

Robi Kelc<sup>1</sup>, Janja Topolovec<sup>2</sup>

# Trendi uporabe in razvoja bioloških zdravil za zdravljenje malignih obolenj

*Trends of Usage and Development of Biological Drugs for Treatment of Malignancies*

---

## IZVLEČEK

**KLJUČNE BESEDE:** biološka zdravila, signalne molekule, tarčni proteini, vnetni mediatorji, monoklonska protitelesa

Biološka zdravila se od klasičnih zdravil razlikujejo predvsem po večji molekularni masi, kompleksnejši tridimenzionalni zgradbi, molekularni heterogenosti in imunogenosti. Njihova poglavitna značilnost je specifičnost delovanja, zaradi česar netarčna tkiva ostanejo bolj ali manj nespremenjena, če ne vsebujejo enakih signalnih molekul kot tarčno tkivo. Zato so še pred leti biološka zdravila veljala za najvarnejša. V različnih raziskavah stranskih učinkov so odkrili doslej še neznane vloge nekaterih tarčnih molekul, kar je domnevo o selektivnosti, specifičnosti in varnosti tarčnih zdravil postavilo pod vprašaj. V zadnjih dveh desetletjih opažamo trend nagle rasti vlaganja v razvoj novih bioloških zdravil. Posledično je v teku mnogo raziskav, vsako leto pa tudi več na novo registriranih bioloških zdravil.

---

## ABSTRACT

**KEY WORDS:** biological drugs, signal molecules, target proteins, inflammatory mediators, monoclonal antibody

Biological drugs mostly differ from classical agents in their molecular mass, complex three-dimensional structure, molecular heterogeneity and immunogenicity. Moreover, the most important aspect of these agents is their capability of targeting specific signal molecules, consequently causing no or less damage to the non-targeted tissue. Hence, this fact led to widely accepted belief that biopharmaceutical drugs are among the safest on the market. During the conduct of different studies researchers found new physiological roles of targeted molecules that were previously unknown. These findings overruled the assumption about targeted therapy being selective and specific and made the researchers question their safety. Over the last two decades, there has been an exponential growth of investments into the development of new molecular therapies. Hence, there are a lot of studies underway and more targeted biologic drugs registered every year.

---

<sup>1</sup> Robi Kelc, dr. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Slomškov trg 15, 2000 Maribor; robi.kelc@uni-mb.si

<sup>2</sup> Janja Topolovec, dr. med., Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska ulica 5, 2000 Maribor

## UVOD

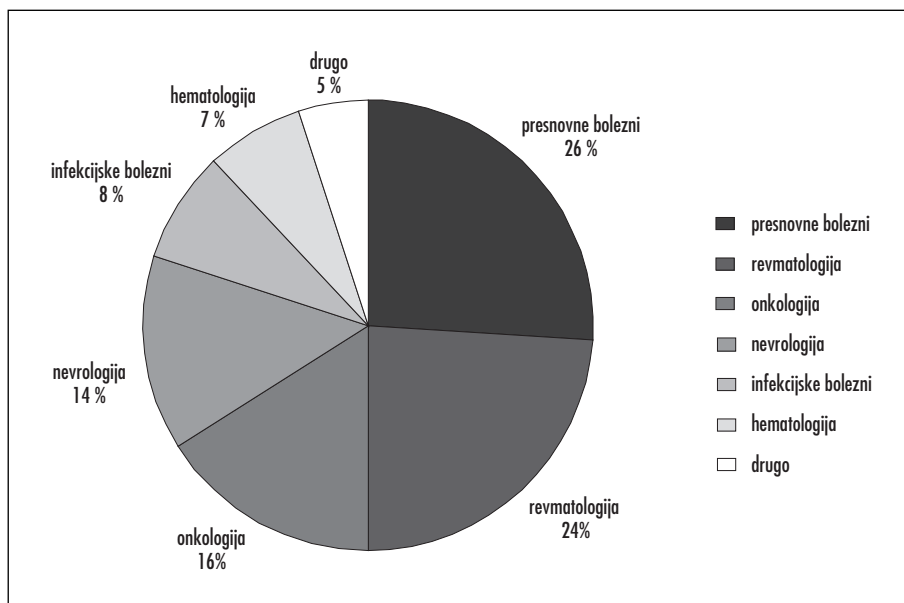
Z razvojem tehnologije rekombinantne DNA, avtomatiziranjem peptidne sinteze in proizvodnjo monoklonskih protiteles je farmacevtska biotehnologija razvila nove metode za proizvodnjo spojin proteinskega izvora, ki jih sicer zaradi omejene količine naravnih virov ni mogoče dobiti v zadostni količini ali pa je izkoriščanje iz naravnih virov, kot so celice, organi in tkiva, neekonomično oz. medicinskoetično sporno (1).

Razvoj sodobne biotehnologije se je začel leta 1953, ko sta James D. Watson in Francis Crick odkrila strukturo DNA, za kar sta devet let kasneje prejela tudi Nobelovo nagrado. 24 let za tem so raziskovalci v bakteriji prvič uspešno prevedli človeški genski zapis za rastni hormon v beljakovino. Leta 1982 je ameriški vladni urad za zdravila in prehrano (angl. *Food and Drugs Administration*, FDA) odobril prvo biotehnološko zdravilo na svetu: rekombinantni humani inzulin (Humulin®). Štiri leta kasneje je bilo odobreno tudi prvo rekombinantno cepivo, in sicer za virus hepatitisa B. V naslednjih letih so na tržišče prihajala prva monoklonska protitelesa. Leta 1998 je biotehnološko zdravilo filgrastim

(Neupogen®), stimulirajoči faktor granulocitov, prvič doseglo prodajo milijardo ameriških dolarjev (1). Trenutno je na trgu več kot 200 bioloških zdravil za človeško uporabo, vsako leto pa se število novo registriranih bioloških zdravil in tudi spekter indikacij za njihovo uporabo veča (slika 1). Samo med letoma 2006 in 2010 je bilo odobrenih 58 novih zdravil, kar pomeni približno 13 novih bioloških zdravil letno (2).

Biološka zdravila delimo na tradicionalna in sodobna. Tradicionalna so pridobljena z izolacijo (učinkovine iz rastlin, človeška kri) ali s klasično biotehnologijo (antibiotiki, steroidi). Sodobna biološka zdravila so pridobljena s pomočjo tehnologije rekombinantne DNA oz. s hibridno tehnologijo. Najširša opredelitev bioloških zdravil vključuje tako tradicionalna kot tudi sodobna in celo genska zdravila, ki so trenutno še v različnih fazah razvoja (4).

Bistvena prednost bioloških zdravil je njihova specifičnost delovanja, saj so bolj kot klasična zdravila usmerjena proti svoji terapevtski tarči. To je še posebej pomembno pri zdravljenju malignih obolenj, pri katerih so stranski učinki kemoterapije lahko zelo problematični (4).



Slika 1. Delež porabe tarčnih bioloških zdravil v svetu glede na terapevtsko področje (3).

