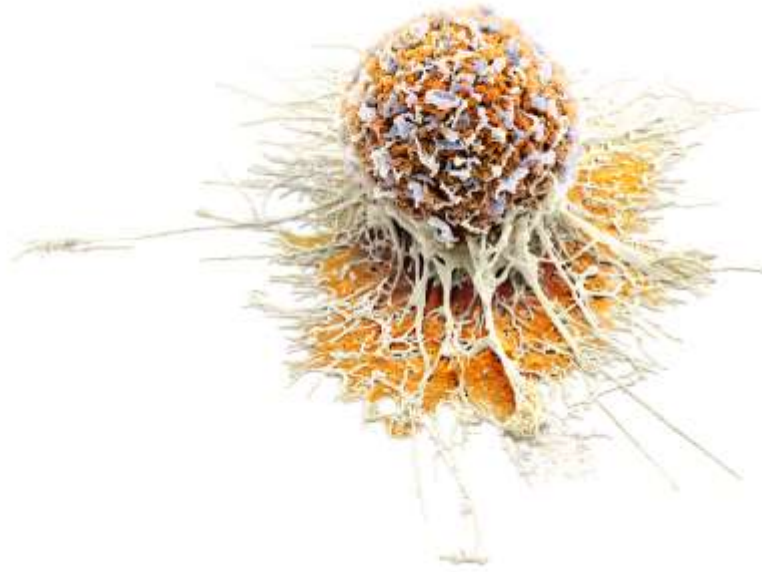


Cytostatika – mechanismus účinku, terapie a rezistence



Jiří Petrák
BIOCEV, 1. LF UK
jpetr@lf1.cuni.cz

Klasická Cytostatika

*genotoxické
látky
a
antimetaboly*

Účinek na
DNA

Účinek na mitotické
vřeténko

Účinek na
receptorech pro
steroidní
hormony

Poškození DNA nebo inhibice
syntézy

Kompetice

Snížení
tvorby
hormonů

Alkylace
s jiné
modifikace

Tvorba
volných
radikálů

Interkalace
a inhibice
topoisomeráz

Antimetaboly
a
hydroxyurea

Poškození existující DNA
(genotoxicita)

Poškození DNA při syntéze,
interference s ní a další efekty

Klasická Cytostatika

Účinek na
DNA

Účinek na mitotické
vřeténko

Účinek na
receptorech pro
steroidní
hormony

Poškození DNA nebo inhibice
syntézy

Kompetice

Snížení
tvorby
hormonů

Alkylace
s jiné
modifikace

Tvorba
volných
radikálů

Interkalace
a inhibice
topoisomeráz

Antimetaboly
a
hydroxyurea

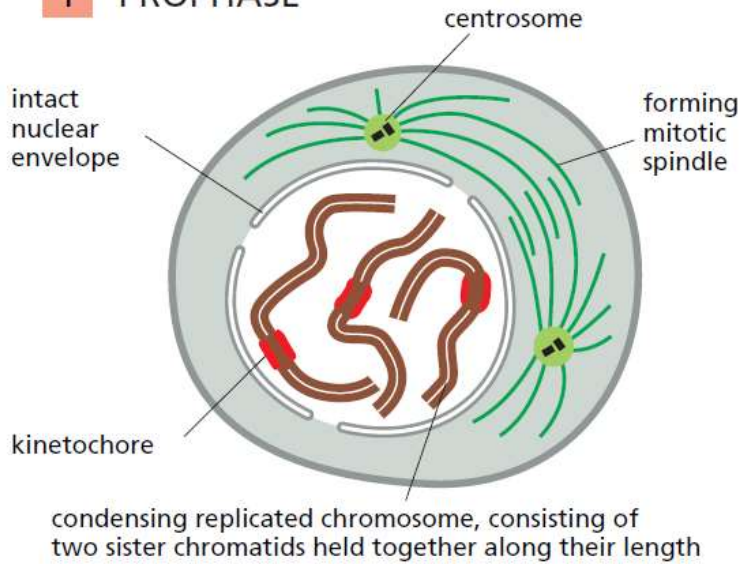
Antimitotika

Látky s účinkem na mitotické vřeténko

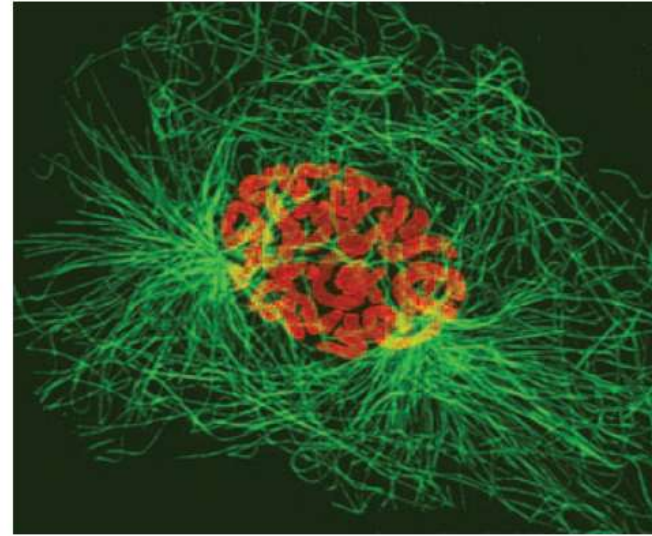
Inhibitory mikrotubulů dělicího vřeténka



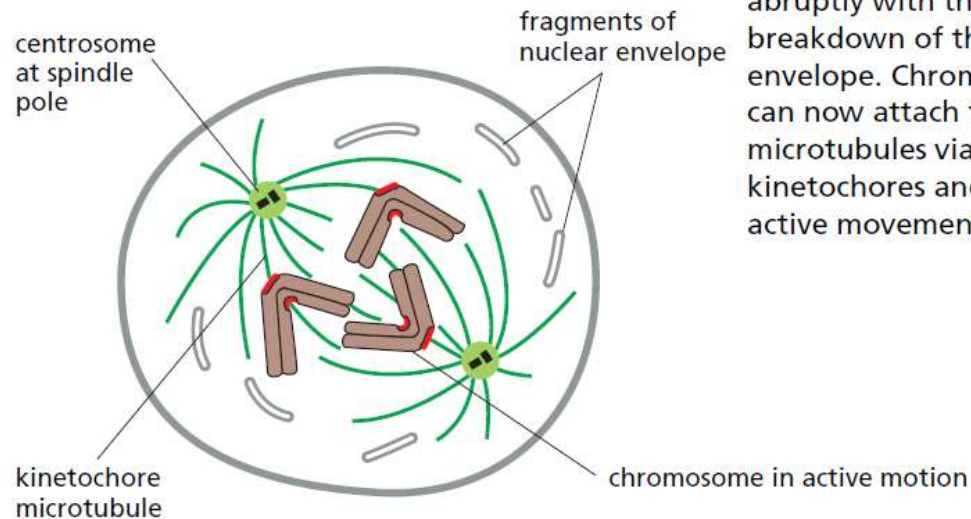
1 PROPHASE



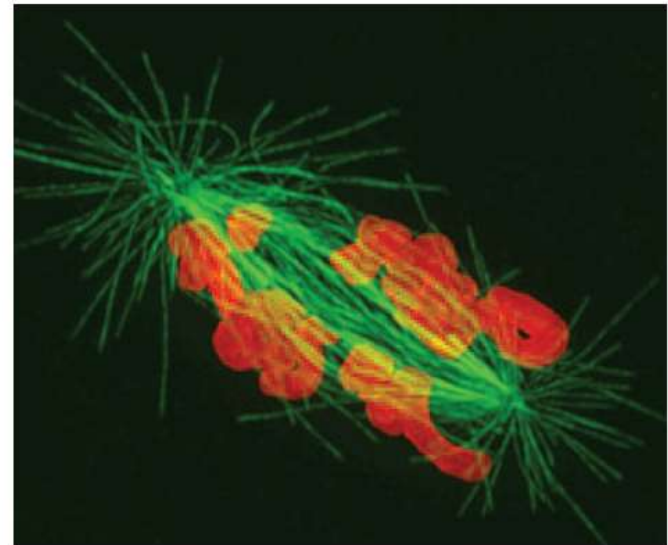
At **prophase**, the replicated chromosomes, each consisting of two closely associated sister chromatids, condense. Outside the nucleus, the mitotic spindle assembles between the two centrosomes, which have replicated and moved apart. For simplicity, only three chromosomes are shown. In diploid cells, there would be two copies of each chromosome present. In the photomicrograph, chromosomes are stained *orange* and microtubules are *green*.



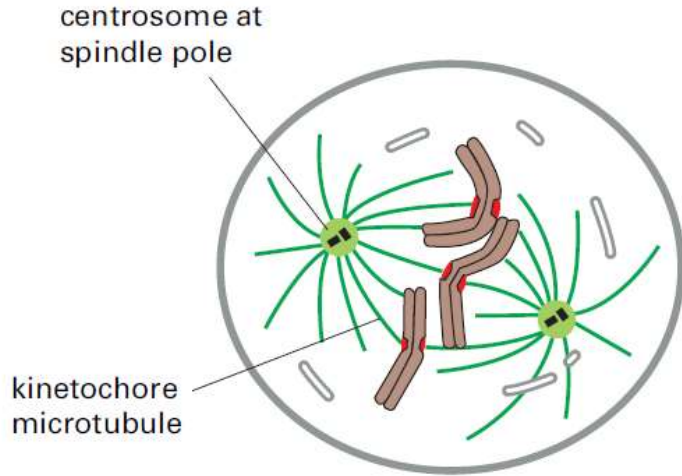
2 PROMETAPHASE



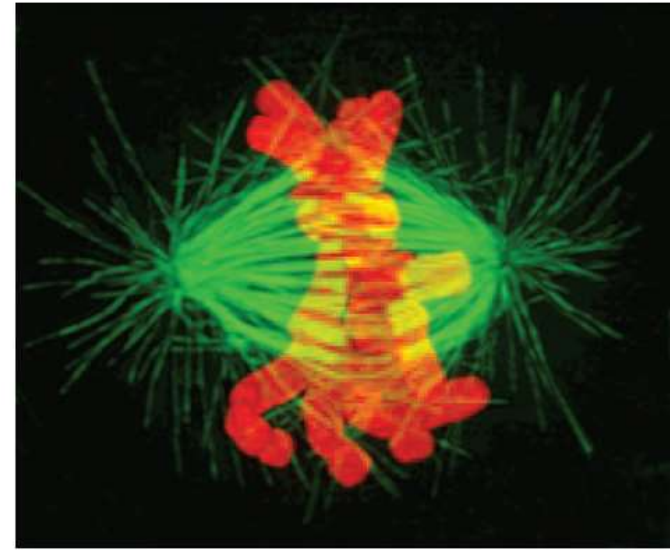
Prometaphase starts abruptly with the breakdown of the nuclear envelope. Chromosomes can now attach to spindle microtubules via their kinetochores and undergo active movement.



