanice karcinoma genetski nestabilne, pretpostavilo se da bi somatske mutacije mogle imati utjecaj na rezistenciju, ali u većini istraživanja provedenih na kliničkim uzorcima zaključeno je da somatske mutacije na β -tubulinskom genu ili nisu prisutne ili su toliko rijetke da nemaju važnu ulogu u rezistenciji na lijek. Provedene studije ne isključuju nastanak mutacija na tumoru tijekom liječenja, međutim, u istraživanju u kojem je korištena metoda analize PCR-SSCP (polimorfizam konformacije jednostruke vrpce) za usporedbu eksona 4 klase I β -tubulinskog gena u 29 pacijentica oboljelih od karcinoma jajnika prije i nakon terapije paklitakselom, nije pronađena niti jedna mutacija. Takav rezultat ide u prilog tezi da mutacije ipak nemaju značajan utjecaj na učinak lijeka. Mali

broj pravih somatskih mutacija na β -tubulinu pronađenih na kliničkim uzorcima ukazuje na to da postoje drugi važniji čimbenici koji utječu na rezistenciju, poput iznošenja lijeka iz stanice ili detoksifikacija ili promjene u razinama ekspresije različitih izotipova β -tubulina.

Kod mnogih vrsta karcinoma paklitaksel pokazuje dobar učinak, međutim, neki pokazuju rezistenciju na lijek, primjerice gastrointestinalni tumori. Smatra se da snažno djelovanje P-glikoproteina u gastrointestinalnom sustavu posreduje u rezistenciji. U prilog tome ide činjenica da pacijenti s uznapredovalim kolorektalnim karcinomom pokazuju klinički odgovor na epotilon B, koji nije supstrat za P-glikoprotein (22, 30).

Unatoč brojnim istraživanjima, kako u *in vitro* tako i u *in vivo* uvjetima, još nisu sa sigurnošću otkriveni uzroci rezistencije na paklitaksel. Buduće studije svakako će biti usmjerene na rasvjetljavanje tog problema kako bi se otkrile nove stanične mete te razvile nove poboljšane formulacije paklitaksela i njegovih analoga.

4.10. Terapijske indikacije paklitaksela

Paklitaksel je indiciran u liječenju različitih vrsta karcinoma, bilo u početnom ili uznapređovalom stadiju. Odobrene terapijske indikacije obuhvaćaju karcinom dojke, jajnika, pluća te Kaposijev sarkom (KS) povezan s AIDS-om (31).

Karcinom jajnika:

- U prvoj liniji kemoterapije karcinoma jajnika, paklitaksel je indiciran za liječenje bolesnica s uznapređovanim karcinomom ili rezidualnom bolešću (> 1 cm) nakon inicijalne laparotomije, u kombinaciji sa spojevima platine.
- U drugoj liniji kemoterapije karcinoma jajnika, paklitaksel je indiciran za liječenje metastatskog karcinoma nakon neuspjeha standardne terapije koja je sadržavala platinu.

Karcinom dojke:

- U adjuvantnoj terapiji, paklitaksel je indiciran za liječenje karcinoma dojke u bolesnica s pozitivnim čvorovima, sekvencijski nakon liječenja antraciklinima i ciklofosfamidom (AC). Adjuvantnu primjenu paklitaksela treba smatrati alternativom produljenoj AC terapiji.
- Prva linija liječenja lokalno uznapređovalog ili metastatskog karcinoma dojke u kombinaciji s antraciklinima kod bolesnika pogodnih za liječenje antraciklinima ili u kombinaciji s trastuzumabom kod bolesnica s naglašenom ekspresijom HER2 receptora (3+) koje nisu pogodne za liječenje antraciklinima.
- Druga linija kemoterapije kao monoterapija u bolesnica s metastatskim karcinomom dojke nakon neuspjeha standardnog liječenja antraciklinima ili u bolesnica koje nisu bile kandidati za takvu terapiju.

Uznapređovali karcinom pluća ne-malih stanica:

- Paklitaksel je u kombinaciji s cisplatinom indiciran u liječenju bolesnika s karcinomom pluća ne-malih stanica (NSCLC) koji nisu kandidati za potencijalno kurativni kirurški zahvat i/ili liječenje zračenjem.

Kaposijev sarkom vezan uz AIDS:

- Paklitaksel je indiciran za liječenje bolesnika s uznapređovanim Kaposijevim sarkomom vezanim uz AIDS (KS) nakon neuspjelog prethodnog liječenja liposomalnim antraciklinima (indikaciju podupire ograničen broj podataka).

4.11. Farmakokinetički profil paklitaksela

Farmakokinetički profil paklitaksela obilježava veliki volumenom distribucije, brz ulazak u većinu tkiva, dugo poluvrijeme eliminacije i značajan metabolizam u jetri. Najvažniji farmakokinetički parametri prikazani su u tablici 2. Unatoč opsežnom vezanju na proteine plazme, paklitaksel se brzo uklanja iz plazme. Volumen distribucije je velik, vrlo vjerojatno zahvaljujući svojstvu vezanja za tubulin. Jetreni oksidativni metabolizam putem citokroma P-450, bilijarna ekskrecija, eliminacija putem fecesa i vezanje na tkiva zaslužni su za većinu sistemskog klirensa, dok je bubrežni klirens praktički beznačajan. Važnost jetrenog metabolizma te bilijarne ekskrecije u raspodjeli paklitaksela moglo bi upućivati na to da je u bolesnika s oštećenom funkcijom jetre potrebno prilagoditi dozu, međutim, još uvijek nema dostupnih relevantnih podataka na temelju kojih bi se preporučila promjena doziranja u bolesnika s blago do umjereno oštećenom funkcijom jetre. Postoji preporuka da bolesnike s teškim oštećenjem jetre ne bi trebalo liječiti paklitakselom. S druge strane, zbog niskog udjela izlučivanja paklitaksela putem bubrega smatra se da prilagodba doze u pacijenata s teškim oštećenjem bubrega nije potrebna (32).

Tablica 2. Sažetak farmakokinetičkih svojstava paklitaksela (32)

Karakteristika	
Farmakokinetički profil	nelinearni
Optimalni linearni model	2-3 odjeljka
Poluvrijeme eliminacije	
2 odjeljka	~ 7 h
3 odjeljka	~ 20 h
Volumen distribucije u ravnoteži	velik, ~ 182 L/ m ²
Vršne koncentracije u plazmi	~ 5 μM (175 mg/m ² kroz 3 sata) ~ 10 μM (250 mg/m ² kroz 3 sata) ~ 0,5 μM (175 mg/m ² kroz 24 sata)
Vežanje na proteine plazme	> 95%
Distribucija u tkiva	znatna, osim u CNS i testise
Sistemska klirens	~ 350 mL/min/m ²
Renalni klirens	manje značajan, < 5-10%
Hepatički klirens	značajan, 70-80% putem fecesa
Vrsta hepatičke razgradnje	inaktivacija, hidroksilacija, citokrom P450, primarno CYP3A
Interakcije s drugim lijekovima	lijekovi koji aktiviraju i inhibiraju CYP450

Standardni put primjene paklitaksela je intravenski, a poznato je da intravenska primjena lijeka može imati povećani rizik od toksičnog djelovanja. Učinkovitost sistemske intravenske primjene može također biti smanjena zbog krvno-pleuralne barijere. Stoga se istražuju pogodniji putovi primjene kemoterapeutika. Karcinom pluća glavni je uzrok malignog pleuralnog izljeva. U pacijenata s malignim pleuralnim izljevom obično se u liječenju koristi intrapleuralna infuzija (tj. infuzija u šupljinu plućne maramice). Primjena lijekova u pleuralnu šupljinu smatra se sigurnom i učinkovitom, te je povezana s malim brojem nuspojava. Kako bi se utvrdile razlike između dva puta primjene provedena je usporedba farmakokinetičkog profila paklitaksela nakon intravenskog

i intrapleuralnog puta primjene, u plazmi, plućima i dijafragmi. U tu svrhu korišten je model štakora. Eksperiment je proveden na Sprague-Dawley odraslim muškim štakorima starosti 10-12 tjedana. Pokusne životinje (n=120) su nasumično podijeljene u dvije jednake skupine. Aplicirano im je 3 mg/kg paklitaksela intravenski u repnu venu ili u pleuralnu šupljinu. Nakon intravenske primjene, koncentracija paklitaksela u plazmi, plućima i dijafragmi naglo se smanjivala. Farmakokinetika ovako primijenjenog paklitaksela slijedi model s dva odjeljka. S druge strane, nakon intrapleuralne injekcije, paklitaksel je dosegao vršnu koncentraciju u plazmi, plućima i dijafragmi koja je postupno opadala. U ovom slučaju farmakokinetika je bolje odgovarala modelu s tri odjeljka. U usporedbi s intravenskom primjenom, intrapleuralna injekcija paklitaksela rezultirala je manjim klirensom i značajno produljenim srednjim vremenom zadržavanja. Dodatno su ustanovljene niže koncentracije paklitaksela u plazmi s učinkom produljenog oslobađanja. Vršna koncentracija u plazmi iznosila je samo 3,5% odgovarajuće koncentracije intravenski primijenjenog paklitaksela.

Sistemska izloženost paklitakselu tijekom 24 sata nakon intrapleuralne primjene, iznosila je 41,1% plazmatske koncentracije zabilježene u štakora koji su primali paklitaksel intravenski. Ovi podaci pokazuju da intrapleuralna primjena, u usporedbi s intravenskom primjenom, smanjuje sistemska izloženost paklitakselu te plazmatsku koncentraciju. Rezultati upućuju također na činjenicu da se intrapleuralnom primjenom može smanjiti sistemska toksičnost paklitaksela (33).

4.12. Toksični učinci paklitaksela

Reakcije preosjetljivosti

U prvim kliničkim ispitivanjima provedenima s paklitakselom već su u ranoj fazi I uočene posljedice toksičnog djelovanja lijeka. Veliki problem bile su ozbiljne reakcije preosjetljivosti koje su se javljale s visokom incidencijom koja je u pojedinim studijama iznosila i 25-30%. U većine bolesnika pojavile su se reakcije preosjetljivosti tipa I, poput dispneje, bronhospazma, urtikarije i hipotenzije. Reakcije su se uglavnom javljale unutar 10 minuta od primjene lijeka. Nakon prekida terapije paklitakselom, većina bolesnika se potpuno oporavila. Primijećeni su također crvenilo i osip manjeg intenziteta, s učestalošću do 40%. Reakcije preosjetljivosti povezuju se s pomoćnom tvari makroglicerolricinoleatom tj. polioksietiliranim ricinusovim uljem koje se još se naziva Cremophor EL, a ima ulogu nosača u formulaciji lijeka. Makroglicerolricinoleat potiče oslobađanje histamina koji djeluje kao posrednik u reakcijama preosjetljivosti. I drugi lijekovi koji u svojoj formulaciji sadrže Cremophor EL povezuju se sa sličnim reakcijama. Kako bi se spriječile teške reakcije preosjetljivosti, prije primjene paklitaksela svi bolesnici moraju primiti premedikaciju koja se sastoji od kortikosteroida, antagonista histaminskih H1 receptora (antihistaminika) i antagonista histaminskih H2 receptora (31, 32).