Biološka zdravila se od klasičnih razlikujejo predvsem po večji molekulski masi, kompleksnejši tridimenzionalni zgradbi, molekulski heterogenosti in imunogenosti. Poleg tega jih je zelo težko v celoti ovrednotiti z običajnimi fizikalno-kemijskimi analitičnimi metodami in določiti njihovo biološko delovanje, ponovljivost njihovega proizvodnega procesa pa je odvisna od vseh stopenj proizvodnje. Teoretično lahko za katero koli terapevtsko področje razvijemo biološko zdravilo. Kljub temu je prioriteta usmerjena v področja, ki lahko zagotovijo ekonomsko pokritje vlaganj v izjemno zahteven razvoj (1).

## SODOBNA BIOLOŠKA ZDRAVILA IN GLOBALNO TRŽIŠČE

V letu 2009 se je vsota kapitala, vloženega v sektor bioloških zdravil, v primerjavi z letom 2008 z 21 milijard evrov povišala za 85 % na 39 milijard evrov. Projekcije so takrat kazale, da bi se dobiček od prodaje bioloških zdravil leta 2008 (12 milijard evrov) v naslednjih treh letih lahko potrojil (5). Vendar šte-

vilo registracij novih učinkovin v zadnjih letih upada. Med letoma 2006 in 2010 je na tržišče sicer prišlo 58 novih bioloških zdravil, a od teh le 25 novih učinkovin, kar je 5,5 na leto, medtem ko je bilo v istem obdobju prej letno odobrenih 8,6 novih učinkovin (2). Med 58 novo registriranimi zdravili je namreč skoraj polovica biološko podobnih zdravil ali pa takšnih, ki so bila registrirana že prej za drugo terapevtsko področje. Strokovnjaki zaradi izteka patentnih zaščit v prihodnjih letih napovedujejo razmah biološko podobnih zdravil na tržišču, ki je že leta 2007 v svetu presešlo vrednost milijardo evrov, do leta 2016 pa naj bi se to število povzpelo na 25 milijard evrov (6). Povečano povpraševanje po biološko podobnih zdravilih je pričakovati tudi na hitro rastočih azijskih trgih, predvsem na Kitajskem in v Indiji. V slednji je vrednost prodaje že v letu 2008 preseгла 1,4 milijarde evrov in na Kitajskem 7 milijard evrov. Tabela 1 prikazuje najboljše prodajana biološka zdravila, ki se jim bodo zaradi poteka patentne zaščite v prihodnjih letih na tržišču najbrž pridružila mnoga konkurenčna biološko podobna zdravila.

Tabela 1. Šest najboljše prodanih bioloških zdravil v letih 2009 in 2010, podatki o prodaji in izteku patenta na ameriškem, evropskem in azijskem trgu (9). EU – Evropska unija, ZDA – Združene države Amerike.

Nelastniško ime	Lastniško ime	Proizvajalec	Primarna indikacija	Prodaja v milijardah evrov v letu 2009	Prodaja v milijardah evrov v letu 2010	Potek patenta
infiksimumab	Remicade®	Johnson & Johnson, Merck, Mitsubishi, Tanabe	revmatološka obolenja	4,16	5,55	2011 (ZDA), 2014 (EU), 2014 (Japonska)
etanercept	Enbrel®	Pfizer, Amgen, Takeda	revmatološka obolenja	5,5	5,14	2012 (ZDA),
bevacizumab	Avastin®	Roche	rak debelega črevesa in danke	4,11	4,72	2019 (ZDA), 2018 (EU), 2020 (Japonska)
rituksimumab	Rituxan®	Roche	ne-Hodgkinov limfom	4,03	4,65	2016 (globalno)
adalimumab	Humira®	Abbott	revmatološka obolenja	3,81	4,51	2016 (ZDA), 2018 (EU), 2018 (Japonska)
trastuzumab	Herceptin®	Roche	rak dojke	3,49	3,82	2015 (ZDA), 2014 (EU), 2016 (Japonska)

## BIOLOŠKA ZDRAVILA PRI MALIGNIH BOLENIJH

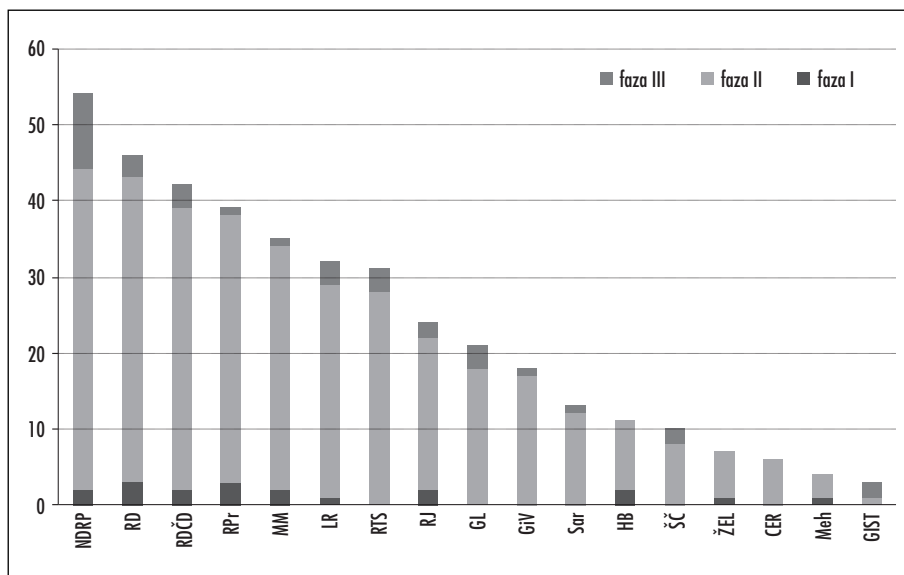
Pred letom 1950 je terapija malignih obolenj temeljila predvsem na kirurških intervencijah, nato je v šestdesetih vodilno vlogo lokalnega in regionalnega nadzora bolezni prevzela radioterapija. V sedemdesetih in osemdesetih letih 20. stoletja je prišlo do odkritij prvih kemoterapevtikov, ki pa jih velikokrat zaradi slabe uspešnosti zdravljenja in hudih stranskih učinkov regulatorne ustanove niso odobrile. Kljub temu sta odkritje cisplatina in razvoj karboplatina pomenila velik korak v sistemskem zdravljenju malignih obolenj. V osemdesetih letih je z namenom izboljšave omenjenih kemoterapevtikov prišlo do odkritja novih signalnih poti, odgovornih za regulacijo celičnih aktivnosti, kot so apoptoza, proliferacija in celično preživetje. To je pripomoglo k boljšemu razumevanju rakavih bolezni in pospešilo razvoj tarčnih zdravil. Slednja so korenito izboljšala zdravljenje teh obolenj. Mednje štejemo monoklonska protitelesa, majhne molekule, peptide in oligonukleotide (11). Nova zdravila za zdravljenje

malignih bolezni delujejo proti ravnim faktorjem, signalnim molekulam, proteinom celičnih ciklov, modulatorjem apoptoze in molekulam, ki spodbujajo angiogenezo, ter imajo širok spekter uporabe (slika 2) (12).

V okviru terapije malignih obolenj naj bi se tarčna zdravila od tradicionalnih citotoksičnih zdravil razlikovala zgolj po citostatičnem delovanju. Kljub vsemu se je v praksi pokazalo, da lahko nekatera povzročijo tudi tumorsko regresijo. Pomembna lastnost bioloških protirakavih zdravil je tudi specifičnost delovanja, zaradi česar zdrava tkiva ostanejo bolj ali manj nespremenjena, če ne vsebujejo enakih tarč kot tumorsko tkivo.