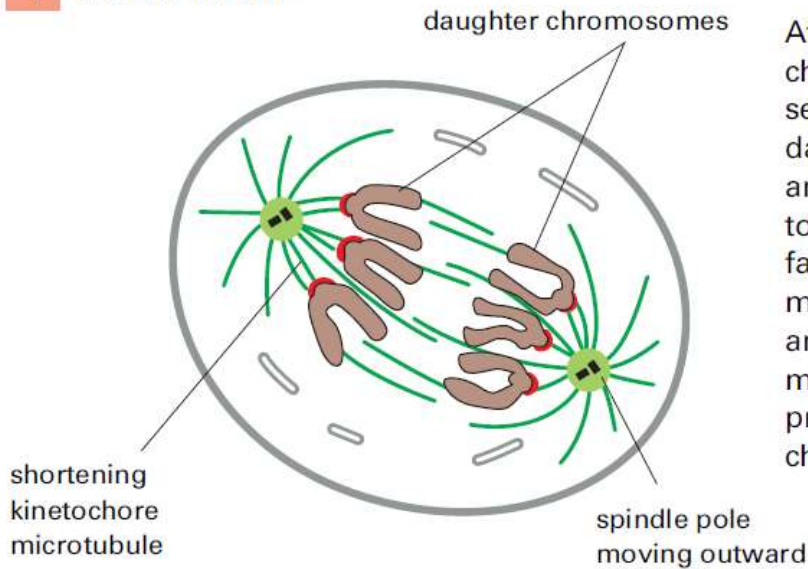
3 METAPHASE



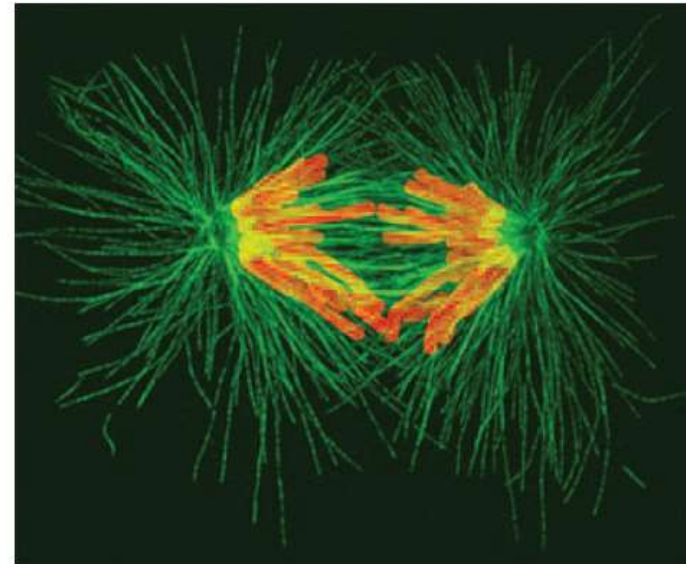
At **metaphase**, the chromosomes are aligned at the equator of the spindle, midway between the spindle poles. The kinetochore microtubules attach sister chromatids to opposite poles of the spindle.



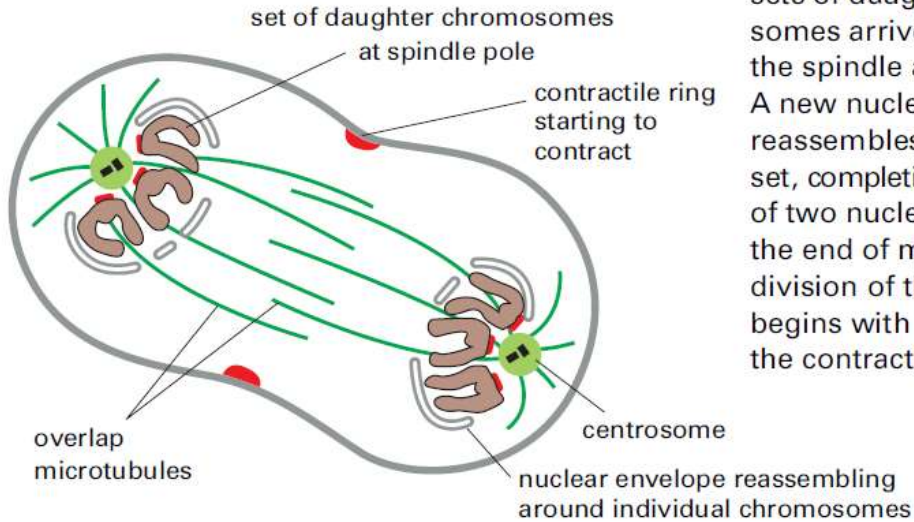
4 ANAPHASE



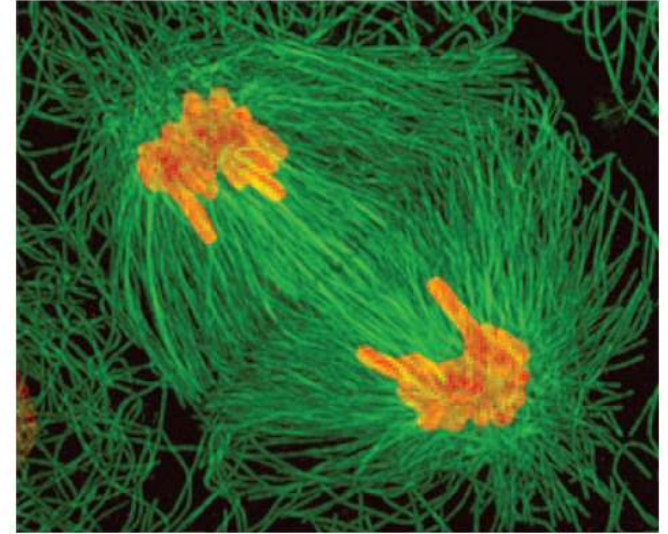
At **anaphase**, the sister chromatids synchronously separate to form two daughter chromosomes, and each is pulled slowly toward the spindle pole it faces. The kinetochore microtubules get shorter, and the spindle poles also move apart; both processes contribute to chromosome segregation.



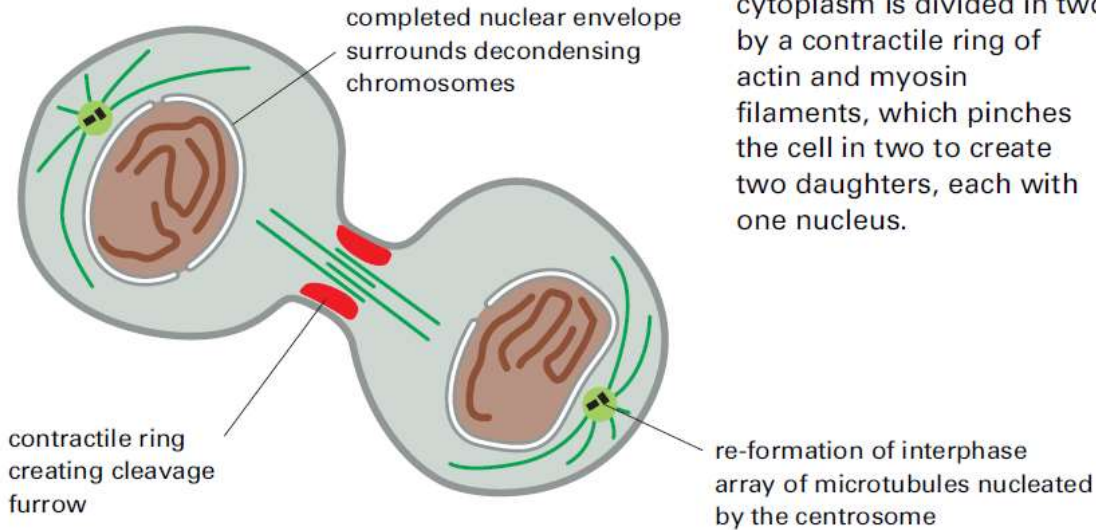
5 TELOPHASE



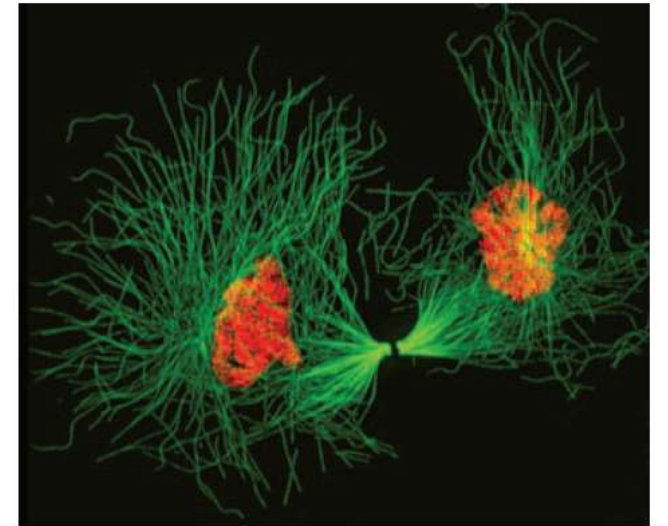
During **telophase**, the two sets of daughter chromosomes arrive at the poles of the spindle and decondense. A new nuclear envelope reassembles around each set, completing the formation of two nuclei and marking the end of mitosis. The division of the cytoplasm begins with contraction of the contractile ring.



6 CYTOKINESIS



During **cytokinesis**, the cytoplasm is divided in two by a contractile ring of actin and myosin filaments, which pinches the cell in two to create two daughters, each with one nucleus.