Hematološka toksičnost

Glavni toksični učinak paklitaksela je neutropenija koja nastupa obično 8 do 10 dana nakon terapije, a pacijent se oporavi u razdoblju od 15 do 21 dan. Neutropenija nije kumulativna, što ukazuje na to da je oštećenje nezrelih hematopoetskih stanica reverzibilno. Pri dozama od 200 mg do 250 mg paklitaksela po m² primijenjenog kroz 24 sata, neutropenija je obično teška čak i u pacijenata koji prethodno nisu primali mijelosupresivnu terapiju, uz vrijednosti neutrofila ispod

500 po mm³. Stoga se u kliničkim ispitivanjima pri tim dozama ispitanicima daje faktor stimulacije kolonije granulocita (G-CSF). Supresija koštane srži (prvenstveno neutropenija) oblik je toksičnosti koji ograničava dozu. Tijekom liječenja paklitakselom potrebno je učestalo pratiti krvnu sliku. Paklitaksel se ne smije ponovno primijeniti dok se broj neutrofila ne vrati na razinu $\geq 1,5 \times 10^9/L$ ($\geq 1 \times 10^9/L$ za bolesnike sa KS), a broj trombocita bude $\geq 100 \times 10^9/L$ ($\geq 75 \times 10^9/L$ za bolesnike s KS). U kliničkom ispitivanju Kaposijeva sarkoma većina bolesnika primala je faktor stimulacije granulocitnih kolonija. Kritičnim farmakološkim pokazateljem težine neutropenije smatra se duljina vremena u kojem je koncentracija lijeka u plazmi viša od biološki aktivne koncentracije, čime je dan odgovor na pitanje zašto je neutropenija teža kod duljih infuzija. Povišena temperatura i infektivna stanja relativno se rijetko pojavljuju. Uočeno je također da sam paklitaksel rijetko izaziva tešku trombocitopeniju i anemiju (31, 32).

Neurotoksičnost

Živčane stanice ovise o transportu i širenju signala na putu između tijela stanice i aksona. Da bi se ti procesi mogli odvijati nužna je normalna funkcija mikrotubula. Vezanje paklitaksela na β -tubulinsku podjedinicu mikrotubula dovodi do pretjerane stabilizacije mikrotubula i poremećaja u njihovoj funkciji. Posljedično, dolazi do promjena u strukturi i funkciji neurona, što se klinički manifestira kao neuropatija. Stupanj oštećenja neurona ovisi o vrsti lijeka, kumulativnoj dozi te trajanju terapije. Paklitaksel izaziva perifernu neuropatiju koju karakteriziraju senzorni simptomi poput utrnulosti i parestezije u tzv. distribuciji „čarapa i rukavica“. Često postoji simetričan gubitak osjeta u najudaljenijim predjelima koji se prenose putem velikih (propriocepcija, vibracija) ili malih vlakana (temperatura, ubod igle). Simptomi se mogu javiti već nakon 24 do 72 sata nakon primjene viših doza ($>250 \text{ mg/m}^2$), no najčešće se javljaju tek nakon više ciklusa standardnih doza (135 do 250 mg/m^2). Teška se neurotoksičnost rijetko uočava kod standardnih

doza, čak i u pacijenata koji su ranije primali druge neurotoksične lijekove poput cisplatina. No ipak, neuropatija ima limitirajući utjecaj na dozu lijeka, bolna je i često ireverzibilna. Može nastati također motorna i autonomna disfunkcija, posebice pri primjeni visokih doza te u bolesnika koji u svojoj anamnezi već imaju neuropatiju uzrokovanu dijabetesom ili alkoholizmom. Nadalje, moguće su smetnje očnog živca i/ili poremećaji vida (scintilirajući skotom), uglavnom u bolesnika koji uzimaju veće doze od preporučenih. Prolazna mijalgija česta je pri dozama iznad 170 mg/m^2 , a obično se javlja 2 do 5 dana nakon primjene lijeka. Mioopatija je uočena nakon primjene visokih doza paklitaksela (250 mg/m^2) u kombinaciji s cisplatinom. (31, 34).

Kardiotoksičnost

U kliničkim ispitivanjima uočeni su poremećaji srčanog ritma. Najčešće se javlja bradikardija, no zbog nje nije potrebno prekinuti terapiju paklitakselom. Kardiološki simptomi su uočeni u ispitivanjima u kojima se provodilo kontinuirano kardiološko praćenje. U pravilu su asimptomatski i reverzibilni. Pretpostavlja se da bradiaritmije uzrokuje paklitaksel, budući da i drugi srodni taksani utječu na provođenje srčanih impulsa, a slični poremećaji uočeni su u ljudi i životinja nakon gutanja listova i plodova tise. Tijekom primjene paklitaksela, primijećene su također hipotenzija i hipertenzija koje su obično asimptomatske i uglavnom ne zahtijevaju liječenje. Kod svih bolesnika preporuča se učestalo praćenje vitalnih znakova, naročito tijekom prvog sata intravenske primjene paklitaksela. Ozbiljne kardiovaskularne nuspojave češće se opažaju u bolesnika s karcinomom pluća ne-malih stanica nego u bolesnika s karcinomom dojke ili jajnika. Pokazalo se da u kombinaciji s antraciklinima paklitaksel pojačava kongestivne kardiomiopatije antraciklina. Stoga je kod kombiniranja ovih lijekova potrebno pomno pratiti funkciju ventrikula tijekom liječenja (31, 35).

Ostale vrste neželjenih učinaka

Mučnina, povraćanje i proljev javljaju se vrlo često. Više doze mogu izazvati mukozitis, osobito u bolesnika s leukemijom koji su skloni oštećenjima mukozne barijere. Paklitaksel uzrokuje alopeciju, a kod kumulativne terapije i gubitak svih dlaka na tijelu. Na mjestu primjene te duž vene moguće su upale, a često se javlja edem, bol, eritem i induracija (31).

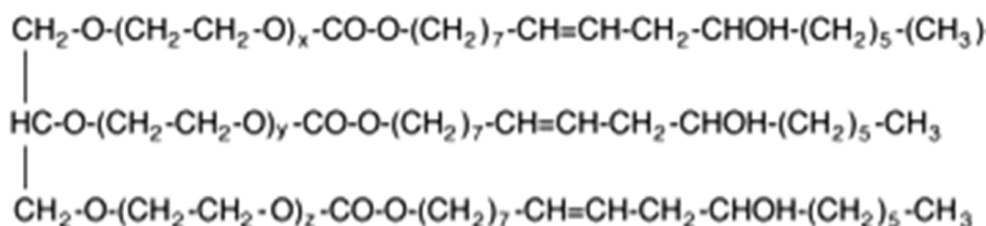
4.13. Formulacije lijeka

Kao i kod mnogih drugih slabo topljivih lijekova, u formulaciji paklitaksela nalazi se Cremophor EL koji ima ulogu nosača. Iako se u početku mislilo da je Cremophor EL (CrEL) inertan, novije studije ukazuju da pokazuje različite biološke učinke, od kojih su neki od kliničkog značaja. Primjena Cremophora EL povezuje se s teškim anafilaktoidnim reakcijama preosjetljivosti, hiperlipidemijom, poremećajima u profilu lipoproteina, agregacijom eritrocita te perifernom neuropatijom. Farmakokinetika CrEL-a je neovisna o dozi, iako na klirens značajno utječe trajanje infuzije. Taj je podatak važan jer CrEL može utjecati na raspoloživost lijeka mijenjajući koncentraciju nevezanog lijeka putem micelarne inkapsulacije. Dokazano je da CrEL, kao sastavni dio formulacije lijeka, može mijenjati toksikološki profil protutumorskih lijekova koji se primjenjuju konkomitantno, mehanizmima koji nisu vezani za kinetičko međudjelovanje.

Paklitaksel je supstancija netopljiva u vodi (< 0,03%), slabo topljiva u oktanolu, propilenglikolu i butanolu, topljiva u CrEL-u, etanolu, metanolu, kloroformu, acetonu i eteru, te lako topljiva u dimetilacetamidu. U tijeku razvoja, formulacija koja sadrži 50% CrEL i 50% bezvodnog etanola, u skladu s Farmakopejom SAD-a (USP), odabrana je za daljnji razvoj. Formulacija paklitaksela koju je razvila kompanija Bristol-Myers Squibb sadrži 30 mg paklitaksela otopljenog u smjesi CrEL i bezvodnog etanola u omjeru 1:1 V/V.

Neionski surfaktant CrEL je bijela do gotovo bijela viskozna tekućina s molekulskom masom od oko 3 kDa i specifičnom težinom 1,05–1,06 (25 °C). Dobiva se reakcijom ricinusova ulja s etilenoksidom u molarnom omjeru 1:35. Ricinusovo ulje je bezbojno ili blijedožuto ulje koje se dobiva iz sjemenki biljke *Ricinus communis* L. Iznimno je visoke viskoznosti, sastoji se uglavnom od glicerida ricinolne, izoricinolne, stearatne i dihidroksistearatne kiseline. CrEL je obično promjenjivog sastava, a najzastupljeniji su oksietilirani trigliceridi ricinolne kiseline (polioksietilirani glicerolni triricinoleat 35). CrEL (slika 21) se koristi kao nosač za solubilizaciju

različitih vrsta hidrofobnih lijekova, među ostalima i paklitaksela. Količina tako primijenjenog CrEL u prosjeku iznosi 5 mL, no paklitaksel je iznimka jer je primijenjena količina CrEL tijekom jednog davanja znatno viša, te iznosi otprilike 26 mL. Zbog toga je važno razmotriti moguće biološke učinke CrEL tijekom terapije paklitakselom.



Slika 21. Cremophor EL ($x + y + z \sim 35$) (36)

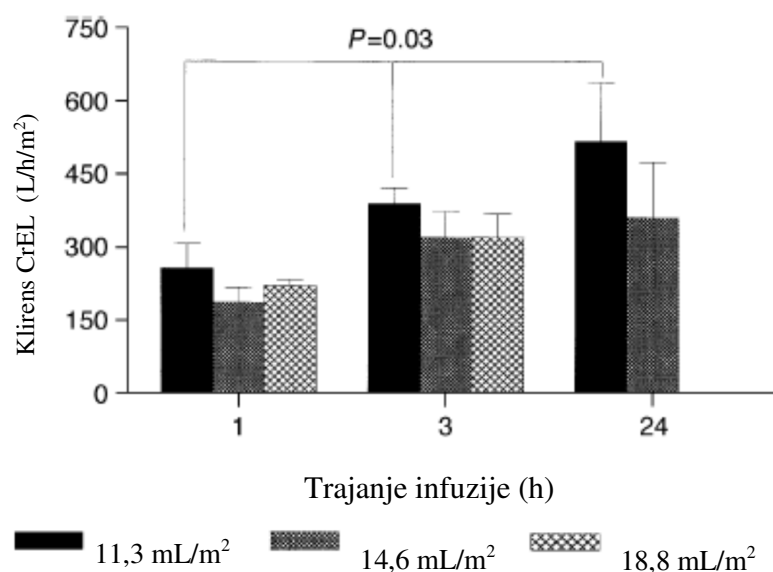
Najznačajniji neželjeni učinak paklitaksela formuliranog s CrEL su akutne reakcije preosjetljivosti. Unatoč primjeni premedikacije, manje reakcije preosjetljivosti (naleti vrućine, osip) javljaju se u 41-44% bolesnika, a teže i potencijalno životno ugrožavajuće u 1,5-3% bolesnika. Studije pokazuju da aktivacija CrEL u ljudskom serumu ovisi o koncentraciji (uz najnižu razinu CrEL potrebnu za aktivaciju reda veličine 2 $\mu\text{L/mL}$) koja se u plazmi klinički lako postiže nakon primjene standardnih doza paklitaksela. Poznat je također podatak da su koncentracije CrEL niže s produljenim trajanjem infuzije, što se očituje u manjoj incidenciji reakcija preosjetljivosti kod takvih režima. Pored reakcija preosjetljivosti uočeni su i drugi biološki učinci CrEL: promjene profila lipoproteina i hiperlipidemije, neurotoksičnost, obrat u aktivnosti P-glikoproteina, *in vitro* citotoksičnost. CrEL mijenja gustoću lipoproteina visoke gustoće (HDL) te mijenja gradijent iz HDL u lipoproteine niske gustoće (LDL). Visoke koncentracije CrEL mogu uzrokovati hiperlipidemiju, uz moguće promjene oblika eritrocita i leukocita (35).