Trenutni razvoj tako temelji na molekularnih pristopih in tarčnih zdravilih, ki so usmerjena proti:

- celičnim signalnim prevodnim potem (tirozinske kinaze),
- znotrajceličnim signalnim kinazam (serin/treonin-kinaze),
- endotelnemu žilnemu rastnemu faktorju (angl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF),
- integrinom,



Slika 2. Število bioloških zdravil v različnih fazah razvoja glede na indikacijo, 2008. NDRP – nedrabcelični rak pljuč, RD – rak dojke, RDČD – rak debelega črevesa in danke, RPr – rak prostate, MM – maligni melanom, LR – ledvični rak, RTS – rak trebušne slinavke, RJ – rak jajčnikov, GL – gliom, GiV – rak glave in vratu, Sar – sarkom, HB – Hodgkinova bolezen, ŠČ – rak ščitnice, ŽEL – rak želodca, CER – rak materničnega vratu, Meh – rak mehurja, GIST – gastrointestinalni stromalni tumor.

- histonskim deacetilazam,
- stresnim proteinom 90 (angl. *heat shock protein 90*, HSP90)
- citokinom,
- popravljalnim mehanizmom DNA in
- gliomskim matičnim celicam.

### Zaviralci tirozin-kinaz

Tirozin-kinaze so skupina proteinskih kinaz, ki igrajo pomembno vlogo pri prenosu signalov, vključenih v celično pomnoževanje, rast, preživetje, pritrjenost na podlago, gibljivost in diferenciacijo (15). Receptor za epidermalni rastni faktor (angl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) je pomembna tarča, saj gre pri mnogih rakavih obolenjih pogosto za napačno regulacijo te beljakovine (16). Obstaja več pristopov specifičnega delovanja na to tarčo, vključno z majhnimi molekulami zaviralcev tirozin-kinaze (angl. *tyrosine kinase inhibitors*, TKI), monoklonskimi protitelesi in cepivi, ki so se že pokazali za učinkovite pri zdravljenju raka debelega črevesa in danke, glave in vratu, dojke, trebušne slinavke in raka pljuč. Med temi sta najbolje raziskana erlotinib (Tarceva®) in gefitinib (Iressa®), oba reverzibilna TKI. Kljub posameznim uspehom pa npr. pri terapiji gliomov in glioblastomov študije ne dajejo zadovoljivih rezultatov. Možni vzroki za neuspeh tičijo v slabi prehodnosti krvno-možganske pregrade, prenizki koncentraciji učinkovine v tumorskem tkivu, hkratni aktivaciji več tirozin-kinaz in neodzivnosti na učinkovino. Ireverzibilni zaviralci EGFR utegnejo imeti boljši učinek predvsem na račun višje moči in koncentracije v možganih, kot se je že izkazalo pri terapiji nedrobnoceličnega raka pljuč.

Med učinkovinami, ki delujejo na celične signalne prevodne poti, velja omeniti še monoklonska protitelesa, usmerjena proti hepatocitnemu rastnemu faktorju (angl. *scatter factor/hepatocyte growth factor*, SF/HGF), katerega nivo je pri glioblastomih močno povečan in povezan tudi z visoko malignostjo. Kljub obetavni teoriji so dosedanji rezultati raziskav razočarali, vzroki za to pa so najbrž enaki prej opisanim. S podobnimi težavami se srečujejo tudi pri preizkušanju imatiniba, zaviralca receptorja trombocitnega rastnega faktorja (angl. *platelet-derived growth factor receptor*, PDGFR), pri katerem je že v pripravi druga

generacija (tandutinib, dasatinib) z izboljšanim prehajanjem v centralno živčevje (19).

### Učinkovine, ki delujejo na serin/treonin-kinaze

Različne raziskave tarčnih učinkovin, ki delujejo na znotrajcelične signalne kinaze (zaviralci signalne poti PI3K/Akt, zaviralci protein-kinaze C, zaviralci Ras-mitogensko aktivirajoče protein-kinaze), za zdaj še niso pokazale klinične pomembnosti, mnoge pa so še v teku. Zaviranje signalne poti PI3K/Akt znižuje regulacijo aktivacije več tarč, med drugim sesalske tarče rapamicina (angl. *mammalian target of rapamycin*, mTOR), ki je serin/treoninska kinaza, odgovorna za celično rast, proliferacijo, gibljivost, preživetje in sintezo beljakovin. Sarolimus, zaviralec mTOR, je skupaj s svojimi analogi najnaprednejši zaviralec signalne poti PI3K/Akt. Kljub obetajočim predkliničnim študijam pa se v drugi fazi kliničnega preizkušanja v dveh raziskavah pri zdravljenju rekurentnega glioblastoma multiforme ni izkazal. Njegovo mesto bo v prihodnosti najbrž v kombinirani terapiji različnih rakavih obolenj.

Med zaviralci protein-kinaze C je najbolje raziskan enzastaurin, peroralni serin/treonin-kinazni zaviralec, ki klinično vzpodbudnih rezultatov za zdaj še ne daje, medtem ko je v teku več raziskav, v katerih proučujejo učinek enzastaurina v kombinaciji z drugimi kemoterapevtiki in obsevalno terapijo.

### Učinkovine, usmerjene proti endotelnemu žilnemu rastnemu faktorju

Opažanja, da lahko rast tumorja spremlja tudi razraščanje žilja, segajo več kot stoletje v preteklost (23). Kloniranje žilnega endotelnega rastnega faktorja (angl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) leta 1989 je predstavljalo mejnik v razumevanju tumorske angiogeneze. VEGF namreč vzpodbuja angiogenezo preko več mehanizmov: od proliferacije endotelijskih celic, njihove povečane migracije in invazije do povečane prepustnosti že obstoječega žilja in kemotakse. Neodvisno od žilovtvornih lastnosti ima VEGF tudi neposredni avtokrini učinek na funkcijo tumorskih celic

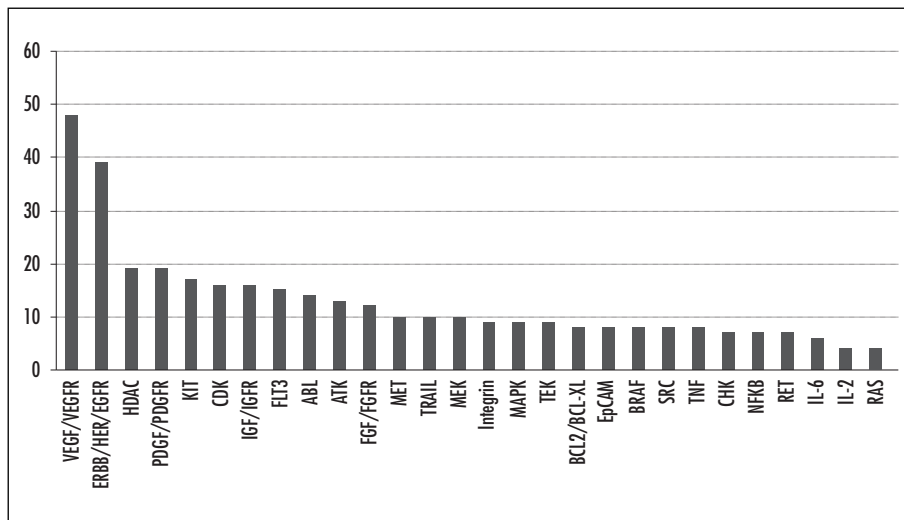
(preživetje, migracija, invazija) in zaviranje imunskega sistema (25).

