

# PROTINÁDOROVÉ LÉČIVO DOXORUBICIN A JEHO *IN VIVO* ANALÝZA FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIÍ

BLAŽKOVÁ I.<sup>1</sup>, DOSTÁLOVÁ S.<sup>1</sup>, ŠMERKOVÁ K.<sup>1</sup>, RYVOLOVÁ M.<sup>1,2</sup>, ADAM V.<sup>1,2</sup>, ECKSCHLAGER T.<sup>3</sup>, STIBOROVÁ M.<sup>4</sup>, KIZEK R.<sup>1,2</sup>

1. Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav chemie a biochemie, Brno, kizek@sci.muni.cz
2. Středoevropský technologický institut v Brně
3. Klinika dětské hematologie a onkologie, Univerzita Karlova v Praze a Fakultní nemocnice v Motole, Praha
4. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie, Praha

*Rakovina (nekontrolované množení buněk) představuje hlavní zdravotní problém ve vyspělých zemích. Ve Spojených státech jsou nádorová onemocnění příčinou 1/4 všech úmrtí [1,2]. V současnosti je v USA během života diagnostikována rakovina u každé třetí ženy a u každého druhého muže [3]. Na druhou stranu úmrtnost způsobená tímto onemocněním postupně klesá díky včasné diagnostice a také účinnosti léčby. V České republice je mortalita spojená s rakovinou 0,425 [4]. Nejběžnější jsou nádory plic, kolorektální karcinom, rakovina prsu a rakovina prostaty [1,5].*

Nejčastější způsoby léčby jsou chirurgie, chemoterapie (cytostatika) a radioterapie (ionizující záření), přičemž je v některých případech využívána také hormonální léčba. Mezi nejběžnější používaná cytostatika patří sloučeniny na bázi platiny, jako je cisplatina, karboplatina nebo oxaliplatina. Druhou významnou skupinou protinádorových léčiv jsou sloučeniny generující radikály jako doxorubicin a epirubicin [6, 7, 8, 9].

Doxorubicin (hydroxyldaunorubicin) je antracyklinové vysoce účinné a široce používané cytostatikum jehož historii lze vystopovat do padesátých let minulého století (obr. 1A). Dnes se běžně používá pro léčbu některých z druhů leukémie, Hodgkinova lymfomu, rakoviny prsu, žaludku nebo vaječníků, mnohočetného myelomu a dalších [10, 11, 12, 13]. Jeho použití je limitováno vysokou kardiotoxicitou a při překročení kumulativní dávky může dojít k selhání srdce. Navíc kardiotoxicita antracyklinů roste s věkem, neboť ve vyšším věku se tělo zbavuje toxických látek pomaleji. K selhání srdce může dojít při překročení dávky 400 mg/m<sup>2</sup> (některé zdroje udávají i 450 mg/m<sup>2</sup> [14], nebo 570 mg/m<sup>2</sup> [15]). Při dosažení tohoto množství je nutné volit jinou, mnohdy méně efektivní léčbu [16, 17, 18].