Aksonalna degeneracija i demijelinizacija se svrstavaju među glavne nuspojave paklitaksela i dovode do periferne neuropatije, a pripisuju se također Cremophoru EL. Plazmatske razine CrEL koje se postižu nakon terapijskih doza paklitaksela i ciklosporina A (također u formulaciji sadrži CrEL) uzrokuju oticanje aksona, vezikularnu degeneraciju i demijelinizaciju dorzalnih ganglijskih neurona u štakora. U pokusnim životinjama koje su dobivale [³H]-paklitaksel bez CrEL u perifernom živčanom sustavu nije pronađen paklitaksel, što ukazuje da sâm paklitaksel nije odgovoran za neurotoksične pojave. Nakon primjene lijeka docetaksela, taksanskog kemoterapeutika kemijski sličnog paklitakselu, učestalost neuroloških nuspojava bila je 10 puta manja. Činjenica da se u formulaciji docetaksela umjesto CrEL koristi Tween 80 ukazuje da je CrEL odgovoran za neurotoksične pojave. Tu pretpostavku dodatno podupire činjenica da intravenski primijenjen ciklosporin A uzrokuje neurotoksičnost u oko 25% pacijenata, dok je nuspojava rijetka kod oralno primijenjenog lijeka. Naime, CrEL se zbog intestinalne razgradnje ne apsorbira nakon oralne primjene. Neurotoksična svojstva CrEL najvjerojatnije su potaknuta ostatnim nezasićenim masnim kiselinama, uslijed nastanka produkata peroksidacije.

Ustanovljeno je da CrEL može u uvjetima *in vitro* modificirati aktivnost P-glikoproteina, membranskog proteina koji sudjeluje u transportu brojnih lijekova. P-glikoprotein se nalazi u povišenim koncentracijama u tumorskim stanicama, uzrokujući unakrsnu rezistenciju na lijekove. Ta aktivnost CrEL nije potvrđena u uvjetima *in vivo*, vjerojatno zbog vrlo malog volumena distribucije.

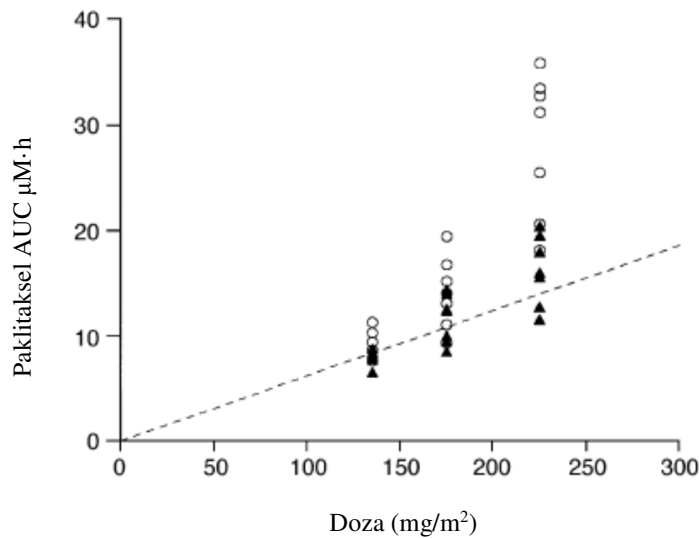
Citotoksična svojstva CrEL najprije su uočena u staničnim linijama humanog karcinoma dojke rezistentnima na doksorubicin, što je kasnije potvrđeno i na drugim vrstama karcinoma. Mehanizam citotoksičnosti povezuje se s nastajanjem slobodnih radikala peroksidacijom polinezasićenih masnih kiselina i/ili s izravnim učinkom CrEL na staničnu membranu, čime dolazi do poremećaja protoka i propuštanja kroz membranu (36).

Kliničke studije farmakokinetike Cremophora EL nakon infuzije paklitaksela pokazuju o dozi ovisno ponašanje. Nakon produljenja vremena infuzije s 1 na 3 i 24 sata klirens CrEL se povećava sa 160 na 300 odnosno 400 mL/h/m² (slika 22). Na temelju toga zaključuje se da CrEL pokazuje linearnu farmakokinetiku ovisnu o dozi ali i ovisnu o režimu primjene, koji može biti povezan sa zasićenjem serumske metaboličke razgradnje posredovane esterazom. Ovisnost o režimu primjene dovodi do povećanja sistemske raspoloživosti, te posljedično povećanja bioloških nuspojava skraćivanjem infuzije. Primjerice, veći je rizik od alergijskih reakcija kod 1-satne infuzije paklitaksela naspram 3-satne odnosno 24-satne infuzije. Volumen distribucije CrEL je iznimno nizak, što ukazuje na to da je njegova tkivna (i tumorska) raspoloživost beznačajna (36).



Slika 22. Ovisnost klirensa CrEL o režimu primjene, prikazana kao funkcija trajanja infuzije u pacijenata s karcinomom koji su liječeni različitim dozama paklitaksela: 135 mg/m² (CrEL: 11,3 mL/m²), 175 mg/m² (CrEL: 14,6 mL/m²) i 225 mg/m² (CrEL: 18,8 mL/m²) (36)

Brojne studije su pokazale da CrEL mijenja farmakokinetiku lijekova, između ostalog i paklitaksela. Prva ispitivanja na miševima pokazala su da se s povišenjem doze smanjuje klirens paklitaksela, te da je površina ispod krivulje koncentracija-vrijeme (AUC) veća kod lijeka koji u formulaciji sadrži CrEL, u odnosu na lijek koji je formuliran s Tween 80, sugerirajući da je CrEL odgovoran za nelinearnost distribucije. Unatoč činjenici da se s CrEL-formulacijom postižu znatno više koncentracije paklitaksela u plazmi, razine lijeka u tkivima bile su približno iste neovisno o formulaciji. Najprije se smatralo da je nelinearna farmakokinetika paklitaksela posljedica utjecaja CrEL na P-glikoproteinima posredovanu biliarnu sekreciju, koji na taj način smanjuje izlučivanje paklitaksela. Novija istraživanja pokazuju da CrEL utječe na farmakokinetiku paklitaksela putem inkapsulacije lijeka unutar CrEL micela, uzrokujući promjene u staničnoj raspodjeli te odnosu koncentracije između krvi i plazme. Micele koje nastaju uklapanjem paklitaksela predstavljaju glavni nosač lijeka u sistemskej cirkulaciji. Postotak ukupnog paklitaksela uklopljenog u micelle neproporcionalno raste s višim dozama primijenjenog CrEL. Hipoteza da je nelinearna farmakokinetika paklitaksela povezana s promjenama koncentracije CrEL u ovisnosti o vremenu potvrđena je u studiji na pacijentima s karcinomom koji su primali rastuće doze od 135, 175 i 225 mg/m² paklitaksela. Pokazalo se da je klirens paklitaksela ovisan o dozi, pri čemu je najmanji klirens uočen kod najviše doze (slika 23). U skladu s *in vitro* podacima, nelinearna raspoloživost paklitaksela u plazmi uzrokovana je o dozi ovisnom razinom CrEL u krvi. Stoga je nemicelarna, odnosno slobodna frakcija paklitaksela u plazmi bolji farmakokinetički pokazatelj toksičnosti na temelju kojeg je potrebno odrediti doziranje paklitaksela, budući da nevezana frakcija lijeka može prolaziti kroz biološke barijere i stupati u interakciju s odgovarajućim strukturama u tumorskim tkivima.



Slika 23. Utjecaj doze na površinu ispod krivulje (AUC) za koncentraciju u plazmi (krugovi) i krvi (trokutići) kod pacijenata s karcinomom koji su liječeni trima različitim dozama paklitaksela (135, 175 i 225 mg/m²). Što je veći AUC, to je manji klirens lijeka. (36)

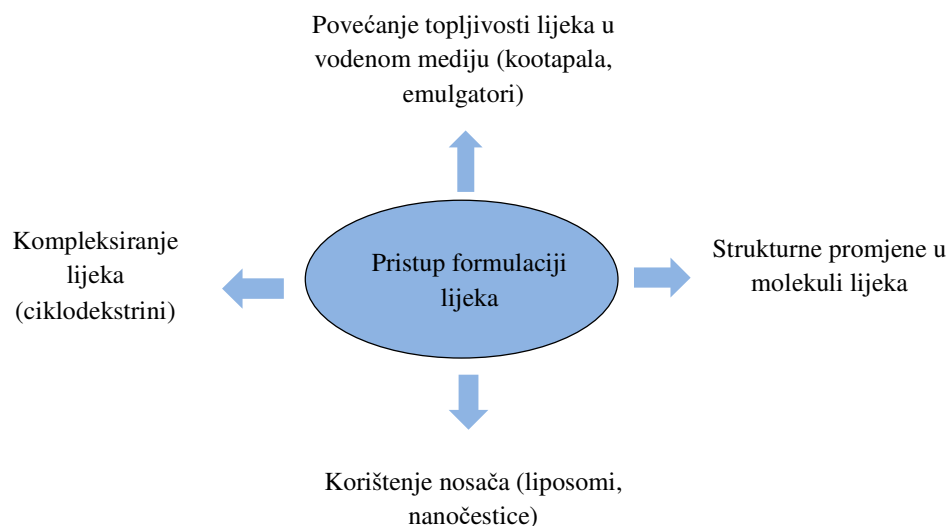
Osim utjecaja na raspodjelu paklitaksela, primjena CrEL povezuje se s promjenama u farmakodinamici brojnih lijekova koji se primjenjuju konkomitantno s paklitakselom. Primjerice, klinička ispitivanja kombinirane terapije paklitaksela i cisplatina otkrila su važne razlike u toksičnosti koje ovise o redoslijedu primjene dvaju lijekova. Kada se paklitaxsel primjenjuje prije cisplatina mijelotoksičnost se javlja rjeđe, što se ne može povezati s promjenama u farmakokinetici. Za razliku od toga, kod kombinacije paklitaksela s karboplatinom nije uočena veza između redoslijeda primjene i toksičnih nuspojava ili promjena u farmakokinetici. Jedan od mehanizama koji čini podlogu ovim klinički važnim interakcijama povezan je sa selektivnom inhibicijom nakupljanja cisplatina u stanicama periferne krvi i koštane srži djelovanjem CrEL, koja ne utječe na protutumorsko djelovanje. Iz toga proizlazi da su klinički učinci koji se uočavaju kod kombinirane primjene cisplatina iza kojeg slijedi paklitaxsel posljedica mijeloprotektivnog učinka cisplatina posredovanog Cremophorom EL. Suprotno ovom

pozitivnom učinku CrEL kod kemoterapije cisplatinom, studije su pokazale da je pri kombiniranoj primjeni paklitaksela i doksorubicina CrEL povezan s klinički važnim kinetičkim i dinamičkim interakcijama koje značajno utječu na ukupni toksikološki profil. Dolazi do izrazitog smanjenja klirensa doksorubicina, osobito kad se paklitaksel daje prije antraciklina, što rezultira znatnim pogoršanjem mukozitisa i hematološke toksičnosti. Stoga se u ovoj kombinaciji preporuča doksorubicin primijeniti prije paklitaksela. Pritom treba imati na umu da i samo male promjene u doziranju i trajanju infuzije mogu uzrokovati nepredvidive farmakodinamičke posljedice. Slične interakcije s CrEL uočene su kod primjene etopozida, epirubicina i metabolita irinotekana SN-38. Intenzitet ovih interakcija velikim dijelom ovisi o lijekovima koji se kombiniraju, primijenjenoj dozi paklitaksela i CrEL te ukupnom trajanju infuzije lijekova primijenjenih u sekvenci.

