

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
Katedra biologických a biochemických věd

INHIBITORY PROTEAZOMU
BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

AUTOR BAKALÁŘSKÉ PRÁCE:
VEDOUCÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE:

Magdaléna Ďugová
RNDr. Karel Královec, Ph.D.

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Magdaléna Ďugová**
Osobní číslo: **C16231**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Inhibitory proteazomu**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Vypracujte literární rešerši obsahující:

1. Strukturu a funkci systému ubikvitin - proteazom. Mechanismus degradace proteinů ubikvitinem.
2. Biologické účinky inhibitorů proteazomu se zaměřením na mechanismus jejich protinádorového působení. Využití inhibitorů proteazomu v terapii nádorových onemocnění.
3. Zhodnocení terapeutického potenciálu inhibitorů proteazomu u nádorových onemocnění.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Karel Královec, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **21. prosince 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30.6. 2020

.....
Magdaléna Ďugová

Poděkování

Touto formou bych především ráda poděkovala svému vedoucímu práce RNDr. Karlu Královcovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval. Také bych ráda poděkovala mé sestřenici Mgr. Lence Habartové za překládání odborných článků a její rady při zpracování.

Anotace

Onemocnění různými typy rakoviny je v lidské populaci stále čtenější. S rostoucím procentem výskytu roste též rezistence na běžně používaná léčiva. Z toho důvodu jsou vyvíjeny a testovány nové látky, které by pomohly při léčbě tohoto onemocnění. Vysoce efektivní strategií je inhibice proteazomu, která se úspěšně používá od roku 2003, kdy bylo schváleno první uznané léčivo, bortezomib (I. generace). Velké procento pacientů bylo na léčbu bortezomibem rezistentních, což vedlo k vývoji inhibitorů proteazomu II. generace (carfilzomib, ixazomib, marizomib, orpozomib a disulfiram). Inhibitory I. a II. generace jsou zaměřeny na 20S podjednotku proteazomu. Vykazují dobrou léčebnou odpověď, nicméně se poměrně často objevuje relaps onemocnění. Z tohoto důvodu se při hledání nových typů léčiv studie zaměřily především na 19S podjednotku proteazomu. Tak vznikly další typy potenciálních léčiv, které různým způsobem ovlivňují ubikvitin-proteazomový systém (UPS). Mezi tyto látky patří RA190, RA183, RIP-1, ubistatin B, capzimin, KDT-11, pevonedistat, serdemetan, nutlin-3 a NSC-207895, jenž v současné době procházejí intenzivním testováním. Je třeba zjistit, proč dochází k rezistenci nádorových buněk na používané léčivo a eliminovat případné vedlejší účinky.

Klíčová slova:

proteazom, ubikvitin, degradace proteinů, inhibitory proteazomu, rakovina

Annotation

Disease from various types of cancer is becoming more common in the human population. As the percentage of occurrence increases, so does resistance to commonly used drugs. For this reason, agents are being developed and tested to help with the treatment of this disease. A highly effective strategy is proteasome inhibition, which has been used successfully since 2003, when the first authorized drug, bortezomib (generation I), was approved. A large percentage of patients were resistant to bortezomib, leading to the development of II. generation proteasome inhibitors (carfilzomib, ixazomib, marizomib, orprozomib and disulfiram). Inhibitors of I. and II. generations were focused on the 20S proteasome subunit. They showed good results, however, relapse often occurred. For this reason, in the search for new types of drugs, studies have focused on the 19S proteasome subunit. So the new potential drugs that variously target the ubiquitin-proteasome system (UPS) such as RA190, RA183, RIP-1, ubistatin B, capzimin, KDT-11, pevonedistat, serdemetan, nutlin-3 and NSC-207895 were formed. These potential drugs are currently under intensive investigation. It is necessary to find out why tumor cells are resistant to the used drugs and to eliminate their side effects.

Keywords:

proteasome, ubiquitin, protein degradation, proteasome inhibitors, cancer

1	Úvod.....	11
2	Struktura proteazomu	12
3	Ubikvitin-proteazomový systém.....	14
3.1	Funkce	14
3.2	Ubikvitinace.....	15
4	Inhibitory proteazomu	18
4.1	Mechanismy protinádorového působení.....	18
4.1.1	Inhibice jaderného faktoru kappa B.....	18
4.1.2	Buněčný cyklus.....	19
4.1.3	Regulace apoptózy	19
4.1.4	Stres endoplazmatického retikula	20
4.1.5	Inhibice angiogeneze.....	20
4.1.6	Opravy DNA.....	21
4.2	Autofagie	21
5	Inhibitory proteazomu I. generace	23
5.1	Bortezomib	23
5.1.1	Historie a struktura.....	23
5.1.2	Mechanismus působení	24
5.1.3	Klinické studie	26
6	Inhibitory proteazomu II. generace	27
6.1	Carfilzomib.....	27
6.1.1	Historie a struktura.....	27
6.1.2	Mechanismus působení	28
6.1.3	Klinické studie	29
6.2	Ixazomib	30
6.2.1	Historie a struktura.....	30
6.2.2	Mechanismus působení	31
6.2.3	Klinické studie	31
6.3	Disulfiram.....	32
6.3.1	Historie a struktura.....	32
6.3.2	Mechanismus působení	33
6.3.3	Klinické studie	34
6.4	Marizomib.....	34
6.4.1	Historie a struktura.....	34
6.4.2	Mechanismus působení	35
6.4.3	Kinické studie	36
6.5	Oprozomib	37
6.5.1	Historie a struktura.....	37

6.5.2	Mechanismus působení	38
6.5.3	Klinické studie	38
7	Další látky ovlivňující ubikvitin-proteazomový systém	40
7.1	Pevonedistat	40
7.1.1	Historie a struktura.....	40
7.1.2	Mechanismus působení	41
7.1.3	Klinické studie	41
7.2	Capzimin.....	42
7.3	Ubistatin B	43
7.4	RA190 a RA183	43
7.5	KDT-11.....	43
7.6	RIP-1	44
7.7	Serdemetan	44
7.8	Nutlin-3.....	44
7.9	NSC-207895	45
8	Zhodnocení terapeutického potenciálu.....	46
9	Závěr.....	48
10	Literatura	49

SEZNAM ZKRATEK

ALDH	enzym aldehyd dehydrogenáza
AML	akutní myeloidní leukémie
ATP	adenosintrifosfát
Bax	proapoptotický protein (BCL2-associated X protein)
Bcl-2	antiapoptotický protein (B-cell lymphoma 2)
Bcl-XL	antiapoptotický protein (B-cell lymphoma-extra large)
c20S	konstitutivní proteazom
CDK	cyklin dependentní kynáza
CP	centrální jednotka
CRLs	cullin-RING ubikvitin ligázy
CYP	cytochrom P
DUB	deubikvitinační enzym
E1	ubikvitin aktivující enzym
E2	ubikvitin konjugující enzym
E3	ubikvitin ligáza
FAS ligand	transmembránový protein typu II
GBM	glioblastom multiforme
HDAC	histondeacetyláza
HDM2	human double minute 2
HtrA2/Omi	serinová proteáza HtrA2
i20S	imunoproteazom
IAP	inhibitor apoptózových proteinů
IGF-I	růstový faktor podobný inzulínu
IKK	enzym I κ B kináza
IL-6	interleukin-6
I κ B	inhibitor jaderného faktoru kappa B
MM	mnohočetný myelom
MTD	maximální tolerovaná dávka
NAE	NEDD8 aktivující enzym
NEDD8	protein NEDD8 (neural cell developmentally downregulated 8)
NF- κ B	jaderný faktor kappa B
NOXA	proapoptotický protein (phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1)

p21	protein p21
p27	protein p27
p53	protein p53
PARP	poly(ADP-ribose) polymeráza
PUMA	proapoptotický protein PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis)
ROS	kyslíkové radikály
RP	regulační jednotka
RRMM	relabující/refrakterní mnohočetný myelom
TNBC	triple negativní karcinom prsu
TNF- α	faktor nádorové nekrózy α
UPS	ubikvitin-proteazomový systém
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor

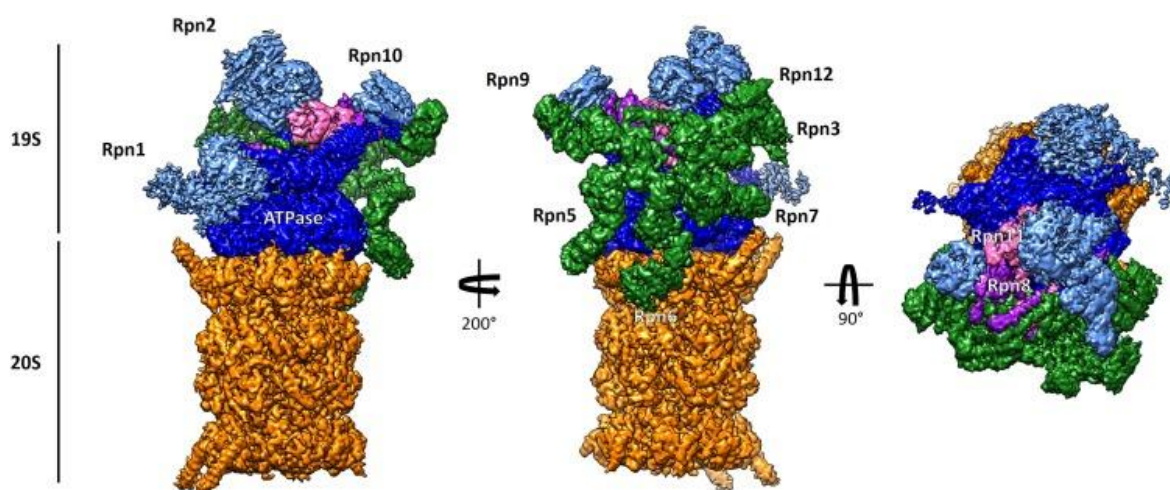
1 Úvod

Tato literární rešerše se zabývá inhibitory proteazomu. Ty jsou v současné době používány při léčbě různých typů rakoviny. Onemocnění tohoto typu je stále čtenější, z tohoto důvodu je potřeba hledat vhodná léčiva. Inhibice proteazomu se jeví slibně, což dokládají studie prováděné po celém světě (např. Veathington a Mallampalli, 2014; Sherman a Li, 2020; Lim a kol, 2007a). Před více než 20 lety byla inhibice proteazomu považována za riskantní a zároveň neudržitelný přístup k léčbě rakoviny. Dnes inhibitory proteazomu představují základ při léčbě mnohočetného myelomu (MM) a výrazně zlepšují kvalitu života a přežívání pacientů s MM (Park a kol., 2018). Nejčastěji používaným inhibitorem proteazomu je bortezomib. Je využíván převážně při léčbě MM. Jelikož se pacienti často stávali rezistentními na léčbu bortezomibem bylo nutno vyvinout nový druh léčiva (inhibitory II. generace). Jejich účinnost byla srovnatelná s bortezomibem, objevoval se však relaps onemocnění (Ma a Diao, 2015; Jao a kol., 2016). Následně bylo přistoupeno k použití dalších látek ovlivňujících ubikvitin-proteazomový systém (UPS) (Sherman a Li, 2020). Z inhibitorů I. generace je u nás dostupný bortezomib, který je celosvětově nejčastěji používán. Z inhibitorů II. generace u nás můžeme najít ixazomib s registrovaným názvem Ninlaro, carfilzomib s registrovaným názvem Kyprolis a disulfiram s registrovaným názvem Antabus. Inhibitory nové generace zatím nejsou klinicky užívány, protože většina z nich je stále ve fázi testování.

Cílem této bakalářské práce je shrnout současné poznatky o ubikvitin-proteazomovém systému, inhibitech proteazomu a o možnostech léčby nádorových onemocnění pomocí inhibitorů proteazomu.

2 Struktura proteazomu

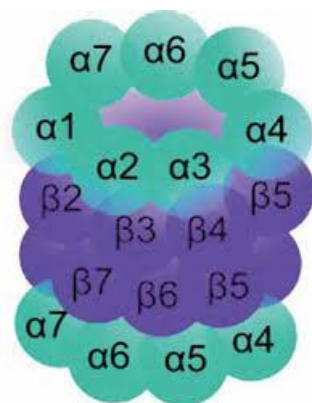
Eukaryotický 26S proteazom (obr. 1) je velký multi-podjednotkový komplex ve tvaru válce, který se podílí na degradaci většiny proteinů v buňkách. Skládá se nejméně z 33 podjednotek, které tvoří dva subkomplexy, 20S a 19S. Centrální jednotka (CP – core particle) 20S tvoří jádro válce. Regulační jednotka (RP – regulatory particle) 19S se nachází na konci každé centrální jednotky 20S a tvoří tak pomyslné kraje válce (Kisselev a kol., 2006; Budenholzer a kol., 2017). 19S se skládá alespoň z 19 podjednotek, které jsou uspořádány do subkomplexů bází a víka. Bázi tvoří šest ATPáz (Rpn1 – 6), které dohromady vytvářejí hexamerní kruh a čtyři non-ATPázové podjednotky, které tvoří dva proteiny skeletu (Rpn1 a 2) a dva ubikvitinové receptory (Rpn10 a 13). Zbývajících devět podjednotek (Rpn3, 5 – 9, 11, 12 a 15) představuje strukturu víka. Patří sem šest podjednotek (Rpn3, 5, 6, 7, 9 a 12) obsahujících COP9/sigalosome-eIF9 (PCI), dvě podjednotky (Rpn8 a 11) Mpr1 – Pad1 – N – terminální (MPN) a malý adhezivní protein Sem1 (Budenholzer a kol., 2017).



Obr. 1: Struktura lidského 26S proteazomu. 26S (oranžová); ATPáza (modrá); Rpn1, 2, 10 (světle modrá); Rpn3, 5, 6, 7, 9, 12 (zelená); Rpn8 (fialová), Rpn11 (růžová) (Upraveno z: Wehmer a Sakata, 2016).

Hlavní funkcí subkomplexu 19S je rozpoznat, rozložit, deubikvitinovat a translokovat substráty dočástice 20S, která obsahuje proteolytická místa proteazomu a dochází zde k degradaci substrátů na krátké proteiny. Proteolytické štěpení substrátů probíhá tedy v centrální dutině 20S, kde jsou uložena aktivní místa. 20S je tvořena duplikací sedmi α a sedmi β podjednotek, které tvoří čtyři axiálně naskládané heteroheptamerní kruhy (obr. 2). α kruhy mají omezovací a bránící funkci, zatímco podjednotky β (β 1, β 2 a β 5) obsahují NH_2 -terminální threoniny, které jsou zodpovědné za různé proteolytické aktivity proteazomu.

Podjednotky $\beta 1$, $\beta 2$ a $\beta 5$ jsou označovány jako podobné kaspáze (caspase-like), trypsinu (trypsin-like) a chymotrypsinu (chymotrypsin-like), protože preferované místo ke štěpení každé podjednotky je podobné jejich známým proteázám (Wang a kol., 2017; Wehmer a Sakata, 2016).



Obr. 2: Struktura proteazomu. Čtyři prstence po 7 podjednotkách v pořadí $\alpha\beta\beta\alpha$ (Převzato z: Matějčková a kol., 2013).

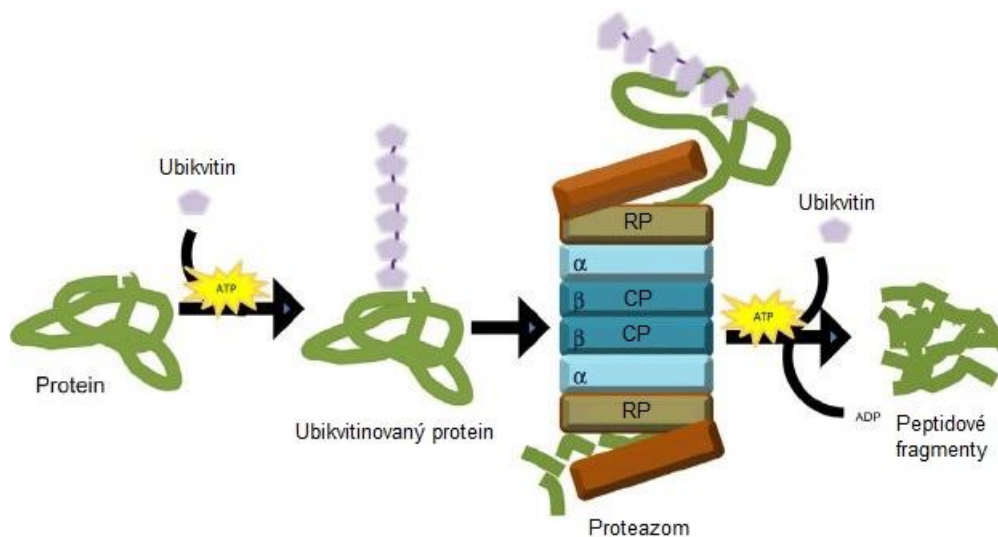
Pro proniknutí do úzkého axiálního kanálu z ATPázy musí být substráty před translokací rozloženy a deubikvitinovány. Většina substrátů je v první řadě kovalentně modifikována ubikvitinem a vzniká ubikvitinovaný substrát, který slouží k nasměrování do proteazomu. Ubikvitinovaný substrát je do proteazomu vázán pomocí vnitřních ubikvitinových receptorů (Rpn10, Rpn13). Poté probíhá deubikvitinace vázaných substrátů za pomoci vnitřní deubikvitinázy Rpn11 (Kupperman a kol., 2010).

3 Ubikvitin-proteazomový systém

3.1 Funkce

Ubikvitin-proteazom systém (UPS) je hlavním systémem degradace intracelulárních proteinů (Schwartz a Ciechanover, 2009). Primární funkcí UPS je regulace buněčných proteinů, která je nezbytná pro diferenciaci a proliferaci buněk (Ciechanover, 2005). Regulační funkce jsou zprostředkovány především ubikvitinovými ligázami a deubiquitačními enzymy (Gupta a kol., 2018). Zpočátku je ubikvitin aktivován prostřednictvím ATP-dependentní tvorby vysokoenergetické thioesterové vazby mezi aktivním místem cysteinu ubikvitin aktivujícího enzymu (E1) a karboxylovým koncem ubikvitinu. Ubikvitin je poté přenesen do ubikvitin konjugujících enzymů (E2) a nakonec je konjugován k lysinovým zbytkům v substrátu nebo k N-terminální aminoskupině pomocí ubikvitin ligázy (E3). Tato ligáza rozpoznává specifické vzory v cílovém proteinu. Další molekuly ubikvitinu se připojí na první molekulu a vytvářejí polyubikvitinovaný shluk molekul. Ten je rozpoznáván proteazomem 26S, což vede k degradaci substrátu (obr. 3) (Gong a kol., 2016).

Během normální proteinové homeostázy jsou specifické proteiny určeny k destrukci prostřednictvím připojeného ubikvitinu (Adams, 2004). K tomu slouží specializované ubikvitin-proteinové ligázy, které mají schopnost rozpoznávat chybně složené proteiny oproti normálně složeným proteinům (Fredrickson a Gardner, 2012). Pleiotropní účinky inhibitorů proteazomu také vedou k aktivaci antiapoptotických drah, které mohou potlačit protinádorovou aktivitu (Orlowski a Kuhn, 2008). Apoptóza je indukována extra- nebo intracelulárními signály, které spouštějí charakteristické signalizační kaskády, včetně jaderné kondenzace a fragmentace DNA (Khazaei a kol., 2017).