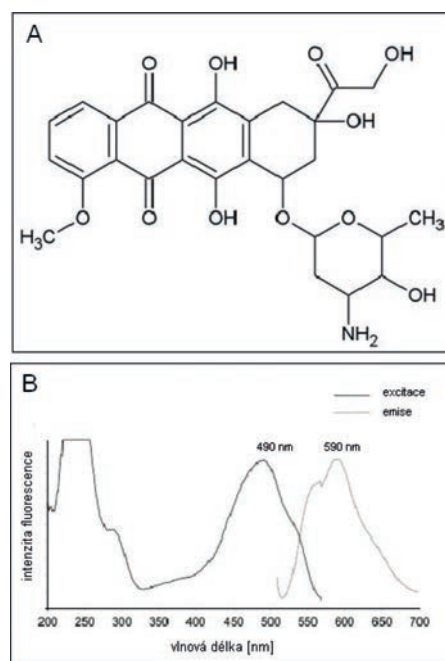
Snaha o snížení cytotoxicity doxorubicinu vedla k uplatnění molekulárních přenašečů, které zajistí snížení jeho kardiotoxicity při zachování terapeutických účinků. Jedním z takových přenašečů mohou být lipozomy. Lipozomální doxorubicin, který je v současnosti už i komerčně dostupný, lze zacílit na konkrétní místo v organizmu a snížit tak množství, které se dostane do srdce, na minimum [19, 20]. Kumulativní dávka lipozomálního doxorubicinu je podstatně vyšší (785 mg/m<sup>2</sup>) [21]. Pro zvýšení účinnosti a bezpečnosti léčiva je nezbytné studovat interakce doxorubicinu s buňkami. Díky své struktuře má doxorubicin fluorescenční vlastnosti (obr. 1B), proto je možné jeho pozorování pomocí fluorescenčních metod včetně fluorescenční mikroskopie [22]. Fluorescence doxorubicinu lze využít k pozorování chování doxorubicinu jak v buňkách, tak v živých organismech [21, 23]. Cílem této práce bylo studovat vliv doxorubicinu na *Staphylococcus aureus* a buňky BY-2 jako další modely pro pozorování vlivu těchto léčiv.

## Experimentální část

### Růstová křivka buněk

Byl sledován růst bakterie *Staphylococcus aureus* a tabákových buněk BY-2 v přítomnosti doxorubicinu. Buněčná suspenze linie BY-2 byla udržována v tekutém Murashige-Skoog médiu. Suspenze (20 ml) v 50 ml Erlenmeyerových baňkách byla umístěna na třepače (Kühner Shaker LT-W, Adolf Kühner AG, Švýcarsko) při 27 ± 1 °C a 135 ot.min<sup>-1</sup> ve tmě. Použitá kultura byla zředěna kutlivačným médiem tak, aby při vlnové délce 600 nm vykazovala absorbanci 0,1, čímž bylo dosaženo koncentrace 5,6 × 10<sup>6</sup> buněk ve 150 μl. Tato kultura o objemu 150 μl byla napipetována do mikrotitrační destičky a k ní přidáno 150 μl doxorubicinu o dané

Obr. 1 – Doxorubicin; A – chemický vzorec doxorubicinu; B – excitační a emisní spektrum doxorubicinu



koncentraci (14,38–230 μM). Absorbance při 620 nm byla měřena prvních devadesát minut po 10 minutách ((Multiskan EX Microplate Photometer)), následně po půl hodině, celkově po dobu 20 hodin. Před každým měřením byla kultura protřepána a po celou dobu udržována teplota 37 °C.