Kod primjene lijekova koji sadrže CrEL potrebno je obratiti pozornost na vrstu primarnog spremnika i primijenjenih setova za infuziju, budući da CrEL može dovesti do oslobađanja DEHP [di-(2-etilheksil) ftalat] iz plastificiranih, polivinilkloridnih (PVC) spremnika (infuzijskih vrećica i setova) u mjeri koja se povećava s vremenom i koncentracijom. Zbog toga može doći do razvoja teške hepatičke toksičnosti. Količina oslobođenog DEHP ovisi o koncentraciji nosača, vremenu kontakta između nosača lijeka i spremnika te vrsti seta za infuziju koja se koristi za primjenu lijeka. Stoga za pripravu, čuvanje i primjenu razrijeđenog paklitaksela treba upotrebljavati opremu koja ne sadrži PVC. Proizvođači preporučuju upotrebu staklenih, polipropilenskih ili poliolefinskih spremnika (37).

4.14. Novi pristupi u formulaciji lijeka

Kako je ranije opisano, nuspojave kod primjene paklitaksela povezuju se s otapalom Cremophor EL koje se koristi u svrhu poboljšanja topljivosti slobodnog paklitaksela. Zabilježene su teške anafilaktičke reakcije te periferna neuropatija. Stoga su posljednjih godina opsežna istraživanja usmjerena na pronalazak novih taksana 2. generacije, s ciljem povećanja selektivnosti, djelotvornosti, sposobnosti prodiranja u središnji živčani sustav te smanjenja toksičnih učinaka i pojave rezistencije. U tu svrhu korištene su različite strategije (slika 24) kao što je upotreba nanočestica, razvoj analoga, prolijekova ili poliglutamnatnih emulzija.



Slika 24. Različiti pristupi formulaciji paklitaksela (38)

Prolijekovi i povećanje topljivosti

Za razliku vodenog medija u kojem je paklitaxsel slabo topljiv, u organskim otapalima dobro se otapa. Tako se mogu pripremiti otopine milimolarnih koncentracija s različitim alkoholima (metanol, etanol, tert-butanol) te dimetilsulfoksidom. Osim toga, paklitaxsel ne posjeduje funkcionalne skupine koje bi se mogle ionizirati u farmaceutski primjenjivom rasponu te se stoga promjenom pH ne može povećati njegova topljivost. Uobičajeni pristup povećanja topljivosti

dodavanjem nabijenih kompleksirajućih agenasa ili stvaranjem različitih soli lijeka nije primjenjiv u slučaju paklitaksela.

Povećanje topljivosti lijeka u vodenom mediju može se postići sintezom prolijekova. Preferirana pozicija za pripravu prolijeka je 2' budući da mnogi 2'-acil-paklitaksel derivati u krvnim odjeljcima prilično brzo hidroliziraju u paklitaksel. Sintetiziran je i C-7 esterski prolijek, budući da C-7 hidroksilna skupina nije ključna za citotoksičnost. Nadalje, sintetiziran je i ester paklitaksela sa snažnim elektron akceptorskim supstituentima, poput alkoksi grupe u α -poziciji estera, kako bi se ubrzalo hidrolitičko cijepanje. Navedeni spojevi na staničnim linijama tumora pokazuju citotoksično djelovanje usporedivo djelovanju paklitaksela. Dodatno, ljudska plazma katalizira oslobađanje djelatnog paklitaksela. Često korištena molekula za povećanje topljivosti je polietilenglikol (PEG). Radi se o amfifilnoj makromolekuli, raspona mase od 2-12 kDa, koja osigurava bolju topljivost konjugata hidrofobnih organskih spojeva ili proteina u vodenom mediju, produžujući im vrijeme poluživota i povećavajući imunogenost (38).

Kootapala

Slabi elektroliti i nepolarne molekule lijeka često su slabo topljivi u vodenom mediju. Topljivost im se može povećati dodavanjem otapala koje se miješa s vodom, a u kojem je lijek dobro topljiv. Takva se otapala nazivaju kootapala. Ona koja se miješaju s vodom često se koriste u formulaciji intravenskih lijekova netopljivih u vodi. Negativna strana ove metode je pojava precipitacije nakon dodatka smjese kootapala intravenskoj tekućini ili krvi. Stoga je u takvim slučajevima potrebno primijeniti iznimno sporu infuziju kako bi se spriječila precipitacija. Nosač koji se sastoji od etanola i polisorbata 80 (Tween) te se prije primjene razrjeđuje u otopini glukoze pogodan je za davanje paklitaksela. Navedeni nosač prethodno je primijenjen u formulaciji drugog citostatskog lijeka iz skupine taksana, docetaksela. Istraživan je i sistem

kootapala koji se sastoji od etanola, polisorbata 80 (Tween) i površinski aktivne tvari Pluronic L64 u volumnom omjeru 3:1:6. Paklitaksel je solubiliziran u navedenom sistemu kootapala pri koncentraciji od 5 mgmL⁻¹. Kroz tri mjeseca nisu uočene promjene u kemijskoj i fizičkoj stabilnosti, no nakon razrjeđivanja s vodom na koncentraciju 3,45 mM otopina je fizički stabilna samo tri dana (38).

Emulzije

Emulzije tipa ulje u vodi (U/V) također se koriste za formulaciju paklitaksela. Kao uljna faza koristi se triacetin koji se pokazao kao odličan solubilizator paklitaksela. Solubilnost paklitaksela u triacetinu iznosi 75 mgmL⁻¹. Ipak, kad se otopina razrijedi oko 9 puta s 5%-tnom dekstrozom u intravenskom setu za infuziju javlja se spora precipitacija. Pripremljena je smjesa emulzije i liposoma s kukuruznim uljem, fosfatidilkolinom iz jaja, kolesterolom i paklitakselom. Pod mikroskopom nije uočen kristalizirani lijek čak niti pri visokim koncentracijama ulja i koncentraciji paklitaksela od 5 mgmL⁻¹ u suvišku. Plazmatski klirens pojedinih lipidnih komponenti pokazuje da je formulacija stabilna nakon intravenske primjene. Dobru stabilnost pokazuju i formulacija paklitaksela sa smjesom ulja, fosfatidilkolinom iz jaja, Tween 80 i otopinom glicerola, kao i emulzija koja sadrži benzilbenzoat i tributirin. Navedene formulacije ne uzrokuju iritacijske učinke i flebitis u zečeva, što je česta pojava kod formulacija s Cremophorom EL, kompatibilne su s uobičajenim pomoćnim tvarima, a nuspojave su rijetke. Patentirana je također formulacija u obliku U/V emulzije u kojoj je paklitaksel uklopljen u ulje šafranike (*Carthamus tinctorius* L.) i vodu. Otopina paklitaksela u ulju dobivena je korištenjem izopropanola kao kootapala koje je uklonjeno, zatim dispergiranjem u vodi primjenom lecitina kao surfaktanta. Na taj način je pripravljena stabilna U/V emulzija. Za podešavanje osmolarnosti

dodan je glicerin. Formulacija je također kompatibilna s uobičajenim pomoćnim tvarima, a nuspojave su rijetke (38).

Formiranje micela

Formiranje micela važan je pristup solubilizaciji hidrofobnog lijeka u hidrofilnom mediju, pri čemu se hidrofobni lijek fizički zarobi u biorazgradivoj miceli koja služi kao nosač lijeka, bez kovalentnog vezanja s micelom. Polimerne micelle su nosači antitumorskih lijekova koje omogućavaju pasivni ciljani učinak lijeka, prikladne jer su strukturno jake te stoga što zbog svoje veličine čestica (20-100 nm) ne ostaju zarobljene u retikuloendotelnom sustavu, za razliku od liposoma. Pri formiranju micela važno je da se koriste netoksični, biorazgradivi polimeri koji se metaboliziraju u tijelu. Pomoću *N*-laurilkarboksimetilkitozana (LCC) pripremljene su micelle paklitaksela veličine manje od 100 nm koja se smatra učinkovitom za pasivni ciljani učinak lijeka na tumor. Koncentracija paklitaksela u ovoj micelarnoj otopini vrlo je visoka te dostiže vrijednost od $2,37 \text{ mgmL}^{-1}$, što je 1000 puta više od koncentracije u zasićenoj otopini paklitaksela pri pH 7,4. Paklitaksel uklopljen u ovakve micelle pokazuje veći citostatski učinak nego niske koncentracije slobodnog paklitaksela. Druga formulacija uključuje solubilizaciju paklitaksela u vodenom mediju primjenom miješanih micela soli žučnih kiselina i fosfolipida. Solubilizacijski potencijal takvih miješanih micela povećava ukupnu koncentraciju lipida te porast molarnog omjera žučne soli/fosfolipidi. Kako bi se postigla optimalna stabilnost preporuča se čuvanje formulacije u liofiliziranom obliku. Na staničnim linijama dokazano je da paklitaksel zadržava citotoksični učinak kada je formuliran u obliku miješane micelarne otopine. Nadalje, za isti solubilizacijski potencijal miješane micelle pokazuju nižu toksičnost od uobičajenog bezvodnog nosača koji sadrži Cremophor EL. Na temelju navedenog zaključuje se da je paklitaksel uklopljen

u micelle topljiv u vodi te ne izaziva uobičajene nuspojave povezane s nosačem Cremophor EL (38).

Liposomi

Stvaranje liposoma kao nosača lijekova uključuje raznovrsne metode, pri čemu često dolazi do značajnih promjena u farmakokinetičkim i farmakodinamičnim svojstvima lijekova, što može imati za posljedicu smanjenje toksičnosti i povećanje učinka. Liposomi se sastoje od jednog ili više vodenih odjeljaka okruženih lipidnim membranskim dvoslojem. Budući da sadrže hidrofilni dio, hidrofobni dio i međupovršinsku regiju, mogu se koristiti za uklapanje lijekova različitih fizikalnih obilježja. Optimalni učinak postiže se formiranjem liposoma od smjese L-dimiristolfosfatidilkolina (DMPC) i L-dimiristolfosfatidilglicerola (DMPG) u molarnom omjeru 7:3 i 9:1, uz dodatak 5% kolesterola. Ustanovljena je veća *in vitro* citotoksičnost liposomalnog paklitaksela na L1210 stanicama nego za slobodni lijek. Razvijen je i liposomalni terapijski sustav koji sadrži paklitaksel i fosfolipid u molarnom omjeru 1:33, dobiven iz fosfatidilglicerola i fosfatidilkolina (1:9 molarni omjer). Takav sustav je stabilan dulje od 2 mjeseca pri temperaturi od 4 °C, te 1 mjesec pri 20 °C, a zadržava porast inhibitornog djelovanja slobodnog lijeka *in vitro* na različitim tumorskim staničnim linijama. Maksimalna tolerirana doza (MTD) sustava je >200 mgkg⁻¹, što je iznad vrijednosti za slobodni paklitaksel koji ima MTD 30 mgkg⁻¹ za *i.v.* primjenu te 50 mgkg⁻¹ za *i.p.* primjenu. Pored konvencionalnog liposomalnog paklitaksela razvijeni su dugocirkulirajući pegilirani liposomi paklitaksela. Usporedbom je ustanovljeno da su pegilirani liposomi manje stabilni tijekom čuvanja od konvencionalnih te imaju niže oslobađanje lijeka u plazmu pri 37 °C. Konvencionalni liposomi nakon 2 i 48 sati pokazuju istu citotoksičnost kao i slobodni lijek, dok pegilirani liposomi dostižu istu citotoksičnost tek nakon 48 sati. Lijek uklopljen u konvencionalne liposome pokazuje značajne razlike u farmakokinetici u usporedbi sa

slobodnim lijekom. Pegilirani liposomi su dugocirkulirajući, uz poluvrijeme eliminacije od 48,6 sati, dok vrijeme polueliminacije za konvencionalne liposome iznosi 9,27 sati. Studije biodistribucije također pokazuju značajno smanjenje uklanjanja pegiliranih liposoma putem retikuloendotelnog sustava u jetri i slezeni 0,5 i 3 sata nakon injektiranja u odnosu na konvencionalne liposome. Kako bi se omogućilo uklapanje većih koncentracija paklitaksela razvijen je novi liposomalni sustav na način da je u vodi topljivi prolijek 2'-mPEG esterski derivat paklitaksela uklopljen u lipidnu vezikulu. Liposomi koji sadrže 2'-mPEG(5000)-paklitaksel pokazuju najbolji učinak u pogledu stabilnosti, djelotvornosti uklapanja i koncentracije lijeka ($6,5 \text{ mgmL}^{-1}$) (39). Citotoksična aktivnost *in vitro* ovog liposomalnog prolijeka slična je onoj konvencionalnog paklitaksela. Najznačajnija promjena u farmakokinetičkom profilu prolijeka u odnosu na liposomalne formulacije sa slobodnim lijekom je u vremenu zadržavanja lijeka u plazmi, koje je dulje kod liposoma koji sadrže 2'-mPEG(5000)-paklitaksel.