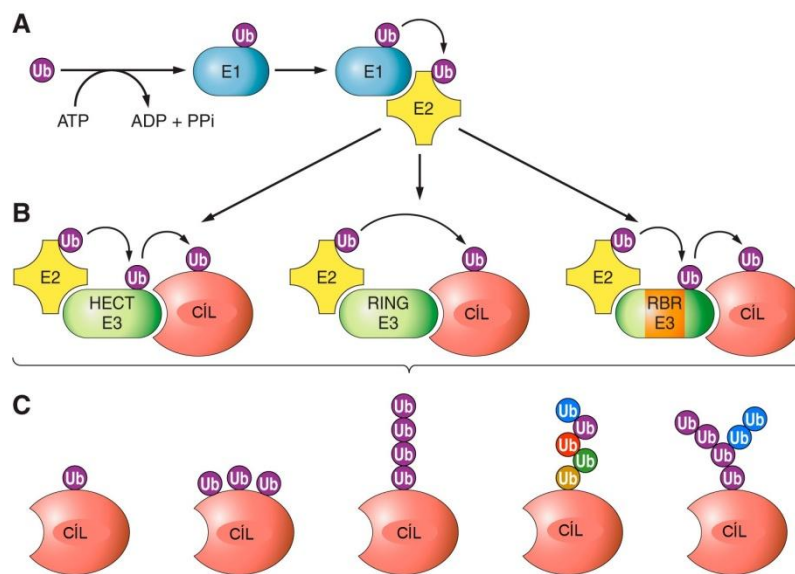
Obr. 3: Struktura a funkce proteazomu. Proteiny určené k degradaci jsou konjugovány s více jednotkami ubikvitinu a poté jsou přiváděny do regulační částice (RP) proteazomu. Proteiny jsou degradovány na peptidy v β podjednotkách jádrové částice (CP) a produkty jsou volné ubikvitinové jednotky a peptidové fragmenty (Převzato a upraveno z: Teicher a Tomaszewski, 2015).

3.2 Ubikvitinace

Ubikvitin je malý protein, který se skládá ze 76 aminokyselinových zbytků. Nachází se ve všech tkáních eukaryotických organismů. V buňce se vyskytuje buď jako volná molekula, nebo je připojen k proteinům pomocí kovalentní vazby. Proces značení proteinů ubikvitinem se nazývá ubikvitinace a byl objeven v 70. letech (Shaid a kol., 2013). V buňce představuje hlavní signál, kterým jsou vyvažovány hladiny intracelulárních proteinů a podílí se na hlavních buněčných procesech, jako je apoptóza, replikace a opravy DNA, progresse buněčného cyklu, transkripce a imunitní reakce (Mukhopadhyay a Riezman, 2007; Ikeda a Dikic, 2008; Zientara-Rytter a Subramani, 2019).

Většina proteinů určených k degradaci je před vstupem do proteazomu označena pomocí ubikvitinových značek nebo degronů. Degron je část proteinu složená ze sekvencí krátkých aminokyselin a je důležitá při regulaci proteinů. Ve většině případů tvoří ubikvitin isopeptidovou vazbu pomocí jeho C-koncové karboxy-skupiny s ϵ -aminoskupinou lysinových zbytků v substrátech. Váže se také s N-koncem polypeptidového řetězce nebo postranního řetězce cysteinového zbytku substrátového proteinu. V mnoha případech jsou k lysinovému zbytku prvního ubikvitinu připojeny další a dochází tak k vytvoření polyubikvitinového řetězce (Foot a kol., 2017). Celý proces vedoucí k ubikvitinaci probíhá v několika krocích

(obr. 4). Počátečním krokem je aktivace ubiquitinů prostřednictvím ubiquitin aktivujícího enzymu (E1), který připojuje glycin 76 k cysteinovému zbytku v E1 přes thioesterovou vazbu. Poté je ubiquitin přenesen na cysteinový zbytek enzymu konjugujícího ubiquitin (E2). V posledním kroku je pomocí ubiquitinové ligázy (E3) usnadněn přenos ubiquitinů z nabitého E2 do vnitřního lysinového zbytku v substrátu. Substráty mohou být monoubikvitinované nebo polyubikvitinované na jednom nebo více lysinových zbytcích. Ubikvitin lze také odstranit z ubikvitinovaných proteinů působením deubiquitinačních enzymů (DUB) (Foot a kol., 2017).

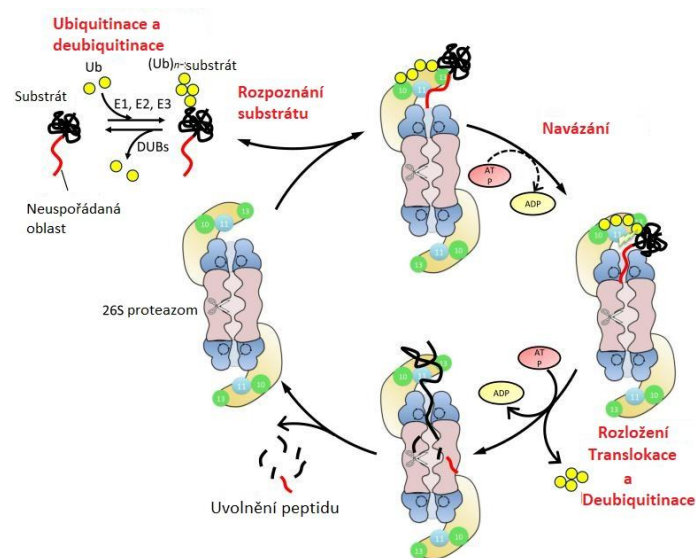


Obr. 4: Ubikvitinační kaskáda. A: Prvním krokem je aktivace ubiquitinů pomocí E1, který je závislý na dodání energie. Takto aktivovaný ubiquitin se poté převede na E2. B: V posledním kroku E3 katalyzuje přenos ubiquitinů na cílový substrát. Existují tři známé třídy E3, a to HECT E3, který nejdříve přijme ubiquitin na katalytický cysteinový zbytek, a poté jej přeneseme na substrát; RING E3 usnadňuje přenos přímo z E2 na substrát; RBR E3 funguje jako hybrid RING/HECT. C: Substráty mohou být modifikovány různými způsoby např. monoubikvitinací, multi-monoubikvitinací, homotypovou polyubikvitinací, heterotypovou polyubikvitinací a rozvětvením (Upraveno z: Foot a kol.; 2017).

Degradace může být řízena načasováním ubikvitinačního procesu. Mnoho E3 rozpozná své substráty pouze tehdy, pokud je jejich místo interakce nejdříve fosforylováno kinázou (Deshaies a Joazeiro, 2009). Pořadí degradace je během buněčného cyklu řízeno také regulátory. Ty jsou ubikvitinovány stejnými E3. V eukaryotech je degradace proteinu ve většině případů iniciována připojením ubiquitinových řetězců, které pomocí 26S proteazomu označují proteiny pro destrukci (Rape a kol., 2006).

Ubikvitinové značky na proteinech se prostřednictvím působení enzymů E3 a DUB mohou zvětšovat a zmenšovat, i když jsou ve vazbě s proteazomem. DUBy upravují (zastříhávají) ubikvitinové řetězce z distálního konce na jedné nebo několika ubikvitinačních skupinách najednou. Omezuje se tak doba, po kterou zůstává zbytek substrátu připojen na proteazom (Lee a kol., 2010).

Proteazom rozpoznává a váže své substráty pomocí svojí polyubikvitinační značky a iniciuje degradaci na neuspořádaných oblastech substrátu (Prakash a kol., 2004). Označení ubikvitinem umožňuje proteazomu navázat cílové proteiny. Neuspořádaná oblast slouží jako místo počátku degradace substrátu proteazomem. Ubikvitinová značka nemusí být umístěna na stejném polypeptidovém řetězci (Prakash a kol., 2009) (obr. 5).



Obr. 5: Degradací cyklus UPS. Proteiny jsou cílené na proteazom pomocí dvoudílného degradačního signálu nebo degronu. Zahrnuje vnitřně neuspořádané části bez substrátů a reverzně připojené polyubikvitinové značky (Ubn). Polyubikvitinová značka je připojena pomocí E1-E2-E3 ubiquitinační kaskády a tento proces může být zvrácen pomocí DUBs (vlevo nahoře). Proteazom rozpozná svůj substrát na ubikvitinové značce pomocí ubikvitinových receptorů (Rpn10 a Rpn13; zelená nahoře) a iniciuje degradaci v nestrukturované části (vpravo). Jakmile proteazom obsadí svůj substrát, rozloží protein translokací do centrální dutiny v jádrové části, kde je protein postupně protealyzován (dole). Polyubikvitinová značka je odštěpena vnitřním DUB Rpn11 (světle modrá) bezprostředně před degradací (Upraveno z: Inobe a Matouschek, 2014).

4 Inhibitory proteazomu

Inhibitory proteazomu jsou krátké peptidy, které mají kovalentně navázaný farmakofor. Farmakofor je skupina atomů, které jsou navázány na katalytická místa proteazomu a zabraňují jeho správné funkci. Inhibitory proteazomu byly původně vyvinuty jako látky s potenciálním přínosem k prevenci kachexie, která souvisí s rakovinou (Schwarzkopf a kol., 2006; Petruzzelli a Wagner, 2016).

Pozdější *in vitro* výzkumy ukázaly, že inhibitory proteazomu vykazují široké spektrum antiproliferativní a proapoptické aktivity proti hematologickým a solidním nádorům. I přes jejich velký terapeutický potenciál, mnohé z nich vykazovaly nedostatek účinnosti, specifity nebo stability, což vedlo ke vzniku nových inhibitorů s větším potenciálem a selektivnější aktivitou (Crawford a kol., 2011).

Většina nádorových buněk je vysoce proliferativních a mají zvýšené nároky na syntézu proteinů, což vede k větší citlivosti vůči proteazomové inhibici. Již dříve bylo prokázáno, že zvýšená proteazomová aktivita v leukemických buňkách je spjata se zvýšenou citlivostí na proteazomové inhibitory (Crawford a kol., 2009; Koyama a kol., 2014).

4.1 Mechanismy protinádorového působení

Existuje několik mechanismů, které vysvětlují protinádorovou aktivitu inhibitorů proteazomu. Z velké míry jsou důsledkem zhoršené degradace proapoptotik a/nebo regulačních proteinů (Nencioni a kol., 2007). Bylo prokázáno, že inhibice aktivity transkripčního faktoru nádorových buněk (NF- κ B), změna degradace proteinů souvisejících s buněčným cyklem, změna proapoptotické a antiapoptotické bilance proteinů, stres endoplazmatického retikula, inhibice angiogeneze a opravy DNA, přispívají k apoptotickému působení inhibitorů proteazomu v nádorových buňkách (Nawrocki a kol., 2008; Crawford a kol., 2011).

4.1.1 Inhibice jaderného faktoru kappa B

Jedním z prvních mechanismů působení přisuzovaných inhibitorům proteazomu, byla inhibice transkripčního jaderného faktoru NF- κ B (nuclear factor kappa B) pomocí stabilizace jeho inhibitoru jaderného faktoru kappa B (I κ B) (Traenckner a kol., 1994; Crawford a kol.,

2011). NF- κ B reguluje různé imunitní a zánětlivé odpovědi, ale také hraje důležitou roli při tvorbě nádorů (Tabruyn a Griffioen, 2008).

NF- κ B je vázán na svůj I κ B v cytoplasmě a je aktivován jeho proteazomální degradací I κ B. Inhibice proteazomové aktivity zabraňuje degradaci I κ B, následné aktivaci a translokaci NF- κ B do jádra. NF- κ B je aktivní u velké části rakovin v pokročilém stádiu. Bylo prokázáno, že hraje roli v rezistenci vůči chemoterapeutickým činidlům, proto byl NF- κ B po nějaký čas zajímavý jako potenciální terapeutický cíl (Luqman a Pezzuto, 2010; Crawford a kol., 2011).

4.1.2 Buněčný cyklus

Progrese v buněčném cyklu probíhá přes pevně řízenou souhru cyklinů a cyklin dependentních kinas (CDK). Ztráta kontroly buněčného cyklu je zásadním krokem v onkogenezi. UPS zprostředkovává degradaci mnoha regulačních proteinů buněčného cyklu. Existuje řada způsobů, kterými mohou inhibitory proteazomu vyvolávat zástavu buněčného cyklu. Jedním ze způsobů je to, že interferují s degradací cyklinů a regulačních proteinů buněčného cyklu v maligních buňkách (Casimiro a kol, 2012). Například protein p27 je CDK inhibitor, který inhibuje cyklin D i cyklin E, a tím negativně reguluje průběh fáze buněčného cyklu G1/S (Sherr a Roberts, 1999).

Degradace p27 tedy podporuje progresi v buněčném cyklu. Buněčné hladiny p27 jsou řízeny UPS. Nízká exprese p27 je spojena s růstem nádoru a špatnou prognózou u různých malignit, včetně lymfomu, rakoviny prsu, plic, tlustého střeva, prostaty, vaječníku a mozku (Chu a kol., 2008).

4.1.3 Regulace apoptózy

Apoptóza je regulována protichůdnými aktivitami proapoptotických a antiapoptotických molekul. Rakovinné buňky mají často neregulované apoptotické signální dráhy, které dávají maligním buňkám výhodu přežití a mohou poskytnout rezistenci vůči chemoterapeutickým činidlům (Siegel a Lenardo, 2002). Proteazom se podílí na kontrole apoptózy modulací hladin proapoptotických a antiapoptotických faktorů. Inhibice aktivity proteazomu má za následek zvýšenou hladinu proapoptotických faktorů, jako jsou protein p53, proapoptotický protein BCL2-associated X protein (Bax) a proapoptotický protein phorbo-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (NOXA), přičemž se snižují hladiny antiapoptotických proteinů, jako jsou antiapoptotický protein B-cell lymphoma (Bcl-2) a inhibitor apoptózových proteinů (IAP)

(Shibue a kol., 2003; Pistritto a kol., 2016). Bylo prokázáno, že inhibitory proteazomu indukují apoptózu v řadě maligních buněčných typů. Pokud se používají jako jediné činidlo, zvyšují citlivost na jiná chemoterapeutická činidla (McConkey a Zhu, 2008).

p53 je zásadním regulátorem apoptózy, která je indukována poškozením DNA (Jung a kol., 2019). Tento supresor je velmi často inaktivován v maligních buňkách, což vede k progresi nádoru a rezistenci na léky (Momand a kol., 1998; Hientz a kol., 2017). Inhibice proteazomu vede k akumulaci p53. Aktivuje cílové geny p53, jako je protein p21, transmembránový protein typu II (FAS ligand), proapoptotický protein p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA) a Bax (Nakano a Vousden, 2001; Pistritto a kol., 2016). Inhibitory proteazomu indukují apoptózu závislou na p53 u buněčných linií odvozených od karcinomu ledviny, rakoviny tlustého střeva, melanomu a mnohočetného myelomu (Ding a kol., 2007; Harris a kol., 2018).

4.1.4 Stres endoplazmatického retikula

Endoplazmatické retikulum hraje důležitou roli při skládání a zrání proteinů. Nesložené nebo špatně složené proteiny jsou nasměrovány do proteazomu k degradaci. Inhibice proteazomu vede k akumulaci a agregaci chybně složených proteinů v endoplazmatickém retikulu, což má za následek jeho stres, který vyvolává UPR (unfolded protein response). UPR je primární odpověď, která snižuje akumulaci nerozložených proteinů a obnovuje funkci retikula (Corazzari a kol., 2017; Roeten a kol., 2018). Maligní buňky mají obecně vyšší rychlost syntézy proteinu než normální buňky, což způsobuje vyšší náchylnost k agregaci proteinů a citlivost na apoptózu indukovanou inhibitorem proteazomu. Bylo prokázáno, že inhibice aktivity proteazomu vyvolává proapoptický stres endoplazmatického retikula v mnoha rakovinných buňkách, včetně mnohočetného myelomu, rakoviny pankreatu, hlavy a krku a nemalobuněčného karcinomu plic (Nawrocki a kol., 2005; Obeng, 2006; Morgillo a kol., 2011).

4.1.5 Inhibice angiogeneze

Angiogeneze je proces tvorby nových cév. Je nezbytným předpokladem pro růst nádoru, protože zásobuje proliferující nádor živinami a kyslíkem. Proces angiogeneze může přispívat k progresi, invazi a metastázování nádoru a je obecně považován za indikátor prognózy nádoru (El-Kenawi a El-Remessy, 2013). Tento proces také zahrnuje migraci

a diferenciaci endoteliálních buněk, které lemují vnitřní stěnu krevních cév (Cook a Figg, 2010).

Úspěch inhibitorů proteazomu u mnohočetného myelomu byl přičítán nejen přímým účinkům na myelomové buňky, ale také účinkům na mikroprostředí nádoru, včetně antiangiogenních účinků. Ukázalo se, že inhibitory proteazomu mají nepřímý vliv na angiogenezi, a to snížením sekrece vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) (Hideshima a kol., 2001). Proces angiogeneze je řízen chemickými signály v těle. Některé z těchto signálů, jako je VEGF, se váží na receptory na povrchu normálních endoteliálních buněk. V případě, že se VEGF a další endoteliální růstové faktory váží na své receptory na endoteliálních buňkách, jsou uvnitř těchto buněk iniciovány signály. V těchto buňkách poté dochází k podpoře růstu a k přežití nových krevních cév (Cook a Figg, 2010).

4.1.6 Opravy DNA

Nedávný výzkum prokázal úlohu UPS při regulaci opravy DNA prostřednictvím mechanismů, jako je například reparace po replikaci nebo homologní rekombinace (Motegi a kol., 2009). Inhibitory proteazomu mohou ovlivnit tyto dráhy prostřednictvím vyčerpání dostupného ubikvitinu v jádře. Inhibice aktivity proteazomu vede k hromadění nedegradovaných polyubikvitinovaných proteinů, což vede ke snížení množství volného ubikvitinu v buňce. Úbytek volného ubikvitinu má za následek ztrátu monoubikvitinovaných histonů v jádře, a také vyšší míru poškození DNA (Marsh a Dickson, 2019). Bylo prokázáno, že inhibitory proteazomu zvyšují citlivost nádorových buněk na různé druhy protinádorové léčby, jako jsou radiace, inhibitory kamptothecinu a topoizomerázy, z nichž všechny indukují poškození DNA (Crawford a kol., 2011; Matsuno a kol., 2018).

4.2 Autofagie

Indukce autofagie, jako alternativní cesta degradace a recyklace intracelulárních proteinů, může fungovat jako možný způsob přežívání při stresu endoplasmatického retikula, který je vyvolán inhibitory proteazomu. Cytosolové agregáty všudypřítomných proteinů (agrezomy) jsou přeneseny mikrotubuly do lyzozomů a zde jsou degradovány pomocí autofagie. Zásadní roli při transportu agrezomů mikrotubuly hraje histondeacetyláza (HDAC)

typu II, která rozpoznává proteinové agregáty pomocí navázání na polyubikvitinované proteiny (Ouyang a kol., 2011; Roeten a kol., 2018).

5 Inhibitory proteazomu I. generace

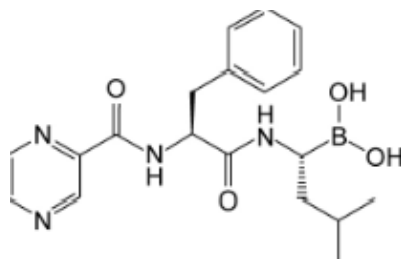
5.1 Bortezomib

5.1.1 Historie a struktura

Bortezomib je dipeptidový derivát kyseliny borité, který obsahuje kyselinu pyrazinovou, fenylalanin a leucin s kyselinou boritou ve své struktuře (obr. 6). Atom boru je nezbytný pro inhibici aktivity proteazomu, protože má schopnost specificky vázat β 5 katalytickou podjednotku proteazomu (Chen a kol., 2011). Molekulový vzorec bortezomibu je $C_{19}H_{25}BN_4O_4$ a jeho chemický název IUPAC je kyselina [3-methyl-1-(3-fenyl-2-pyrazin-2-ylkarbonylamino-propanoyl) amino-butyl] boronová (Chen a kol., 2010).