### *In vivo* analýza buněk

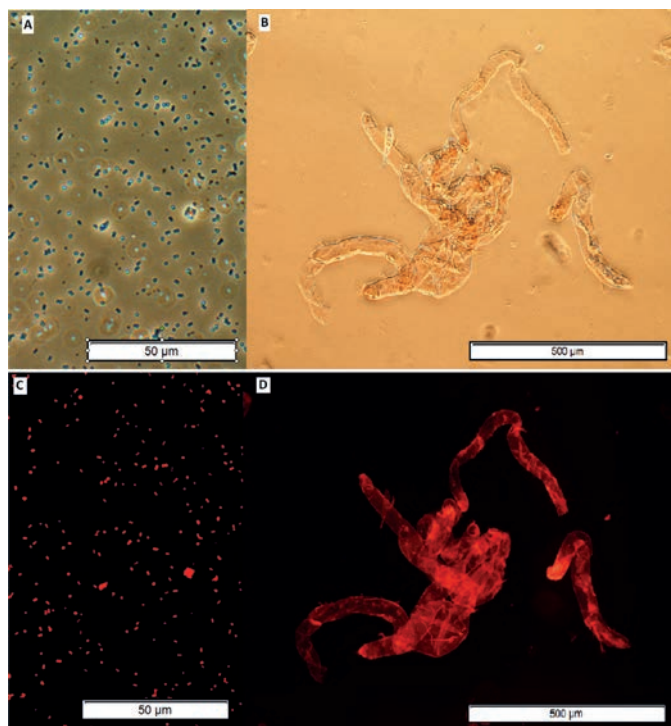
5 μl buněk bakterie *Staphylococcus aureus* nebo buněk BY-2 bylo inkubováno s 20 μl doxorubicinu různých koncentrací (14,38–230 μM). Inkubace probíhala na třepače (1400 rpm) při teplotě 20 °C po dobu 30 nebo 60 minut. Po inkubaci byly buňky resuspendovány ve 100 μl PBS pufru (pH = 7,4) a následně centrifugovány (5000 g, 20 °C, 5 minut). Supernatant byl odsát a buňky byly dvakrát promyty stejným objemem PBS. Promyté buňky promíchané ve 100 μl PBS pufru se uchovávaly při teplotě 6 °C. Mikroskopovány byly hned po přípravě a po týdnu od přípravy. Fluorescence byla pozorována pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus IX 71 při excitační vlnové délce 520–550 nm a emisní vlnové délce 580 nm.

### Výsledky a diskuze

V modelovém experimentu byl studován efekt doxorubicinu na bakteriální buňky *Staphylococcus aureus* a buňky BY-2 [24]. Nízké

koncentrace doxorubicinu do 50  $\mu\text{M}$  neovlivňují růst této bakterie. Naopak, koncentrace doxorubicinu 57,5  $\mu\text{M}$  již významně inhibuje růst bakterie. Z výsledků jasně vyplývá, že nejvyšší aplikovaná koncentrace doxorubicinu inhibovala růst bakterií na méně než 10 % ve srovnání s kontrolní variantou. Tento fakt jasně ukazuje na značnou toxicitu tohoto léku vůči bakteriální kultuře. Výsledky získané analýzou buněk BY-2 vystavených stejnému koncentračnímu rozsahu přinesl velmi podobné výsledky jako v případě bakterií. A navíc jsme se pokusili sledovat doxorubicin pomocí fluorescenční spektrometrie, protože je doxorubicin díky své výrazné fluorescenci dobře pozorovatelný fluorescenčním mikroskopem [25]. Buňky doxorubicin velmi dobře absorbují, což jsme ověřili na inhibičním testu a potvrdili pomocí spektrometrie. Mikroskopické obrázky *Staphylococcus aureus* a buněk BY-2 jsou ukázány na obr. 2 A a B. Obarvení buněk bylo zaznamenáno i při inkubaci při nejnižší koncentraci doxorubicinu a fluorescence byla pozorovatelná i týden po obarvení. Na obr. 2 C a D jsou ukázány buňky *Staphylococcus aureus* a BY-2 buňky po aplikaci nejvyšší dávky doxorubicinu.

**Obr. 2 – Mikroskopické obrázky buněk inkubovaných s 230  $\mu\text{M}$  doxorubicinem; A – bakterie *Staphylococcus aureus* ve světelném poli; B – tabákové buňky BY-2 ve světelném poli; C – bakterie *Staphylococcus aureus* – fluorescence (excitační vlnová délka 520–550 nm, emisní vlnová délka 580 nm); D – buňky BY-2 – fluorescence (excitační vlnová délka 520–550 nm, emisní vlnová délka 580 nm)**



## Závěr

Doxorubicin lze díky jeho strukturním vlastnostem velmi dobře pozorovat pomocí fluorescenční mikroskopie a díky tomu vizualizovat jeho interakce s buňkami. Buňky inkubované s doxorubicinem vykazovaly signifikantní fluorescenci po dobu několika dní.