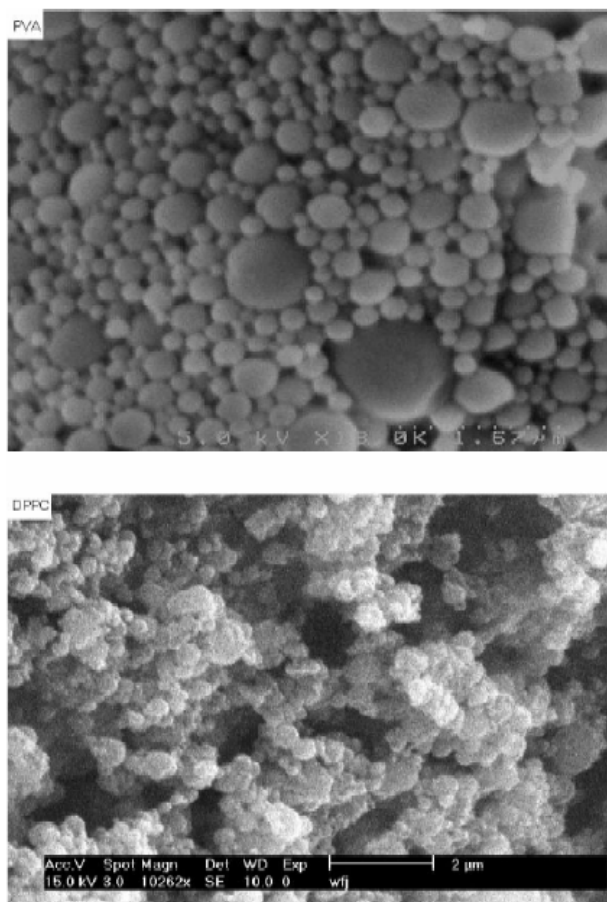
Iako su liposomalni lijekovi uključeni u brojna klinička istraživanja, njihovo korištenje za ciljanu dopremu lijeka je ograničeno zbog slabe djelotvornosti uklapanja, nestabilnosti lijeka, brzog istjecanja lijeka iz formulacije te niske stabilnosti tijekom čuvanja. Problemi stabilnosti prevladani su razvojem novih vezikularnih sustava za dopremu lijeka poput neionskih površinski aktivnih vezikula tzv. niosoma, no potrebna su daljnja istraživanja kako bi se liposome učinilo optimalnim oblikom za ciljanu dopremu lijekova (38).

Mikročestice i nanočestice

Prednost uporabe biorazgradivih polimernih mikrokapsula i nanokapsula za kontroliranu primjenu antitumorskih lijekova očituje se u povećanju djelotvornosti i smanjenju sistemskih nuspojava. Nanočestice pritom imaju prednost nad mikročesticama. Nanočestice omogućavaju

primjenu i u obliku intravenske i intramuskularne injekcije kao i supkutane primjenu, smanjujući na taj način neželjene učinke. Ranije formulacije mikročestica paklitaksela s poli(ϵ -kaprolaktonom) ili smjesom etilenvinilacetata i poli(d,l-laktatne kiseline) nisu bile pogodne za kliničku primjenu zbog presporog oslobađanja lijeka. Kako bi se postiglo brže oslobađanje paklitaksela pripremljene su mikročestice pomoću kopolimera laktatne i glikolatne kiseline (PLGA) manje molekulske mase. U mikročestice je dodan i aditiv izopropilmiristat koji povećava brzinu oslobađanja lijeka, ali nema utjecaja na površinsku morfologiju niti degradaciju mikročestica. Mehanizam oslobađanja lijeka iz mikročestica primarno je difuzija lijeka u matriks (40).

Posljednjih desetljeća razvijene su nanočestice s paklitakselom izrađene od biorazgradivih polimera tehnikom uklanjanja otapala liofilizacijom. Umjesto tradicionalnog emulgatora polivinilalkohola (PVA) korišteni su fosfolipidi koji omogućuju stvaranje kvalitetnije ovojnice te se postiže bolji emulgirajući učinak (41). Rentgenska fotoelektronska spektroskopija (XPS) pokazala je da je površina nanočestica prekrivena emulgatorom. Karakteristike površine u velikoj mjeri ovise o korištenom emulgatoru, pri čemu je površina nanočestica s 1,2-dipalmitoilfosfatidilkolinom (DPPC) puno glađa od onih s PVA. To se može objasniti gušćim pakiranjem DPPC na površini nanočestica (slika 25).



Slika 25. Čestice s kopolimerima laktatne i glikolatne kiseline (PLGA) i nanočestice (gore) i nanočestice od PLGA s DPPC (dolje) snimljene skenirajućim elektronskim mikroskopom (41)

U usporedbi s nanočesticama s PVA kao emulgatorom, nanočestice s DPPC imaju sličnu veličinu i raspodjelu veličina čestica, ali puno veću uspješnost uklapanja lijeka, na temelju čega se zaključuje da je DPPC pogodniji emulgator za proizvodnju nanočestica. Potrebna je puno manja količina DPPC (~1/40 PVA) kako bi se dobile nanočestice slične uspješnosti uklapanja. DPPC ima veću tendenciju razmještanja po površini, u potpunosti prekriva površinu nanočestica i djeluje kao dobar stabilizator, te na taj način sprečava agregaciju. Količina emulgatora je ključna za veličinu čestica i uspješnost uklapanja lijeka. Prevelika količina emulgatora (PVA i DPPC) dovodi do smanjene uspješnosti uklapanja lijeka u nanočestice jer se molekule lijeka vežu na

molekule emulgatora u suvišku, što dovodi do gubitka lijeka u proizvodnom procesu. Profil oslobađanja *in vitro* sličan je za oba emulgatora (PVA i DPPC) i uključuje inicijalni nagli skok nakon kojeg daljnje oslobađanje paklitaksela ide gotovo ravnomjerno. Glavna razlika uočena je u brzini oslobađanja. Budući da je glavni mehanizam oslobađanja lijeka difuzija kroz mikrošupljine i mikropore na površini nanočestica, morfologija ima važnu ulogu. Nanočestice s DPPC imaju manje pora na površini kroz koje je moguća difuzija lijeka od nanočestica s PVA pa je brzina oslobađanja niža, čime se postiže produženo otpuštanje lijeka. Oslobađanje može trajati do 6 mjeseci pa čak i duže. Uspoređen je utjecaj različitih dužina alkilnog lanca i nezasićenih fosfolipida na nanočestice. Fosfolipidi s kraćim i zasićenim lancem formiraju manje nanočestice i imaju puno bolju uspješnost uklapanja lijeka od onih s dužim i/ili nezasićenim lancem. Polimerne nanočestice posjeduju sve prednosti liposomalne dopreme lijeka, uz dodatno prevladavanje ograničavajućih obilježja liposoma poput niske uspješnosti uklapanja, nestabilnosti lijeka i curenja lijeka iz liposoma. Dodatno, nanočestice zahvaljujući vrlo maloj veličini mogu ekstravazirati na patološkom mjestu, kao što je solidni tumor, putem mehanizma pasivne ciljane dopreme lijeka (38).

Tablica 3. Uspješnost uklapanja lijeka i srednja veličina nanočestica od poli(laktatne/glikolatne kiseline (PLGA) izrađenih s različitim emulgatorima u različitim koncentracijama (41)

Emulgator	Uspješnost uklapanja lijeka (%)	Srednja veličina nanočestica (nm)
PVA (2% w/w)	40,2	973,5±41,0
PVA (4% w/w)	22,9	801,0±38,0
DPPC (0,05% w/w)	44,9	571,0±89,0
DPPC (0,1% w/w)	34,0	633,0±134,0

PVA – polivinilalkohol, DPPC – 1,2-dipalmitoilfosfatidilkolin

Ciklodekstrini

Ciklodekstrini su oligosaharidi koji se koriste za povećanje topljivosti, brzine oslobađanja lijeka i bioraspoloživosti slabo topljivih lijekova. Koriste se također za povećanje stabilnosti lijekova i poboljšanje intravenskih formulacija. U svrhu poboljšanja topljivosti, paklitaksel je uklopljen u kompleks hidroksipropil- β -CD (HP β CD) koji pokazuje bolju topljivost od nekompleksiranog paklitaksela. Zbog stereokemijske strukture paklitaksela, za formiranje kompleksa najpogodniji su β - i γ -ciklodekstrini koji posjeduju velike šupljine u koje lako ulazi velika kondenzirana taksanska prstenasta struktura i velika fenilna skupina na C-13 esterificiranom postraničnom lancu. Utvrđeno je da β -ciklodekstrini povećavaju topljivost paklitaksela za 950 puta ili više, te se klinički djelotvorna koncentracija paklitaksela lako postiže. Paklitaksel s ciklodekstrinima pretežno formira komplekse drugog reda, pri čemu su kompleksi sa HP β CD stabilniji od onih s HP γ CD ili γ CD. Paklitaksel je stabilniji u otopini ciklodekstrina nego u puferskoj otopini jednake pH vrijednosti. Najveća stabilnost postiže se pri pH 3-5. Dodatno poboljšanje stabilnosti paklitaksela ostvaruje se dodatkom etanola. Unatoč postignutim poboljšanjima, ciklodekstrini imaju veliku prepreku za formulacije s paklitakselom. Naime, lijek ima tendenciju taloženja iz ciklodekstrin-lijek kompleksa nakon razrjeđenja u vodenom mediju, zbog čega je potrebno koristiti visoke koncentracije ciklodekstrina koje mogu dovesti do hemolize. Stoga je potrebna daljnja optimizacija terapijskih sustava paklitaksela s ciklodekstrinima (38).

Pripravci za lokalnu primjenu

Jedan od terapijskih pristupa liječenju solidnih tumora je kirurško uklanjanje, nakon čega slijedi zračenje i/ili sistemska kemoterapija kako bi se ubile maligne stanice koje nisu uklonjene te spriječio razvoj metastaza i ponovni rast tumora. Ugradnjom biorazgradivog implantata s

antineoplastičnim lijekom u šupljinu nastalu nakon uklanjanja tumora postiže se visoka lokalna koncentracija lijeka kojom se mogu ubiti preostale maligne stanice te ujedno spriječiti sistemske nuspojave kemoterapije uzrokovane intravenskom primjenom. Na taj način paklitaksel, koji inače pokazuje značajnu sistemska toksičnost, ukoliko se daje u obliku pripravka s produljenim oslobađanjem za lokalnu primjenu, osim što povećava djelotvornost, smanjuje i sistemska toksičnost. Razvijeni su implantati u obliku diska koji sadrže polianhidrid P(FAD-SA, 50:50, w/w) napunjen 10%-tnim (w/w) paklitakselom (42). No, iz ovakvog pripravka paklitaksel se oslobađa vrlo sporo. Samo 15% lijeka oslobođeno je u 77 dana te je pomoću kinetike prvog reda procijenjeno da bi za potpuno oslobađanje lijeka iz implantata bila potrebna 44 mjeseca, što je predugo vrijeme za bilo koje kliničko stanje. Stoga je razvijen bolji implantat s hidrofilnijim polianhidridom P(CPP-SA, 20:80, w/w) koji je u istraživanju na ekperimentalnom malignom glioma modelu pokazao obećavajući učinak. Oslobađanje paklitaksela je u odnosu na prethodni sustav ubrzano na 45-65% u 30 dana. Lokalnom intersticijskom primjenom paklitaksela na modelu malignog glioma štakora postižu se visoke koncentracije paklitaksela u mozgu te povećava medijan preživljavanja. Nadalje, bolesnici s malignim gliomima kojima su polimerni implantati paklitaksela usađeni u tumor pomoću kompjuterizirane tomografije pokazuju značajno smanjenje tumorske mase.