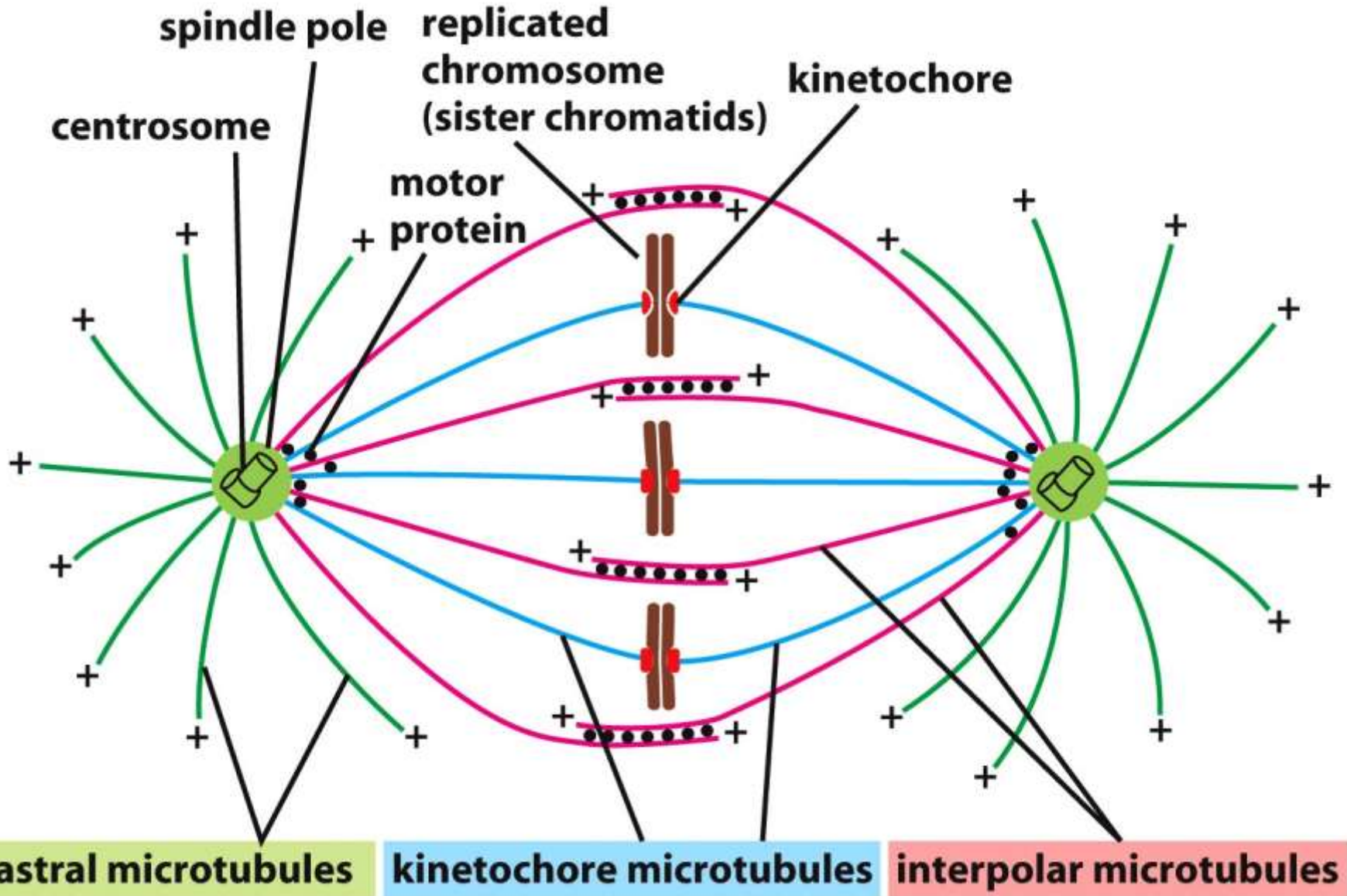


Figure 17-28 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

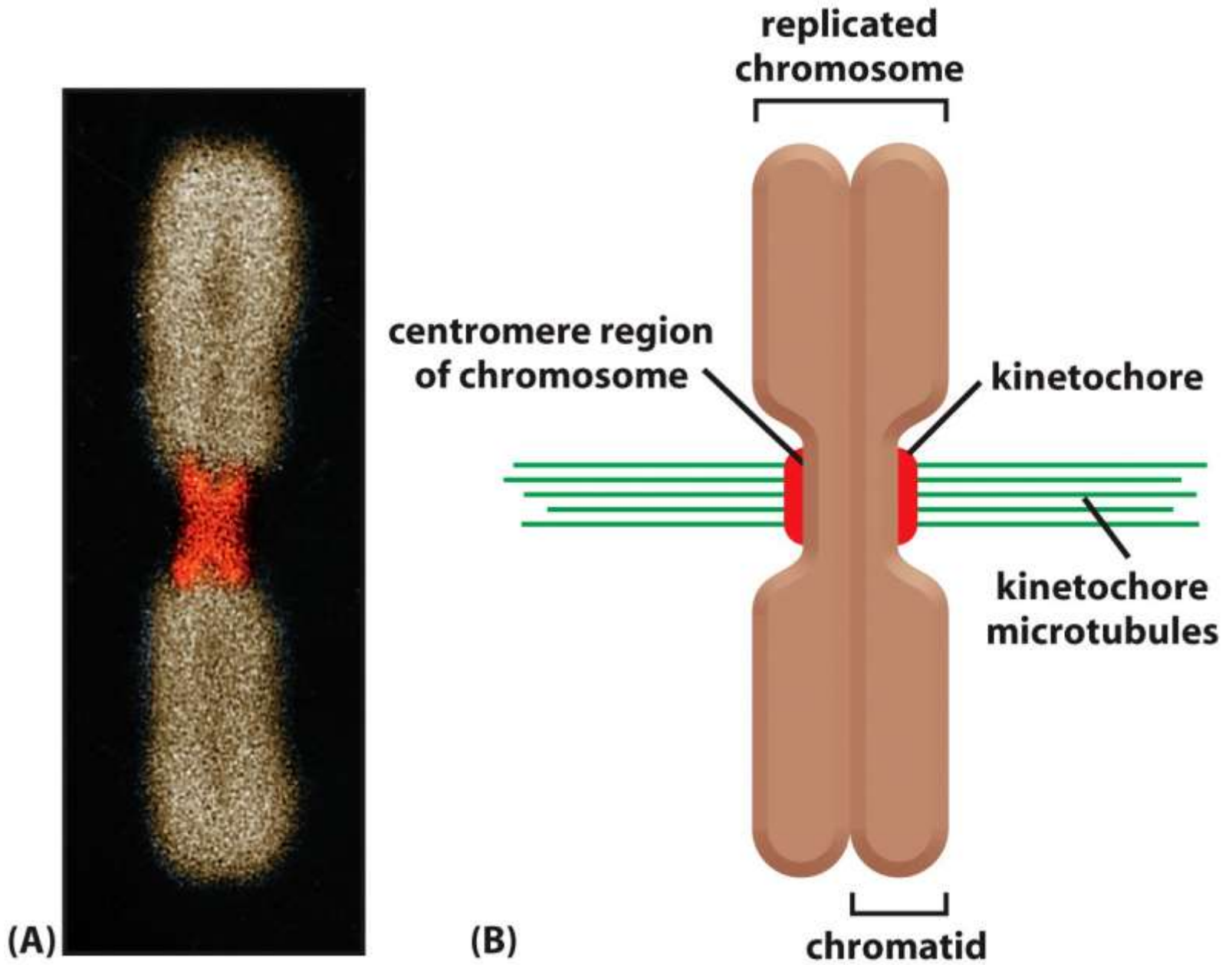
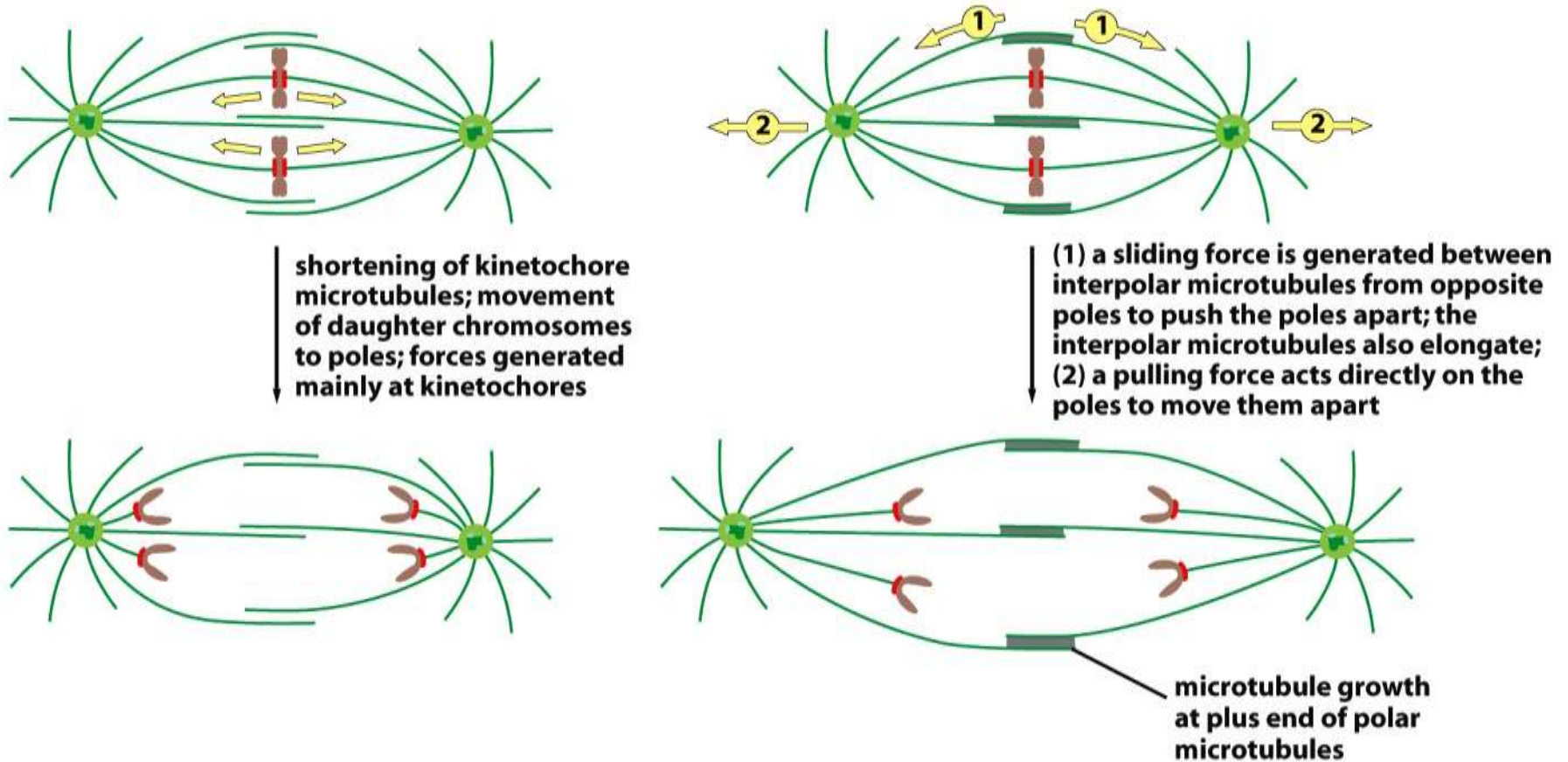