Bortezomib byl syntetizován v roce 1995 a v roce 1999 byly provedeny rozsáhlé klinické zkoušky. V roce 2003 byl v USA schválen úřadem FDA s názvem bortezomib (značka Velcade®) pro léčbu pacientů s mnohočetným myelomem (MM), relapsem/refrakterním MM (RRMM) a lymfomem z pláštěvých buněk. Inhibice proteazomu může podporovat degradaci antiapoptotických proteinů a zabránit degradaci proapoptotických proteinů, což má za následek programovanou buněčnou smrt v maligních buňkách (Kane a kol., 2007; Chen a kol., 2011).

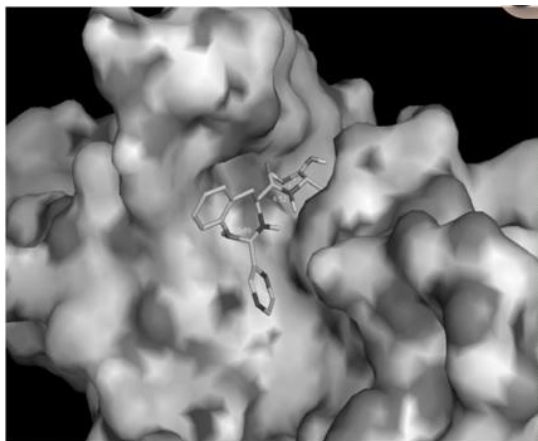
Údaje z klinických studií I. fáze ukázaly přijatelnou úroveň toxicity spojenou s významným klinickým přínosem vůči hematologickým malignitám (Adams a kol., 1999; Orłowski a kol., 2002). Bortezomib se ukázal být přínosný nejen při léčbě mnohočetného myelomu, ale je také intenzivně studován v souvislosti s dalšími hematologickými malignitami a solidními nádory, ať již jako samostatný přípravek, nebo jako součást kombinované terapie. Byly však pozorovány některé toxické vedlejší účinky spojené s léčbou bortezomibem. Samotný bortezomib vykazoval minimální účinky při léčbě solidních nádorů. V kombinaci s jinými přípravky při probíhající chemoterapii se reakce pacientů nezlepšila (Dou a Goldfarb, 2002; Kane a kol., 2006; Chen a kol., 2011).



Obr. 6: Chemická struktura bortezomibu (Převzato z: Muz a kol., 2016).

5.1.2 Mechanismus působení

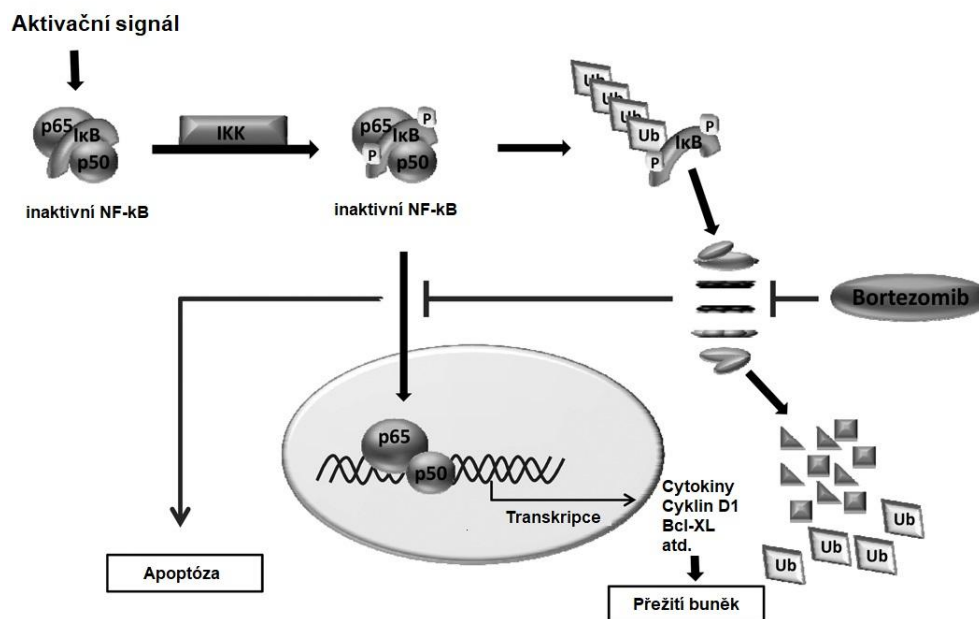
Bortezomib působí jako reverzibilní inhibitor 26S proteazomu. Obvykle se stává nedetekovatelným 72 hodin po jeho podání, kdy dochází k obnovení inhibované aktivity proteazomu. Skupina boronové kyseliny v bortezomibu se může vázat a tvořit komplex s aktivním místem hydroxylové skupiny threoninu v $\beta 5$ podjednotce a blokovat chymotrypsin-like aktivitu proteazomu (obr. 7), který je zodpovědný za indukci buněčné smrti (Schwartz a Davidson, 2004; Chen a Dou, 2010).



Obr. 7: Ukotvení bortezomibu do $\beta 5$ podjednotky proteazomu. Obrázek ukazuje, že bortezomib zapadá do S1 kapsy $\beta 5$ podjednotky proteazomu a blokuje ji. (Upraveno z: Chen D. a kol., 2011).

Jedním z mechanismů účinku bortezomibu, které jsou spojeny s jeho protinádorovou aktivitou je potlačení signální dráhy NF- κ B, která vede ke snížení hladiny antiapoptotických cílových genů (Obr. 6). Aktivace NF- κ B dráhy je iniciována degradací I κ B proteinu (obr. 8). Fosforylace I κ B vede k ubikvitinaci I κ B a degradaci proteazomem. S degradací I κ B se pak komplex NF- κ B přemístí do jádra, kde může stimulovat expresi specifických genů, včetně cytokinů, např. interleukinu-6 a faktoru nádorové nekrózy α (IL-6, TNF- α), faktorů přežití (IAP, antiapoptotický protein B-cell lymphoma-extra large (Bcl-XL)) a inzulínu podobnému

růstovému faktoru (IGF-I). To má za následek buněčnou proliferaci, rezistenci na indukci apoptózy a rezistenci vůči léčivům u rakovinných buněk (obr. 8) (Chauhan a Anderson, 2003; Adams, 2004). Léčba mnohočetného myelomu bortezomibem brání degradaci I κ B, blokuje aktivaci NF- κ B, čímž potlačuje produkci souvisejících cytokinů a faktorů přežití v buňkách mnohočetného myelomu za určitých experimentálních podmínek (Ma a kol., 2003; Chen a kol., 2011; Roy a kol., 2018).



Obr. 8: Inaktivace NF- κ B dráhy bortezomibem. V odpovědi na vnější stres dojde k fosforylaci I κ B pomocí IKK a je degradován proteazomem. S degradací I κ B se pak komplex NF- κ B přemístí do jádra a podporuje transkripci řady genů pro přežití. Inhibice proteazomu brání aktivaci NF- κ B a zvyšuje citlivost maligních buněk na chemoterapeutické léky (Upraveno z: Chen a kol., 2011).

Dalším klíčovým mechanismem působení bortezomibu spojeným s jeho protirakovinnou aktivitou je zvýšení hladiny proapoptického proteinu NOXA. Zvýšená regulace NOXA indukuje apoptózu selektivní interakcí s antiapoptotickými proteiny Bcl-XL a Bcl-2 nebo stimulací dalších faktorů podporujících apoptózu (Oda a kol., 2000, Qin a kol., 2005). NOXA může být indukována bortezomibem v různých nádorových buněčných liniích s poškozenou signalizací p53. Bortezomib může selektivně podporovat 20-60 násobnou indukci NOXA v různých melanomových buňkách, zatímco hladiny v normálních melanocytech zůstávají nezměněny (Qin a kol., 2006; Nikoforov a kol., 2007).

5.1.3 Klinické studie

Klinické výsledky potvrdily dřívější zjištění z preklinických studií. Proteazomová aktivita může být inhibována bortezomibem v závislosti na velikosti dávky a době, po kterou byl lék podáván. Bortezomib byl testován celkem ve třech fázích. V první fázi byla zjištěna maximální tolerance a efektivita dávky léku u pacientů s různými druhy rakoviny. Tato maximální tolerance byla pro samotný bortezomib stanovena na $1,04 \text{ mg/m}^2$. V kombinaci s doxorubicinem u pokročilých hematologických malignit byla maximální tolerovaná dávka $1,30 \text{ mg/m}^2$ (Holkova a kol., 2011; Chen a kol., 2011).

Ve druhé fázi testování byla použita maximální tolerovaná dávka, která byla zjištěna v první fázi. Testování probíhalo za účasti vyššího počtu pacientů ve více skupinách. Účinky bortezomibu byly navíc testovány i v kombinaci s dalšími léky používanými při léčbě rakoviny u pacientů s RRMM. Výsledky této fáze byly z větší části pozitivní (Richardson a kol., 2003; Markovic a kol., 2005; Chen a kol., 2011).

V rámci třetí fáze byl testován účinek bortezomibu samostatně i v kombinaci s jinými léčivými. Tato studie prokázala, že pacienti, kterým byl podáván bortezomib od začátku léčby vykazovali vyšší pravděpodobnost přežití, než pacienti, kterým byl bortezomib podán po předchozí léčbě konvenčními léčivými (Curran a McKeage, 2009; Chen a kol. 2011; Mai a kol, 2015).

Výsledky klinických studií prokázaly, že je bortezomib velmi účinný při léčbě pacientů s mnohočetným myelomem. Většina pacientů reaguje na počáteční chemoterapii, ale u mnoha z nich obvykle dojde k relapsu nemoci v důsledku proliferace rezistentních nádorových buněk. Míra pozitivní odpovědi u léčby bortezomibem byla 35% pacientů, kteří byli předtím neúspěšně léčeni jinými protinádorovými léky (Richardson a kol., 2003).

Bylo prokázáno, že buněčné linie mnohočetného myelomu jsou 170krát citlivější na léčbu bortezomibem než buňky kostní dřeně nebo buňky periferní krve zdravých jedinců. (Hideshima a kol., 2001). Hlavními nevýhodami léčby bortezomibem jsou četné vedlejší účinky, jako je například únava, slabost, nevolnost, průjem, zvracení, nechut' k jídlu, nízký počet trombocytů a erytrocytů, neuropatie a další (Tariman a Lemoine, 2003).

6 Inhibitory proteazomu II. generace

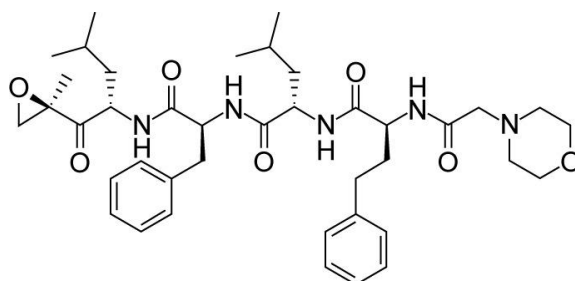
6.1 Carfilzomib

6.1.1 Historie a struktura

Carfilzomib je tetrapeptidový epoxyketon příbuzný epoxymycinu. Molekulový vzorec je $C_{40}H_{57}N_5O_7$ (obr. 9) a jeho chemický název IUPAC je (2S)-4-methyl-N-[(2S)-1-[[[(2S)-4-methyl-1-[(2R)-2-methyloxiran-2-yl]-1-oxopentan-2-yl]amino]-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]-2-[[[(2S)-2-[(2-morpholin-4-ylacetyl)amino]-4-phenylbutanoyl]amino]pentanamide (Herndon a kol., 2013).

Je selektivnější pro chymotrypsin-like aktivitu ve 20S podjednotce proteazomu. Díky této zvýšené selektivitě byly prokázány nižší nežádoucí účinky ve srovnání s bortezomibem (McBride a kol., 2015). Inhibice proteazomu má delší průběh kvůli kovalentní vazbě na cílový protein. (Khan a Stewart, 2011; Teicher a Tomaszewski, 2015).

Cílem inhibitorů II. generace bylo dosažení vyšší účinnosti a nižší toxicity. Carfilzomib byl schválen v USA v roce 2012 úřadem FDA pro léčbu pacientů s RRMM, kteří podstoupili nejméně 2 předchozí terapie. U těchto pacientů byla již dříve použita léčba bortezomibem a jinými imunomodulačními přípravky (de Moraes Hungria a kol., 2019). V roce 2015 úřad FDA schválil carfilzomib jako součást kombinované terapie. V současné době je lék indikován společně s dexamethasonem nebo lenalidomidem (Perel a kol., 2016). Carfilzomib oproti bortezomibu není primárně metabolizován jaterním cytochromem, a proto jsou plazmatické hladiny minimálně závislé na funkci jater a souběžně podávané medikaci (Kortuem a Stewart, 2013).

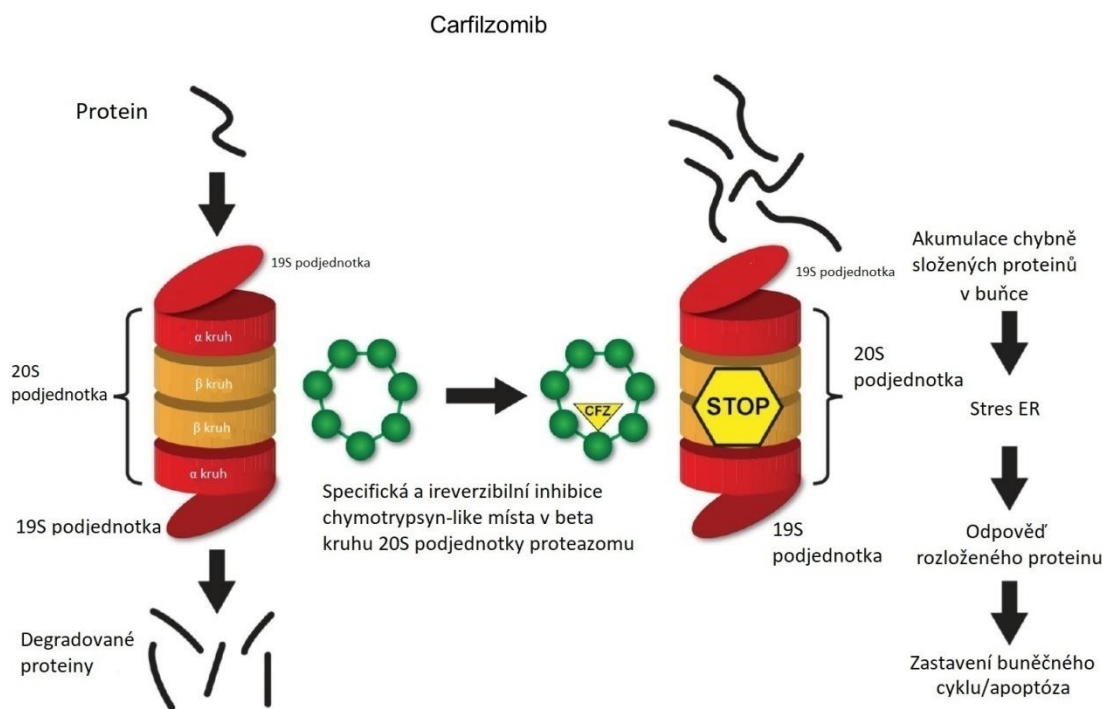


Obr. 9: Chemická struktura carfilzomibu (Převzato z: Muz a kol., 2016).

6.1.2 Mechanismus působení

Carfilzomib selektivně cílí na proteazomové enzymy uvnitř buňky. Ireverzibilně se váže na aktivní místa 20S proteazomu, a také na hlavní složku v rámci 26S proteazomu. Selektivní a ireverzibilní inhibicí těchto proteáz má carfilzomib schopnost oddálit proliferaci a indukovat apoptózu maligních plazmatických buněk (Maisnar, 2016; Perel a kol., 2016).

Carfilzomib selektivně inhibuje $\beta 5$ podjednotkukonstitutivního proteazomu (c20S) a $\beta 5i$ podjednotku imunoproteazomu (i20S) (obr. 10). Inhibice všech proteazomových podjednotek vede k cytotoxickým účinkům na buňky hematologických malignit, ale také na mononukleární buňky periferní krve. Na rozdíl od bortezomibu je carfilzomib v menší míře spojen s periferní neuropatií. Periferní neuropatii indukovanou bortezomibem lze vysvětlit mechanismem, který není závislý na proteazomu, a tento lék inhibuje také několik nonproteazomálních cílů (např. serinové proteázy katepsin G, katepsin A, rennin, dipeptidyl peptidázu II a HtrA2/Omi). Serinová proteáza HtrA2/Omi se podílí na přežití neuronů a je inhibována bortezomibem, nikoli však carfilzomibem. Carfilzomib dobře proniká do celého těla, ale nepřekračuje hematoencefalickou bariéru (Lee a kol., 2016; Perel a kol., 2016). Kvůli peptidovému složení může být carfilzomib degradován endogenními proteázami a plasmatickými peptázami, což snižuje jeho účinnost (de Moraes Hungria a kol., 2019). Má velmi krátký poločas rozpadu, přibližně 30 minut. Na rozdíl od bortezomibu je extrahepatálně metabolizován na neaktivní metabolity (Lee a kol., 2016; Perel a kol., 2016). Samotná inhibice proteazomu trvá 48 hodin a déle. Po podání není carfilzomib v systému kumulován.



Obr. 10: Mechanismus proteazomové inhibice při použití carfilzomibu (Upraveno z: Groen a kol., 2019).

6.1.3 Klinické studie

Ve dvou studiích fáze I bylo zkoumáno několik strategií podávání jak samotného carfilzomibu, tak v kombinaci s lenalidomidem, dexamethasonem, melphalanem a prednisonem, ale maximální tolerovaná dávka nebyla zjištěna. Maximální testovaná dávka byla stanovena na 20 mg/m^2 , s následným navýšením na 27 mg/m^2 . Tento dávkovací režim byl použit i v následujících klinických studiích. Stále však nebylo objasněno nejoptimálnější dávkovací schéma (Kortuem a Stewart, 2013; Groen a kol., 2019). Této studii se zúčastnili pacienti s hematologickými malignitami a jejich relapsem (MM, Non-Hodgkinův lymfom, Hodgkinův lymfom), kteří podstoupili alespoň dvě předchozí léčby (McBride a kol., 2015).

Ve studii fáze II bylo použito stejné schéma dávkování carfilzomibu jako v první fázi. Ani v této fázi nebyla stanovena maximální tolerovaná dávka. Studie se zúčastnili pacienti s RRMM. V této studii byl společně s carfilzomibem podáván v několika skupinách i dexamethason (Kortuem a Stewart, 2013; Groen a kol., 2019).

V poslední studii fáze III byly srovnávány účinky léčby carfilzomibu s dexametasonem a bortezomibu s dexametasonem. Byla zjištěna vyšší účinnost a nižší toxicita carfilzomibu než bortezomibu, který tak může být potencionálně carfilzomibem při léčbě plně nahrazen (Maisnar, 2016; de Moraes Hungria a kol., 2019).

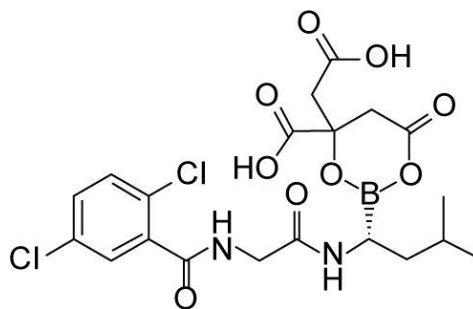
Výhodou léčby carfilzomibem je nízký výskyt periferní neuropatie na rozdíl od bortezomibu. Má potenciální využití také u dalších onemocnění jako Waldenströмова makroglobulinemie, lymfom, amyloidóza a různých druhů autoimunitních onemocnění. Celková odpověď při léčbě carfilzomibem činila u poslední studie 46% při nižších dávkách a 53% při vyšších dávkách. Léčba je celkově dobře snášena a je bezpečnou možností u pacientů s poruchou funkce ledvin a jater a u pacientů s periferní neuropatií (Kortuem a Stewart, 2013). Vývoj carfilzomibu představuje významný pokrok směrem k méně neurotoxickým a účinnějším proteazomovým inhibitorům (Brayer a Baz, 2017). Naopak nevýhodou je zvýšená kardiovaskulární toxicita. Nejčastějšími nežádoucími účinky jsou trombocytopenie, únava, neutropenie, lymfopenie, anémie, pneumonie a hyperglykemie (Kortuem a Stewart, 2013).