Razvijena je i kirurška pasta bazirana na poli-(kaprolaktonu) (PCL), biorazgradivom i biokompatibilnom polimeru niskog tališta (oko 44-56 °C). Pasta se nakon laganog zagrijavanja primjenjuje pomoću šprice u rastaljenom stanju. Budući da je oslobađanje paklitaksela iz poli-(kaprolaktona) jako sporo, vrijeme polurazgradnje je vrlo dugo. Stoga je proučavan utjecaj ugradnje različitih aditiva topljivih u vodi u PCL matriks na oslobađanje paklitaksela. U *in vivo* studijama formulacija koja sadrži paklitaksel/želatinu/PCL pastu značajno je smanjila masu

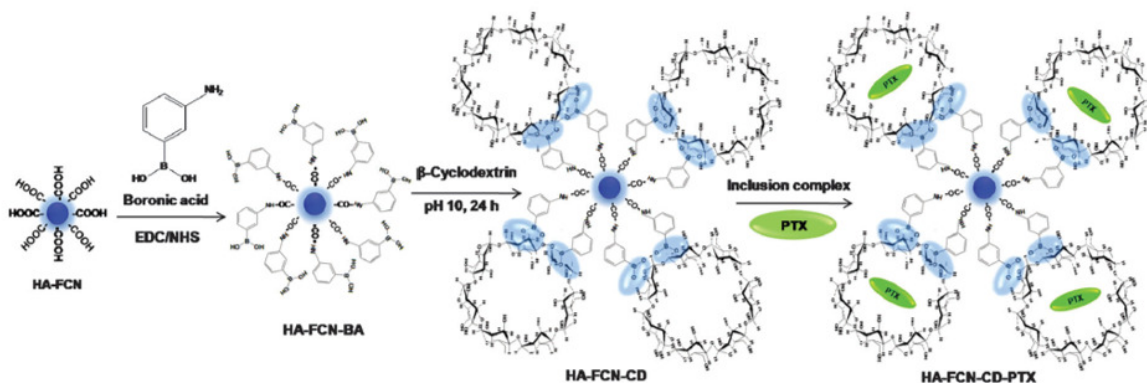
tumora u miševa. Utvrđeno je da na oslobađanje lijeka utječe vrsta aditiva topljivog u vodi, veličina mikročestica i udio aditiva.

Konjugati s albuminom

Paklitaksel-albumin konjugat formira se na način da se lijek kovalentno veže za humani serumski albumin preko sukcinila. Fizikalno kemijske karakteristike i antitumorska aktivnost ovih makromolekularnih konjugata proučavana je *in vitro*, dok su njihova farmakokinetička svojstva i toksičnost proučavani *in vivo* na miševima. Konjugati su stabilni u fiziološkoj tekućini i serumu, a u prisutnosti proteaza ili ekstrakta jetre lijek se oslobađa linearnom kinetikom. Na tri različite stanične linije pokazalo se da konjugati zadržavaju visoku citotoksičnost s učinkovitim vezanjem na stanice, internalizacijom i oslobađanjem lijeka u unutrašnjost stanice. Konjugati kontinuirano oslobađaju lijek u plazmu kroz produljeno vremensko razdoblje, osiguravajući depo efekt. Akutna toksičnost koja se javlja kod standardne formulacije paklitaksela uvelike je smanjena primjenom albuminskih konjugata u miševa (43).

Potencijalne formulacije budućnosti

Ciljana doprema lijeka poznata kao pojam liječenja pamentnim lijekovima predmet je brojnih istraživanja. Sustav dopreme lijeka koji omogućuje detektiranje i ciljano djelovanje na mjestu gdje je to potrebno promijenit će čitavu perspektivu liječenja. Godine 2015. skupina znanstvenika predstavila je ciljani terapijski sustav baziran na kompleksu paklitaksela s β -ciklodekstrinom uklopljenim u fluorescentno označene nanočestice. Shema sinteze terapijskog sustava prikazana je na slici 26 (44).

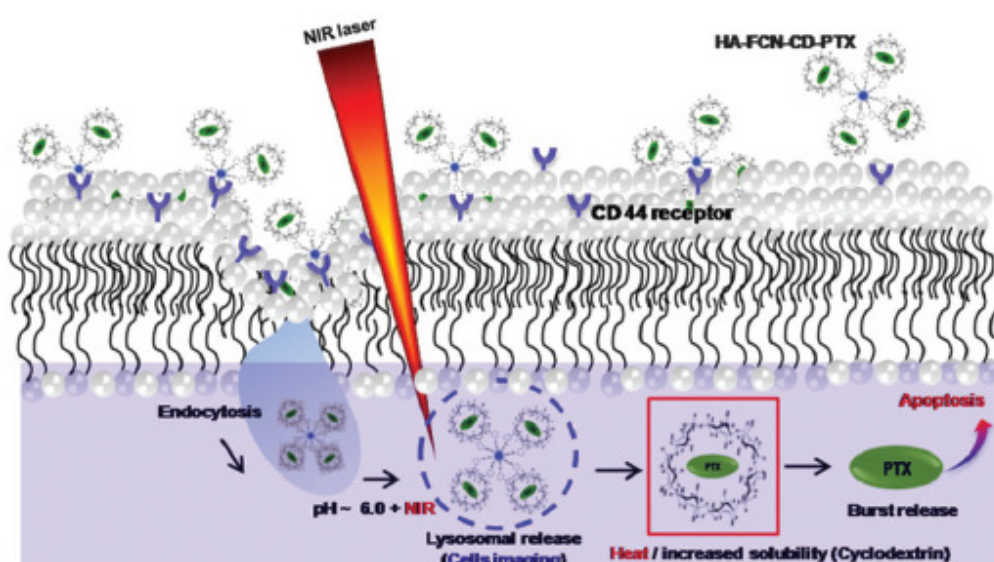


Slika 26. Prikaz sinteze paklitaksela kompleksiranog s HA-FCN-CD uz nastajanje kompleksa [HA-FCN-CD-PTX] (44)

HA-FCN – fluorescentno označena hijaluronska kiselina, CD – ciklodekstrin, PTX – paklitaksel

Transmisijskom elektronskom mikroskopijom utvrđeno je da su nastale nanočestice oblika malih sferičnih čestica veličine 70 ± 6 nm, što je potvrđeno i mikroskopijom atomskih sila. Kompleks HA-FCN-CD-PTX ima izvrsnu stabilnost kod ionskih koncentracija sličnih fiziološkim uvjetima. Kombinacija biooslikavanja i dopreme lijeka u obliku nanonosača predstavlja novi korak u polju nanomedicine. Pomoću dva različita stimulansa postignuto je prepoznavanje ciljne stanice i ciljane dostava lijeka. Interni stimulans je pH, dok eksterni stimulans predstavlja optički signal iz izvora fototermalne topline (slika 27). Oba stimulansa mogu djelovati pojedinačno ili simultano kako bi se omogućilo oslobađanje lijeka u ciljane stanice. Djelovanjem kiselog pH (pH 5,0 i 6,0) 85-90% paklitaksela se oslobodi kroz 36 sati, u usporedbi sa 60% pri normalnom fiziološkom pH od 7,4. Razlog tomu su neoštećeni dioli između β CD i HA-FCN koji pri fiziološkom pH djeluju kao strukturne prepreke oslobađanju lijeka iz CD, dok u kiselim uvjetima dolazi do odvajanja boronatnog estera i oslobađanja CD-PTX. Ukoliko se primijeni NIR zračenje u trajanju od 5 minuta, nastupa naglo inicijalno oslobađanje lijeka pri kiselom pH te nešto sporije pri pH 7,4. Nakon 24-satnog sinergističkog djelovanja oba

stimulansa (pH i fototermalna toplina) dolazi do brzog 90%-tnog oslobađanja paklitaksela pri pH 5,0 i 6,0 te 62%-tnog pri pH 7,4. Na taj način kombinacija boronatne esterske veze osjetljive na promjenu pH, uz pogodno djelovanje fototermalne topline, omogućuje internu kontrolu putem pH i eksternu NIR udaljenu kontrolu dopreme lijeka. Pod utjecajem fototermalne topline djelovanjem NIR zračenja dolazi do pomaka emisije fluorescencije iz crvene koja je karakteristična za kompleks HA-FCN-CD-PTX u plavu. Povišena temperatura utječe na topljivost CD te dolazi do oslobađanja paklitaksela iz kompleksa (44).



Slika 27. Shematski prikaz dopreme paklitaksela interno kontrolirane putem kisele mikrookoline, i eksterno kontrolirane pomoću fototermalnog NIR zračenja (44)

Nove formulacije paklitaksela u kliničkoj primjeni ili kliničkim ispitivanjima

Nab paklitaksel, ABI 007 ili Abraxane®

Predstavlja paklitaksel u obliku nanočestica vezanih na albumin (Celgene Inc, Odenton, MD). To je koloidna suspenzija koja se dobiva homogenizacijom humanog serumskog albumina pri koncentraciji 3-4% s paklitakselom. Tako dobivene nanočestice malog su promjera i

poboljšavaju dopremu paklitaksela u stanicu i njegovo antitumorsko djelovanje. U pripravku je iskorišteno povoljno svojstvo albumina da se nakuplja i zadržava u tumorskom tkivu. Abraxane® ne sadrži Cremophor EL te stoga premedikacija steroidima nije potrebna. Osim toga, nab paklitaksel se može pripremati u klasičnim plastičnim vrećicama za intravensku infuziju, jer za razliku od paklitaksela formuliranog s CrEL ne izaziva oslobađanje DEHP iz infuzijskih vrećica i setova. Nadalje, Abraxane® se može razrijeđivati sa znatno manjim volumenom fiziološke otopine te je stoga odobren režim primjene od 260 mg/m² svaka tri tjedna, pri čemu je trajanje infuzije skraćeno s uobičajenih 180 minuta za CrEL-paklitaksel na svega 30 minuta (45).

DJ-927, XRP6258, XRP9881, Tesetaxel®

To je novi oralni polusintetski derivat taksana. Visoke je topljivosti, nije neurotoksičan i pokazuje izvrsnu antitumorsku aktivnost. Usporedbom DJ-297 s paklitakselom i docetakselom u uvjetima *in vitro* i *in vivo* utvrđeno je da DJ-297 posjeduje bolji citotoksični učinak na različitim staničnim linijama. Osobito se to odnosi na stanične linije s eksprimiranim P-glikoproteinom. Za razliku od ostalih taksana, na tumorsko djelovanje DJ-297 ne utječe razina ekspresije P-glikoproteina. Unutarstanično nakupljanje DJ-297 puno je obimnije od paklitaksela i docetaksela, posebice u P-gp pozitivnim stanicama. U tijeku je nekoliko studija faze I/II. U studiji na pacijentima s rekurentnim uznapredovalim NSCLC karcinomom rezultati upućuju na mogući povoljni utjecaj kombiniranja s drugim citostaticima. Studija faze I se provodi u kombinaciji s kapecitabinom. Najpovoljniji ukupni odgovor je stabiliziranje bolesti u 82% bolesnika, uz dobro podnošenje, pa se očekuje daljnji klinički razvoj (45).