Figure 17-36a,b *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

Odlišná funkce kinetochorových a interpolárních mikrotubulů při anafázi



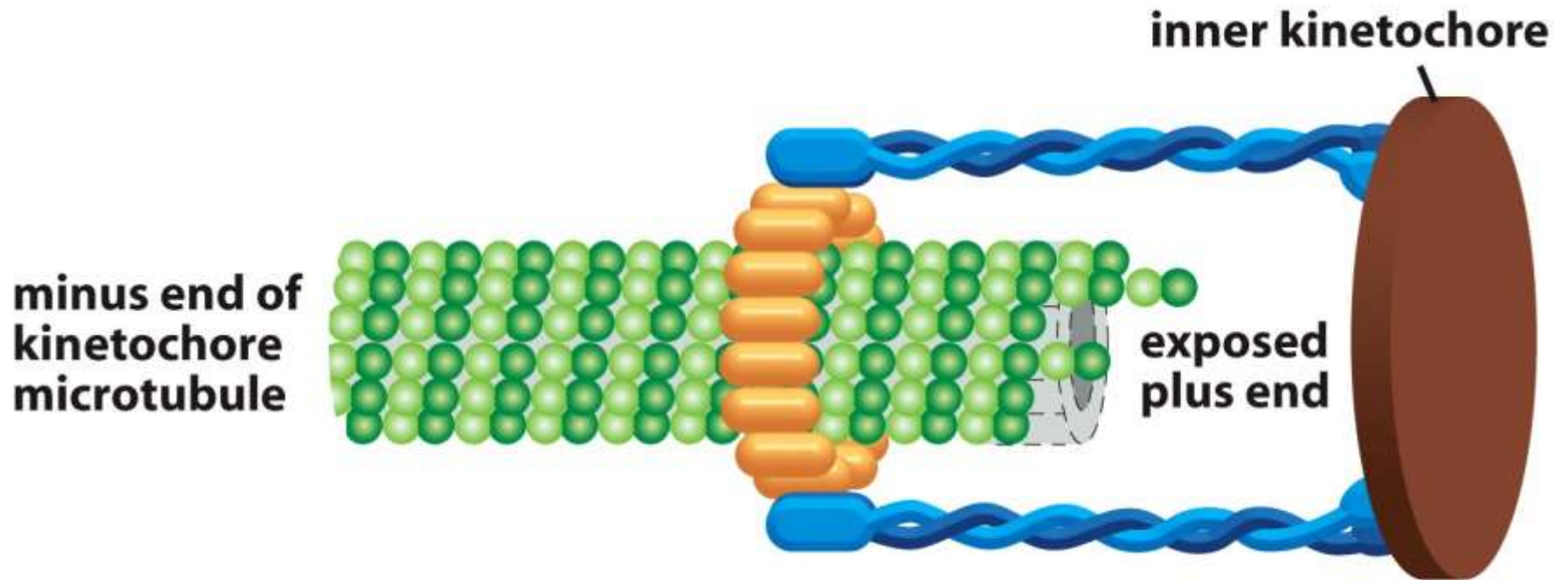


Figure 17-37 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

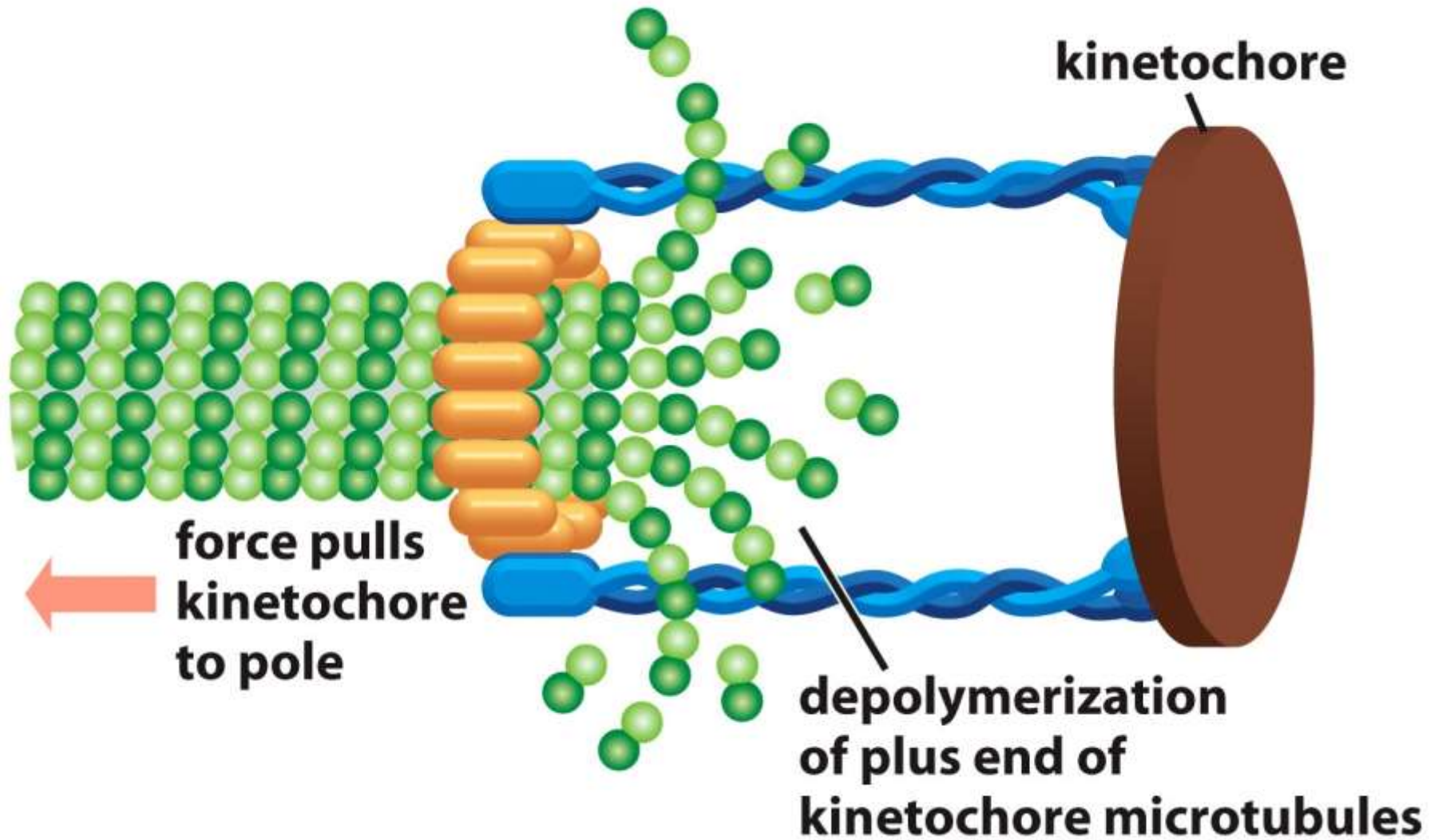


Figure 17-40 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

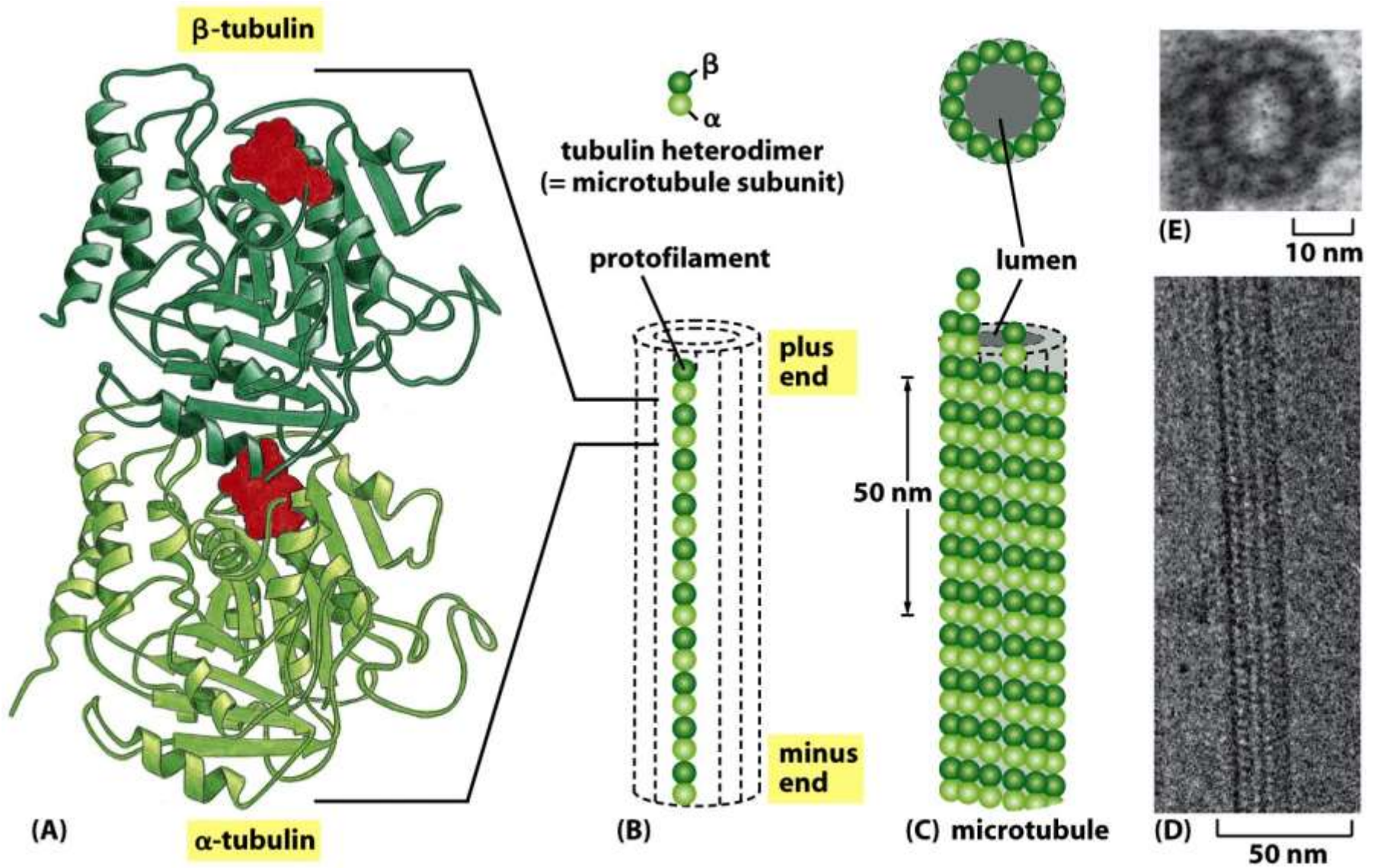
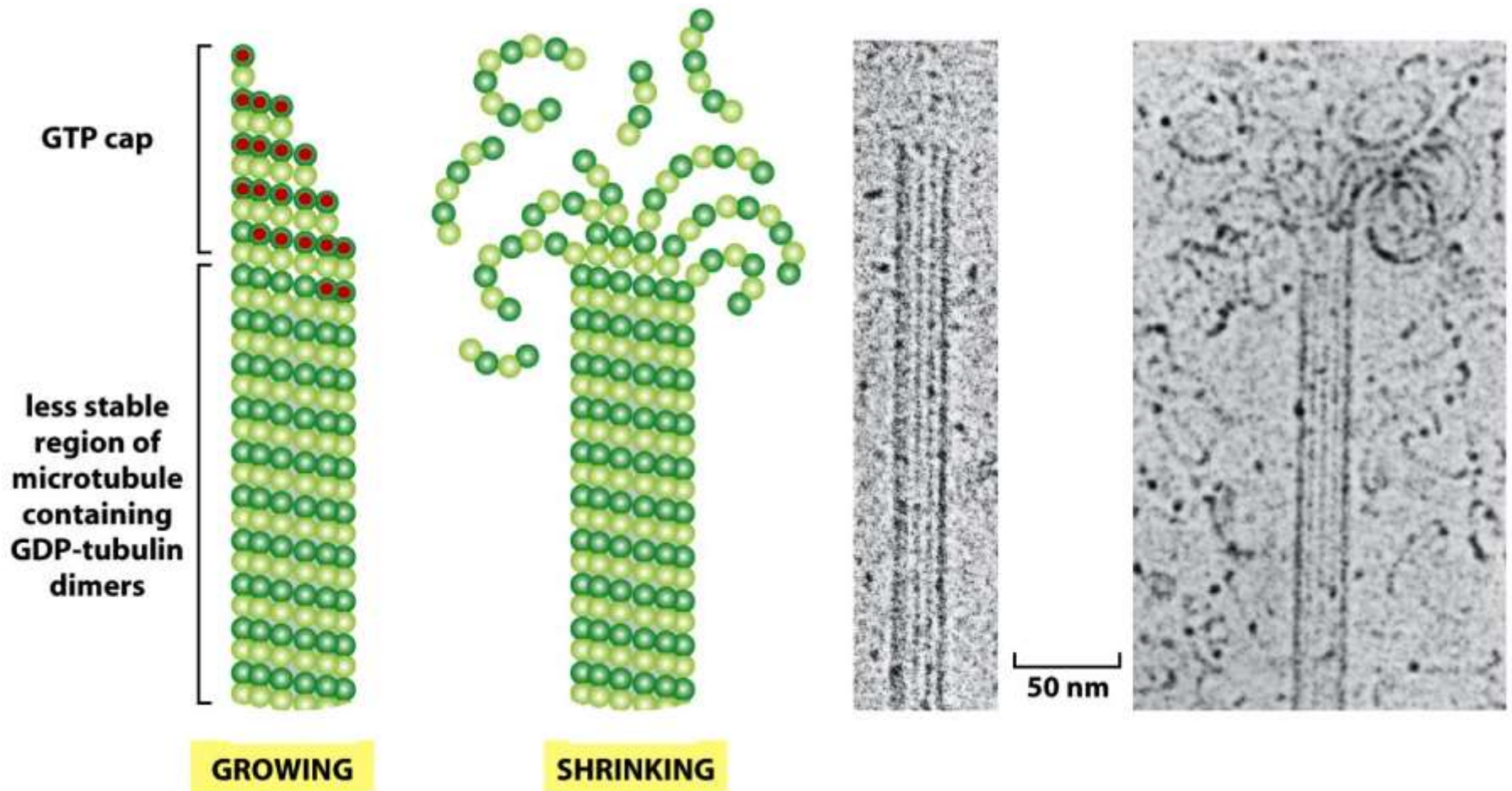
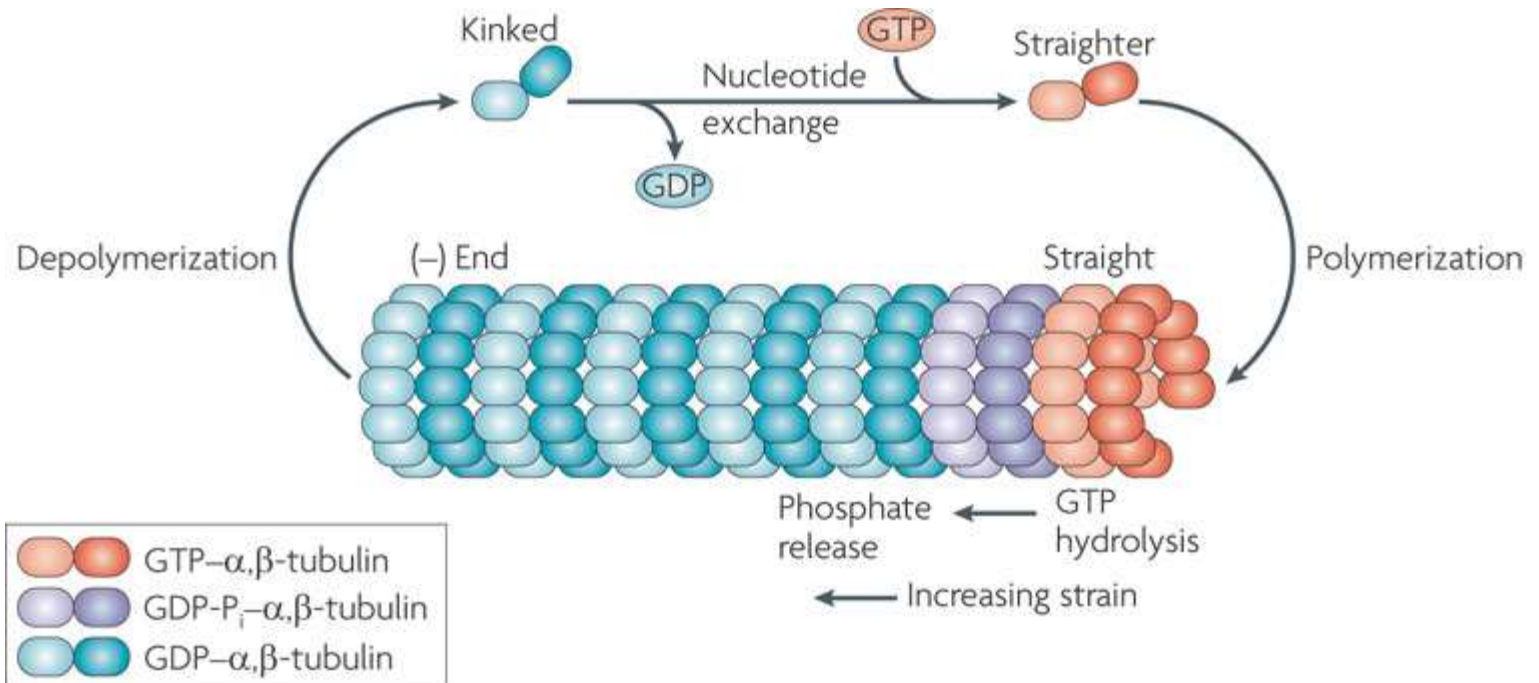