Štirinajst let kasneje je to odkritje vodilo do razvoja bevacizumaba (Avastin®), prvega monoklonskega protitelesa, usmerjenega proti VEGF-A, ki je najpomembnejši v družini VEGF (23). Bevacizumab, humanizirano monoklonsko protiteleso, je najnaprednejša tarčna terapija za zdravljenje solidnih tumorjev. Je prvi zaviralec VEGF, ki ga je FDA leta 2004 odobrila za zdravljenje metastatskega raka debelega črevesa in danke. Veže in nevtralizira vse humane izoforme VEGF-A in s tem preprečuje vezavo liganda na tirozin-kinazna receptorja 1 (angl. *vascular endothelial growth factor receptor*, VEGFR1) in VEGFR2.

Na podlagi obetavnih izidov iz druge faze preizkušanja zdravila je Sandler s sodelavci v tretji fazi preizkušanja primerjal učinek kemoterapije s karboplatinom/paklitakselom in kombinacije teh z bevacizumabom pri bolnikih z nedrobnoceličnim rakom pljuč. Zara-

di izboljššanega splošnega preživetja in ustavitve napredovanja bolezni je FDA leta 2006 kombinirano zdravljenje z bevacizumabom odobrila kot zdravilo izbora za zdravljenje napredovalega nedrobnoceličnega raka pljuč.

Terapija z bevacizumabom je dala obetajoče rezultate tudi pri zdravljenju raka dojke. V tretji fazi so preizkušali bevacizumab v kombinaciji s kapecitabinom pri bolnicah, ki so že prej prejemale antraciklin in taksan ter se niso odzivale na zdravljenje s trastuzumabom. Ugotovili so signifikantno izboljšanje učinka terapije ob sicer enakem splošnem preživetju kot v kontrolnih skupinah. Raziskava, v kateri je Miller s sodelavci preučeval učinek bevacizumaba v kombinaciji s paklitakselom, je prav tako dala podobne rezultate. Medtem ko je to zadoščalo za ohranitev dovoljenja za uporabo bevacizumaba pri zdravljenju metastatskega raka dojke v Evropi, pa je FDA konec leta 2010 rak dojke umaknila s seznama indikacij za zdravljenje s tem zdra-



Slika 3. Število bioloških zdravil v kliničnih fazah razvoja glede na biološko tarčo leta 2008. VEGF – žilni endotelni rastni faktor, VEGFR – receptor VEGF, ERBB – homolog v-erb eritroblastnega virusnega onkogen, HER – receptor za humani epidermalni rastni faktor, EGFR – receptor za epidermalni rastni faktor, HDAC – histonska deacetilaza, PDGF – rastni faktor trombocitov, PDGFR – receptor PDGF, KIT – homolog v-kit Hardy-Zukerman 4 felinskega sarkomskega virusnega onkogen, CDK – ciklinsko odvisna kinaza, IGF – inzulinu podoben rastni faktor, IGFR – receptor IGF, FLT3 – fms tirozin-kinaza, ABL – c-abl onkogen 1, receptor tirozin-kinaze, FGF – fibroblastni rastni faktor, FGFR – receptor FGF, MET – met protoonkogen, MAPK – mitogen aktivirajoča proteinska kinaza, TEK – endotelna tirozin-kinaza TEK, BCL2 – B-celični limfom 2, BCL-XL – izredno velik B-celični limfom, EpCAM – epiteljska celična adhezivna molekula, BRAF – homolog v-raf murinskega sarkomskega virusnega onkogen, SRC – homolog v-src sarkomskega virusnega onkogen, TNF – tumorje nekrotizirajoči faktor, CHK – holinska kinaza, NFκB – jedrni faktor κB, RET – ret protoonkogen, IL-6 – interlevkin 6, IL-2 – interlevkin 2, RAS – družina onkogenov Ras.

vilom, saj se naj kljub vsemu ne bi izkazal kot varen in učinkovit način zdravljenja (29).

Bevacizumab so leta 2007 preizkusili tudi pri zdravljenju ledvičnega raka. Pri bolnikih, ki so prejeli kombinirano zdravljenje bevacizumaba in interferona gama, so poročali o izboljššanem odzivu na zdravljenje in podvojenem učinku zaustavitve napredovanja bolezni v primerjavi z monoterapijo z interferonom. Po registraciji v Evropi leta 2007 je dve leti kasneje sledila odobritev uporabe bevacizumaba za zdravljenje ledvičnega raka tudi v ZDA.

Leta 2009 je FDA izdala dovoljenje za uporabo bevacizumaba tudi za zdravljenje glioblastoma multiforme, kar je temeljilo na izsledkih kliničnih raziskav, ki so skupno vključevale več kot 200 bolnikov. Pri 20–26 % bolnikov je prišlo do občutljivosti tumorja na zdravljenje, ki je trajala približno 4 mesece.

Proti VEGF je usmerjeno največ bioloških zdravil (slika 3). Med zaviralci sta tudi dve majhni molekuli: vatalanib in sorafenib (Nexavar®). FDA je uporabo slednjega odobrila leta 2007 za zdravljenje hepatocelularnega karcinoma. Sorafenib učinkuje kot antagonist izooblik VEGFR2, VEGFR3 in PDGFR ter pomembnih onkogenov Kit in BRAF, ki kodirata serin/treoninske kinaze. Ker je mutacija BRAF prisotna v 69 % melanomskih celičnih linij, sorafenib trenutno preiskujejo v različnih fazah kliničnega preizkušanja pri bolnikih z metastatskim melanomom.

Vatalanib zavira VEGFR1, VEGFR2, PDGFR, KIT in tirozin-kinazni receptor kolonizirajočega stimulirajočega faktorja-1 (CSF1R, poznan tudi kot c-Fms). V različnih raziskavah je pokazal ugodne učinke pri zdravljenju zasevajočega raka debelega črevesa in danke, kot je povzel Wagner s sodelavci, a za to indikacijo s strani upravnih ustanov še ni bil odobren (35).

Trenutno je v poteku razvoj novih tarčnih zdravil proti VEGF. Aflibercept se na VEGF-A veže s 100-krat višjo afiniteto kot bevacizumab, kljub temu pa preliminarni rezultati raziskav pri zdravljenju nedrobno-celičnega raka pljuč ter raka debelega črevesa in danke v primerjavi z njim niso pokazali bistveno boljšega učinka. Strokovnjaki za zdaj ocenjujejo, da bi aflibercept svoj nastop

na trgu lahko dočakal še v tem letu, in sicer kot drugi izbor pri terapiji raka debelega črevesa in danke (36).