Paclitaxel poliglumex (PPX) ili CT-2103, Opaxio®

PPX (prethodno zaštićeno ime Xytotax®, Cells Therapeutics, Inc, Seattle, WA) je novi biorazgradivi polimerni konjugat paklitaksela s α -poli-L-glutamatnom kiselinom. Dizajniran je na način da poveća topljivost paklitaksela i njegovu selektivnu permeabilnost u tumorsko tkivo, smanji izloženost normalnog tkiva lijeku, te izbjegne MDR pumpe koje izbacuju lijek. Formulacija ne sadrži Cremophor EL te stoga premedikacija nije potrebna. Lijek se primjenjuje u perifernu venu kroz 20-30 minuta svaka 3 tjedna. U pacijenata s uznapredovalim NSCLC koji prethodno nisu liječeni citostaticima i lošim općim stanjem PPX je uspoređen s gemcitabinom ili vinorelbinom te se pokazalo da je iste djelotvornosti, uz manju mijelotoksičnost i veću neurotoksičnost. U kombinaciji s karboplatinom nije dokazana superiornost u odnosu na kombinaciju s gemcitabinom s obzirom na preživljavanje. PPX je pokazao aktivnost kod uznapredovalog karcinoma jajnika te se provodi usporedba s paklitakselom. Kombinirana terapija PPX s radioterapijom i cisplatinom za ezofagealni karcinom dobro se tolerirala i rezultirala je dobrim ukupnim odgovorom od 32% (46).

Kationski liposomalni paklitaksel (EndoTAG®-1)

Ova formulacija ne sadrži Cremophor EL. Razvijena je kao liposomalni lijek s ciljem poboljšane djelotvornosti i boljeg profila toksičnosti u odnosu na konvencionalnu formulaciju paklitaksela s CrEL. Neklinička ispitivanja s EndoTAG®-1 pokazala su da kationski liposomi ciljano djeluju na angiogenetske endotelne stanice. EndoTAG®-1 ima antiangiogenetska svojstva te djeluje na tumorsku mikrovaskulaturu uzrokujući funkcionalna oštećenja, začepljenje krvnih žila te povećanu propusnost mikrovaskulature, što može povećati njegovo terapijsko djelovanje u kombinaciji s ostalim kemoterapeuticima. U studiji faze II kombinacija gemcitabina i EndoTAG®-1 u bolesnika s uznapredovalim ili metastatskim karcinomom gušterače koji

prethodno nisu primali kemoterapiju dobro se podnosila te omogućila bolju kontrolu bolesti, bolje preživljavanje bez bolesti (PFS) i ukupno preživljavanje (OS) u usporedbi s gemcitabinom samim. U drugoj studiji faze II u bolesnika s uznapredovalim trostruko negativnim karcinomom dojke kombinacija paklitaksela s EndoTAG[®]-1 pokazala je bolji učinak u odnosu na oba lijeka primijenjena samostalno (47).

Polimerni micelarni paklitaksel, Genexol-PM[®]

To je novi analog paklitaksela u obliku biorazgradivih polimernih micelarnih nanočestica. (Samyang Genex, South Korea). Kopolimer povećava topljivost paklitaksela u vodi te omogućava dopremu visokih doza paklitaksela. U multicentričnom kliničkom ispitivanju faze II primijenjen je u pacijenata s uznapredovalim karcinomom dojke u dozi od 300 mg/m² svaka tri tjedna te je pokazao znatnu aktivnost uz ukupni terapijski odgovor (ORR) od 59,5% i medijan vremena do progresije bolesti (TTP) od 9,0 mjeseci. Kombinacija Genexol-PM[®] u dozi 175 mg/m² s cisplatinom u bolesnika s prethodno neliječenim uznapredovalim karcinomom želuca dovela je do djelomičnog odgovora na terapiju u 46% pacijenata i stabilizacije bolesti u 20% s TTP od 4,9 mjeseci (48).

DHA-paklitaksel, Taxoprexin[®]

U ovoj formulaciji prirodna masna kiselina dokozaheksanoična kiselina (DHA) konjugirana je preko esterske veze na 2'-O u molekuli paklitaksela, uz nastajanje konjugata paklitaksela i masne kiseline. Djelovanje formulacije temelji se na činjenici da određene masne kiseline lako prodiru u tumor gdje se koriste kao biokemijski prekursori i izvor energije. Koncentracije paklitaksela i DHA-paklitaksela u *in vivo* uvjetima na modelu miša pokazale su da DHA uspješno doprema paklitaksel u tumorsko tkivo, pri čemu je vrijednost AUC u tumoru 61 puta veća za DHA-paklitaksel u odnosu na paklitaksel pri ekvivalentnim dozama i 8 puta veća pri

ekvimolarnim dozama. Taxoprexin® se primjenjuje u obliku dvosatne infuzije a formulacija sadrži 81% manje CrEL u odnosu na konvencionalni paklitaksel pri molarnom omjeru. Preporučena doza za fazu II je 1100 mg/m², što je pri molarnom omjeru 4,6 puta više od maksimalne odobrene doze paklitaksela. Kod polovice ispitivanih pacijenata bolest se stabilizirala uz značajno poboljšanje kvalitete života, a DHA-paklitaksel dobro se podnosio. U ispitivanju faze III u bolesnika s metastatskim malignim melanomom nije utvrđena značajna razlika između terapije DHA-paklitakselom i terapije dakarbazinom u pogledu ukupnog preživljavanja, terapijskog odgovora i vremena do progresije bolesti (49).

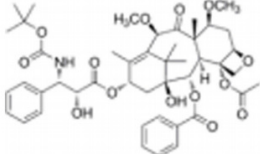
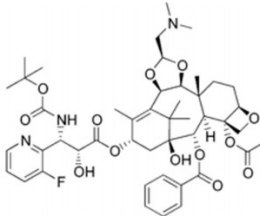
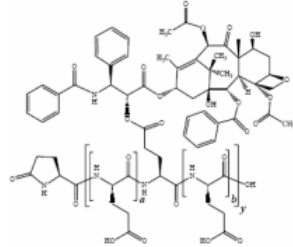
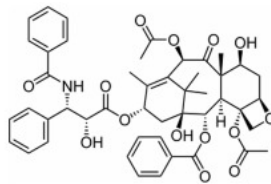
X5 BMS-184476

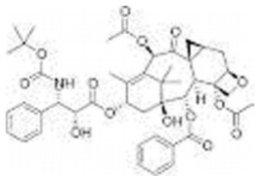
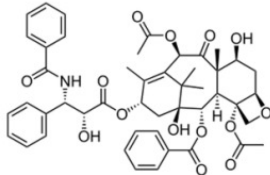
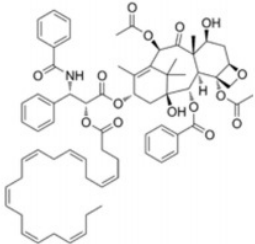
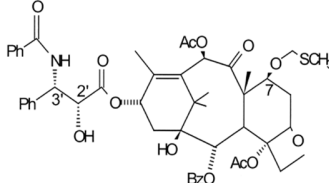
Ovaj analog paklitaksela primarno je razvijen zbog veće potentnosti i aktivnosti koju pokazuje na staničnim linijama rezistentnima na konvencionalni paklitaksel. Neklinička ispitivanja pokazala su da BMS-184476 nije potentniji u ispitivanjima polimerizacije tubulina i kod neoplazmi osjetljivih na taksane, međutim, djelotvorniji je kod tumora koji su rezistentni na taksane. Bolje je topljiv od konvencionalnog paklitaksela u vodenim otapalima koja sadrže polioksietilirano ricinusovo ulje. Nadalje, zbog veće potentnosti u odnosu na paklitaksel, manja količina BMS-184476 je potrebna za formulaciju 1 mg lijeka. Formulacija sadrži manju količinu CrEL, što se smatra povoljnim u smislu poboljšanja sigurnosti, manje premedikacije i kraćeg vremena davanja. U nekliničkim studijama utvrđeno je da BMS-184476 može povećati učinak radijacije na humanim staničnim linijama karcinoma pluća i *in vivo* i *in vitro*, te je potvrđena pretpostavka da je G2/M blokada uključena u radiosenzitizaciju uzrokovanu taksanima. U kliničkoj studiji faze II bolesnicima s uznapredovalim NSCLC nakon jedne ili više prethodnih kemoterapija, davan je BMS-184476 u dozi od 60 mg/m² *i.v.* kroz 1 sat svakih 21 dan. Djelomičan odgovor uočen je kod 14% pacijenata, a stabilizacija bolesti kod 59%. Medijan PFS

bio je 3,7 mjeseci, a medijan OS 10 mjeseci. U studiji faze IB pacijentima s uznapredovalim solidnim tumorima davan je BMS-184476 na dan 1 i 8 uz doksorubicin na dan 1. Maksimalna tolerirana doza (MTD) i ujedno preporučena doza za fazu II bila je 35 mg/m²/tjedan (70 mg/m² po ciklusu) na dan 1 i 8. ORR u 17 prethodno neliječenih ili minimalno liječenih bolesnika s karcinomom dojke bio je 59%. Doziranje BMS-184476 u dva uzastopna tjedna omogućilo se davanje većih doza lijeka uz impresivno antitumorsko djelovanje u pacijenata s neliječenim ili minimalno liječenim karcinomom dojke (50).

U tablici 4. dan je prikaz osnovnih obilježja novorazvijenih formulacija paklitaksela.

Tablica 4. Obilježja novih formulacija paklitaksela (45)

Naziv	Proizvođač	Faza razvoja	Mehanizam dopreme	Potencijalne indikacije	Put primjene	Potrebna premedikacija	Toksičnosti stupnja 3 i 4 > 5%	Kemijska struktura
Nab-paclitaxel (Abraxane®)	Abraxis bioscience/ Celgene	Odobren od strane EMA i FDA (dojka, pluća, gušterača)	nanočestice, vezane na albumin	dojka NSCLC gušterača jajnici - neodobreno	i.v.	Ne	Neutropenija, ↑GGT, periferna neuropatija, slabost	
DJ-927 (Tesetaxel®)	Genta	Faza II	analog	dojka gastroezofagealni melanom mjehur NSCLC	p.o.	Ne	Neutropenija, sepsa, proljevi, letargija	
Paclitaxel poliglumex/CT 2103 (Opaxio®)	Cell therapeutics	Faza III NSCLC, Jajnici i glioblastom	prolijek makromolekula, u vodi topljivi polimer glutamatne kiseline, vezan na paklitaxel	NSCLC (faza III na PS2 naivni), jajnici (faza II), glioblastom, ezofagealni (faza II)	i.v.	Ne	Neurotoksičnost Neutropenija Alopecija	
EndoTAG + paclitaxel (EndoTAG®-1)	MediGene	Faza II gušterača s gemcitabinom TNBC	kationski liposomalni paclitaxel	gušterača dojka	i.v.	Ne	Neutropenija Povišena tjelesna temperatura	

Naziv	Proizvođač	Faza razvoja	Mehanizam dopreme	Potencijalne indikacije	Put primjene	Potrebna premedikacija	Toksičnosti stupnja 3 i 4 > 5%	Kemijska struktura
XRP9881 (Larotaxel®)	Sanofi	Faza II NSCLC sa cisplatinom ili gemcitabinom dojka	analog	NSCLC dojka	i.v.	Da	Neutropenija Neuropatija Proljev	
Polymeric-micellar paclitaxel (Genexol-PM®)	Samyang Genex Co	Faza II NSCLC sa cisplatinom ili karboplatinom dojka želudac	kootapala, ne sadrži Cremophor	NSCLC dojka želudac	i.v.	Potrebna daljnja evaluacija	Neutropenija Neuropatija Artralgija Hipersjetljivost	
DHA-paclitaxel (Taxoprexin®)	Protarga	Završena faza III NSCLC s karboplatinom Završena faza III melanom	prolijek	NSCLC melanom GE veza	i.v.	Da	Neutropenija	
BMS-184476	Bristol-Myers-Squibb	Faza I/II NSCLC samostalno ili u kombinaciji sa cisplatinom, karboplatinom ili doksorubicinom	analog CrEL	NSCLC dojka	i.v.	Potrebna daljnja evaluacija	Neutropenija Periferna neuropatija	

5. ZAKLJUČCI

Otkriće i razvoj paklitaksela s jedinstvenim mehanizmom djelovanja u odnosu na dotad poznate antitumorske lijekove otvorilo je novo poglavlje u liječenju karcinoma. Paklitaksel potiče stvaranje mikrotubula od dimera tubulina te ih stabilizira sprječavanjem depolimerizacije, što rezultira inhibicijom normalne dinamičke reorganizacije mreže mikrotubula koja je ključna za vitalnu interfazu i mitotske funkcije stanice.