*Poděkování: Práce byla podporována grantovým projektem CYTORES GA ČR P301/10/0356 a projektem centra excelence CEITEC CZ.1.05/1.1.00/02.0068.*

## Literatura

- [1] Siegel R., Naishadham D., Jemal A., Cancer statistics, 2012. *Cancer, Journal for Clinicians*, 62, (2012), 10–29
- [2] Nunney L. (2012), Lineage selection and the evolution of multistage carcinogenesis. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 266, (2012), 493–498
- [3] Siegel R., DeSantis C., Virgo K., Stein K., Mariotto A., et al., Cancer treatment and survivorship statistics, 2012 *Ca-a Cancer, Journal for Clinicians*, 62, (2012), 220–241
- [4] Zaloudik J., Onkologický výzkum v České republice v souvislostech, *Klinická onkologie*, (2007), 405–407
- [5] Stiborova M., Poljakova J., Eckschlager T., Kizek R., Frei E., Analysis of covalent ellipticine- and doxorubicin-derived adducts in DNA of neuroblastoma cells by the P-32-postlabeling technique, *Biomedical Papers - Olomouc*, 156, (2012), 115–121
- [6] Gulyaev A.E., Anisimova E.V., Ya. KG, Antibacterial effect of antibiotics modified by their interaction with antitumor preparations on the cellular level, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 32, (1998), 17–19
- [7] Petrakova K., Nenutil R., Grell P., Svoboda M., Fabian P., et al., Mechanizmy rezistence na tamoxifen, *Klinická onkologie*, 20, (2007), 369–376
- [8] Buss I., Kalayda G.V., Lindauer A., Reithofer M.R., Galanski M., et al., Effect of reactivity on cellular accumulation and cytotoxicity of oxaliplatin analogues, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 17, (2012), 699–708
- [9] Kizek R., Adam V., Hrabeta J., Eckschlager T., Smutny S., et al., Anthracyclines and ellipticines as DNA-damaging anticancer drugs: Recent advances, *Pharmacology & Therapeutics*, 133, (2012), 26–39
- [10] Huska D., Adam V., Babula P., Hrabeta J., Stiborova M., et al., Square-Wave Voltammetry as a Tool for Investigation of Doxorubicin Interactions with DNA Isolated from Neuroblastoma Cells, *Electroanalysis*, 21, (2009), 487–494
- [11] Huska D., Adam V., Krizkova S., Hrabeta J., Eckschlager T., et al., An electrochemical study of interaction of an anticancer alkaloid ellipticine with DNA, *Chimica Oggi-Chemistry Today*, 28, (2010), 15–17
- [12] Hynek D., Krejčova L., Zitka O., Adam V., Trnkova L., et al., Electrochemical Study of Doxorubicin Interaction with Different Sequences of Single Stranded Oligonucleotides, Part I., *International Journal of Electrochemical Science*, 7, (2012), 13–33
- [13] Hynek D., Krejčova L., Zitka O., Adam V., Trnkova L., et al., Electrochemical Study of Doxorubicin Interaction with Different Sequences of Double Stranded Oligonucleotides, Part II., *International Journal of Electrochemical Science*, 7, (2012), 34–49
- [14] Theodoulou M., Hudis C., Cardiac profiles of liposomal anthracyclines – Greater cardiac safety versus conventional doxorubicin?, *Cancer*, 100, (2004), 2052–2063
- [15] Batist G., Ramakrishnan G., Rao C.S., Chandrasekharan A., Gutheil J., et al., Reduced cardiotoxicity and preserved antitumor efficacy of liposome-encapsulated doxorubicin and cyclophosphamide compared with conventional doxorubicin and cyclophosphamide in a randomized, multicenter trial of metastatic breast cancer, *Journal of Clinical Oncology*, 19, (2001), 1444–1454
- [16] Li J., Gwilt P.R., The effect of age on the early disposition of doxorubicin, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 51, (2003), 395–402
- [17] Reynolds J.G., Geretti E., Hendriks B.S., Lee H., Leonard S.C., et al., HER2-targeted liposomal doxorubicin displays enhanced anti-tumorigenic effects without associated cardiotoxicity, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 262, (2012), 1–10
- [18] Swain S.M., Whaley F.S., Ewer M.S. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin – A retrospective analysis of three trials, *Cancer*, (2003), 97, 2869–2879
- [19] Harris L., Batist G., Belt R., Rovira D., Navari R., et al., Liposome-encapsulated doxorubicin compared with conventional doxorubicin in a randomized multicenter trial as first-line therapy of metastatic breast carcinoma, *Cancer*, 94, (2002), 25–36