## Aromatazni zaviralci

Rak dojke je z 10 % tveganjem za zbolewnost glavni vzrok smrti žensk v zahodni populaciji. Večina rakov dojk je hormonsko odvisnih. Selektivni modulator estrogenskih receptorjev tamoksifen, ki je do zdaj predstavljal standardno terapijo, ne deluje samo kot estrogenski antagonist, temveč deluje tudi kot estrogenski agonist v smislu ohranjanja kostnih struktur. Aromatazni zaviralci zavirajo delovanje encima aromataze, ki pretvarja androgene v estrogene. Lin je v svojem poročilu povzel rezultate več mednarodnih raziskav, v katerih so se ti zaviralci pokazali za učinkovite in postali nova standardna terapija za hormonsko odvisne rake dojk. Dodaja, da so v sistemski raziskavi poti aktivacije estrogena ugotovili, da sta encima steroidna sulfataza in 17 beta-hidroksisteroid-dehidrogenaza tipa 1, ki imata oba pomembni vlogi pri sintezi estrogena, pomembni tarči pri zdravljenju raka dojke in sta v tem kontekstu dala vzpodbudne rezultate tudi v različnih predkliničnih raziskavah.

Pri 22 % rakov dojke prihaja do prekomerne ekspresije receptorja humanega epidermalnega ravnega faktorja 2 (angl. *human epidermal growth factor receptor 2*, HER2), ki je že leta tarča bioloških zdravil, tako monoklonskega protitelesa trastuzumaba (Herceptin®) kot tudi cepiva HER2 pertuzumaba (Omnitarg®). Med hormonsko odvisnimi raki dojk ima trojno negativni tumor (negativen za estrogenske in progesteronske receptorje ter HER2) slabo preživetje, zato so v nadaljevanju omenjene terapevtske izboljšave nujne. Lapatinib TKI (Tykerb®) deluje proti HER2 in EGFR ter posnema učinek trastuzumaba. V raziskavi Geyerja s sodelavci se je izkazalo, da to zdravilo v kombinaciji s kapecitabinom statistično značilno izboljša preživetje in prognozo bolnic s HER2-pozitivnim rakom dojke. Prihodnost tarčnega zdravljenja raka dojke se kaže predvsem v kombinaciji različnih terapij ter tudi v uporabi funkcionalne genomike in interferenčnih študij DNA.

## Histonske deacetilaze

Histonske deacetilaze (HDAC) sodijo med novejšje molekularne tarče pri zdravljenju rakavih obolenj, ki so se v preteklosti že uporabljale pri zdravljenju nevroloških in psihiatričnih bolezni. HDAC odstranjuje acetilne skupine iz histonskih proteinov in s tem omogoča bolj zgoščeno nukleosomsko strukturo. Pri rakavih obolenjih prihaja do povišanega izražanja HDAC, kar naj bi vzpodbujalo kancerogenezo preko acetilacije in interakcije s ključnimi regulatorji transkripcije. Na tej osnovi je prišlo do razvoja majhnih molekul, ki ne zavirajo samo aktivnosti HDAC, temveč tudi rast, diferenciacijo in apoptozo tumorskih celic *in vitro* ter *in vivo* (40). Od odkritja natrijevega butirata se je pojavilo veliko zanimanje za razvoj zaviralcev HDAC. V različnih fazah kliničnega preizkušanja za zdravljenje hematoloških rakavih bolezni in solidnih tumorjev je trenutno vsaj 15 teh učinkovin (42).

Vorinostat (Zolinza<sup>®</sup>) je prvi zaviralec HDAC, ki ga je FDA na podlagi rezultatov dveh raziskav druge faze kliničnega preizkušanja leta 2006 odobrila za zdravljenje T-celičnega limfoma (43). Kasneje se je pokazalo izboljšanje stabilne bolezni ter delnih in popolnih remisij tudi pri zdravljenju B-celičnega limfoma.

Opravljenih je bilo tudi več raziskav, pri katerih so z vorinostatom zdravili bolnike z nedrobnoceličnim rakom pljuč, karcinomom ovarijskega jajnika, raka glave in vratu, dojke, prostate ter debelega črevesa in danke, pri katerih pa je prišlo do pogostega pojava neželenih stranskih učinkov, ki so učinkovitost in varnost postavili pod vprašaj.

Romidepsin (Istodax<sup>®</sup>) je drugi zaviralec HDAC, ki je bil s strani FDA za zdravljenje T-celičnega limfoma odobren leta 2009. Njegovo močno citotoksično aktivnost v različnih tumorskih celičnih linijah ter kasneje pri miših so ugotovili po tem, ko so sprva preizkušali njegove antibakterijske lastnosti. V nasprotju z vorinostatom se ob uporabi romidepsina pojavlja stranski učinek kardiotsičnosti, domnevno zaradi interakcije učinkovine s kalcijevimi kanali v celicah srčne mišice, kodiranimi z genom hERG (angl. *human Ether-à-go-go Gene*) (48).

Medtem ko sta vorinostat in romidepsin edina odobrena za klinično uporabo, pa je na

pohodu še mnogo drugih učinkovin, kot so mecetinostat, panobinostat, belinostat, etinostat in valproična kislina, v različnih fazah razvoja in kliničnih preizkušanj, ki bodisi kot monoterapija bodisi v kombinaciji predstavljajo obetavno skupino protirakavih učinkovin.

## Zaviralci stresnih proteinov

Stresni proteini (angl. *heat shock protein*, Hsp) so šaperoni, ki sodelujejo pri pravilnem strukturiranju in funkciji t. i. klientnih proteinov, tudi nekaterih, ki igrajo vlogo pri nastanku in napredovanju različnih tumorjev. Tanespimicin je prvi zaviralec Hsp90, ki se veže nanj in sproži proteosomsko razgradnjo klientnih proteinov. Predklinične študije so pokazale občutno upočasnitev rasti celic gliomske linije *in vitro*, zdravilo pa trenutno vstopa v klinične faze preizkušanja pri bolnikih z možganskimi tumorji. Obenem se vzpodbudni rezultati kažejo tudi v raziskavah zdravljenja hepatocelularnega karcinoma, pri katerem pa je ena izmed težav tudi pojav hepatotoksičnosti (50–52).

Vsi modulatorji Hsp90, ki se vežejo na N-terminalni del vezavnega mesta, sprožijo prekomerno izražanje stresnih proteinov, kot so Hsp27, Hsp40, Hsp70 in Hsp90, fenomen, znan kot stresni odgovor. Transkripcijski faktor, odgovoren za indukcijo stresnih proteinov, je stresni faktor 1 (angl. *heat shock factor 1*, HSF1) in je normalno vezan na Hsp90 (54). Zaviralci, ki se vežejo na N-terminalni del, razgradijo kompleks Hsp-90HSF1, pri čemer pride do fosforilacije in translokacije HSF1 v jedro (55). Posledično se HSF1 veže na vezavne elemente stresnih proteinov in sproži transkripcijo stresnih genov. Ker stresni proteini zavirajo apoptozo in izboljšajo celično preživetje, lahko njihovo prekomerno izražanje v rakavih celicah zniža potencial zaviralcev Hsp kot protirakavih učinkovin.

## Zaviralci popravljalnih mehanizmov DNA in genska terapija

Poli(ADP-riboza)-polimeraza (angl. *poly(ADP-ribose) polymerase*, PARP) je jedrni encim, ki signalizira prisotnost DNA ter prekinja in omogoča popravljalne mehanizme DNA.