6.2 Ixazomib

6.2.1 Historie a struktura

Ixazomib je modifikovaná peptidová kyselina boronová (Obr. 11). Je formulován jako stabilní ester citrátu, ixazomib citrát (Skořepová a kol, 2017). Ten za fyziologických podmínek rychle hydrolyzuje na biologicky aktivní formu kyseliny boronové, ixazomib (Richardson a kol., 2014; Gupta a kol., 2019). Molekulový vzorec je $C_{14}H_{19}BCl_2N_2O_4$. Jeho chemický název IUPAC je [(1R)-1-[[2-[(2,5-dichlorobenzoyl)amino]acetyl]amino]-3-methylbutyl] boronová kyselina (Gupta a kol., 2018). Ixazomib je vysoce rozpustný a má nízkou propustnost. Chemická struktura ixazomibu obsahuje jedno chirální centrum, přičemž léčivá látka je $\geq 99,0\%$ R enantiomer (Gupta a kol., 2019).

Klinický vývoj ixazomibu byl rychlý. Od počátečního zařazení pacientů do studií uplynulo 6 let do schválení. Jako první perorální inhibitor proteazomu byl schválen v roce 2015 úřadem FDA v kombinaci s lenalidomidem a dexamethasonem k léčbě pacientů s RRMM, kteří již podstoupili alespoň jednu předchozí léčbu (Ramirez, 2017; Dimopoulos a kol., 2019). Hlavním důvodem zrychleného vývoje byla předem specifikovaná a komplexní charakteristika klinické farmakologie této perorálně podávané látky. Schválení bylo provedeno na základě výsledků studie fáze III (Dimopoulos a kol., 2019).



Obr. 11: Chemická struktura ixazomibu (Převzato z: Muz a kol., 2016).

6.2.2 Mechanismus působení

Studie *in vitro* prokázaly, že ixazomib je selektivní, účinný a reverzibilní inhibitor 20S proteazomu, který se přednostně váže a inhibuje proteolyticky aktivní místo $\beta 5$ podjednotky (chymotrypsin-like). Při podání vyšší koncentrace léčiva může dojít k vazbě na $\beta 1$ podjednotku (caspase-like) a $\beta 2$ podjednotku (trypsin-like) a způsobit jejich inhibici. Tato selektivita a účinnost je podobná jako u bortezomibu, nicméně ixazomib se od bortezomibu liší svou vazebnou kinetikou. Má podstatně kratší poločas rozpadu ($t_{1/2}$). $t_{1/2}$ u ixazomibu činí 18 min, což je přibližně šestkrát rychlejší než u bortezomibu, který činí 110 min (Krhovská a Minařík, 2017; Gupta a kol., 2019). Ixazomib je odbouráván pomocí cytochromu P (CYP) a non CYP enzymů. Je vylučován především močí, méně pak stolicí (Krhovská a Minařík, 2017; Richardson a kol., 2017).

6.2.3 Klinické studie

I. fáze testování probíhala ve dvou klinických studiích, kde bylo testováno odlišné dávkovací schéma u pacientů s MM. Populace pacientů měla průměrný věk 64 let a hlavním kritériem byly minimálně dvě předchozí linie léčby, které zahrnovaly expozici bortezomibem, imunomodulačních přípravků a kortikosteroidů v jakékoli kombinaci (Brayer a Baz, 2017). Bylo hodnoceno podávání léku jednou týdně a dvakrát týdně. V obou dávkovacích strategiích byl ixazomib dobře snášen. V obou studiích převládaly nežádoucí účinky, trombocytopenie a gastrointestinální toxicita. Vyšší výskyt únavy a vyrážky se vyskytoval u dávkování dvakrát týdně. Studie fáze I hodnotily ixazomib jako jedinou látku. Maximální tolerovaná dávka byla stanovena na $2,97 \text{ mg/m}^2$. (Brayer a Baz, 2017; Zanwar a kol., 2018).

Klinických studií fáze II se účastnili především pacienti s relapsem MM, kteří nebyli dříve léčeni žádnými inhibitory proteazomu. V klinických studiích byl testován ixazomib

samostatně, ale i v kombinaci s dexamethasonem a cyklofosfamidem. Primárním cílem této fáze bylo zjištění procenta celkové odpovědi (Kumar a kol., 2018).

V současné době probíhají nové studie fáze III, kde je testován ixazomib v kombinaci s lenalidomidem a dexamethasonem u odlišných skupin pacientů. Výsledky studie fáze III prokázaly vyšší míru přežití u pacientů s RRMM (Brayer a Baz, 2017; Krhovská a Minařík, 2017).

Výhodou ixazomibu je jeho perorální podání na rozdíl od bortezomibu a carfilzomibu, které jsou podávány intravenózně. Bortezomib a carfilzomib jsou spojeny se specifickými nežádoucími účinky, zejména s periferní neuropatií u bortezomibu a kardiovaskulární toxicitou u carfilzomibu (Brayer a Baz, 2017; Gupta a kol., 2018). Výskyt periferní neuropatie u pacientů užívajících ixazomib je výrazně nižší ve srovnání s bortezomibem. Mezi pacienty užívajícími ixazomib byly nejčastějšími nežádoucími účinky (vyskytující se u ≥ 20 % pacientů) průjem, zácpa, žaludeční potíže, zvracení, periferní neuropatie, bolest zad, trombocytopenie a vyrážka, z nichž nejčastějšími závažnými nežádoucími účinky byly trombocytopenie a průjem (Ramirez, 2017). Se zvýšeným zaměřením na dlouhodobou kontinuální terapii u MM je potřeba takový inhibitor proteazomu, který kombinuje pohodlnější podávání s tolerovaným toxickým profilem, což ixazomib splňuje (Brayer a Baz, 2017; Krhovská a Minařík, 2017; Gupta a kol., 2018).

6.3 Disulfiram

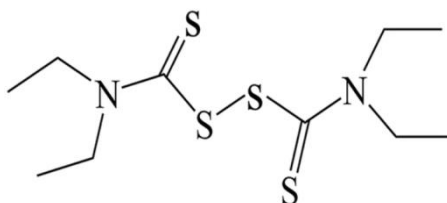
6.3.1 Historie a struktura

Disulfiram je členem skupiny dithiokarbamatů a obsahuje funkční skupinu, která má schopnost vytvářet komplexní kovy a reaguje se sulfhydrylovou skupinou (obr. 12) (Chen a kol., 2006). Molekulový vzorec disulfiramu je $C_{10}H_{20}N_2S_4$ (obr. 11) a jeho chemický název IUPAC je 1-(diethylthiokarbamoyldisulfanyl)-N,N-diethyl-methanethioamid (Sandberg a kol. 2008; Marciniak a kol., 2012).

Disulfiram patří k perorálně podávaným léčivům. Byl objeven ve 30. letech 20. století a v posledních šedesáti letech je používán především k léčbě závislosti na alkoholu. Je známý pod obchodním názvem Antabus (Sanberg a kol., 2008). Jeho použití při léčbě rakoviny je popsáno již od roku 1987 (Stewart a kol., 1987). Je považován za dobře tolerované léčivo s mírnými nežádoucími účinky. Disulfiram ireverzibilně inhibuje enzym aldehyd dehydrogenázu (ALDH). Ta vyvolává při konzumaci alkoholu zvýšení koncentrace

metabolitu acetaldehydu, což vede k vysoce nepříjemným příznakům (Askgaard a kol., 2014; Jiao a kol., 2016; Butcher a kol., 2018).

Bylo prokázáno, že disulfiram indukce apoptózu v lidských nádorových buňkách u pacientů s myeloidní leukémií, karcinomem prsu, kolorektálním karcinomem, karcinomem vaječníků a s glioblastomem. Základní mechanismus působení však nebyl zcela objasněn a jsou známy pouze jeho možné mechanismy (viz. kapitola 6.3.2) (Jiao a kol., 2016).



Obr. 12: Chemická struktura disulfiram (Převzato z: Li a kol., 2020).

6.3.2 Mechanismus působení

Bylo zjištěno, že disulfiram inhibuje aktivitu proteazomu a selektivně indukce apoptózu v buněčných liniích rakoviny prsu a prostaty. Proteasomová inhibice může podporovat protinádorovou aktivitu potlačením NF- κ B. Aktivace NF- κ Bse podílí na karcinogenezi prostřednictvím exprese genů buněčného cyklu, inhibitorů apoptózy a invazivních proteáz. Disulfiram navíc může inhibovat metylaci DNA v buňkách karcinomu prostaty (Askgaard a kol., 2014).

V těle se molekula disulfiram přeměňuje na menší metabolit diethyldithiokarbamát. Tento metabolit má schopnost vytvářet silné komplexy s ionty mědi a zinku (Triscott a kol., 2015). Kombinace disulfiram nebo jeho metabolitu s mědí inhibuje proteazomovou aktivitu v nádorových buňkách. Inhibice proteazomové aktivity komplexem disulfiram a mědi způsobuje hromadění polyubikvitinovaných proteinů a cytotoxických proteinových agregátů, což vede k narušení proteinové homeostázy, a tím ke smrti rakovinných buněk (Brüning a Kast, 2014; Jiao a kol., 2016).

6.3.3 Klinické studie

V současné době je testován účinek disulfiramu jako samostatného léčiva i v kombinaci s jinými léčivy (Jiao a kol., 2017). V I. fázi testování byla jednou z významných klinických studií léčba glioblastomu multiforme (GBM) u 12 nově diagnostikovaných pacientů po standardní chemoradioterapii. Primárním cílem této studie bylo stanovení bezpečnosti a maximální tolerované dávky disulfiramu v kombinaci s temozolomibem. Maximální tolerovaná dávka byla stanovena na 500 mg denně. Disulfiram byl testován také v kombinaci s mědí (Cu) (Huang a kol., 2016; Huang a kol., 2018).

Ve II. fázi studie bylo zjištěno, že maximální tolerovaná dávka 500 mg měla toxické účinky na pacienty už po prvním měsíci užívání. Dávka disulfiramu byla stanovena na 80 mg, měď na 1,5 mg a temozolomid na 150 mg/m^2 . Tato dávka byla pacientovi podávána 1-5 dní v každém cyklu trvajícím 28 dní (Huang a kol., 2019). Léčivé účinky disulfiramu byly testovány u dalších druhů rakovin jako například plic, jater, prsu atd. (Grossmann a kol., 2011; Allensworth a kol., 2015; Nechushtan a kol., 2015).

Disulfiram je používán již mnoho let. Díky tomu je velmi dobře prozkoumán a zdokumentován, což je velká výhoda. Výhodou je také perorální podávání stejně jako u ixazomibu. Jelikož se jedná o lék používaný především při závislosti na alkoholu, je nutné se vyhýbat i alkoholu, obsaženém v některých pochutinách (rumové pralinky, bonboniéry s likéry apod.), léčivech (sirup proti kašli a nachlazení) a dalších produktech, jako například ústní vody, desinfekční přípravky, parfémy, antiperspiranty a vody po holení. Dále hrozí nebezpečí v kombinaci s plošně používaným léčivem warfarinem a určitými druhy antidepresiv. K nežádoucím vedlejším účinkům patří náladovost, únava, bolest hlavy, kožní vyrážka, otok jazyka, kovová pachuť v ústech, rozmazané vidění apod. (Alharbi a el-Guebaly, 2013; Kalra a kol., 2014).

6.4 Marizomib

6.4.1 Historie a struktura

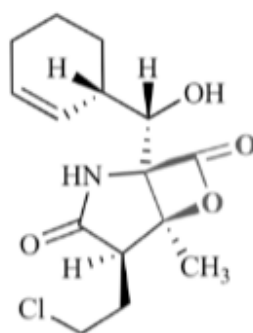
Marizomib (salinosporamid A) patří do skupiny β -lakton- γ -laktamů. Je to bicyckická sloučenina, která se vyskytuje v přírodě jako produkt získaný z mořských aktinomycet a jedná se o ireverzibilní inhibitor proteazomu (Park a kol., 2018). Molekulový vzorec marizomibu je $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{ClNO}_4$ a jeho chemický název IUPAC je (1R, 4R, 5S)-4-(2-chlorethyl)-1-[(S)-[(S)-

cyklohex-2-en-1-yl]-(hydroxymethyl]-5-methyl-6-oxa-2-azabicyclo[3.2.0]heptan-3,7-dion (obr. 13) (Obaidat a kol., 2011). Marizomib má ve své struktuře navázány substituenty chlorethyl a cyklohex-2-enylkarbinol, které ovlivňují jeho selektivitu pro proteazomová aktivní místa (Potts a kol., 2011).

Marizomib má ve srovnání s bortezomibem a carfilzomibem širší inhibiční profil pro 20S proteazom. Bylo prokázáno, že inhibuje $\beta 5$ (chymotrypsin-like), $\beta 1$ (caspase-like) a $\beta 2$ (trypsin-like) aktivitu 20S proteazomu. Marizomib navíc také aktivuje různé kaspázy a vytváří kyslíkové radikály (ROS), což vede k apoptóze (Kaijun a kol., 2016).

Jako přírodní mořský produkt získaný z mikrobiálních zdrojů a jejich derivátů, slibuje vysokou účinnost proti MM, RRMM a dalším typům solidních nádorů. Ve srovnání s Bortezomibem má méně závažných vedlejších účinků. V roce 2013 byl v USA schválen úřadem FDA pro léčbu mnohočetného myelomu a v roce 2014 Evropskou agenturou pro léčivé přípravky (EMA). Jako jeden z inhibitorů proteazomu druhé generace může být marizomib uznáván jako trvalé a úplné terapeutické činidlo, které prodlužuje životnost pacientů s rakovinou (Ma a Diao, 2015).

Bylo prokázáno, že marizomib má silné inhibiční účinky u agresivní, triple negativní rakoviny prsu (TNBC). Inhibuje proteazomové katalytické aktivity a vyvolává lepší protinádorovou odpověď v TNBC buněčných liniích (Raniga a kol., 2020).



Obr. 13: Chemická struktura marizomibu

(Převzato z: Jankowska a kol., 2013)

6.4.2 Mechanismus působení

V MM buňkách zprostředkovává marizomib apoptózu převážně prostřednictvím kaspáz. Kromě vyvolání apoptózy marizomib snižuje regulaci růstu u různých typů buněk

a signálních drah pro přežití v MM buňkách. Marizomib se stejně jako bortezomib zaměřuje také na NF- κ B a oproti bortezomibu je jeho silnějším inhibitorem (Potts a kol., 2011). Nejpravděpodobněji je inhibice NF- κ B aktivována inhibicí degradace regulátoru I κ B (Mareček a Rudá-Kučerová, 2017). Bortezomib, carfilzomib a ixazomib jsou selektivními inhibitory pouze β 5 podjednotky, zatímco marizomib inhibuje všechny tři podjednotky. Marizomib rychle vstupuje do buněk a kovalentně se váže na všechna tři aktivní enzymatická místa. Tato nevratná vazba vyvolává proteazomální inhibici. Ke zrušení této vazby je potřeba buněčné náhrady nebo proteazomové resyntézy (Levin a kol., 2016). Inhibice proteazomové cesty vede k zástavě buněčného cyklu a apoptóze nádorových buněk (Rajan a Kumar, 2016).

6.4.3 Kinické studie

Klinické studie byly rozděleny do dvou fází. I. fáze byla zaměřena na pacienty s RRMM. Primárním cílem této studie bylo stanovit maximální tolerovanou dávku (MTD) (Richardson a kol., 2016). Marizomib byl v I. fázi podáván jako samostatné léčivo. Studie fáze I zahrnovala 34 pacientů. 88% z nich bylo po předchozí léčbě bortezomibem a 71% z nich bylo refrakterních. MTD marizomibu byla stanovena na 0,4 mg/m² při 60 minutové infuzi a 0,5 mg/m² při 120 minutové infuzi (Teicher a Tomaszewski, 2015; Harrison a kol., 2016).

Ve II. fázi byl marizomib podáván intravenózně ve dvou různých režimech. První skupina sestávala z 32 pacientů, kterým byla podána dávka 0,025–0,7 mg/m² jednou týdně. Ve druhé skupině bylo 36 pacientů, kteří dostávali dávku 0,15–0,6 mg/m² dvakrát týdně s přidáním dexamethasonu. Všichni pacienti měli relabující/refrakterní mnohočetný myelom (RRMM) a prodělali průměrně pět až sedm cyklů předchozí léčby. U obou schémat byla pozorována významná klinická aktivita. Minimální nebo lepší odpověď byla pozorována u 2 z 68 pacientů (3%), přičemž 3 další pacienti reagovali po přidání dexamethasonu. Autoři studie doporučili další testování v kombinaci s jinými chemoterapeutiky (Rajan a Kumar, 2016).

Samostatně probíhala další studie se 36 pacienty s postupným zvýšením dávky marizomibu v kombinaci s pomalidomidem a dexamethasonem. Pacienti podstoupili několik předchozích cyklů léčby bortezomibu s lenalidomidem nebo carfilzomibem. Marizomib byl podáván intravenózně v množství 0,3–0,5 mg/m² po dobu 2 hodin v kombinaci s pomalidomidem a dexamethasonem. Z 11 hodnocených pacientů jich dosáhlo částečné

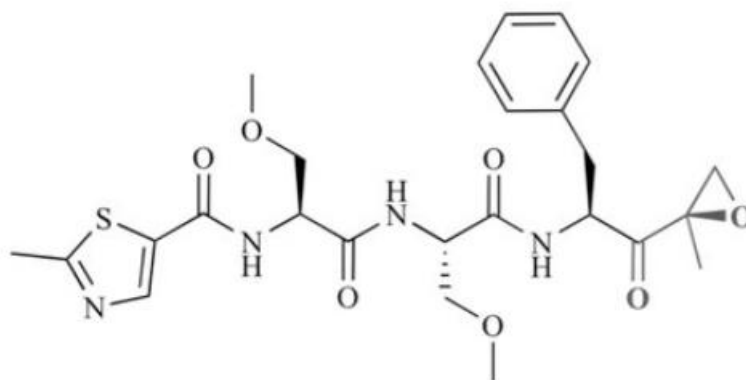
odpovědi šest (54%), dva (12%) měli minimální odpověď a u tří (27%) došlo ke stabilizaci onemocnění (Rajan a Kumar, 2016).

Mezi běžné nežádoucí účinky patří únava, nevolnost, zvracení, bolesti hlavy, závratě a horečka. Méně často byla pozorována trombocytopenie a neutropenie. Narozdíl od bortezomibu nebyla pozorována periferní neuropatie (Harrison a kol., 2016; Rajan a Kumar, 2016).

6.5 Oprozomib

6.5.1 Historie a struktura

Oprozomib patří k perorálně podávaným léčivům. Selektivně se váže na proteazom a má slibnou účinnost pro léčbu pacientů s relapsem MM a Waldenströmovou makroglobulinémií (Ghobrial a kol., 2019). Je strukturálně velmi podobný carfilzomibu a byl vyvinut k zlepšení absorpce léčiva (Wang a kol., 2017; Shah a kol., 2019). Kovalentně se váže na N-terminální molekulu threoninu 20S proteazomu (Ou a kol., 2019). Molekulový vzorec oprozomibu je $C_{25}H_{32}N_4O_7S$ a jeho chemický název IUPAC je N-[(2S)-3-methoxy-1-[[[(2S)-3-methoxy-1-[[[(2S)-1-[(2R)-2-methyloxiran-2-yl]-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino]-1-oxopropan-2-yl]amino]-1-oxopropan-2-yl]-2-methyl-1,3-thiazole-5-carboxamide (obr. 14) (Thibaudeau a Smith, 2019). Jedná se o vzácný příklad léčiva s malou molekulou, který potlačuje cytochrom P450 (CYP) v mRNA (Ou a kol., 2019).