Figure 16-11 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

Dynamická instabilita mikrotubulů



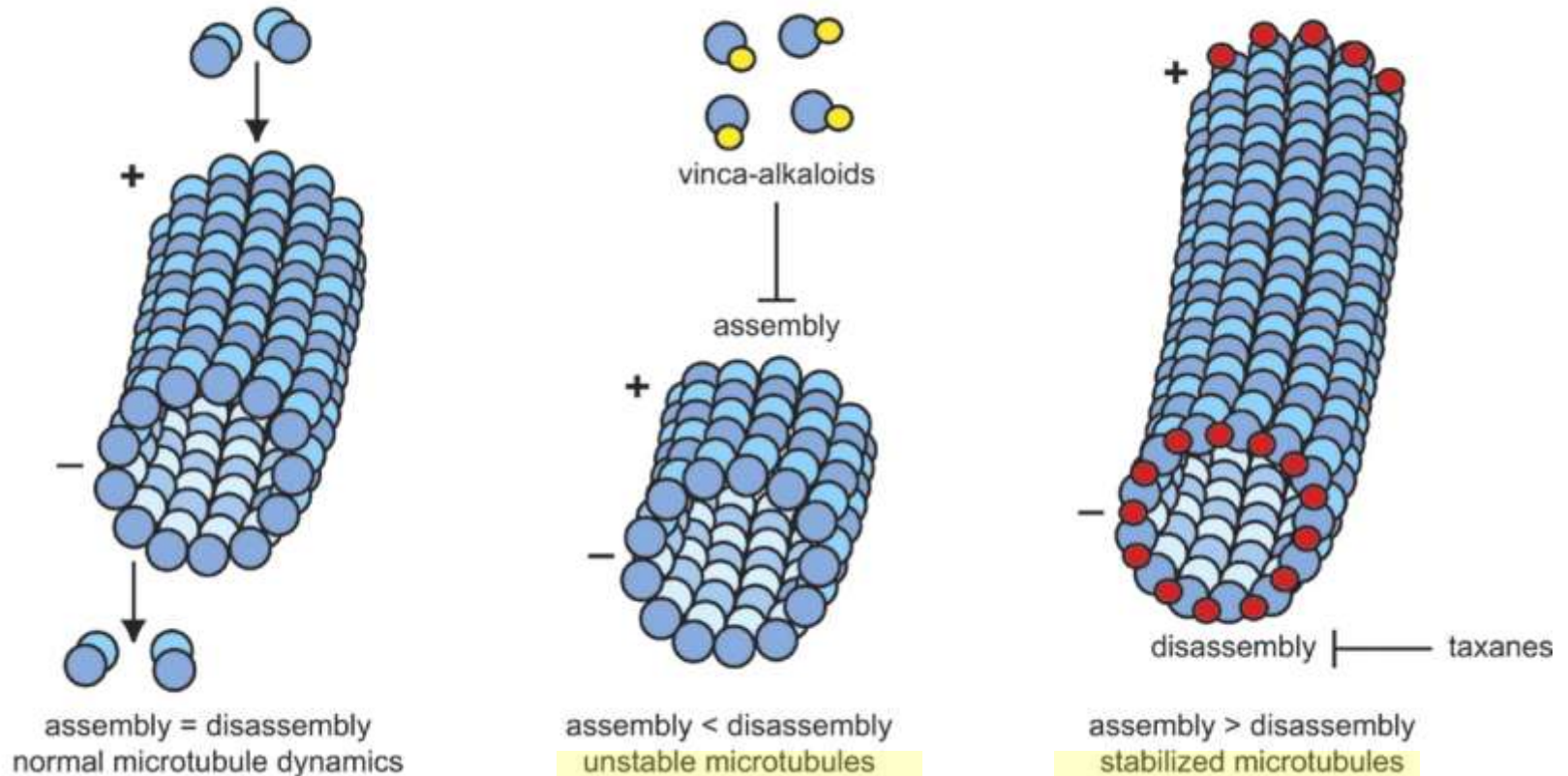
Dynamická instabilita mikrotubulů



Inhibitory mikrotubulů dělicího vřeténka:

Inhibitory polymerace (destabilizanty) – **vinca alkaloidy**

Inhibitory depolymerace (stabilizanty) – **taxany**



INHIBITORY POLYMERACE MT

Kolchicin (z ocúnu jesenního) – požíván již nejméně od 1 století., protizánětlivý, k „očistě“ a později k léčbě dny

Vinca alkaloidy

Vinca (Catharanthus) rosea (barvínek růžový)