V raziskavah se trenutno preizkuša osem zaviralcev PARP, ki temeljijo na dveh konceptih (57). V okviru prvega gre za preizkušanje po principu sintetične celične smrti z enim samim zaviralcem PARP pri bolnikih s pomanjkljivo homologno rekombinacijo, kot npr. pri tumorjih z mutacijo BRCA. Pri drugem konceptu gre za vpliv na celično učinkovitost popravljanih mehanizmov napak DNA, povzročenih z različnimi kemoterapijami. V zadnjih letih je na podlagi poročil o aktivnosti zaviralcev PARP pri BRCA1- ali BRCA2-pozitivnem raku jajčnikov in dojke ter kombinacijskem zdravljenju s kemoterapevtiki pri trojno negativnem raku dojke zanimanje za razvoj teh učinkovin močno porastlo (57). AG014699 je bil prvi zaviralec PARP z dokazano klinično aktivnostjo pri zdravljenju napredovalega melanoma, medtem ko se preizkuša tudi v kombinaciji s karboplatinom, paklitakselom, cisplatinom in ciklofosfamidom (58, 59).

Olaparib je peroralni zaviralec PARP, ki je klinično učinkovitost v prvih in drugih fazah preizkušanja pokazal predvsem pri zdravljenju BRCA-pozitivnega raka dojke in ovarija, posebej v kombinaciji z drugimi kemoterapevtiki.

Iniparib je prvi zaviralec PARP, ki je pokazal izboljšano preživetje (s 7,7 mesecev na 12,2 meseca) pri bolnicah s trojno negativnim rakom dojke in vstopil v tretjo fazo preizkušanja (57). Spodbudni so bili tudi prvi rezultati zdravljenja ploščatoceličnega karcinoma pljuč, vendar so preliminarni izidi tretje faze preizkušanja za zdaj bolj ali manj razočarali (63).

Veliparib je zaviralec PARP, ki naj bi potencialno učinkovitost, platine, ciklofosfamida in radioterapije na tumorskih modelih solidnih tumorjev in limfomov. Ker naj bi dobro prehajal krvno-možgansko pregrado, je njegov potencialni učinek zanimiv tudi za zdravljenje možganskih tumorjev.

Geni, ki so povezani z apoptozo tumorskih celic, so pogosto tarča pri genskem zdravljenju raka. Tako deluje zdravilo TNFerade, adenovirusni vektor, ki v tumorsko tkivo, kamor ga vbrizgamo, vnese gen za tumorje nekrotizirajoči faktor alfa (angl. *tumor necrosis factor*  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ). To zdravilo je protein z močnim protitumorskim učinkom, ki pa je pre-

več toksičen za sistemsko uporabo. Sam vnos vektorja ne omogoča zadostne selektivnosti, saj se gen vključuje tudi v mnoge celice okolnega tkiva. Dodatno selektivnost so dosegli z uporabo na sevanje občutljivega promotora, zaradi česar se TNFerade izrazi le v tumorskih celicah, ki jih obsevamo.

Drugi proapoptotični geni, ki so bili testirani v genski terapiji raka, so: p53, p16/p27, FasL, kaspaze, Bax, Bak in apoptin. V rakave celice lahko vnesemo tudi samomorilne gene, kot sta timidin-kinaza virusa HSV in citozin-deaminaza (4).

## VARNOST UPORABE BIOLOŠKIH ZDRAVIL

Kljub razvoju selektivnih tarčnih zdravil v terapiji raka je zdravljenje rakavih obolenj še zmeraj v veliki meri odvisno od vsakega posameznika in njegovega odziva na zdravljenje. Iz različnih ocen je razvidno, da pride pri samo 30–40 % bolnikov z rakom do dejanskega kliničnega izboljšanja, pri še manj bolnikih (15–20 %) pa pride tudi do popolne ali daljše remisije.

Še pred leti so biološka zdravila veljala za najvarnejša zdravila z manj stranskimi učinki zaradi specifičnosti njihovega delovanja. Po več kot desetletju uporabe pa je o njihovi varnosti vedno več ugihanj. Izkazalo se je namreč, da se lahko ob zdravljenju z biološkimi zdravili pojavi cela vrsta stranskih učinkov.

V različnih raziskavah stranskih učinkov je prišlo do odkritij doslej še neznanih vlog nekaterih tarčnih molekul, kar je domnevo o selektivnosti, specifičnosti in varnosti tarčnih zdravil postavilo pod vprašaj. Sprva je vladalo prepričanje, da zaviralci tirozin-kinaze selektivno vplivajo le na rakave celice. Kasneje se je izkazalo, da prihaja pri zaviranju tirozin-kinaz s trastuzumabom do pojava srčnega popuščanja, najbrž zaradi njegovega kardiotoksičnega učinka, ki naj bi sprožil znotrajcelični signalni odgovor po vezavi na membranski receptor HER2. Vpliv zaviralcev HER2 na kardiotoksičnost naj sicer ne bi bil velik, a bo za večjo gotovost treba počakati še na izsledke dodatnih raziskav. Trenutno je na tržišču registriranih skoraj 30 zaviralcev tiro-

zin-kinaze, več kot 100 pa se jih uporablja v kliničnih študijah.

Podoben primer se je pokazal pri zaviralcih angiogeneze, ki ne delujejo le na tumorske celice in žilje, temveč tudi na sproščanje vazodilatatorjev iz endotelnih celic. Arterijska hipertenzija je tako sorazmerno pogost neželen učinek zaviralcev angiogeneze.

Zaradi dobre klinične prakse je pri uvedbi novih razredov tarčnih zdravil potrebno natančno opazovanje in skrbna ocena stranskih učinkov ter natančno razumevanje vzročnih molekularnih mehanizmov za pojav le-teh.

## ZAKLJUČEK

Kljub mnogim raziskavam, identifikaciji novih tarč in razvoju novih bioloških zdravil bo dogajanje na globalnem trgu bioloških zdravil v prihodnjih letih zaznamoval že omenjeni pojav biološko podobnih zdravil in biokemijske izboljšave že obstoječih v procesih posttranslacijske modifikacije. Slednja je postala temelj raziskav v biofarmaceutskem sektorju. Tehnološki napredek je v zadnjih 10–15 letih omogočil boljše razumevanje odnosa med

biokemijskimi modifikacijami proteinov z glikozilacijo, pegilacijo, acetilacijo itd. ter njihovimi funkcijami in posledičnim izboljšanjem specifičnih terapevtskih lastnosti mnogih bioloških zdravil. Hkrati je natančno poznavanje posttranslacijskih poti v mnogih evkariotskih celičnih tipih pospešilo razvoj različnih ekspresijskih sistemov, ki omogočajo izdelavo rekombinantnih proteinov s posttranslacijskimi profili, primernimi za humano uporabo. Ta napredek bo brez dvoma prispeval h kontinuiranemu razvoju mnogih bioloških zdravil naslednjih generacij z izboljšanimi terapevtskimi lastnostmi.

Nenehni razvoj in potekajoče raziskave na področju molekularne tarčne terapije predstavljajo priložnost za izboljšanje trenutnih terapevtskih možnosti pri zdravljenju raka-vih obolenj. Trenutno se resnična klinična vrednost tarčnih terapij še ocenjuje in dopolnjuje, v prihodnje pa bo glavna naloga iskanje najboljših kombinacij bioloških zdravil z adjuvantno terapijo za vsak tumor in posameznega bolnika. V tem oziru je cilj tarčne terapije in tudi obče medicinske stroke omogočiti čim boljše ciljno zdravljenje, hkrati pa ohranjati visoko kakovost življenja.