Obr. 14: Chemická struktura oprozomibu (Převzato z: Jankowska a kol., 2013).

6.5.2 Mechanismus působení

V *in vitro* studii bylo prokázáno, že oprozomib inhibuje růst a migraci v myelomových buněčných liniích a indukuje apoptózu pomocí kaspáz (-8, -9, -3) a poly(ADP-ribose) polymerázy (PARP) (Kubiczkova a kol., 2014; Accardi a kol., 2015). V dalších preklinických studiích oprozomib prokázal protinádorovou aktivitu podobnou carfilzomibu a bortezomibu. Inhibuje $\beta 5$ (chymotrypsin-like) podjednotku proteazomu v buněčných liniích MM, a také $\beta 5$ podjednotku u primárních buněk Waldenstromovy makroglobulinémie (Ghobrial a kol., 2019). Narozdíl od bortezomibu inhibuje pouze N-terminální část threoninu aktivní proteazomové podjednotky. Podobně jako carfilzomib přímo inhibuje diferenciaci a funkci osteoklastů, ale neovlivňuje životaschopnost jejich prekurzorů (Kubiczkova a kol., 2014; Accardi a kol., 2015).

6.5.3 Klinické studie

I. fáze klinického testování byla zaměřena na stanovení maximální tolerované dávky, bezpečnosti a snášenlivosti oprozomibu u pacientů s hematologickými malignitami. Ve II. fázi bylo primárním cílem stanovení celkové míry odpovědi a sekundárními cíli bylo stanovení doby odpovědi a míry klinického přínosu u pacientů s MM.

V první fázi byl oprozomib testován ve skupině 71 pacientů s MM nebo s Waldenströvu makroglobulinémií. Pacienti dostávali oprozomib v tabletách na základě dvou schémat. V prvním schématu pacienti dostávali dávku vždy první dva dny v týdnu. Maximální tolerovaná dávka byla u tohoto schématu stanovena na 300 mg/den. V druhém schématu dostávali pacienti dávku v pěti po sobě jdoucích dnech, toto schéma trvalo 14 dní. Maximální tolerovaná dávka byla stanovena na 240 mg/den. Ve II. fázi byly testovány alternativní režimy s nižšími dávkami. Oprozomib byl pacientům podáván na lačno. U MM pacientů byla celková míra odpovědi 41 % u schématu 2/7 (240/300 mg/den), 28,1 % u schématu 5/14 (150/180 mg/den) a 25 % ve schématu 5/14 (240 mg/den) (Ghobrial a kol., 2019).

V jiné studii byl oprozomib v kombinaci s pomalidomidem podáván pacientům s RRMM ve stejných dvou schématech jako u předešlé studie, a to v dávce 150 mg/den a 210 mg/den. Maximální tolerované dávky nebyly v této studii stanoveny. Celková míra

odpovědi byla 70,6 %, což je velmi dobré. Problémem však zůstává farmakokinetický profil a přetrvávající vedlejší účinky, které je potřeba eliminovat (Shah a kol., 2019).

Během podávání oprozomibu bylo nutno pacientům předepsat doplňující léčiva pro zmírnění vedlejších účinků. Především šlo o přetrvávající nevolnost, průjem a zvracení. Dále pak anémie, neutropenie a trombocytopenie (Ghobrial a kol.,2019; Hari a kol., 2019; Shah a kol., 2019).

7 Další látky ovlivňující ubikvitin-proteazomový systém

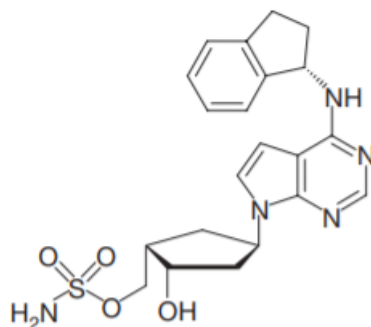
Inhibitory I. a II. generace vykazují dobré výsledky, nicméně se častokrát dostavuje relaps onemocnění. Proto je potřeba zabývat se novými léčivy, která budou vykazovat vyšší účinnost. Předšlé dvě kapitoly byly věnovány inhibitorům které cílí na 20S podjednotku proteazomu. Tato kapitola bude věnována inhibitorům 19S podjednotky proteazomu s pracovním názvem non-20S inhibitory, kromě pevonedistatu, který je cílený na 20S podjednotku proteazomu. Dále pak látkám, které se zaměřují na ligázy E3 (HDM2 a MDMX), které jsou nepřímými inhibitory proteazomu.

7.1 Pevonedistat

7.1.1 Historie a struktura

Pevonedistat známý jako MLN4924 je inhibitor s malou molekulou NEDD8 aktivujícího enzymu (NAE) (Lan a kol., 2016). Byl hodnocen v klinických studiích pro léčbu akutní myeloidní leukémie (AML), myelodysplastického syndromu, solidních nádorů, nehematologických malignit, melanomů, lymfomů a MM (Wolenski a kol., 2015). Molekulový vzorec pevonedistatu je $C_{21}H_{25}N_5O_4S$ a jeho chemický název IUPAC je [(1S,2S,4R)-4-[4-[[[(1S)-2,3-dihydro-1H-inden-1-yl]amino]pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-7-yl]-2-hydroxycyklopentyl]methyl sulfamát (obr. 15) (Soucy a kol., 2009).

V myších xenograftových modelech rakoviny slinivky způsoboval vyšší citlivost nádorových buněk na radioterapii (Wei a kol., 2012). V několika preklinických modelech bylo prokázáno, že toto léčivo účinně blokuje proliferaci neoplastických buněk. Byla dokončena I. fáze studie u nehematologických malignit a další studie stále probíhají (Weathington a Mallampalli, 2014).



Obr. 15: Chemická struktura pevonedistatu (Převzato z: Soucy a kol., 2009).

7.1.2 Mechanismus působení

Jak již bylo zmíněno výše, pevonedistat je inhibitor NEDD8 aktivujícího enzymu (NAE) (Lan a kol., 2016). Role NAE je přenášet k substrátům protein neural cell developmentally downregulated 8 (NEDD8), který je podobný ubikvitinu. Těmito substráty jsou cullin ring ligázy (CRLs) (Wolenski a kol., 2015). CRLs patří do největší rodiny ubikvitin ligáz a vyžadují pro svou aktivitu neddylace cullinu. Pevonedistat působí jako nepřímý inhibitor CRLs blokováním neddylace cullinu (Lan a kol., 2016). Neddylace je proces, kterým je protein ubikvitinového typu NEDD8 konjugován s cílovými proteiny. Tento proces je podobný procesu ubikvitinace, za použití vlastních enzymů E1 a E2 (Rabut a Peter, 2008). Komplex CRLs-NEDD8 funguje jako ubikvitinová ligáza, která připojuje ubikvitin k substrátům a směřuje je k degradaci (Wolenski a kol., 2015). Pevonedistat narušuje přeměnu proteinů zprostředkovanou CRLs, což vede k apoptóze v dělicích se rakovinných buňkách (Soucy a kol., 2009; Xu a kol., 2018). V reakci na léčbu pevonedistatem vede zhoršená aktivita NAE ke kumulaci substrátu CRLs, což způsobuje antiproliferativní účinky u AML (Swords a kol., 2018).

7.1.3 Klinické studie

V I. fázi tesování bylo cílem stanovení maximální tolerované dávky a toxicity. Testování probíhalo ve dvou skupinách u pacientů s AML a myelodysplastickým syndromem (MDS). Pevonedistat byl podáván intravenózně po dobu 1 hodiny v cyklu trvajícím 21 dní. Byla použita dvě schémata A a B. Ve schématu A bylo 27 pacientů a léčivo bylo podáváno ve dnech 1, 3 a 5. Maximální tolerovaná byla stanovena na 59 mg/m². Ve schématu B bylo 26 pacientů a léčivo bylo podáváno ve dnech 1, 4, 8 a 11. Maximální tolerovaná byla stanovena na 83 mg/m² (Swords a kol., 2015). Celková kladná odpověď u pacientů se schématem A byla 17% a u pacientů se schématem B 10%.

V jiné studii byl pevonedistat použit v kombinaci s azacitidinem u 64 pacientů s AML, kteří byli starší 65 let. Pevonedistat byl podáván intravenózně po dobu 1 hodiny ve 28 denním cyklu ve dnech 1, 3 a 5. Současně s ním by podáván azacitidin se standardní dávkou 75 mg/m² ve dnech 1, 5, 8 a 9. Maximální tolerovaná dávka byla stanovena na 20 mg/m² v kombinaci se standardní dávkou azocitidinu. Celková kladná odpověď u pacientů byla 50% (Swords a kol., 2018). V současné době probíhá II. fáze testování u pacientů s relapsem MDS, kteří již absolvovali předchozí léčbu. Průměrný věk pacientů

je 67 let. Podle posledních dat z března 2019 je celková kladná odpověď 42,9% (Moyo a kol., 2019).

Další studie byla zaměřena na pacienty s metastatickým melanomem. 26 pacientům byl podáván pevonedistat intravenózně ve dnech 1, 4, 8 a 11 ve schématu A a 11 pacientům ve dnech 1, 8 a 15 ve schématu B. Cyklus trval 21 dní a maximální tolerovaná dávka byla u schématu A stanovena na 209 mg/m². U schématu B nebyla maximální tolerovaná dávka stanovena z důvodu odstoupení sponzora od projektu (Bhatia a kol., 2016).

Pevonedistat byl testován také u pacientů s RRMM nebo lymfomem. Pacientů s MM bylo 17 a s lymfomem 27. Intravenózně jim byla podávána látka ve dvou schématech v cyklu trvajícím 21 dní. Ve schématu A bylo 27 pacientů a léčivo bylo podáváno ve dnech 1, 2, 8 a 9. Maximální tolerovaná byla stanovena na 110 mg/m². Ve schématu B bylo 17 pacientů a léčivo bylo podáváno ve dnech 1, 4, 8 a 11. Maximální tolerovaná byla stanovena na 196 mg/m² (Swords a kol., 2015). Celková kladná odpověď byla 71% (Shah a kol., 2016).

Z nežádoucích účinků převládala horečka, průjem, neutropenie, anemie, nevolnost, závratě, zvracení, nechutenství, periferní neuropatie. Při vysokých dávkách se objevovaly závažné až letální vedlejší účinky, jako celkové selhání organismu, trombocytopenie a hypoxie (Swords a kol., 2015; Shah a kol., 2016; Swords a kol., 2018).

7.2 Capzimin

Je to první inhibitor proteazomu na 19S podjednotce, konkrétně na ubiquitinovém receptoru Rpn 11 (Li a kol., 2017). Capzimin blokuje proteazomovou funkci inhibicí deubikvitinázové aktivity Rpn11, která způsobuje akumulaci polyubikvitinovaných proteinů (Sherman a Li, 2020). Jedná se o derivát quinoline-8-thiolu, který stabilizuje proteazomové substráty, vyvolává rozvinutou proteinovou odpověď a blokuje proliferaci rakovinných buněk (Li a kol., 2017). Je aktivní proti mnoha rakovinným buněčným liniím, včetně buněk rezistentních na bortezomib. Capzimin je třeba dále optimalizovat, zlepšit účinnost a specifitu (Sherman a Li, 2020).

7.3 Ubistatin B

Ubistatin blokuje vazbu ubikvitinových řetězců k jejich receptorům. Jeho účinkem dochází k inhibici degradace proteinů *in vitro*. Také byla odhalena interakce mezi ubistatinem a ubikvitinem. Ubistatin přímo interaguje s hydrofobní částí ubikvitinu a s okolními polárními zbytky na jeho povrchu. Hlavní roli pro další vývoj ubistatinu jako léčiva hraje jeho negativní náboj, který zabraňuje průchodu membránou. Tímto je značně omezena účinnost v buňkách (Verma a kol., 2004; Nakasone a kol., 2017; Sherman a Li, 2020).

7.4 RA190 a RA183

RA190 s chemickým názvem bis-benzylidin piperidin, byl identifikován jako první inhibitor Rpn13 (Anchoori a kol., 2020). Nalezení inhibitorů Rpn13 bylo považováno za důležité proto, že se společně s deubikvitinovaným enzymem Uch37, který ho aktivuje, objevuje u několika dalších druhů rakoviny (Song a kol., 2016; Sherman a Li, 2020). RA190 indukuje akumulaci polyubikvitinovaných proteinů, způsobuje stres ER a stabilizuje proteazomové substráty, včetně p53. Při testování na myších vykazoval protinádorové účinky u rakoviny vaječníků a MM (Anchoori a kol., 2013). Byly zjištěny dva mechanismy účinku, a to zacílení přímo na Rpn13, pokud není vázán na proteazom (v místě Cys88) a inaktivace Uch37 na proteazomu (Lu a kol., 2017; Sherman a Li, 2020).

Stejně jako RA190 je RA183 nevratný inhibitor se zacílením na Cys88 na Rpn13. Inhibuje růst nádoru u rakoviny vaječníků na myších modelech (Anchoori a kol., 2018; Sherman a Li, 2020). Oba inhibitory vykazují antineoplastickou aktivitu u MM s rezistencí na bortezomib, u solidních nádorů v preklinických modelech rakoviny vaječnicku, u lidského papilomaviru a u několika dalších typů rakoviny (Anchoori a kol., 2020).

7.5 KDT-11

Tento peptoidový inhibitor způsobuje akumulaci ubikvitinu a ve spolupráci s bortezomibem působí při léčbě buněk MM. KDT-11 je reverzibilní inhibitor, který má odlišný vazebný mechanismus, a proto nekonkuruje RA190 (Trader a kol., 2015; Sherman a Li, 2020). Vzhledem k velikosti a hydrofobitě sloučeniny, nemá KDT-11 potřebné vlastnosti pro použití *in vivo*. Potvrzuje však fakt, že zaměření na Rpn13 je velmi slibnou cestou k léčbě rakoviny (Jiang a kol., 2017; Yu a kol., 2018).

7.6 RIP-1

RIP-1 byl první identifikovaný peptoidní inhibitor zaměřený na Rpt4, což je podjednotka proteazomu ATPázy. Biochemicky blokuje aktivitu rozkládání proteinu 19S podjednotky a inhibuje obrat proteazomového substrátu p27 v buňkách (Sherman a Li, 2020). Byl objeven už v roce 2007, od té doby však nebyly provedeny žádné studie vedoucí k pochopení jeho biologických účinků. Vzhledem k množství a podobnosti ATPáz v buňkách by bylo dobré zabývat se dalším sudiem jeho selektivity vůči proteazomálním ATPázám (Lim a kol., 2007a; Lim a kol., 2007b; Sherman a Li, 2020).

7.7 Serdemetan

Serdemetan je nová sloučenina tryptaminu s antiproliferativní aktivitou u různých nádorových buněčných linií s aktivní formou proteinu p53 (Chargari a kol., 2011). Specificky se váže na kruhovou doménu human double minute 2 (HDM2), stejně jako nutlin-3. Tím inhibuje navázání komplexu HDM2-p53 na proteazom a brání degradaci p53. HDM2 je E3 ubikvitin ligáza odpovědná za degradaci proteazomu, a také inhibuje aktivaci transkripce divkého typu p53. Tumor supresorový gen *TP53*, který kóduje protein p53 je nejčastěji mutovaný nádorový supresorový gen. Divoký typ označuje původní formu (Lub a kol., 2016). Zatím proběhla pouze první fáze testování, a to u pacientů s pokročilými solidními nádory a s chronickou myeloidní leukémií (Stintzing a Lenz, 2014; You a kol., 2017). Výsledky byly slibné, ale byly pozorovány vady srdečního vedení (syndrom dlouhého QT intervalu) (Taberner a kol., 2011; Weathington a Mallampalli, 2014).

7.8 Nutlin-3

Je to analog cis-imidazolu se silnou afinitou k p53. Je prvním zaznamenaným HDM2 inhibitorem. Váže se na HDM2 a inhibuje interakci mezi HDM2 a p53. Následkem je akumulace p53 a aktivace jeho signální dráhy (Teoh a Chng, 2014). Aby došlo k indukci apoptózy nutlinem-3, je vžadována přítomnost p53. Nutlin-3 funguje nejlépe na nádorech s divokým typem p53 (Lee a kol., 2017). Při testování bylo zjištěno, že nutlin-3 působí v synergii se současně používanými léky proti MM, např. s bortezomibem. Bylo však také zjištěno, že léčba nutlinem-3 může způsobit somatické mutace v p53. Dlouhodobější používání tohoto léčiva, by tak potencionálně mohlo vést k rezistenci (Lub a kol., 2016).

Další studie ukázala, že nutlin-3 v kombinaci s bortezomibem indukuje paraptózu, což je typ apoptózy spojený s dilatací endoplasmatického retikula a mitochondrií (Lee a kol., 2017). V současné době je testování zaměřeno na léčbu rakoviny prsu (Kobayashi a kol., 2020).

7.9 NSC-207895

Tento benzofuroxanový derivát inhibuje expresi murine double minute X (MDMX). Ten je důležitým regulátorem reakce p53 na ribozomální stres a chemoterapeutická činidla zaměřená na RNA (Wang a kol., 2011). Bylo prokázáno, že inhibice murine double minute 2 (MDM2) a MDMX s nutlinem-3 a NSC-207895 má silný inhibiční účinek na proliferaci buněk androgen-responzivního divokého typu genu *p53*, který nese buňky karcinomu prostaty. Účinek NSC-207895 na buněčnou proliferaci byl závislý na dávce (Chopra a kol., 2018). Při testování *in vivo* na kvasinkách se ukázalo, že toto léčivo spouští cestu, vedoucí k narušení DNA. Díky tomuto zjištění se předpokládá, že se toto léčivo bude chovat stejně i v případě lidských buněk. Z tohoto důvodu zatím nebyly provedeny žádné laboratorní testy (Kapitzky a kol., 2010).

8 Zhodnocení terapeutického potenciálu

Nejdéle používaným léčivem je bortezomib. Ten však nevykazoval vysokou účinnost u konkrétních druhů rakoviny a docházelo k častým relapsům onemocnění (Dou a Goldfarb, 2002; Chen a kol., 2011). Proto bylo potřeba objevit nové a účinnější druhy léčiv na základě dat získaných při léčbě bortezomibem. Proto byly vyvinuty inhibitory II. generace - carfilzomib, ixazomib, oprozomib, marizomib a disulfiram. Cílem při vývoji těchto léčiv bylo také snížení závažných nežádoucích účinků, vykytujících se u bortezomibu a následně i u carfilzomibu (Maisnar, 2016; Kortuem a Stewart, 2013).

Inhibitory II. generace vykazovaly vysokou míru odpovědi na léčbu, ale i u nich se objevovaly nežádoucí účinky a výskyt relapsů (de Moraes Hungria a kol., 2019). Jelikož se věda stále zdokonaluje, bylo potřeba aplikovat nový přístup při léčbě rakoviny. Inhibitory I. a II. generace byly zacíleny na 20S podjednotku proteazomu. Nejnovější inhibitory jsou zaměřeny na 19S podjednotku, kromě pevonedistatu, který je zaměřen na 20S podjednotku. Další typ těchto nejnovějších inhibitorů je zaměřen na ubikvitinové ligázy. Tato nejnovější léčiva, jako například pevonedistat, capzimin, ubistatin B, RA190, RA183, KTD-11 a RIP-1 se jeví slibně, jsou však stále ve fázi testování (Veathington a Mallampalli, 2014; Sherman a Li, 2020; Lim a kol, 2007a, Lim a kol., 2007b). Cílem řady probíhajících studií je vyhodnotit účinnost a toxicitu nových kombinací léčby, zahrnující nové inhibitory proteazomu a monoklonální protilátky. Tyto kombinace již prošly schalovacím procesem pro léčbu MM pro dosažení lepší chemosenzibilizace určitých buněk. Tímto způsobem by mohlo dojít ke snížení odolnosti daných buněk vůči lékům (de Moraes Hungria a kol., 2019).