Dokončení na další straně



- [20] Petruzelka L., Lipozomalni doxorubicin, *Remedia*, 17, (2007), 197–200
- [21] Longmuir K.J., Haynes S.M., Baratta J.L., Kasabwalla N., Robertson R.T. Liposomal delivery of doxorubicin to hepatocytes in vivo by targeting heparan sulfate, *International Journal of Pharmaceutics*, 382, (2009), 222–233
- [22] Wouters F.S., Verveer P.J., Bastiaens P.I.H., Imaging biochemistry inside cells, *Trends in Cell Biology*, 11, (2001) 203–211.
- [23] Dahlstrom K.K., Chenoufi H.L., Daugaard S., Fluorescence microscopic demonstration and demarcation of doxorubin extravasation – experimental and clinical-studies, *Cancer*, 65, (1990), 1722–1726
- [24] Peiris V., Oppenheim B.A., Antimicrobial activity of cytotoxic drugs may influence isolation of bacteria and fungi from blood cultures, *Journal of Clinical Pathology*, 46, (1993), 1124–1125
- [25] Gutteridge J.M.C., Wilkins S., Doxorubicin degradation - changes in activity compared by bacterial-growth inhibition and free radical-dependent damage to deoxyribose, *Journal of Biological Standardization*, 11, (1983) 359–364

## Abstract

ANTICANCER DRUG DOXORUBICIN AND ITS IN VIVO ANALYSIS WITH FLUORESCENT MICROSCOPY

**Summary:** Doxorubicin is a cytostatic drug used in cancer therapy; however its cardiotoxicity is limiting the clinical application. On the other hand, it has fluorescence properties, and therefore it is suitable for monitoring by fluorescence microscopy. In this study fluorescence microscopy was used for imaging of doxorubicin interactions with *Staphylococcus aureus* and BY-2 cells. Bacterial and BY-2 cells were stained by doxorubicin, and the influence of doxorubicin on cells viability was investigated.

**Key words:** Cancer, Doxorubicin, Cytostatic drugs, Fluorescence Microscopy

## BIOTECHNOLOGIE

# SPOLEČNOSTI WACKER BIOTECH A XL-PROTEIN DEMONSTROVALI PROVEDITELNOST PRODUKCE PASYLATED BIOFARMACEUTIK TECHNOLOGIÍ ESETEC® S VELMI VYSOKOU VÝTĚŽNOSTÍ

Německá společnost Wacker Biotech a firma XL-protein úspěšně dokončili studii proveditelnosti výroby PASylátových terapeutických proteinů s použitím technologie vylučování Wacker ESETEC® *E.coli*. Pro účely studie a sledování produkce byla použita technologie PASylátových lidských růstových hormonů firmy Wacker, jakožto modelového proteinu. Výsledkem byla buněčná linie s pomocí ESETEC® technologie, která generuje velmi vysoký výtěžek PASylátových proteinů. PASylátová technologie tak umožňuje vývoj biofarmaceutik s prodlouženým poločasem plazmy a vede tak k vývoji nové generace léčiv se zvýšenou tolerancí, které vyžadují méně častou administrativu, díky jejich delší trvající době použitelnosti.

Cílem studie bylo posoudit, zda klinicky zavedené terapeutické proteiny, vylepšené tzv. PASylation®, mohou být produkovány s vysokou výtěžností ekonomicky efektivním procesem.