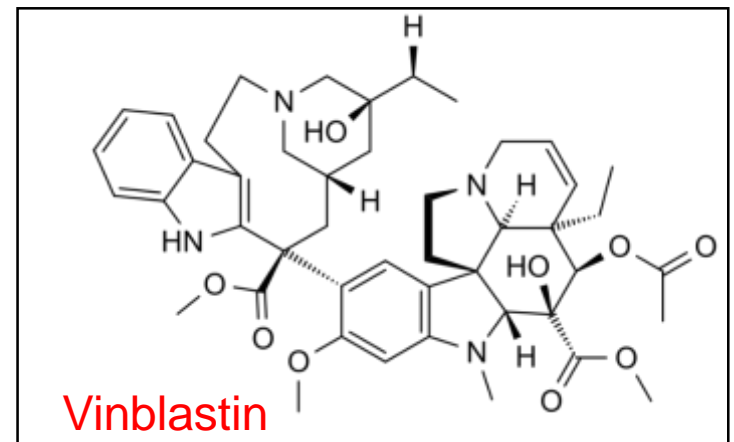
VINBLASTIN

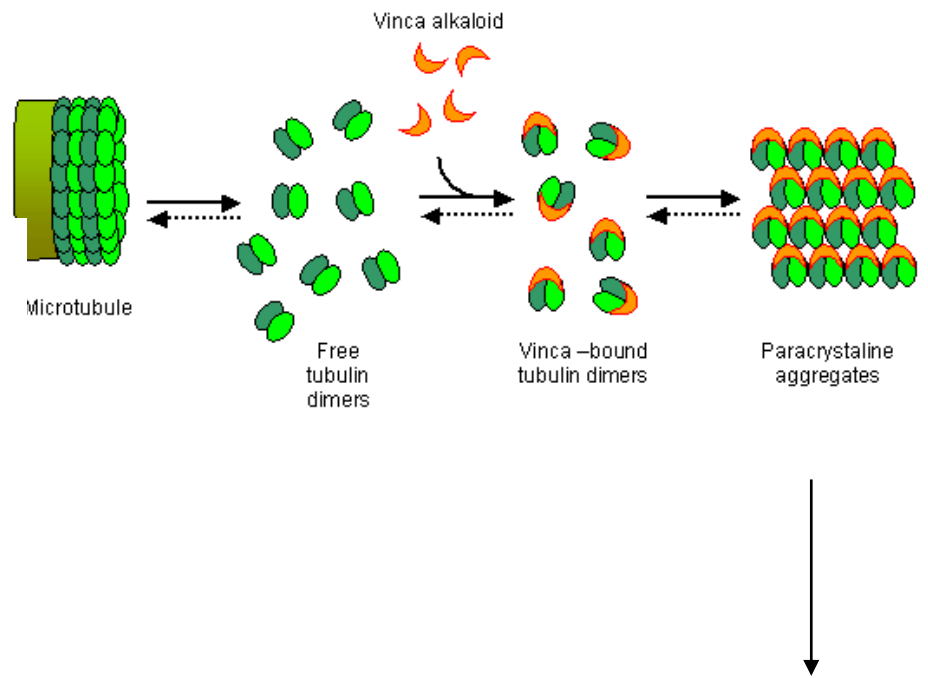
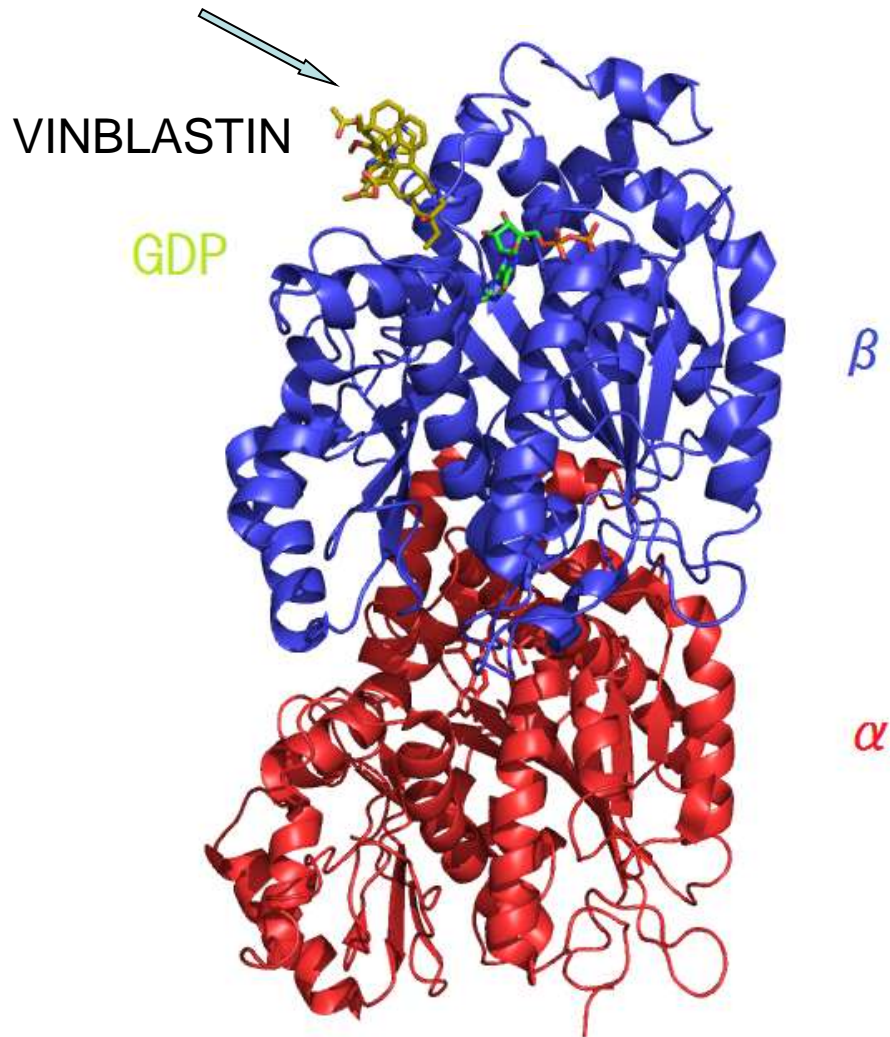
(Noble and Beer 1957) Izolován a testován pro předpokládaný antidiabetický efekt, králík zemřel na infekci (drasticky snížený počet bílých krvinek)

VINKRISTIN

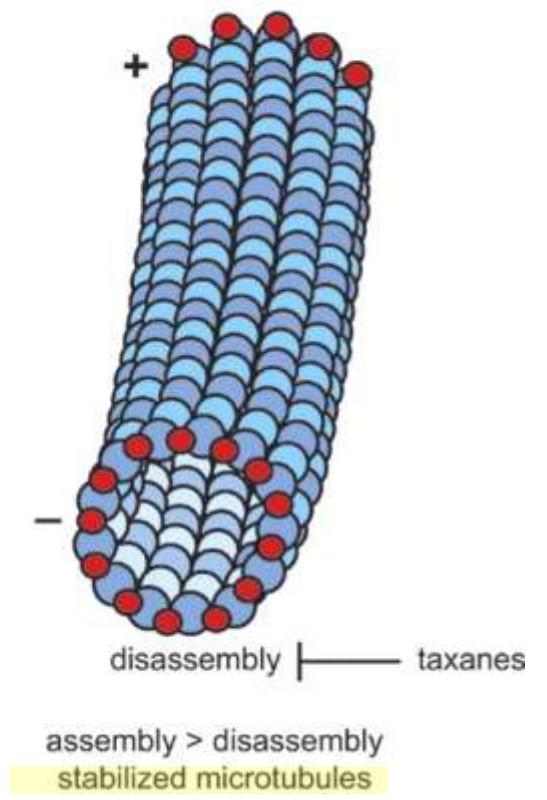
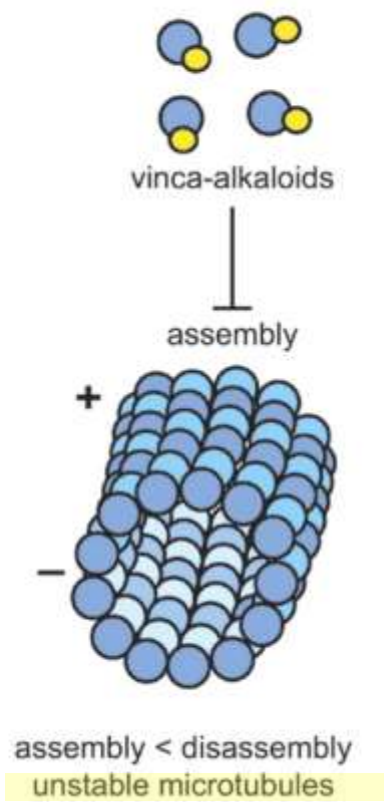
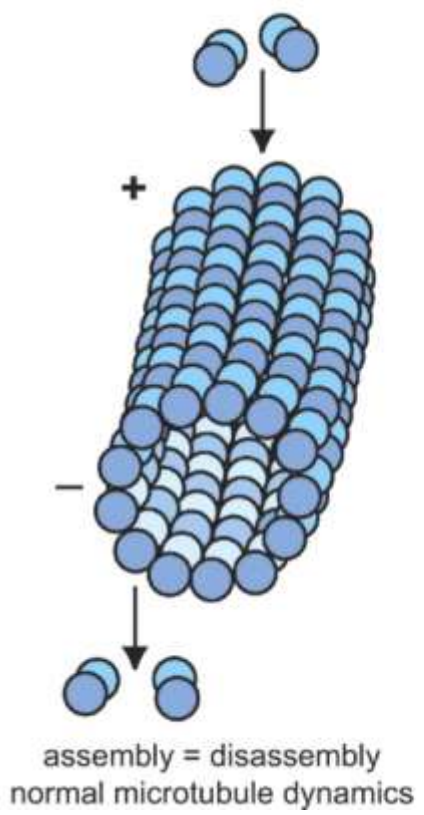
VINORELBIN (poosyntetický derivát)

NOKODAZOL (syntetický a nepříbuzný inhibitor)





Nedojde k anafázi,
nebo je v ní buňka
zastavena

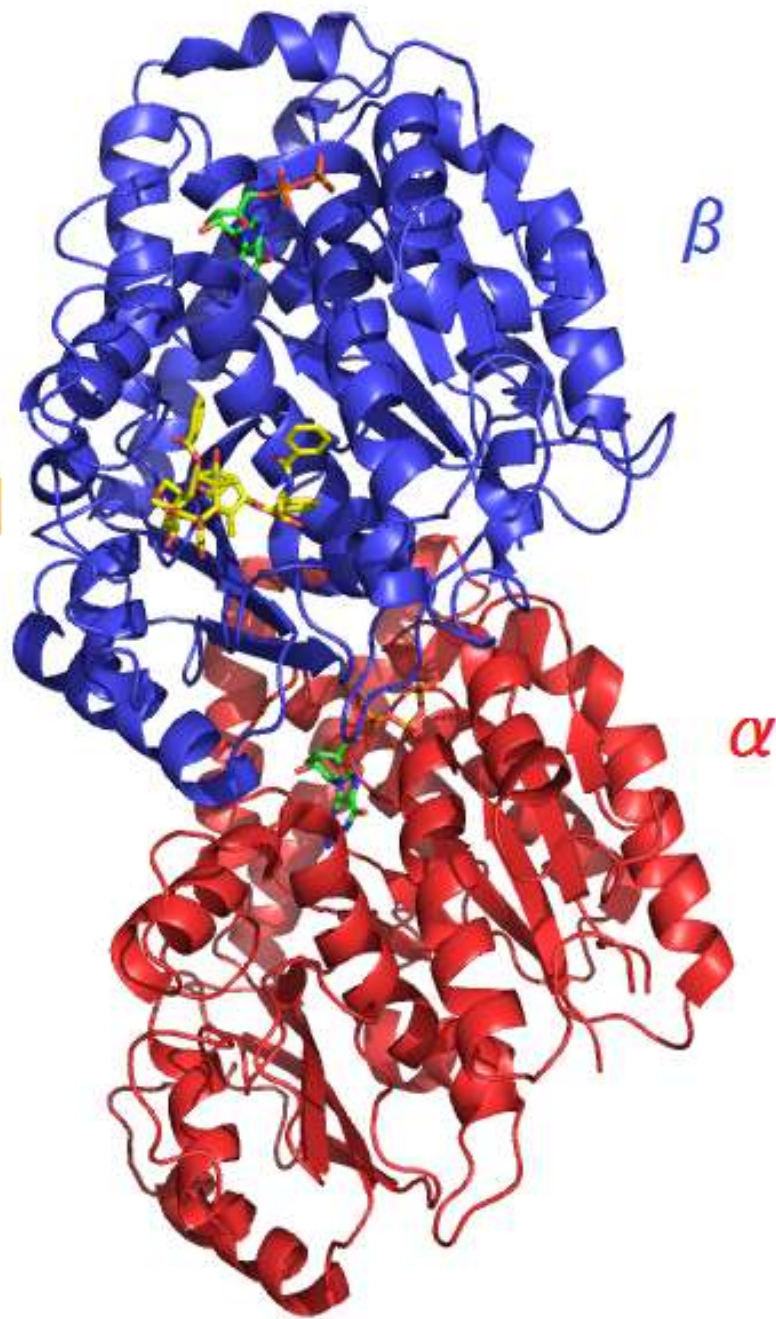


INHIBITORY DEPOLYMERACE MT (stabilizanty)

Taxany – PACLITAXEL a DOCETAXEL

- 1964 Cytotoxické účinky extraktů *Taxus brevifolia* (tis krátkolistý)
- 1968-71 Izolace a určení struktury účinné látky- taxolu
- 1979 Mechanismus účinku
- 1988 Výsledky prvních klinických studií (tisíce tun kůry T. B)