Nespornou výhodou inhibitorů proteazomu je jejich snadné podávání ve formě tablet, což neplatí pro bortezomib, carfilzomib a pevonedistat, které jsou podávány intravenózně. Použití inhibitorů proteazomu jako samostatného léčiva při léčbě řady lidských onemocnění je ztíženo základní úlohou proteazomu v biologii buňky. Nové inhibitory proteazomu mají potenciál pro zlepšení klinických výsledků, včetně zpožděného progresu onemocnění u vysoce rizikových pacientů (de Moraes Hungria a kol., 2019).

Přes pozoruhodný klinický úspěch bortezomibu se objevilo několik omezení. U části pacientů byla pozorována pozitivní odpověď na začátku léčby, ale postupem času se vyvinula rezistence. Dále se velmi často vyskytovala periferní neuropatie a jiné vedlejší účinky. Tyto problémy vedly k vývoji inhibitorů II. generace s příznivějším bezpečnostním profilem a přesnějším zacílením. Kromě strukturálních a mechanických rozdílů umožňuje carfilzomib

na rozdíl od bortezomibu léčbu s mnohem menším rizikem periferní neuropatie. Vyskytují se však další různé nežádoucí účinky jako např. kardiovaskulární komplikace, srdeční selhání a hypertenze, kterým jde předejít pečlivým sledováním pacienta. Carfilzomib je však také náchylný k rezistenci. Tento problém podnítl vývoj dalšího inhibitoru, ixazomibu. Jeho hlavní výhodou oproti bortezomibu i carfilzomibu bylo perorální podání. Ixazomib má potenciál výrazně zlepšit kvalitu života pacientů s MM. Jeho terapeutické výhody oproti bortezomibu nebo carfilzomibu však musí být prozkoumány v klinických studiích (de Moraes Hungria a kol., 2019). Ixazomib je první perorálně podávané léčivo. Byla u něj pozorována nižší míra toxicity a vynikající snášenlivost v kombinaci s jinými léčivy. S velkou pravděpodobností bude z dlouhodobého hlediska hrát důležitou roli při léčbě pacientů s MM (Richardson a kol., 2018). Nejnovější klinické studie dokazují, že léčba založená na ixazomibu může být přínosná zvláště pro pacienty, u kterých po předešlé léčbě bortezomibem nedochází k progresu po uplynutí 24 měsíců (Cohen a kol., 2020).

Obrovský potenciál má také disulfiram, používaný jako lék proti alkoholismu. V současné době probíháněkolik klinických testování u pacientů s GBM, a to samostatně nebo v kombinaci s jinými sloučeninami. Dále probíhají studie pro léčbu rakoviny prsu a slinivky břišní (Xu a kol., 2020). Dalším slibným léčivem byl oprozomib, který však má minimální účinnost u pacientů se solidním tumorem. Je proto potřeba dalšího testování se snahou pro rozšíření jeho terapeutického potenciálu. Pro léčbu pokročilých malignit, včetně MM a refrakterního lymfomu je testován marizomib. Momentálně u něj probíhají studie týkající se léčby maligního glioblastomu (de Moraes Hungria a kol., 2019). Látky zaměřující se na 19S podjednotku a ligázy E3 jsou stále ve fázi testování a klinických studií. Představují novou generaci přípravků pro léčbu nádorových onemocnění. Výsledky klinických testování jsou slibné, je však nutné snížit míru toxicity a zbavit se závažných nežádoucích účinků.

9 Závěr

V této práci jsem se zabývala inhibitory proteazomu, které jsou v současné době využívány při léčbě různých typů rakoviny. Zaměřila jsem se především na MM, který se v lidské populaci vyskytuje stále častěji a s úspěchem lze v jeho terapii využít inhibitory proteazomu. Přípravků pro léčbu rakoviny je mnoho, často se však u nich vyskytují závažné nežádoucí účinky. Společně s tímto problémem dochází i k častému relapsu onemocnění a ke vzniku a rozvoji rezistence na daná léčiva. Léčebné postupy využívající inhibitory proteazomu, tak nabízejí možnost, jak čelit těmto komplikacím, které mohou protinádorovou léčbu doprovázet.

10 Literatura

Accardi F.; Toscan D.; Bolzoni M.; Dalla Palma B.; Aversa F.; Giuliani N.: Mechanism of Action of Bortezomib and the New Proteasome Inhibitors on Myeloma Cells and the Bone Microenvironment: Impact on Myeloma-Induced Alterations of Bone Remodeling. *BioMed Research International*. 2015, (2), 1 – 13.

Adams J.: The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nature Reviews Cancer*. 2004, 4(5), 349-360.

Adams J.; Palombella V. J.; Sausville E. A.; Johnson J.; Destree A.; Lazarus D. D.; Maas J.; Pien C. S.; Prakash S.; Elliott P. J.: Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Research*. 1999, 59(11), 2615 – 2622.

Alharbi F.; el-Guebaly N.: The Relative Safety of Disulfiram. *Addictives Disorders & Their Treatment*. 2013, 12(3), 140 – 147.

Allensworth J. L.; Evans M. K.; Bertucci F.; Aldrich A. J.; Festa R. A.; Finetti P.; Ueno N. T.; Safi R.; McDonnell D. P.; Thiele D. J.; Van Laere S.; Devi G. R.: Disulfiram (DSF) acts as a copper ionophore to induce copper-dependent oxidative stress and mediate anti-tumor efficacy in inflammatory breast cancer. *Molecular Oncology*. 2015, 9(6), 1155 – 1168.

Anchoori R. K.; Jiang R.; Peng S.; Soong R. S.; Algethami A.; Rudek M. A.; Anders N.; Hung C. F.; Chen X.; Lu X.; Kayode O.; Dyba M.; Walters K. J. Roden R. B. S.: Covalent Rpn13-Binding Inhibitors for the Treatment of Ovarian Cancer. *ACS Omega*. 2018, 3(9), 11917 – 11929.

Anchoori R. K.; Karanam B.; Peng S.; Wang J. W.; Jiang R.; Tanno T.; Orłowski R. Z.; Matsui W.; Zhao M.; Rudek M. A.; Hung C. F.; Chen X.; Walters K. J.; Roden R. B.: A bis-benzylidene piperidone targeting proteasome ubiquitin receptor RPN13/ADRM1 as a therapy for cancer. *Cancer Cell*. 2013, 24(6), 791 – 805.

Anchoori R. K.; Tan M. Tseng S.-H.; Peng S.; Soong R. S.; Algethami A.; Foran P.; Das S.; Wang Ch.; Wang T.-L.; Liang H.; Hung Ch.-F.; Roden R. B. S.: Structure-function analyses of candidate small molecule RPN13 inhibitors with antitumor properties. *PLoS ONE*. 2020, 15(1), 1 – 19.

Askgaard G.; Friis S.; Hallas J.; Thygesen L. C.; Pottegård A.: Use of disulfiram and risk of cancer: a population-based case-control study. *European Journal of Cancer Prevention*. 2014, 23(3), 225 – 232.

Bhatia S.; Pavlick A. C.; Boasberg P.; Thompson J. A.; Mulligan G.; Pickard M. D.; Faessel H.; Dezube B. J.; Hamid O.: A phase I study of the investigational NEDD8-activating enzyme inhibitor pevonedistat (TAK-924/MLN4924) in patients with metastatic melanoma. *Investigational New Drugs*. 2016, 34, 439 – 449.

Brayer J.; Baz R.: The potential of ixazomib, a second generation proteasome inhibitor, in the treatment of multiple myeloma. *Therapeutic Advances in Hematology*. 2017, 8(7), 207 – 220.

Brüning A.; Kast R. E.: Oxidizing to death. Disulfiram for cancer cell killing. *Cell Cycle*. 2014, 13(10), 1513 – 1514.

Budenholzer L.; Cheng Ch. L.; Li Y.; Hochstrasser M.: Proteasome Structure and Assembly. *Journal of Molecular Biology*. 2017, 429(22), 3500 – 3524.

Butcher K.; Kannappan V.; Kilari R. S.; Morris M. R.; McConville C.; Armesilla A. L.; Wang W.: Investigation of the key chemical structures involved in the anticancer activity of disulfiram in A549 non-small cell lung cancer cell line. *BMC Cancer*. 2018, 18(1), 1 – 12.

Casimiro M. C.; Crosariol M.; Loro E.; Li Z.; Pestell R. G.: Cyclins and Cell Cycle Control in Cancer and Disease. *Genes Cancer*. 2012, 3(11 – 12), 649 – 657.

Ciechanover A.: Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2005, 6(1), 79-87.

Cohen Y. C.; Magen H.; Lavi N.; Gatt M. E.; Chubar E.; Horowitz N.; Kreiniz N.; Tadmor T.; Trestman S.; Vitkon R.; Rouvio O.; Shvetz O.; Shaulov A; Ziv-Baran T.; Avivi I.: Ixazomib-based regimens for relapsed/refractory multiple myeloma: are real-world data compatible with clinical trial outcomes? A multi-site Israeli registry study. *Annals of Hematology*. 2020, 99(7), 1 – 9.

Cook K. M.; Figg W. D.: Angiogenesis Inhibitors – Current Strategies and Future Prospects. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2010, 60(4), 222 – 243.

Corazzari M.; Gagliardi M.; Fimia G. M.; Piacentini M.: Endoplasmic Reticulum Stress, Unfolded Protein Response, and Cancer Cell Fate. *Frontiers in Oncology*. 2017, 7(78), 1 – 11.

Crawford L. J. A.; Walker B.; Ovaas H.; Chauhan D.; Anderson K. C.; T. C. M. Morris; Irvine A. E.: Comparative selectivity and specificity of the proteasome inhibitors BzLLCOCOCHO, PS-341, and MG-132. *Cancer Research*. 2006, 66(12), 6379 – 6386.

Crawford L. J.; Walker B.; Irvine A. E.: Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Journal of Cell Communication and Signaling*. 2011, 5(2), 101 – 110.

Crawford L. J.; Windrum P.; Magill L.; Mělo J. V.; McCallum L.; McMullin M. F.; Ovaas H.; Walker B.; Irvine A. E.: Proteasome proteolytic profile is linked to Bcr-Abl expression. *Experimental Hematology*. 2009, 37(3), 357 – 366.

Curran M. P.; McKeage K.: Bortezomib: a review of its use in patients with multiple myeloma. *Drugs*. 2009, 69(7), 859 – 888.

Dalton W.: The proteasome. *Seminars in Oncology*. 2004, 31, str. 3 – 9.

de Moraes Hungria V. T.; de Queiroz Crusó E.; Bittencourt R. I.; Maiolino A.; Pessoa Magalhães R. J.; do Nascimento Sobrinho J.; Vaz Pinto J.; Coutinho Fortes R.; de Sá Moreira E.; Tanaka Y. P.: New proteasome inhibitors in the treatment of multiple myeloma. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*. 2019, 41(1), 76 – 83.

de Moraes Hungria V. T.; de Queiroz Crusoé E.; Bittencourt R. I.; Maiolino A.; Pessoa Magalhães R. J.; do Nascimento Sobrinho J.; Vaz Pinto J.; Coutinho Fortes R.; de Sá Moreira E.; Tanaka P. Y.: New proteasome inhibitors in the treatment of multiple myeloma. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*. 2019, 41(1), 76 – 83.

Deshaies R. J.; Joazeiro C. A. P.: RING Domain E3 Ubiquitin Ligases. *Annual Review of Biochemistry*. 2009, 78(1), 399 – 434.

Dimopoulos M. A.; Grosicki S.; Jeźdrzejczak W. W.; Nahi H.; Gruber A.; Hansson M.; Gupta N.; Byrne C.; Labotka R.; Teng Z.; Yang H.; Grzasko N.; Kumar S.: All-oral ixazomib, cyclophosphamide, and dexamethasone for transplant-ineligible patients with newly diagnosed multiple myeloma. *European Journal of Cancer*. 2019, 106, 89 – 98.

Ding W.-X.; NI H.-M.; Chen X.; Yu J.; Zhang L.; Yin X.-M.: A coordinated action of Bax, PUMA, and p53 promotes MG132-induced mitochondria activation and apoptosis in colon cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2007, 6(3), 1062 – 1069.

Dou Q. P.; Goldfarb R. H.: Bortezomib (millennium pharmaceuticals). *Drugs: The Investigational Drugs Journal*. 2002, 5(8), 828 – 834.

El-Kenawi A. E.; El-Remessy A. B.: Angiogenesis inhibitors in cancer therapy: mechanistic perspective on classification and treatment rationales. *British Journal of Pharmacology*. 2013, 170(4), 712 – 729.

Foot N.; Henshall T.; Kumar S.: Ubiquitination and the Regulation of Membrane Proteins. *Physiological Reviews*. 2017, 97(1), 253 – 281.

Fredrickson E. K.; Gardner R. G.: Selective destruction of abnormal proteins by ubiquitin-mediated protein quality control degradation. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2012, 23(5), 530 – 537.

Ghobrial I. M.; Vij R.; Siegel D.; Badros A.; Kaufman J.; Raje N.; Jakubowiak A.; Savona M. R.; Obreja M.; Berdeja J. G.: A Phase Ib/II Study of Oprozomib in Patients

with Advanced Multiple Myeloma and Waldenström Macroglobulinemia. *Clinical Cancer Research*. 2019, 25(16), 4907 – 4916.

Gong B.; Radulovic M.; Figueiredo-Pereira M. E.; Cardozo Ch.: The Ubiquitin-Proteasome System: Potential Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease and Spinal Cord Injury. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2016, 9(4), 1 – 16.

Groen K.; Van de Donk N W. J. C.; Stege C. A. M.; Zweegman S.; Nijhof I. S.: Carfilzomib for relapsed and refractory multiple myeloma. *Cancer Management and Research*. 2019, 11, 2663 – 2675.

Grossmann K. F.; Blankenship M. B.; Akerley W.; Terrazas M. C.; Kosak K. M.; Boucher K. M.; Buys S. S.; Jones K.; Werner T. L.; Agarwal N.; Weis J.; Sharma S.; Ward J.; Shami P .J.: A phase I clinical study investigating disulfiram and copper gluconate in patients with advanced treatment-refractory solid tumors involving the liver. *American Association for Cancer research*. 2011, 71(8), 1308.

Gupta I.; Singh K.; Varshney N.K.; Khan S.: Delineating Crosstalk Mechanisms of the Ubiquitin Proteasome System That Regulate Apoptosis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2018, 6, 1 – 25.

Gupta N.; Hanley M. J.; Xia C.; Labotka R.; Harvey R. D.; Venkatakrishnan K.: Clinical Pharmacology of Ixazomib: The First Oral Proteasome Inhibitor. *Clinical Pharmacokinetics*. 2018, 58(6), 1 – 19.

Gupta N.; Hanley M. L.; Xia C.; Labotka R.; Harvey R. D.; Venkatakrishnan K.: Clinical Pharmacology of Ixazomib: The First Oral Proteasome Inhibitor. *Clinical Pharmacokinetics*. 2019, 58, 431 – 449.

Hari P.; Matous J. V.; Voorhees P. M.; Shain K. H.; Obreja M.; Frye J.; Fujii H.; Jakubowiak A. J.; Rossi D.; Sonneveld P.: Oprozomib in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood Cancer Journal*. 2019, 9(66), 1 – 4.

Harris B. R. E.; Wang D.; Zhang Y.; Ferrari M.; Okon A.; Cleary M. P.; Wagner C. R.; Yang D. – Q.: Induction of the p53 Tumor Suppressor in Cancer Cells through Inhibition of Cap-Dependent Translation. *Molecular and Cellular Biology*. 2018, 38(10), 1 – 14.

Harrison S. J.; Mainwaring P.; Price T.; Millward M. J.; Padrik P.; Underhill C. R.; Cannell P. K.; Reich S. D.; Trikha M.; Spencer A.: Phase I Clinical Trial of Marizomib (NPI-0052) in Patients with Advanced Malignancies Including Multiple Myeloma: Study NPI-0052-102 Final Results. *Clinical Cancer Research*. 2016, 22(18), 4559 – 4566.

Herndon T. M.; Deisseroth A. B.; Kaminskas E.; Kane R. C.; Koti K. M.; Rothmann M.; Habtemariam B. A.; Bullock J.; Bray J. D.; Hawes J. J.; Palmby T. R.; Jee J.; Adams W. M.; Mahayni H.; Brown J.; Dorantes A.; Sridhara R.; Farrell A. T.; Pazdur R.: U.S. Food and Drug Administration Approval: Carfilzomib for the Treatment of Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research*. 2013, 19(17), 4559 – 4563.

Hideshima T.; Chauhan D.; Podar K.; Schlossman R. L.; Richardson P.; Anderson K. C.: Novel therapies targeting the myeloma cell and its bone marrow microenvironment. *Seminars in Oncology*. 2001, 28(6), 607 – 612.

Hideshima T.; Ikeda H.; Chauhan D.; Okawa Y.; Raje N.; Podar K.; Mitsiades C.; Munshi N. C.; Richardson P. G.; Carrasco R. D.; Anderson K. C.: Bortezomib induces canonical nuclear factor-kappaB activation in multiple myeloma cells. *Blood*. 2009, 114(5), 1046 – 1052.

Hideshima T.; Richardson P.; Chauhan D.; Palombella V. J.; Elliott P. J.; Adams J.; Anderson K. C.: The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Research*. 2001, 61(7), 3071 – 3076.

Hientz K.; Mohr A.; Bhakta-Guha D.; Efferth T.: The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy. *Oncotarget*. 2017, 8(5), 8921 – 8946.

Holkova B.; Perkins E. B.; Ramakrishnan V.; Tombes M.B.; Shrader E.; Talreja N.; Wellons M. D.; Hogan K. T.; Roodman G. D.; Coppola D.; Kang L.; Dawson J.; Stuart R.

K.; Peer C.; Figg W. D.; Kolla S.; Doyle A.; Wright J.; Sullivan D. M.; Roberts J. D.; Grant S.: Phase I trial of bortezomib (PS-341; NSC 681239) and alvocidib (flavopiridol; NSC 649890) in patients with recurrent or refractory B-cell neoplasms. *Clinical Cancer Research*. 2011, 17(10), 3388 – 3397.

Huang J. Chaudhary R.; Cohen A. L.; Fink K.; Goldlust S.; Boockvar J.; Chinnaiyan P.; Wan L.; Marcus S.; Campian J. L.: A multicenter phase II study of temozolomide plus disulfiram and copper for recurrent temozolomide-resistant glioblastoma. *Journal of Neuro-Oncology*. 2019, 142(3), 537 – 544.

Huang J.; Campian J. L.; Gujar A. D.; Tran D. D.; Lockhart A. C.; DeWees T. A.; Tsien C. I.; Kim A. H.: A phase I study to repurpose disulfiram in combination with temozolomide to treat newly diagnosed glioblastoma after chemoradiotherapy. *Journal of Neuro-Oncology*, 2016, 128(2), 259–266.

Huang J.; Campian J. L.; Gujar A. D.; Tsien Ch.; Ansstas G.; Tran D. D.; DeWees T. A.; Lockhart A. C.; Kim A. H.: Final results of a phase I dose-escalation, dose-expansion study of adding disulfiram with or without copper to adjuvant temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *Journal of Neuro-Oncology*. 2018, 138(1), 105 – 111.

Chargari C.; Leteur C.; Angevin E.; Bashir T.; Schoentjes B.; ARTS J.; Janicot M.; Bourhis J.; Deutsch E.: Preclinical assessment of JNJ-26854165 (Serdemetan1), a novel tryptamine compound with radiosensitizing activity in vitro and in tumor xenografts. *Cancer Letters*. 2011, 312(2), 209 – 218.