Provedená studie ukázala, že testované PASylátované proteiny, nesoucí až 600 sekvencí aminokyselin složených z prolinu, alninu a serinu, mohou být technologií ESETEC® úspěšně vyráběny. Navíc to také vede k účinné buněčné linii, která během fermentace vylučuje přesně složený, plně funkční protein v kultivačním médiu s vysokým výtěžkem (3–4 g/l), což je pozoruhodné, protože dostupnost dostatečného množství aminokyselin z bakteriálního primárního metabolismu pro biosyntézu rozlehlých PASylátových proteinů představuje potenciální výzvu. Navíc detailní analytická studie ukázala,

že PASylátovaný lidský růstový hormon byl produkován s vysokou homogenitou v monomerní, neagregované formě, zachovávající si pozoruhodně vysokou afinitu na jeho receptor.

V porovnání s PEGylací, což je nyní standardní technologie pro prodloužení poločasu plazmy biofarmaceutik, je hlavní výhodou PASylace vyvarování se drahého a úzce selektivního chemického modifikačního kroku během produkce. Navíc na rozdíl od chemicky polymerního PEGu, PAS aminokyselinové sekvence jsou bioodbouratelné, a tudíž se neakumulují v buňkách nebo orgánech.

ESETEC®, který je patentován firmou Wacker, je ekonomicky velmi dobře zavedená technologie výroby proteinů a fragmentu protilátek. Je na bázi patentovaného kmene *E.coli* K12, který je schopen během fermentace rekombinovat proteiny vylučováním v jejich přirozené konfirmaci v kultivačním roztoku. Vylučování do roztoku značně usnadňuje čištění cílených proteinů, protože komplikované kroky, jako je např. homogenizace apod., nejsou již nezbytné, a tudíž je celý proces výrazně efektivnější a ekonomičtější. Řada biofarmaceutik produkováných ESETEC® technologií je v současnosti vyhodnocována v předklinických a klinických testech.

Podle Dr. Thomase Maiera, generálního ředitele Wacker Biotech GmbH, jsou on a jeho tým: „potěšeni stávajícími výsledky spolupráce s XL-protein. PASylation® je velice zajímavá technologie pro selektivní zlepšení vlastností biofarmaceutik. S naší inovativní

ESETEC® technologií vylučování jsme tak nyní schopni vyrábět cenově velmi výhodné produkty v průmyslovém měřítku“.

Prof. Dr. Arne Skerra, generální ředitel XL-protein, souhlasí: „Jsem velice spokojen s výsledky současné studie. Úspěšné spojení naší technologie PASylation® s technologií vylučování ESETEC® firmy Wacker má vysoký synergický potenciál s důrazem na účinnou a rychlou produkci nových terapeutických proteinů použitím zavedeného hostitelského organismu, jako je *E.coli*“.

PASylation® je genetická fúze terapeutického proteinu s konfirmačně uspořádaným polypeptidem definované sekvence, skládajícího se z aminokyselin Pro, Ala a Ser. Tato technologie nabízí lepší způsob přichycení solvatovaného molekulárního nahodilého řetězce s velkým hydrodynamickým objemem k biologicky aktivnímu proteinu. Díky tomuto vedlejšímu efektu může být obvyklá rychlost čištění biofarmaceutik ledvinami zpomalena faktorem 10–100, v závislosti na délce PAS. PAS sekvence jsou vysoce rozpustné, ačkoliv nenabitě, biochemicky inertní, nabízející účinnou rekombinantní produkci proteinu v *E.coli*, stejně tak jako eukaryotických hostitelských buněk, vyvarujících se chemických reakcí. Jsou netoxické, neimunogenní a stabilní proti plazmovým proteidům a jsou zároveň plně biologicky odbouratelné.

Ing. Jaroslav HOLEČEK, Ph.D.  
Wacker Chemie AG,  
jaroslav.holecek@wacker.com,  
www.wacker.com/biologics