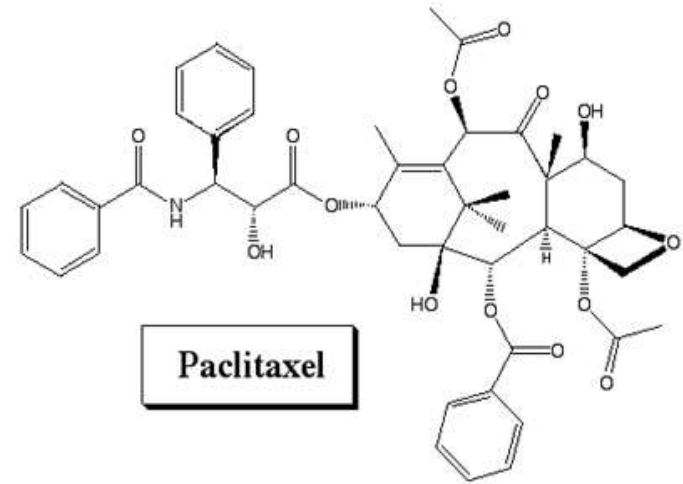
paclitaxel



Paclitaxel & Docetaxel



Tis krátkolistý *Taxus brevifolia* (kùra)

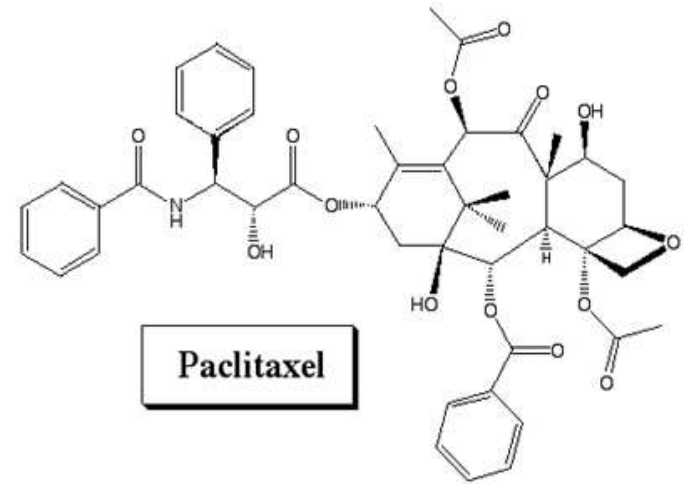


! Izolace taxolu z *Taxus brevifolia* pro léčbu karcinomu ovária a melanomů jen v USA by vyžadovala 360 000 stromů ročně!

Paclitaxel & Docetaxel



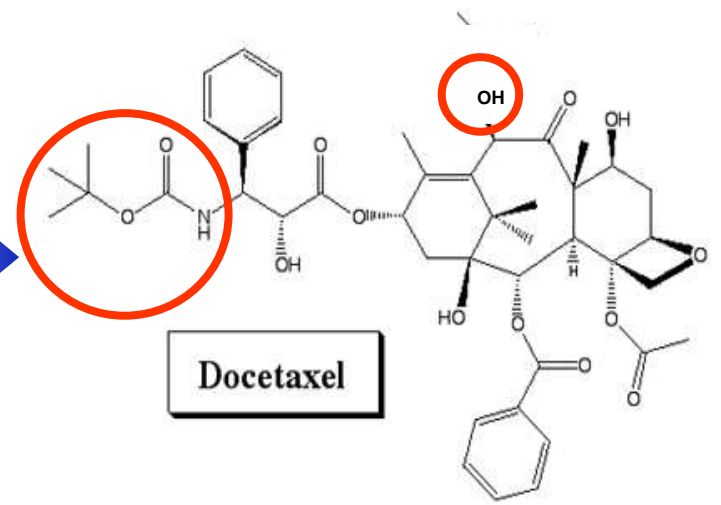
Tis krátkolistý *Taxus brevifolia* (kůra)



Paclitaxel



Tis červený *Taxus baccata* (jehličí)



Docetaxel

TAXANY



Taxany jsou ve skutečnosti syntetizovány symbiotickou houbou v kůře.



Od roku 1993 prekurzory produkovány s pomocí biotechnologií (kultura buněk z tisů + endosymbiont *Penicillium raistrickii*)

PACLITAXEL + DOCETAXEL + CABAZITAXEL

Klasická Cytostatika

Účinek na
DNA

Účinek na mitotické
vřeténko

Účinek na
receptorech pro
steroidní
hormony

Poškození DNA nebo inhibice
syntézy

Kompetice

Snížení
tvorby
hormonů

Alkylace
s jiné
modifikace

Tvorba
volných
radikálů

Interkalace
a inhibice
topoisomeráz

Antimetaboly
a
hydroxyurea

Nádory závislé na steroidních hormonech



George Beatson (1848-1933, skotský chirurg)

1890 Overektomie žen s nádorem prsu s metastázami vedla k ústupu nádorů!
(ovšem jen u části žen, u části zcela bez odezvy)



Charles Huggins

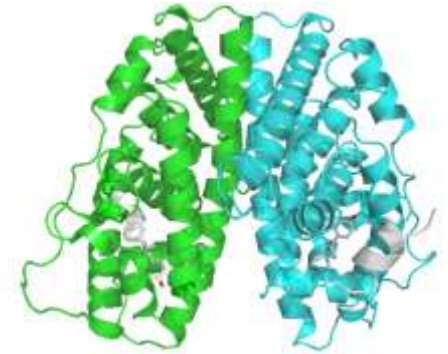
1930-1940s kastrace psa s nádorem prostaty vede ke zmenšení nádoru, později pomocí „feminizace nebo „chemické kastrace“ u mužů tentýž efekt

1966 – Nobelova cena (vztah hormonů, prostaty a nádorů)

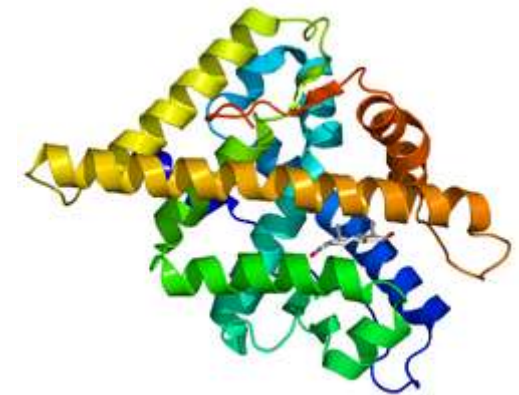
1930s – struktura estrogeneru a testosteronu

1968 – objeven estrogenový receptor (ER)

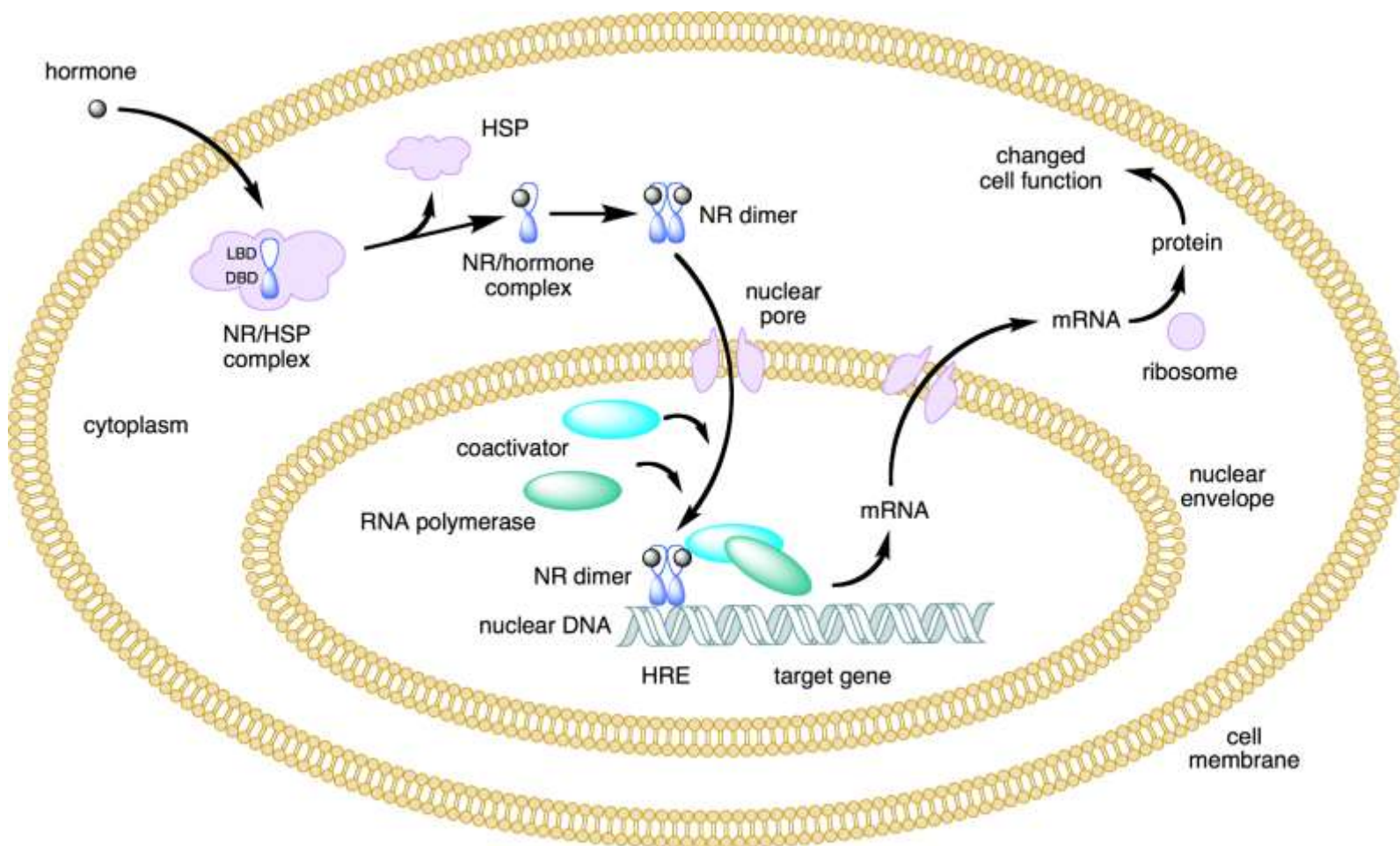
Vazba estrogeneru na ER (nemembránový jaderný receptor) vede k jeho dimerizaci, lokalizaci do jádra, a transkripční regulaci vedoucí k proliferaci



Testosteron se váže na jaderný androgenový receptor (AR), ale i na membránové receptory (signální kaskáda)



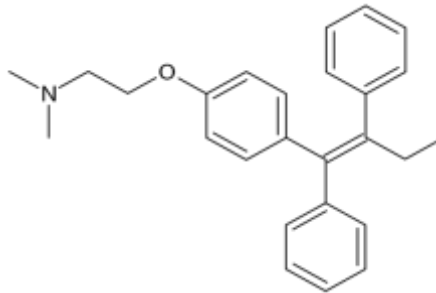
Po navázání hormonu dojde k uvolnění HSP, dimerizaci a přesunu do jádra a následné transkripční regulaci vazbou na HRE (hormone-response elements)



Vazba estrogenu na ER (nemembránový receptor) vede k jeho dimerizaci, lokalizaci do jádra, a transkripční regulaci vedoucí k proliferaci

Hledání analogu estrogenu (jako způsob antikoncepce) vedlo k vývoji **tamoxifenu** s **opačným** účinkem.