Chauhan D.; Anderson K. C.: Mechanisms of cell death and survival in multiple myeloma (MM): Therapeutic implications. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*. 2003, 8(4), 337 – 343.

Chen D.; Cui Q. C.; Yang H.; Dou Q. P.: Disulfiram, a Clinically Used Anti-Alcoholism Drug and Copper-Binding Agent, Induces Apoptotic Cell Death in Breast Cancer Cultures and Xenografts via Inhibition of the Proteasome Activity. *Cancer Research*. 2006, 66(21), 10425 – 10433.

Chen D.; Frezza M.; Schmitt S.; Kanwar J.; Dou Q. P.: Bortezomib as the First proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Current Cancer Drug Targets*. 2011, 11(3), 239 – 253.

Chen D.; Frezza M.; Schmitt, S.; Kanwar J.; Dou Q. P.: Bortezomib as the First Proteasome Inhibitor Anticancer Drug: Current Status and Future Perspectives. *Current Cancer Drug Targets*. 2011, 11(3), 239 – 253.

Chen D.; Ping Dou Q.: The ubiquitin-proteasome system as a prospective molecular target for cancer treatment and prevention. *Current Protein & Peptide Science*. 2010, 11(6), 459 – 470.

Chopra H.; Khan Z.; Contreras J.; Wang H.; Sedrak A.; Zhu Y.: Activation of p53 and destabilization of androgen receptor by combinatorial inhibition of MDM2 and MDMX in prostate cancer cells. *Oncotarget*. 2018, 9(5), 6270 – 6281.

Chu I. M.; Hengst L.; Slingerland J.M.: The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2008, 8(4), 253 – 267.

Ikeda F.; Dikic I.: Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein Modifications. *European Molecular Biology Organization Reports*. 2008, 9(6), 536-542.
Inobe T.; Matouschek A.: Paradigms of protein degradation by the proteasome. *Current Opinion in Structural Biology*. 2014, 24, 156 – 164.

Jagannath S.; Durie B. G.; Wolf J.; Camacho E.; Irwin D.; Lutzky J.; McKinley M.; Gabayan E.; Mazumder A.; Schenkein D.; Crowley J.: Bortezomib therapy alone and in combination with dexamethasone for previously untreated symptomatic multiple myeloma. *British Journal of Haematology*. 2005, 129(6), 776 – 783.

Jankowska E.; Witkowska J.; Karpowicz P.; Osmulski P. A.; Gaczynska M.: The Proteasome in Health and Disease. *Current Pharmaceutical Design*. 2013, 19, 1010 – 1028.

Jiang R. T.; Yemelyanova A.; Xing D.; Anchoori R. K.; Hamazaki J.; Murata S.; Seidman J. D.; Wang T.-L.; Roden R. B. S.: Early and consistent overexpression of *ADRM1* in ovarian high-grade serous carcinoma. *Journal of Ovarian Research*. 2017, 10(53), 1 – 12.

Jiao Y.; Ding W.-Q.; Hannafon B.: Disulfiram's Anticancer Activity: Evidences and Mechanisms. *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2016, 16(11), 1378 – 1384.

Jiao Y.; Hannafon B. N.; Zhang R. R.; Fung K.-M.; Ding W.-Q.: Docosahexaenoic acid and disulfiram act in concert to kill cancer cells: a mutual enhancement of their anticancer actions. *Oncotarget. Open Access Impact Journal*. 2017, 8(11), 17908 – 17920.

Jung J. H.; Lee H.; Kim J. – H.; Sim D. Y.; Ahn H.; Kim B.; Chang S.; Kim S. – H.: p53-Dependent Apoptotic Effect of Puromycin via Binding of Ribosomal Protein L5 and L11 to MDM2 and Its Combination Effect with RITA or Doxorubicin. *Cancers*. 2019, 11(4), 1 – 13.

Kaijun D.; Lloyd K.; Abraham V.; MacLaren A.; Burrows F. J.; Desjardins A.; Trikha M.; Bota D. A.: Marizomib activity as a single agent in malignant gliomas: ability to cross the blood-brain barrier. *Neuro-Oncology*. 2016, 18(6), 840 – 848.

Kalra G.; Desousa A.; Shiravastava A.: Disulfiram in the management of alcohol dependence: A comprehensive clinical review. *Open Journal of Psychiatry*. 2014, 4(1), 43 – 52.

Kane R. C.; Dagher R.; Farrell A.; Ko C.-W.; Sridhara R.; Justice R.; Pazdur R.: Bortezomib for the Treatment of Mantle Cell Lymphoma. *Clinical Cancer Research*. 2007, 13(18), 5291 – 5294.

Kane R. C.; Farrell A. T.; Sridhara R.; Pazdur R.: United states food and drug administration approval summary: Bortezomib for the Treatment of Progressive Multiple Myeloma after One Prior Therapy. *Clinical Cancer Research*. 2006, 12(10), 2955 – 2960.

Kapitzki L.; Balrao P.; Berens T. J.; Gassner N.; Zhou Ch.; Wüster A.; Wu J.; Babu M. M.; Elledge S. J.; Toczyski D.; Lokey R. S.; Krogan N. J.: Cross-species chemogenomic profiling revers evolutionarily conserved drug mode of action. *Molecular Systems Biology*. 2010, 6(451), 1 – 13.

Khan M. L.; Stewart A. K.: Carfilzomib: a novel second-generation proteasome inhibitor. *Future Oncology*. 2011, 7(5), 607 – 612.

Khazaei S.; Esa N. M.; Ramachandran V.; Hamid R. A.; Pandurangan A. K.; Etemad A.; Ismail P.: *In vitro* Antiproliferative and Apoptosis Inducing Effect of *Allium atroviolaceum* Bulb Extract on Breast, Cervical, and Liver Cancer Cells. *Frontiers in Pharmacology*. 2017, 8(5), 1 – 16.

Kisselev A. F.; Callard A.; Goldberg A. L.: Importance of the Different Proteolytic Sites of the Proteasome and the Efficacy of Inhibitors Varies with the Protein Substrate. *Journal of Biological Chemistry*. 2006, 281(13), 8582 – 8590.

Kobayashi M.; Ishizaki Y.; Owaki M.; Matsumoto Y.; Kakiyama Y.; Hoshino S.; Tagawa R.; Sudo Y.; Okita N.; Akimoto K.; Higami Y.: Nutlin-3a suppresses poly (ADP-ribose) polymerase 1 by mechanisms different from conventional PARP1 suppressors in a human breast cancer cell line. *Oncotarget*. 2020, 11(18), 1653 – 1665.

Kortuem K. M.; Stewart A. K.: Carfilzomib. *Blood*. 2013, 121(6), 893 – 897.

Koyama D.; Kikuchi J.; Hiraoka N.; Wada T.; Kurosawa H.; Chiba S.; Furukawa Y.: Proteasome inhibitors exert cytotoxicity and increase chemosensitivity via transcriptional repression of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2014, 28, 1216 – 1226.

Krhovská P.; Minařík J.: Ixazomib – první perorální inhibitor proteazomu. *Remedia*. 2017, 27, 461 – 465.

Kubiczkova L.; Pour L.; Sedlarikova L.; Hajek R.; Sevcikova S.: Proteasome inhibitors – molecular basis and current perspectives in multiple myeloma. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2014, 18(6), 947 – 961.

Kumar S. K.; Grzasko N.; Delimpasi S.; Jedrzejczak W. W.; Grosicki S.; Kyrtsolis M. C.; Spencer A.; Gupta N.; Teng Z.; Byrne C.; Labotka R.; Dimopoulos M. A.: Phase 2 study of all-oral ixazomib, cyclophosphamide and low-dose dexamethasone for relapsed/refractory multiple myeloma. *British Journal of Hematology*. 2018, 184(4), 536 – 546.

Kupperman E.; Lee E. C.; Cao Y.; Bannerman B.; et al.: Evaluation of the Proteasome Inhibitor MLN9708 in Preclinical Models of Human Cancer. *Cancer Research*. 2010, 70(5), 1970 – 1980.

Lan H.; Tang Z.; Jin H.; Sun Y.: Neddylation inhibitor MLN4924 suppresses growth and migration of human gastric cancer cells. *Scientific Reports*. 2016, 6, 1 – 12.

Lee B.; Lee M. J.; Park S.; Oh D. Elsasser S.; Chen P.; Gartner C.; Dimova N.; Hanna J.; Gygi S. P.; Wilson S. M.; King R. W.; Finley D.: Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. *Nature*. 2010, 467, 179 – 184.

Lee D. M.; Kim I. Y.; Seo M. J.; Kwon M. R.; Choi K. S.: Nutlin-3 enhances the bortezomib sensitivity of p53-defective cancer cells by inducing paraptosis. *Experimental and Molecular Medicine*. 2017, 49(8), 1 – 18.

Lee S. J.; Levitsky K.; Parlati F.; Bennett M. K.; Arastu-Kapur S.; Kellerman L.; Woo T. F.; Wong A. F.; Papadopoulos K. P.; Niesvizky R.; Badros A. Z.; Vij R.; Jagannath S.; Siegel D.; Wang M.; Ahmann G. J.; Kirk C. J.: Clinical activity of carfilzomib correlates with inhibition of multiple proteasome subunits: application of a novel pharmacodynamic assay. *British Journal of Hematology*. 2016, 173, 884 – 895.

Levin N.; Spencer A.; Harrison S. J.; Chauhan D.; Burrows F.; Anderson K. C.; Reich S. D.; Richardson P. G.; Trikha M.: Marizomib irreversibly inhibits proteasome to overcome

compensatory hyperactivation in multiple myeloma and solid tumour patients. *British Journal of Haematology*. 2016, 174(5), 1 – 10.

Li H.; Liu B.; Ao H.; Fu J.; Wang Y.; Feng Y.; Guo Y.; Wang X.: Soybean lecithin stabilizes disulfiram nanosuspensions with a high drug-loading content: remarkably improved antitumor efficacy. *Journal of Nanobiotechnology*. 2020, 18, 1 – 11.

Li J.; Yakushi T.; Parlati F.; Mackinnon A. L.; Perez Ch.; Ma Y.; Carter K. P.; Colayco S.; Magnuson G.; Brown B.; Nguyen K.; Vasile S.; Suyama E.; Smith L. H.; Sergienko E.; Pinkerton A. B.; Chung T. D. Y.; Palmer A. E.; Pass I.; Hess S.; Cohen S. M.; Deshaies R. J.: Capzimin is a potent and specific inhibitor of proteasome isopeptidase Rpn11. *Nature Chemical Biology*. 2017, 13(5), 486 – 493.

Lim H.-S.; Cai D.; Archer Ch. T.; Kodadek T.: Identification of a Peptoid Inhibitor of the Proteasome 19S Regulatory Particle. *Journal of the American Chemical Society*. 2007b, 129(25), 7750 – 7751.

Lim H.-S.; Cai D.; Archer Ch. T.; Kodadek T.: Periodate-Triggered Cross-Linking Reveals Sug2/Rpt4 as the Molecular Target of a Peptoid Inhibitor of the 19S Proteasome Regulatory Particle. *Journal of the American Chemical Society*. 2007a, 129(43), 12936 – 12937.

Lu X.; Nowicka U.; Sridharan V.; Liu F.; Randles L.; Hymel D.; Dyba M.; Tarasov S. G.; Tarasova N. I.; Zhi Zhao X.; Hamazaki J.; Murata S.; Burke T. R., Jr.; Walters K. J.: Structure of the Rpn13-Rpn2 complex provides insights for Rpn13 and Uch37 as anticancer targets. *Nature Communications*. 2017, 8(15540), 1 – 13.

Lub S.; Maes K.; Menu E.; De Bruyne E.; Vanderkerken K.; Van Valckenborgh E.: Novel strategies to target the ubiquitin proteasome system in multiple myeloma. *Open Access Impact Journal*. 2016, 7(6), 6521 – 6537.

Luqman S.; Pezzuto J. M.: NFκB: a promising target for natural products in cancer chemoprevention. *Phytotherapy Research*. 2010, 24(7), 949 – 963.

Ma L.; Diao A.: Marizomib, A Potent Second Generation Proteasome Inhibitor from Natural Origin. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2015, 15(3), 298 – 306.

Ma M. H.; Yang H. H.; Parker K.; Manyak S.; Friedman J. M.; Altamirano C.; Wu Z. Q.; Borad M. J.; Frantzen M.; Roussos E.; Neeser J.; Mikail A.; Adams J.; Sjak-Shie N.; Vescio R. A.; Berenson J. R.: The proteasome inhibitor PS-341 markedly enhances sensitivity of multiple myeloma tumor cells to chemotherapeutic agents. *Clinical Cancer Research*. 2003, 9(3), 1136 – 1144.

Mai E. K.; Bertsch U.; Dürig J.; Kunz C.; Haenel M.; Blau I. W.; Munder M.; Jauch A.; Schurich B.; Hielscher T.; Merz M.; Huegle-Doerr B.; Seckinger A.; Hose D.; Hillengass J.; Raab M. S.; Neben K.; Lindemann H. W.; Zeis M.; Gerecke C.; Schmidt-Wolf I. G.; Weisel K.; Scheid C.; Salwender H.; Goldschmidt H.: Phase III trial of bortezomib, cyclophosphamide and dexamethasone (VCD) versus bortezomib, doxorubicin and dexamethasone (PAd) in newly diagnosed myeloma. *Leukemia*. 2015, 29(8), 1721 – 1729.

Maisnar V.: Carfilzomib – selektivní inhibitor proteasomu, další naděje v léčbě mnohočetného myelomu. *Remedia*. 2016, 26, 542 – 546.

Marciniec B.; Dettlaff K.; Naskrent M.; Pietralik Z.; Kozak M.: DSC and spectroscopic studies of disulfiram radiostability in the solid state. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2012, 108(1), 33 – 40.

Mareček D.; Rudá-Kučerová J.: Léčivé látky z mořských organismů v klinických studiích a praxi. *Česká a slovenská farmacie*. 2017, 66, 191 – 207.

Markovic S.; Geyer S. M.; Dawkins F.; Sharfman W.; Albertini M.; Maples W.; Fracasso P. M.; Fitch T.; LoRusso P.; Adjei A. A.; Erlichman C.: A Phase II Study of Bortezomib in the Treatment of Metastatic Malignant Melanoma. *American Cancer Society*. 2005, 11, 2584 – 2589.

Marsh D. J.; Dickson K.-A.: Writing Histone Monoubiquitination in Human Malignancy—The Role of RING Finger E3 Ubiquitin Ligases. *Genes*. 2019, 10(1), 1 – 15.

Matějčková J.; Kubiczková L.; Sedlaříková L.; Potáčová A.; Hájek R.; Ševčíková S.: Degradace proteinů ubiquitin-proteazomovou dráhou. *Klinická Onkologie*. 2013, 26(4), 251 – 256.

Matsuno Y.; Hyodo M.; Fujimori H.; Shimizu A.; Yoshioka K.: Sensitization of Cancer Cells to Radiation and Topoisomerase I Inhibitor Camptothecin Using Inhibitors of PARP and Other Signaling Molecules. *Cancers*. 2018, 10(10), 1 – 11.

McBride A.; Klaus J. O.; Stockerl-Goldstein K.: Carfilzomib: A second-generation proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 2015, 75(5), 353 – 360.

McConkey D. J.; Zhu K.: Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer. *Drug Resistance Updates*. 2008, 11(4-5), 164 – 179.

Momand J.; Jung D.; Wilczynski S.; Nilandi J.: The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Research*. 1998, 26(15), 3453 – 3459.

Morgillo F.; D'aiuto E.; Troiani T.; Martinelli E.; Cascone T.; De Palma R.; Orditura M.; De Vita F.; Ciardiello F.: Antitumor activity of bortezomib in human cancer cells with acquired resistance to anti-epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Lung Cancer*. 2011, 71(3), 283 – 290.

Motegi A.; Murakawa Y.; Takeda S.: The vital link between the ubiquitin-proteasome pathway and DNA repair: impact on cancer therapy. *Cancer Letters*. 2009, 283(1), 1 – 9.

Moyo T. K.; Watts J. M.; Skikne B. S.; Mendler J. H.; Klimek V. M.; Chen S.; Fan R.; Anderson I. A.; Sochacki A.; Strickland S. A.; Byrne M. T.; Bradley T. J.; Ayers G. D.; Mohan S. R.; Savona M. R.: Preliminary Results from a Phase II Study of the Combination of Pevonedistat and Azacitidine in the Treatment of MDS and MDS/MPN after Failure of DNA Methyltransferase Inhibition. *Blood*. 2020, 134(1), 4236.

Mukhopadhyay D.; Riezman H.: Proteasome-Independent Functions of Ubiquitin in Endocytosis and Signaling. *Science*. 2007, 315(5809), 201-205.

Muz B.; Ghazarian R. N.; Ou M.; Luderer M. J.; Kusdono H. D.; Azab A. K.: Spotlight on ixazomib: potential in the treatment of multiple myeloma. *Drug Design, Development and Therapy*. 2016, 10, 217 – 226.

Nakano K.; Vousden K. H.: PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53. *Molecular Cell*. 2001, 7(3), 683 – 694.

Nakasone M. A.; Lewis T. A.; Walker O.; Thakur A.; Mansour W.; Castañeda C. A.; Goeckeler-Fried J. L.; Parlati F.; Chou T.-F.; Hayat O.; Zhang D.; Camara Ch. M.; Bonn S. M.; Nowicka U. K.; Krueger S.; Glickman M. H.; Brodsky J. L.; Deshaies R. J.; Fushman D.: Structural basis for the inhibitory effects of ubistatins in the ubiquitin-proteasome pathway. *Structure*. 2017, 25(12), 1839 – 1855.

Nawrocki S. T.; Carew J. S.; Maclean K. H.; Courage J. F.; Huang P.; Houghton J. A.; Cleveland J. L.; Giles F. J.; McConkey D. J.: Myc regulates aggresome formation, the induction of Noxa, and apoptosis in response to the combination of bortezomib and SAHA. 2008, 112(7), 2917 – 2926.

Nawrocki S. T.; Carew J. S.; Pino M. S.; Highshaw R. A.; Dunner K.; Huang P.; Abbruzzese J. L.; McConkey D. J.: Bortezomib Sensitizes Pancreatic Cancer Cells to Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis. *Cancer Research*. 2005, 65(24), 11658 – 11666.

Nechushtan H.; Hamamreh Y.; Nidal S.; Gotfried M.; Baron A.; Shalev Y. I.; Nisman B.; Peretz T.; Peylan-Ramu N.: A Phase IIb Trial Assessing the Addition of Disulfiram to Chemotherapy for the Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *The Oncologist*. 2015, 20(4), 366 – 367.

Nencioni A.; Grünebach F.; Patrone F.; Ballestrero A.; Brossart P.: Proteasome inhibitors: antitumor effects and beyond. *Leukemia*. 2007, 21, 30 – 36.

Nikiforov M. A.; Riblett M.; Tang W. H.; Gratchouck V.; Zhuang D.; Fernandez Y.; Verhaegen M.; Varambally S.; Chinnaiyan A. M.; Jakubowiak A. J.; Soengas M. S.: Tumor cell-selective regulation of NOXA by c-MYC in response to proteasome

inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007, 104(49), 19488 – 19493.

Obaidat A.; Weiss J.; Wahlgren B.; Manam R. R.; Macherla V. R.; McArthur K.; Chao T.-H.; Palladino M. A.; Lloyd G. K.; Potts B. C.; Enna S. J.; Neuteboom S. T. C.; Hagenbuch B.: Proteasome Regulator Marizomib (NPI-0052) Exhibits Prolonged Inhibition, Attenuated Efflux, and Greater Cytotoxicity than Its Reversible Analogs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2011, 337(2), 479 – 486.

Obeng E. A.: Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood*. 2006, 107(12), 4907 – 4916.