## LITERATURA

1. Štrukelj B, Kos J. Biološka zdravila. Od gena do učinkovine. 673th ed. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo; 2007.
2. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nat Biotechnol.* 2010; 28 (9): 917–24.
3. Biopharmazeutika – Hightech im Dienst der Patienten [internet]. Berlin: VFA; 2010 [citirano 2011 Mar 16]. Dosegljivo na: <http://www.vfa-bio.de/vb-de/aktuelle-themen/branche/biopharmazeutika-hightech-im-dienst-der-patienten.html>
4. Kos J. Biološka zdravila pri raku. *Farm vestn.* 2009; 60 (2): 61–6.
5. Scott Alex: Pharmaceuticals: Cash Injection for Biologic Drugs [internet]. New York (NY): Chemical Week Magazine; 2010 [citirano 2012 Jan 17]. Dosegljivo na: [http://www.pfenex.com/file/chemical\\_week\\_magazine\\_feb.pdf](http://www.pfenex.com/file/chemical_week_magazine_feb.pdf)
6. ReportsandReports. The top 10 biosimilars players; positioning performance and SWOT analysis [internet]. Dallas (TX): SBwire. 2010 [citirano 2011 Jul 25]. Dosegljivo na: <http://www.sbwire.com/press-releases/sbwire-56584.htm>
7. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med.* 1994; 331 (19): 1286–92.
8. Chakraborty C, Agoramorthy G. A special report on India's biotech scenario: advancement in biopharmaceutical and health care sectors. *Biotechnol Adv.* 2010; 28 (1): 1–6.
9. Maggon K: World Best Selling Human Medicinal Brands 2010, Top Ten, Top Twenty, First Global Market Report. Results and discussion [internet]. New York (NY): Knol BETA; 2011 [citirano 2011 Jul 29]. Dosegljivo na: [http://knol.google.com/k/krishan-maggon/top-ten-twenty-best-selling-drugs-2010/3fy5eowysuq3/141#Results\\_and\\_Discussion](http://knol.google.com/k/krishan-maggon/top-ten-twenty-best-selling-drugs-2010/3fy5eowysuq3/141#Results_and_Discussion)

10. Stoffel A. Targeted therapies for solid tumors: current status and future perspectives. *BioDrugs*. 2010; 24 (5): 303–16.
11. Imai K, Takaoka A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6 (9): 714–27.
12. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100 (1): 57–70.
13. Brunetto AT, Kristeleit RS, de Bono JS. Early oncology clinical trial design in the era of molecular-targeted agents. *Future Oncol*. 2010; 6 (8): 1339–52.
14. Quant EC, Wen PY. Novel Medical Therapeutics in Glioblastomas, Including Targeted Molecular Therapies, Current and Future Clinical Trials. *Neuroimaging Clin N Am*. 2010; 20 (3): 425.
15. Futreal PA, Kasprzyk A, Birney E, et al. Cancer and genomics. *Nature*. 2001; 409 (6822): 850–2.
16. Bigner SH, Humphrey PA, Wong AJ, et al. Characterization of the Epidermal Growth-Factor Receptor in Human Glioma Cell-Lines And Xenografts. *Cancer Res*. 1990; 50 (24): 8017–22.
17. Stommel JM, Kimmelman AC, Ying HQ, et al. Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies. *Science*. 2007; 318 (5848): 287–90.
18. Li D, Ambrogio L, Shimamura T, et al. BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in pre-clinical lung cancer models. *Oncogene*. 2008; 27 (34): 4702–11.
19. Dai H, Marbach P, Lemaire M, et al. Distribution of STI-571 to the brain is limited by P-glycoprotein-mediated efflux. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 304 (3): 1085–92.
20. Chang SM, Wen P, Cloughesy T, et al. Phase II study of CCI-779 in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Invest New Drugs*. 2005; 23 (4): 357–61.
21. Galanis E, Buckner JC, Maurer MJ, et al. Phase II trial of temsirolimus (CCI-779) in recurrent glioblastoma multiforme: a North Central Cancer Treatment Group Study. *J Clin Oncol*. 2005; 23 (23): 5294–304.
22. Butowski N, Lamborn K, Chang S, et al. Phase I/II Study of Enzastaurin (Enz) Plus Temozolomide (Tmz) and Radiation Therapy (Xrt) in Patients (Pts) with Glioblastoma Multiforme (Gbm) or Gliosarcoma (Gs). *Neuro-Oncology*. 2008; 10 (6): 1073–4.
23. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, et al. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2004; 3 (5): 391–400.
24. Rafii S, Lyden D, Benezra R, et al. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer*. 2002; 2 (11): 826–35.
25. Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8 (8): 579–91.
26. Sandler A, Gray R, Perry MC, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2006; 355 (24): 2542–50.
27. Miller KD, Chap LI, Holmes FA, et al. Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005; 23 (4): 792–9.
28. Miller K, Wang M, Gralow J, et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2007; 357 (26): 2666–76.
29. U.S. Food and Drug Administration: FDA News Release. FDA begins process to remove breast cancer indication from Avastin label [internet]. Silver Spring MD: U.S. Food and Drug Administration; 2010 [citrano 2011 Dec 12]. Dosegljivo na: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm237172.htm>
30. Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, et al. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet*. 2007; 370 (9605): 2103–11.
31. Friedman HS, Prados MD, Wen PY, et al. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol*. 2009; 27 (28): 4733–40.
32. Nghiemphu PL, Liu W, Lee Y, et al. Bevacizumab and chemotherapy for recurrent glioblastoma: a single-institution experience. *Neurology*. 2009; 72 (14): 1217–22.
33. Amaravadi RK, Schuchter LM, McDermott DF, et al. Phase II Trial of Temozolomide and Sorafenib in Advanced Melanoma Patients with or without Brain Metastases. *Clin Cancer Res*. 2009; 15 (24): 7711–8.
34. Wellbrock C, Hurlstone A. BRAF as therapeutic target in melanoma. *Biochem Pharmacol*. 2010; 80 (5): 561–7.
35. Wagner AD, Arnold D, Grothey AA, et al. Anti-angiogenic therapies for metastatic colorectal cancer. 2009 Jul 8 [citrano 2011 Dec 26]. In: *The Cochrane Database of Systematic Reviews* [Internet]. Hoboken (NJ): John Wiley & Sons, Ltd. c1999–2011. 702K. Dosegljivo na: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD005392.pub3/abstract>. Številka vpisa: CD005392.
36. Genetic Engineering & Biotechnology News. Regeneron and Sanofi-Aventis Report Positive Phase III mCRC Trial Data. New York: Genetic Engineering & Biotechnology News; 2011 [citrano 2011 Dec 12]. Dosegljivo na: <http://www.genengnews.com/gen-news-highlights/regeneron-and-sanofi-aventis-report-positive-phase-iii-mcrc-trial-data/81245067/>
37. Lin SX, Chen J, Mazumdar M, et al. Molecular therapy of breast cancer: progress and future directions. *Nat Rev Endocrinol*. 2010; 6 (9): 485–93.