Paklitaksel je diterpen kompleksne strukture prisutan u vrlo maloj količini u kori biljne vrste *Taxus brevifolia* Nutt. Nedostatak prirodnih resursa te za farmaceutsku industriju ekonomski neisplativa sinteza neka su od ograničenja koja su stajala na putu brzom razvoju lijeka. Danas se dobiva polusintetski iz 10-deacetilbakatina III koji se izolira iz igličastih listova europske tise.

Jedan je od najpoznatijih i najprimjenjivanih antitumorskih lijekova današnjice. Dio je standardne terapije u liječenju različitih vrsta karcinoma, bilo u početnom ili uznapredovalom stadiju. Odobrene terapijske indikacije obuhvaćaju karcinom dojke, jajnika i pluća te Kaposijev sarkom povezan s AIDS-om.

Kako bi se poboljšala slaba topljivost paklitaksela u vodenom mediju, u formulaciji lijeka koristi se otapalo Cremophor EL. Ono može dovesti do teških anafilaktoidnih reakcija preosjetljivosti. Pored toga, primjena paklitaksela povezuje se i s neželjenim učincima poput hematotoksičnosti, neurotoksičnosti i kardiotoksičnosti.

Novija istraživanja usmjerena su prema razvoju suvremenih formulacija lijeka povećane selektivnosti i djelotvornosti, ciljane dopreme na mjesto djelovanja te smanjenih toksičnih učinaka. U tu svrhu najčešće se koriste nanočestice, liposomi, ciklodekstrini, analozi i prolijekovi. Od desetak formulacija koje se nalaze u različitim fazama kliničkih ispitivanja, potrebno je istaknuti paklitaksel u obliku nanočestica vezanih na albumin, zaštićenog naziva

Abraxane, kojeg su odobrile EMA i FDA za liječenje karcinoma dojke, pluća i gušterače. Za konačnu potvrdu terapijskog potencijala ostalih formulacija potrebno je pričekati dovršetak kliničkih ispitivanja.

6. LITERATURA

1. WHO. WHA 58.22 Cancer prevention and control, 2005.
2. Demain AL, Vaishnav P. Natural products for cancer chemotherapy. *Microb Biotechnol* 2011;4:687-699.
3. Kingston DGI. Taxol and Its Analogs. U: Cragg GM, Kingston DGI, Newman DJ. Ur. Anticancer agents from natural products Anticancer agents from natural products. CRC Press; 2005, str. 98-131.
4. Priyadarshini K, Keerthi AU. Paclitaxel against cancer: A short review. *Med Chem* 2012;2:139-141.
5. Tyagi AK i Prasad S. Drug discovery inspired by mother nature for cancer therapy. *Biochem Physiol* 2015; doi:10.4172/2168-9652.1000e128.
6. Mastropaolo D, Camerman A, Luo Y, Brayer GD, Camerman N. Crystal and molecular structure of paclitaxel (taxol). *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:6920-6924.
7. Snyder JP, Nettles JH, Cornett B, Downing KH i Nogales E. The binding conformation of Taxol in β -tubulin: A model based on electron crystallographic density. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:5312–5316.
8. Weaver BA, How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell* 2014;25:2677-2681.
9. Ma P, Mumper RJ. Paclitaxel nano-delivery systems: A comprehensive review. *J Nanomed Nanotechnol* 2013; doi: 10.4172/2157-7439.1000164.
10. Wall ME, Wani MC. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. *J Ethnopharmacol* 1996;51:239-254.
11. Patel RN. Tour de paclitaxel: Biocatalysis for semisynthesis. *Annu Rev Microbiol* 1998;98:361-395.

12. Wheeler NC, Jech K, Masters S, Brobst SW, Alvarado AB, Hoover AJ, Snader KM. Effects of genetic, epigenetic, and environmental factors on taxol content in *Taxus brevifolia* and related species. *J Nat Prod* 1992;55:432-440.
13. Vidensek N, Lim P, Campbell A i Carlson C. Taxol content in bark, wood, root, leaf, twig, and seedling from several taxus species. *J Nat Prod* 1990;53:1609-1610.
14. Samuelsson G. Drugs of natural origin. Swedish Pharmaceutical Society 2004, str. 344-351.
15. Tabata H. Paclitaxel production by plant-cell-culture technology, *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2004;7:1-23.
16. Holton RA, Kim HB, Somoza C. i sur. First total synthesis of taxol. 1. Functionalization of the B ring. *J Am Chem Soc* 1994;116:1597-1598.
17. Holton RA, Kim HB, Somoza C. i sur. First total synthesis of taxol. 2. Completion of the C and D rings. *J Am Chem Soc* 1994;116:1599-1600.
18. Nicolaou KC, Yang Z, Liu JJ i sur. Total synthesis of taxol. *Nature* 1994;367:630-634.
19. Danishefsky SJ, Masters JJ, Young WB i sur. Total synthesis of baccatin III and taxol, *J Am Chem Soc* 1996;118:2843-2859.
20. Srivastava V, Negi AS, Kumar JK, Gupta MM, Khanuja SPS. Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads, *Bioorg Med Chem*. 2005;13:5892-5908.
21. Heider EM, Harper JK, Grant DM. Structural characterization of an anhydrous polymorph of paclitaxel by solid-state NMR. *Phys Chem Chem Phys* 2007;9:6083-6097.
22. Orr GA, Verdier-Pinard P, McDaid H, Horwitz SB. Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene* 2003;22:7280-7295.

23. Kidd JF, Pilkington MF, Schell MJ, Fogarty KE, Skepper JN, Taylor CW, Thorn P. Paclitaxel affects cytosolic calcium signals by opening the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* 2002;277:6504-6510.
24. Pan Z, Gollahon L. Taxol directly induces endoplasmic reticulum-associated calcium changes that promote apoptosis in breast cancer cells. *Breast J* 2011;17:56-70.
25. Pan Z, Avila A, Gollahon L. Paclitaxel induces apoptosis in breast cancer cells through different calcium - regulating mechanisms depending on external calcium conditions. *Int J Mol Sci* 2014;15:2672-2694.
26. Anna Maria Barbuti AM, Chen Z-S. Paclitaxel Through the ages of anticancer therapy: exploring its role in chemoresistance and radiation therapy. *Cancers* 2015;7:2360-2371.
27. Gonçalves A, Braguer D, Kamath K i sur. Resistance to taxol in lung cancer cells associated with increased microtubule dynamics. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:11737-11742.
28. Nicoletti MI, Valoti G, Giannakakou P. Expression of β -tubulin isotypes in human ovarian carcinoma xenografts and in a sub-panel of human cancer cell lines from the NCI-anticancer drug screen: Correlation with sensitivity to microtubule active agents. *Clin Cancer Res* 2001;7:2912-2922.
29. Gonzalez-Garay ML, Chang L, Blade K, Menick DR, I Cabral F. A β -tubulin leucine cluster involved in microtubule assembly and paclitaxel resistance. *J. Biol. Chem.* 1999;274:23875-23882
30. Berrieman HK, Lind MJ i Cawkwell L. Do β -tubulin mutations have a role in resistance to chemotherapy? *Lanc Oncol* 2004;5:158-164.
31. HALMED - Agencija za lijekove i medicinske proizvode. Dostupno na stranici <http://www.halmed.hr>. Pristupljeno 1. lipnja 2016.

32. Rowinsky EK. The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents. *Annu Rev Med* 1997;48:353-374.
33. Li J, Tang J, Li Y, Yu J, Zhang B, Yu C. Pharmacokinetic profile of paclitaxel in the plasma, lung, and diaphragm following intravenous or intrapleural administration in rats. *Thoracic Cancer* 2015;6:43-48.
34. Rivera E, Cianfrocca M. Overview of neuropathy associated with taxanes for the treatment of metastatic breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2015; 75:659-670.
35. Schimmel KJ, Richel DJ, van den Brink RB, Guchelaar HJ. Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer Treat Rev* 2004;30:181-191.
36. Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, Sparreboom A. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *Eur J Cancer* 2001;37:1590-1598.
37. Sparreboom A, van Zuylen L, Brouwer E i sur. Cremophor EL-mediated alteration of paclitaxel distribution in human blood: Clinical pharmacokinetic implications. *Cancer Res* 1999;59:1454-1457.
38. Singla AK, Garg A, Aggarwal D. Paclitaxel and its formulations. *Int J Pharm* 2001;235:179-192.
39. Ceruti M, Crosasso P, Brusa P, Arpicco S, Dosio F, Cattel L. Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing water-soluble prodrugs of paclitaxel. *J Controlled Release* 2000;63:141-153.
40. Wang YM, Sato H, Adachi I i Horikoshi I. Preparation and characterization of Poly(lactic-co-glycolic-acid) microspheres for targeted delivery of a novel anticancer agent, Taxol. *Chem Pharm Bull* 1996;44:1935-1940.
41. Feng S, Huang G. Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol®) from nanospheres of biodegradable polymers. *J. Controlled Release* 2001;71:53-69.

42. Park ES, Maniar M, Shah JC. Biodegradable polyanhydride devices of cefazolin sodium, bupivacaine, and taxol for local drug delivery: preparation, and kinetics and mechanism of *in vitro* release. *J Controlled Release* 1998;52:179-189.
43. Dosio F, Brusa P, Crosasso P, Arpicco S, Cattel L. Preparation, characterization and properties in vitro and in vivo of a paclitaxel–albumin conjugate. *J Controlled Release* 1997;47:293-304.
44. Sharker SM, Kim SM, Kim SH, In I, Lee H, Park SY. Target delivery of β -cyclodextrin/paclitaxel complexed fluorescent carbon nanoparticles: externally NIR light and internally pH sensitive-mediated release of paclitaxel with bio-imaging. *J. Mater Chem B* 2015;3:5833-5841.
45. Yared JA, Tkaczuk KHR. Update on taxane development: new analogs and new formulations, *Drug Des Devel Ther* 2012;6:371-384.
46. Galic VL, Wright JD, Lewin SN, Herzog TJ. Paclitaxel poliglumex for ovarian cancer. *Expert Opin Investig Drugs*. 2011;20:813-821.
47. Awada A, Bondarenko IN, Bonnetterre J, Nowara E, Ferrero JM, Bakshi AV, Wilke C, Piccart M. A randomized controlled phase II trial of a novel composition of paclitaxel embedded into neutral and cationic lipids targeting tumor endothelial cells in advanced triple-negative breast cancer (TNBC). *Ann Oncol* 2014;25:824-831.
48. Lee KS, Chung HC, Im SA, Park YH, Kim CS, Kim SB, Rha SY, Lee MY, Ro J. Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a Cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;108:241-250.
49. Bedikian AY, DeConti RC, Conry R, Agarwala S, Papadopoulos N, Kim KB, Ernstoff M. Phase 3 study of docosahexaenoic acid-paclitaxel versus dacarbazine in patients with metastatic malignant melanoma. *Ann Oncol*. 2011;22:787-793.

50. Camps C, Felip E, Sanchez JM, B. Massuti B i sur. Phase II trial of the novel taxane BMS-184476 as second-line in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2005;16:597-601.