Oda E.; Ohki R.; Murasawa H.; Nemoto J.; Shibue T.; Yamashita T.; Tokino T.; Taniguchi T.; Tanaka N.: Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*. 2000, 288(5468), 1053 – 1058.

Orlowski R. Z.; Kuhn D. J.: Proteasome Inhibitors in Cancer Therapy: Lessons from the First Decade. *Clinical Cancer Research*. 2008,14(6), 1649-1657.

Orlowski R. Z.; Stinchcombe T. E.; Mitchell B. S.; Shea T. C.; Baldwin A. S.; Stahl S.; Adams J.; Esseltine D.-L.; Elliont P. J.; Pien Ch. S.; Guerciolini R.; Anderson J. K.; Depcik-Smith N. D.; Bhagat R.; Lehman M. J.; Novick S. C.; O'Connor O. A.; Soignet S. L.: Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies. *Journal of Clinical Oncology*. 2002, 20(22), 4420 – 4427.

Ou Y.; Xu Y.; Gore L.; Harvey R. D.; Mita A.; Papadopoulos K. P.; Wang Z.; Cutler R. E., Jr.; Pinchasik D. E.; Tsimberidou A. M.: Physiologically-based pharmacokinetic modelling to predict oprozomib CYP3A drug–drug interaction potential in patients with advanced malignancies. *British Journal of Clinical /Pharmacology*. 2019, 85(3), 530 – 539.

Ouyang H.; Ali Y. O.; Revichandran M.; Dong A.; Qiu W.; Mackenzie F.; Dhe-Paganon S.; Arrowsmith C. H.; Zhai R. G.: Protein Aggregates Are Recruited to Aggresome by

Histone Deacetylase 6 via Unanchored Ubiquitin C Termini. *Journal of Biological Chemistry*. 2011, 287(4), 2317 – 2327.

Park J. E.; Miller Z.; Jun Y.; Lee W.; Kim K. B.: Next-generation proteasome inhibitors for cancer therapy. *Translational Research*. 2018, 198, 1 – 16.

Perel G.; Bliss J.; Thomas C. M.: Carfilzomib (Kyprolis). A Novel Proteasome Inhibitor for Relapsed And/or Refractory Multiple Myeloma. *Oncology Special Report*. 2016, 41(5), 303 – 307.

Petruzzelli M.; Wagner E. F.: Mechanisms of metabolic dysfunction in cancer-associated cachexia. *Genes & Development*. 2016, 30, 489 – 501.

Pistritto G.; Trisciuglio D.; Ceci C.; Garufi A.; D’Orazi G.: Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*. 2016, 8(4), 603 – 619.

Potts B. C.; Albitar M. X.; Anderson K. C.; Baritaki S.; Berkers C.; Bonavida B.; Chandra J.; Chauhan D.; Cusack Jr. J. C.; Fenical W.; Ghobrial I. M.; Groll M.; Jensen P. R.; Lam K. S.; Lloyd G. K.; McBride W.; McConkey D. J.; Miller C. P.; Neuteboom S. T. C.; Oki Y.; Ova H.; Pajonk F.; Richardson P. G.; Roccaro A. M.; Sloss C. M.; Spear M. A.; Valashi E.; Younes A.; Palladino M. A.: Marizomib, a Proteasome Inhibitor for All Seasons: Preclinical Profile and a Framework for Clinical Trials. *Current Cancer Drug Targets*. 2011, 11(3), 254 – 284.

Prakash S.; Inobe T.; Hatch A. J.; Matouschek A.: Substrate selection by the proteasome during degradation of protein complexes. *Nature Chemical Biology*. 2009, 5(1), 29 – 36.

Prakash S.; Tian L.; Ratliff K. S.; Lehotzky R.E.; Matouschek A.: An unstructured initiation site is required for efficient proteasome-mediated degradation. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2004, 11(9), 830 – 837.

Qin J. Z.; Xin H.; Sitailo L. A.; Dening M. F.; Nickoloff B. J.: Enhanced Killing of Melanoma Cells by Simultaneously Targeting Mcl-1 and NOXA. *Cancer Research*. 2006, 66(19), 9636 – 9645.

Qin J. Z.; Ziffra J.; Stennett L.; Bodner B.; Bonish B. K.; Chaturvedi V.; Bennett F.; Pollock P. M.; Trent J. M.; Hendrix M. J.; Rizzo P.; Miele L.; Nickoloff B. J.: Proteasome Inhibitors Trigger NOXA-Mediated Apoptosis in Melanoma and Myeloma Cells. *Cancer Research*. 2005, 65(14), 6282 – 6293.

Rabut G.; Peter M.: Function and regulation of protein neddylation. ‘Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects’ Review Series. *European Molecular Biology Organization Reports*. 2008, 9(10), 969 – 976.

Rajan A. M.; Kumar S.: New investigational drugs with single-agent activity in multiple myeloma. *Blood Cancer Journal*. 2016, 6(7), 1 – 10.

Ramirez K. G.: Ixazomib: An Oral Proteasome Inhibitor for the Treatment of Multiple Myeloma. *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology*. 2017, 8(4), 401 – 405.

Raninga P. V.; Lee A.; Sinha D.; Dong L.-F.; Datta K. K.; Lu X.; de Croft P. K.; Dutt M.; Hill M.; Pouliot N.; Gowda H.; Kalimutho M.; Neuzil J.; Khanna K. K.: Marizomib suppresses triple-negative breast cancer via proteasome and oxidative phosphorylation inhibition. *Theranostics*. 2020, 10(12), 5259 – 5275.

Rape M.; Reddy S. K.; Kirschner M. W.: The Processivity of Multiubiquitination by the APC Determines the Order of Substrate Degradation. *Cell*. 2006, 124(1), 89 – 103.

Richardson P. G.; Barlogie B.; Berenson J.; Singhal S.; Jagannath S.; Irwin D.; Rajkumar S. V.; Srkalovic G.; Alsina M.; Alexanian R.; Siegel D.; Orłowski R. Z.; Kuter D.; Limentani S. A.; Lee S.; Hideshima T.; Esseltine D.; Kauffman M.; Adams J.; Schenkein M. D.; Anderson K. C.: A Phase 2 Study of Bortezomib in Relapsed, Refractory Myeloma. *The New England Journal of Medicine*. 2003, 348, 2609 – 2617.

Richardson P. G.; Baz R.; Wang M.; Jakubowiak A. J.; Laubach J. P.; Harvey R. D.; Talpaz M.; Berg D.; Liu G.; Yu J.; Gupta N.; Di Bacco A.; Hui A.-M.; Lonial S.: Phase 1 study of twice-weekly ixazomib, an oral proteasome inhibitor, in relapsed/refractory multiple myeloma patients. *Blood*. 2014, 124(7), 1038 – 1046.

Richardson P. G.; Hideshima T.; Anderson K.C.: Bortezomib (PS-341): A Novel, First-in-Class Proteasome Inhibitor for the Treatment of Multiple Myeloma and Other Cancers. *Cancer Control*. 2003, 10(5), 361 – 369.

Richardson P. G.; Kumar S.; Laubach J. P.; Paba-Prada C.; Gupta N.; Berg D.; van de Velde H.; Moreau P.: New developments in the management of relapsed/refractory multiple myeloma – the role of ixazomib. *Journal of Blood Medicine*. 2017, 8, 107 – 121.

Richardson P. G.; Zimmerman T. M.; Hofmeister C. C.; Talpaz M.; Chanan-Khan A. A.; Kaufman J. L.; Laubach J. P.; Chauhan D.; Jakubowiak A. J.; Reich S.; Trikha M.; Anderson K. C.: Phase 1 study of marizomib in relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: NPI-0052-101 Part 1. *Blood*. 2016, 127(22), 2693 – 2700.

Richardson P. G.; Zweegman S.; O'Donnell E. K.; Laubach J. P.; Raje N.; Voorhees P.; Ferrari R. H.; Skacel T.; Kumar S. K.; Lonial S.: Ixazomib for the treatment of multiple myeloma. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2018, 19(17), 1949 – 1968.

Roeten M.S. F.; Cloos J.; Jansen G.: Positioning of proteasome inhibitors in therapy of solid malignancies. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2018, 81(2), 227 – 243.

Roy P.; Sarkar U. A.; Basak S.: The NF- κ B Activating Pathways in Multiple Myeloma. *Biomedicines*. 2018, 6(2), 59.

Sanberg T.; Rosenholm J.; Hotokka M.: The molecular structure of disulfiram and its complexation with silica. A quantum chemical study. *Journal of Molecular Structure*. 2008, 861(1-3), 57 – 61.

Shah J. J.; Jakubowiak A. J.; O'Connor O. A.; Orłowski R. Z.; Harvey D.; Smith M. R.; Lebovic D.; Diefenbach C.; Kelly K.; Hua Z.; Berger A. J.; Mulligan G.; Faessel H.;

Tirrell S.; Dezube B. J.; Lonial S.: Phase I Study of the Novel Investigational NEDD8-activating Enzyme Inhibitor Pevonedistat (MLN4924) in Patients with Relapsed/refractory Multiple Myeloma or Lymphoma. *Clinical Cancer Research*. 2016, 22(1), 34 – 43.

Shah J.; Usmani S.; Stadtmauer E. A.; Rifkin R. M.; Berenson J. R.; Berdeja J. G.; Lyons R. M.; Klippel Z.; Chang Y.-L.; Niesvizky R.: Oprozomib, pomalidomide, and Dexamethasone in Patients With Relapsed and/or Refractory Multiple Myeloma. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*. 2019, 19(9), 570 – 578.

Shaid S.; Brandts C. H.; Serve H.; Dikic I.: Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death and Differentiation*. 2013, 20(1), 21 – 30.

Sherman D. J.; Li J.: Proteasome Inhibitors: Harnessing Proteostasis to Combat Disease. *Molecules*. 2020, 25(3), 1 – 30.

Sherr C. J.; Roberts J. M.: CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Development*. 1999, 13(12), 1501 – 1512.

Shibue T.; Takeda K.; Oda E.; Tanaka H.; Murasawa H.; Takaoka A.; Morishita Y.; Akira S.; Taniguchi T.; Tanaka N.: Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response. *Genes & Development*. 2003, 17(18), 2233 – 2238.

Schwartz A. L.; Ciechanover A.: Targeting proteins for destruction by the ubiquitin system: implications for human pathobiology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2009, 49, 73 – 96.

Schwartz R.; Davidson T.: Pharmacology, pharmacokinetics, and practical applications of bortezomib. *Oncology (Wiliston Park)*. 2004, 18(14), 14 – 21.

Schwarzkopf M.; Coletti D.; Sassoon D.; Marazzi G.: Muscle cachexia is regulated by a p53–PW1/Peg3-dependent pathway. *Genes & Development*. 2006, 20, 3440 – 3452.

Siegel R. M.; Lenardo M. J.: Apoptosis signaling pathways. *Current Protocols in Immunology*. 2002, 44(1), 1 – 10.

Skořepová E.; Čerňa I.; Vlasáková R.; Zvoniček V.; Tkadlecová M.; Dušek M.: True molecular structure of ixazomib citrate. *Journal of Molecular Structure*. 2017, 1148, 22 – 27.

Song Y.; Ray A.; Li S.; Das D. S.; Tai Y. T.; Carrasco R. D.; Chauhan D.; Anderson K. C.: Targeting proteasome ubiquitin receptor Rpn13 in multiple myeloma. *Leukemia*. 2016, 30(9), 1877 – 1886.

Soucy T. A.; Smith P. G.; Milhollen M. A.; Berger A. J.; Gavin J. M.; Adhikari S.; Brownell J. E.; Burke K. E.; Cardin D. P.; Critchley S.; Cullis C. A.; Doucette A.; Garnsey J. J.; Gaulin J. L.; Gershman R. E.; Lublinsky A. R.; McDonald A.; Mizutani H.; Narayanan U.; Olhava E. J.; Peluso S.; Rezaei M.; Sintchak M. D.; Talreja T.; Thomas M. P.; Traore T.; Vyskocil S.; Weatherhead G. S.; Yu J.; Zhang J.; Dick L. R.; Claiborne Ch. F.; Rolfe M.; Bolen J. B.; Langston S. P.: An inhibitor of NEDD8-activating enzymes as a new approach to treat cancer. *Nature*. 2009, 458, 732 – 736.

Stewart, D. J.; Verma, S.; Maroun, J. A.: Phase I Study of the Combination of Disulfiram with Cisplatin. *American Journal of Clinical Oncology*. 1987, 10(6), 517 – 519.

Stintzing S.; Lenz H. J.: Molecular Pathways: Turning Proteasomal Protein Degradation into a Unique Treatment Approach. *Clinical Cancer Research*. 2014, 20(12), 3064 – 3070.

Swords R. T.; Coutre S.; Maris M. B.; Zeidner J. F.; Foran J. M.; Cruz J.; Erba H. P.; Berdeja J. G.; Tam W.; Vardhanabhuti S.; Pawlikowska-Dobler I.; Faessel H. M.; Dash A. B.; Sedarati F.; Dezube B. J.; Faller D. V. Savona M. R.: Pevonedistat, a first-in-class NEDD8-activating enzyme inhibitor, combined with azacitidine in patients with AML. *Blood*. 2018, 131(13), 1415 – 1424.

Swords R. T.; Erba H. P.; DeAngelo D. J.; Bixby D. L.; Altman J. K.; Maris M.; Hua Z.; Blakemore S. J.; Faessel H.; Sedarati F.; Dezube B. J.; Giles F. J.; Medeiros B. C.: Pevonedistat (MLN4924), a First-in-Class NEDD8-activating enzyme inhibitor, in patients with acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndromes: a phase 1 study. *British Journal of Haematology*. 2015, 169, 534 – 543.

Tabernero J.; Dirix L.; Schöffski P.; Cervantes A.; Lopez-Martin J. A.; Capdevila J.; van Beijsterveldt L.; Platero S.; Hall B.; Youan Z.; Knoblauch R.; Zhuang S. H.: A Phase I First-in-Human Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of Serdemetan in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*. 2011, 17(19), 6313 – 6321.

Tabruyn S. P.; Griffioen A. W.: NF- κ B: a new player in angiostatic therapy. *Angiogenesis*. 2008, 11(1), 101 – 106.

Tariman J.; Lemoine C.: Bortezomib. *Clinical Journal of Oncology Nursing*. 2003, 7(6), 687 – 689.

Teicher B. A.; Tomaszewski J. E.: Proteasome inhibitors. *Biochemical Pharmacology*. 2015, 96(1), 1 – 9.

Teoh P. J.; Chng W. J.: p53 Abnormalities and Potential Therapeutic Targeting in Multiple Myeloma. *BioMed Research International*. 2014, 1 – 9.

Thibaudeau T. A.; Smith D. M.: A Practical Review of Proteasome Pharmacology. *Pharmacological Reviews*. 2019, 71(2), 170 – 197.

Trader D. J.; Simanski S.; Kodadek T.: A Reversible and Highly Selective Inhibitor of the Proteasomal Ubiquitin Receptor Rpn13 Is Toxic to Multiple Myeloma Cells. *Journal of the American Chemical Society*. 2015, 137(19), 6312 – 6319.

Traenckner E. B.; Wilk S.; Baeuerle P. A.: A proteasome inhibitor prevents activation of NF-kappa B and stabilizes a newly phosphorylated form of I kappa B-alpha that is still bound to NF-kappa B. *The EMBO Journal*. 1994, 13(22), 5433 – 5441.

Verma R.; Peters N.R.; D’Onofrio M.; Tochtrop G.P.; Sakamoto, K.M.; Varadan R.; Zhang M.; Cono P.; Fushman D.; Deshaies R.J.; King R. W.: Ubistatins inhibit proteasome-dependent degradation by binding the ubiquitin chain. *Science*. 2004, 306(5693), 117 – 120.

Wang H.; Ma X.; Ren S.; Buolamwini J. K.; Yan Ch.: A Small-molecule Inhibitor of MDMX Activates p53 and Induces Apoptosis. *Molecular Cancer Therapies*. 2011, 10(1), 69 – 79.

Wang X.; Cimermancic P.; Yu C. et al.: Molecular Details Underlying Dynamic Structures and Regulation of the Human 26S Proteasome. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2017, 16(5), 840 – 854.

Wang Z.; Fang Y.; Teague J.; Wong H.; Morisseau Ch.; Hammock B. D.; Rock D. A.; Wang Z.: In Vitro Metabolism of Oprozomib, an Oral Proteasome Inhibitor: Role of Epoxide Hydrolases and Cytochrome P450s. *Drug Metabolism and Disposition*. 2017, 45(7), 712 – 720.

Weathington N. M.; Mallampalli R. K.: Emerging therapies targeting the ubiquitin-proteasome system in cancer. *The Journal of Clinical Investigation*. 2014, 124(1), 6 – 12.

Wehmer M.; Sakata E.: Recent advances in the structural biology of the 26S proteasome. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2016, 79, 437 – 442.

Wei D.; Li H.; Yu J.; Sebolt J. T.; Zhao L.; Lawrence T. S.; Smith P. G.; Morgan M. A.; Sun Y.: Radiosensitization of human pancreatic cancer cells by MLN4924, an investigational NEDD8-activating enzyme inhibitor. *Cancer Research*. 2012, 72(1), 282 – 293.

Wolenski F. S.; Fisher C. D.; Sano T.; Wyllie S. D.; Cicia L. A.; Gallacher M. J.; Baker R. A.; Kirby P. J.; Senn J. J.: The NAE inhibitor pevonedistat (MLN4924) synergizes with TNF- α to activate apoptosis. *Cell Death Discovevery*. 2015, 1, 1 – 9.

Xu B.; Deng Y.; Bi R.; Guo H.; Shu G.; Shah N. K.; Chang J.; Liu G.; Du Y.; Wei W.; Wang Ch.: A first-in-class inhibitor, MLN4924 (pevonedistat), induces cell-cycle arrest, senescence, and apoptosis in human renal cell carcinoma by suppressing UBE2M-dependent neddylation modification. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2018, 81(6), 1083 – 1093.

Xu X.; Zhou Q.; Feng X.; Dai Y.; Jiang Y.; Liu X.; Xing X.; Wang Y.; Ni Y.; Zheng Ch.: Disulfiram/copper markedly induced myeloma cell apoptosis through activation of JNK and intrinsic and extrinsic apoptosis pathways. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020, 126, 1 – 11.

You L.; Liu H.; Huang J.; Xie W.; Wei J.; Ye X.; Qian W.: The Novel Anticancer Agent JNJ-26854165 Is Active in Chronic Myeloid Leukemic Cells With Unmutated BCR/ABL and T315I Mutant BCR/ABL Through Promoting Proteosomal Degradation of BCR/ABL Proteins. *Oncotarget*. 2017, 8(5), 7777 – 7790.

Yu G.-Y.; Wang X.; Zheng S.-S.; Gao X.-M.; Jia Q.-A.; Zhu W.-W.; Lu L.; Jia H.-L.; Chen J.-H.; Dong Q.-Z.; Lu M.; Qin L.-X.: RA190, a Proteasome Subunit ADRM1 Inhibitor, Suppresses Intrahepatic Cholangiocarcinoma by Inducing NF-kB Mediated Cell Apoptosis. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018, 47, 1152 – 1166.

Zanwar S.; Abeykoon J. P.; Kapoor P.: Ixazomib: a novel drug for multiple myeloma. *Expert Review of Hematology*. 2018, 11(10), 761 – 771.

Zientara-Rytter K.; Subramani S.: The Roles of Ubiquitin-Binding Protein Shuttles in the Degradative Fate of Ubiquitinated Proteins in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Cells*. 2019, 8(1), 1 – 32.

Zolota V. G.; Tzelepi V. N.; Leotsinidis M.; Zili P. E.; Panagopoulos N. D.; Dougenis D.; Tsamandas A.; Scopa C. D.: Histologic-Type Specific Role of Cell Cycle Regulators in Non-Small Cell Lung Carcinoma. *Journal of Surgical Research*. 2010, 164(2), 256 – 265.