38. Buzdar AU. Role of biologic therapy and chemotherapy in hormone receptor- and HER2-positive breast cancer. *Ann Oncol.* 2009; 20 (6): 993-9.
39. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med.* 2006; 355 (26): 2733-43.
40. Federico M, Bagella L. Histone deacetylase inhibitors in the treatment of hematological malignancies and solid tumors. *J Biomed Biotechnol* [internet]. 2011 [citirano 2012 Jan 17]. DOI:10.1155/peds.2011-475641. Dosegljivo na: <http://www.hindawi.com/journals/jbb/2011/475641/>
41. Kruh J. Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Mol Cell Biochem.* 1982; 42 (2): 65-82.
42. Marks PA, Xu WS. Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *J Cell Biochem.* 2009; 107 (4): 600-8.
43. Marks PA, Breslow R. Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nat Biotechnol.* 2007; 25 (1): 84-90.
44. Crump M, Coiffier B, Jacobsen ED, et al. Phase II trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) in relapsed diffuse large-B-cell lymphoma. *Ann Oncol.* 2008; 19 (5): 964-9.
45. Blumenschein GR Jr, Kies MS, Papadimitrakopoulou VA, et al. Phase II trial of the histone deacetylase inhibitor vorinostat (Zolinza, suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) in patients with recurrent and/or metastatic head and neck cancer. *Invest New Drugs.* 2008; 26 (1): 81-7.
46. Bradley D, Rathkopf D, Dunn R, et al. Vorinostat in advanced prostate cancer patients progressing on prior chemotherapy (National Cancer Institute Trial 6862): trial results and interleukin-6 analysis: a study by the Department of Defense Prostate Cancer Clinical Trial Consortium and University of Chicago Phase 2 Consortium. *Cancer.* 2009; 115 (23): 5541-9.
47. Vansteenkiste J, Van Cutsem E, Dumez H, et al. Early phase II trial of oral vorinostat in relapsed or refractory breast, colorectal, or non-small cell lung cancer. *Invest New Drugs.* 2008; 26 (5): 483-8.
48. Lane AA, Chabner BA. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *J Clin Oncol.* 2009; 27 (32): 5459-68.
49. Sauvageot CME, Weatherbee JL, Kesari S, et al. Efficacy of the HSP90 inhibitor 17-AAG in human glioma cell lines and tumorigenic glioma stem cells. *Neuro-Oncology.* 2009; 11 (2): 109-21.
50. Breinig M, Caldas-Lopes E, Goepfert B, et al. Targeting heat shock protein 90 with non-quinone inhibitors: a novel chemotherapeutic approach in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2009; 50 (1): 102-12.
51. Matsushima-Nishiwaki R, Adachi S, Yoshioka T, et al. Suppression by heat shock protein 20 of hepatocellular carcinoma cell proliferation via inhibition of the mitogen-activated protein kinases and AKT pathways. *J Cell Biochem.* 2011; 112 (11): 3430-9.
52. Park YN. Update on precursor and early lesions of hepatocellular carcinomas. *Arch Pathol Lab Med.* 2011; 135 (6): 704-15.
53. Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, et al. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol.* 2007; 81 (1): 15-27.
54. Shamovsky I, Nudler E. New insights into the mechanism of heat shock response activation. *Cell Mol Life Sci.* 2008; 65 (6): 855-61.
55. Guetouche T, Boellmann F, Lane WS, et al. Analysis of phosphorylation of human heat shock factor 1 in cells experiencing a stress. *BMC Biochem* [internet]. 2005 [citirano 2012 Jan 17]; 6 (4). DOI:10.1186/peds.1471-209164. Dosegljivo na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1079796/pdf/1471-2091-6-4.pdf>
56. Bagatell R, Paine-Murrieta GD, Taylor CW, et al. Induction of a heat shock factor 1-dependent stress response alters the cytotoxic activity of hsp90-binding agents. *Clin Cancer Res.* 2000; 6 (8): 3312-8.
57. Chen A. PARP inhibitors: its role in treatment of cancer. *Chin J Cancer.* 2011; 30 (7): 463-71.
58. Plummer R, Lorigan P, Evans J, et al. First and final report of a phase II study of the poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor, AGO14699, in combination with temozolomide (TMZ) in patients with metastatic malignant melanoma (MM). *Journal of Clinical Oncology.* 2006; 24 (18): 456s.
59. ClinicalTrials.gov: A study of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor PF-01367338 in combination with several chemotherapeutic regimens [internet]. Bethesda (MD): 2011 [citirano 2011 Dec 26]. Dosegljivo na: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01009190?term=PF-01367338&rank=1>
60. Audeh MW, Carmichael J, Penson RT, et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet.* 2010; 376 (9737): 245-51.
61. Gelman K, Hirte HW, Robidoux A, et al. Can we define tumors that will respond to PARP inhibitors? A phase II correlative study in ovarian cancer patients and triple negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010; 28 suppl 15: a3002.
62. Kaye S, Kaufman B, Lubinski J, et al. Phase II Study of the Oral Parp Inhibitor Olaparib (Azd2281) Versus Liposomal Doxorubicin in Ovarian Cancer Patients with Brca1 and/or Brca2 Mutations. *J Clin Oncol.* 2012; 30 (4): 372-9.
63. Spigel D, Harper PG, Hainsworth F, et al. Randomized phase III trial of gemcitabine/carboplatin with or without iniparib (BSI-201) in patients with previously untreated stage IV squamous non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol.* 2011; 29 suppl 15: TPS220.

64. Kummar S, Chen A, Ji J, Zhang Y, et al. Phase I Study of ABT-888, a PARP Inhibitor, in Combination with Topotecan Hydrochloride in Adults with Refractory Solid Tumors and Lymphomas. *Cancer Res.* 2011; 71 (17): 5626–34.
65. Kummar S, Kinders R, Gutierrez ME, et al. Phase 0 clinical trial of the poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor ABT-888 in patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol.* 2009; 27 (16): 2705–11.
66. Donawho CK, Luo Y, Penning TD, et al. ABT-888, an orally active poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor that potentiates DNA-damaging agents in preclinical tumor models. *Clin Cancer Res.* 2007; 13 (9): 2728–37.
67. Rasmussen H, Rasmussen C, Lempicki M, et al. TNFerade Biologic: preclinical toxicology of a novel adenovector with a radiation-inducible promoter, carrying the human tumor necrosis factor alpha gene. *Cancer Gene Ther.* 2002; 9 (11): 951–7.
68. Coate LE, John T, Tsao MS, et al. Molecular predictive and prognostic markers in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol.* 2009; 10 (10): 1001–10.
69. Mountzios G, Sanoudou D, Syrigos KN. Clinical Pharmacogenetics in Oncology: the Paradigm of Molecular Targeted Therapies. *Curr Pharm Design.* 2010; 16 (20): 2184–93.
70. Force T, Krause DS, Van Etten RA. Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition. *Nature Reviews Cancer.* 2007; 7 (5): 332–44.
71. Chen MH, Kerkela R, Force T. Mechanisms of cardiac dysfunction associated with tyrosine kinase inhibitor cancer therapeutics. *Circulation.* 2008; 118 (1): 84–95.
72. Yang JC, Haworth L, Sherry RM, et al. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *New Engl J Med.* 2003; 349 (5): 427–34.

Prispelo 10. 1. 2011