Klinické testy k potlačení nádorů prsu 1969-1970s

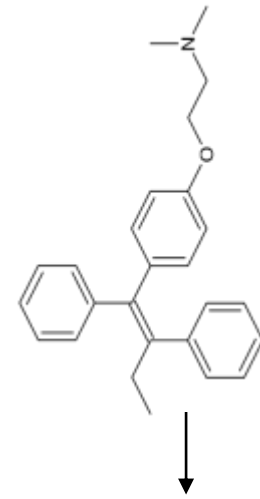
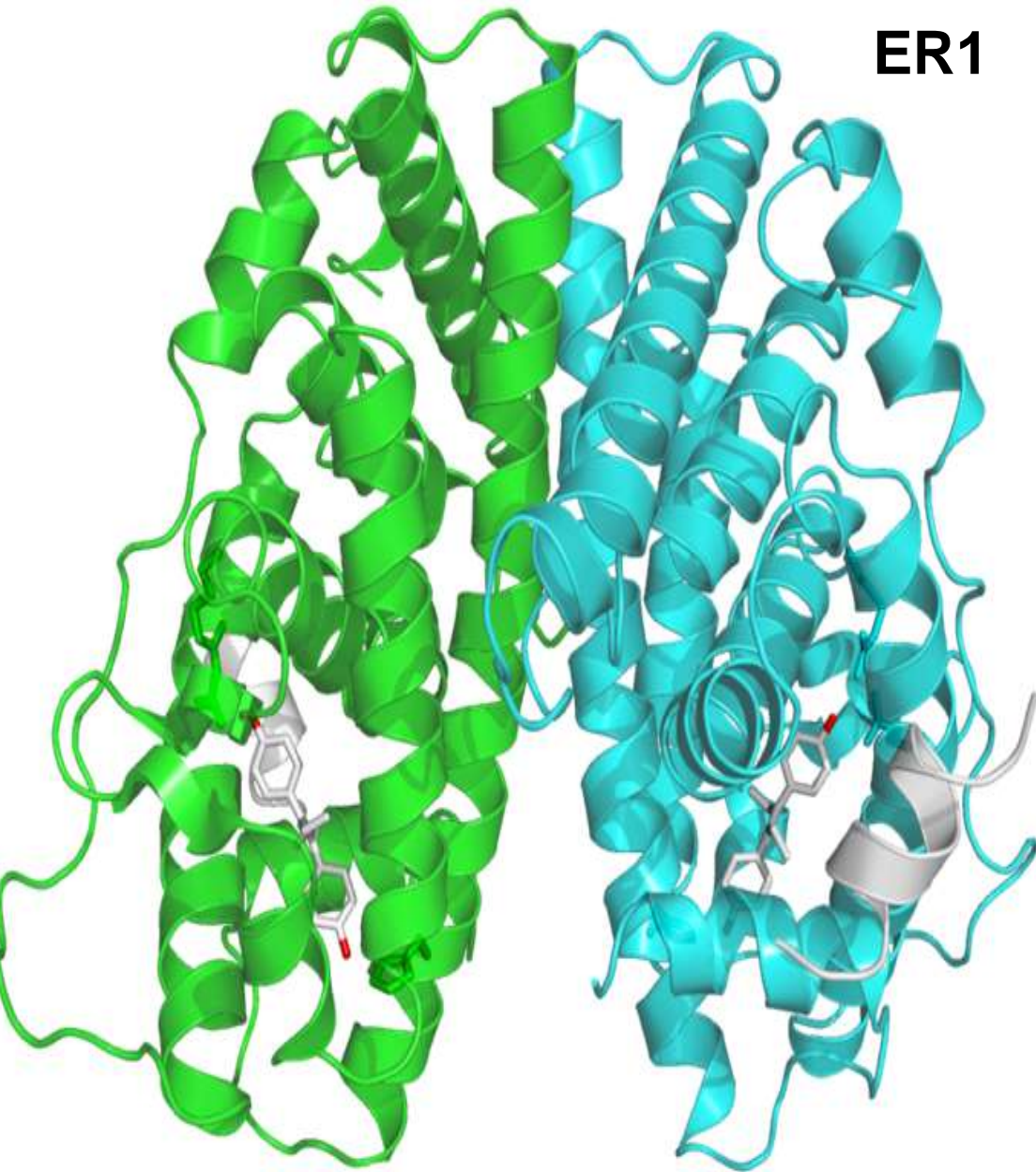


TAMOXIFEN

Tamoxifen nebrání ER-regulované transkripci, ale komplex tamoxifen-ER spouští **jinou sadu genů** než komplex s estrogenem (nebo je odpověď tkáňově specifická)

Není to typický antiestrogen, ale **selektivní modulátor ERs**

ER1

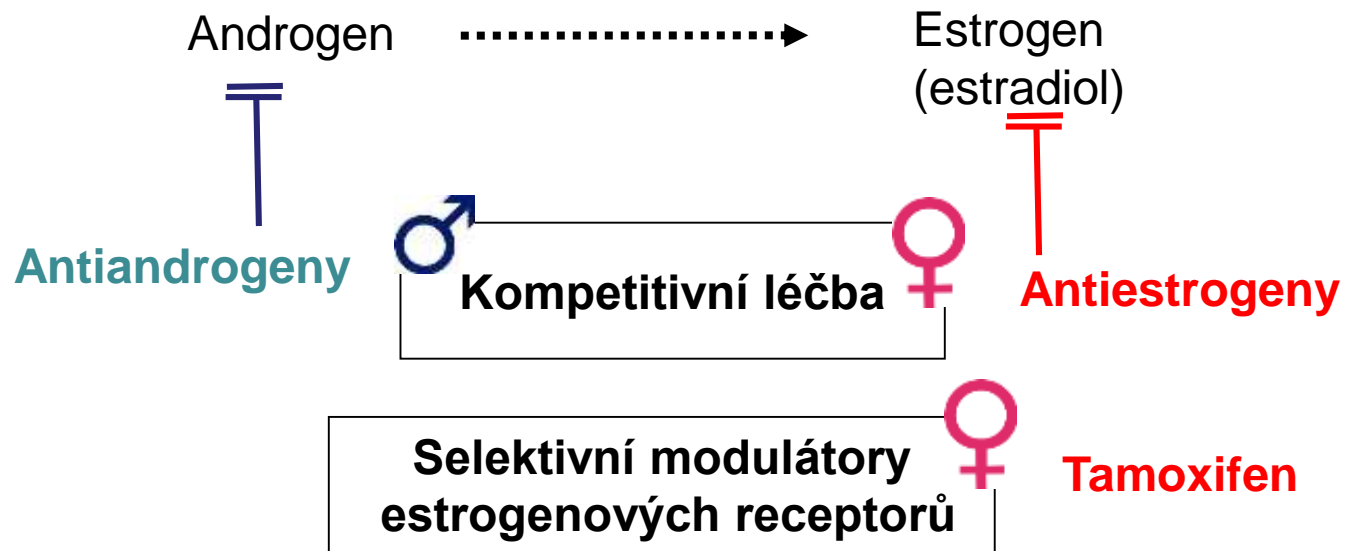


Tamoxifen
(prodrug)

Tamoxifen hydroxylován
jaterními enzymy

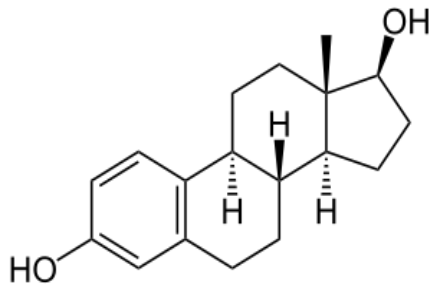


Možnosti léčby nádorů závislých na hormonech (nádory prsu a prostaty)

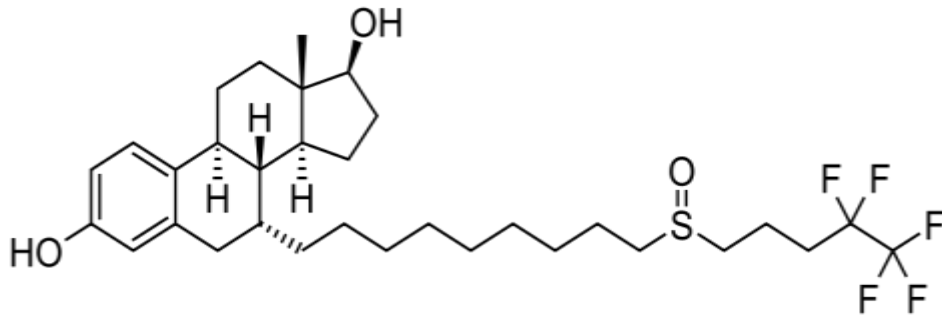


Antiestrogeny a selektivní modulátory ER (SERM)

kompetice s estrogeny o vazbu na ER receptory nebo blok receptoru

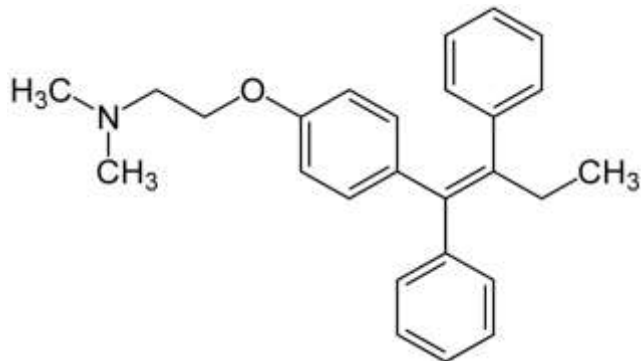


estradiol



Antiestrogen
(zřejmě způsobuje degradaci ER)

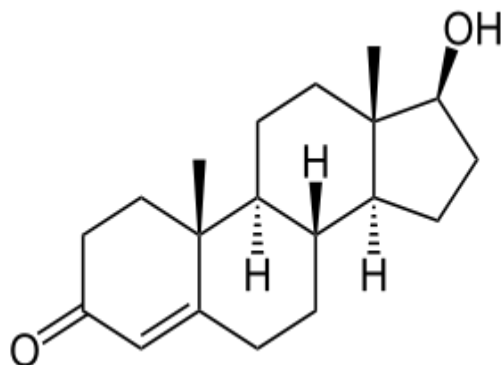
fulvestrant



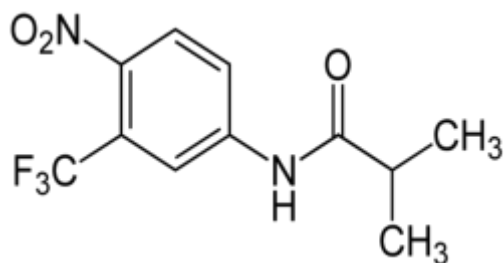
SERM (v některých tkáních jako
antiestrogen jinde jako estrogen)

tamoxifen

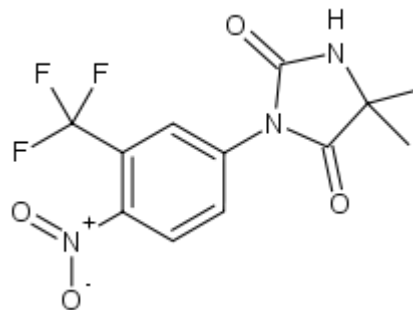
Antiandrogeny - kompetice s testosteronem a dihydrotestosteronem
O vazbu na androgenový receptor
(terapie karcinomu prostaty, v kombinaci s kastrací)



testosteron



Flutamid



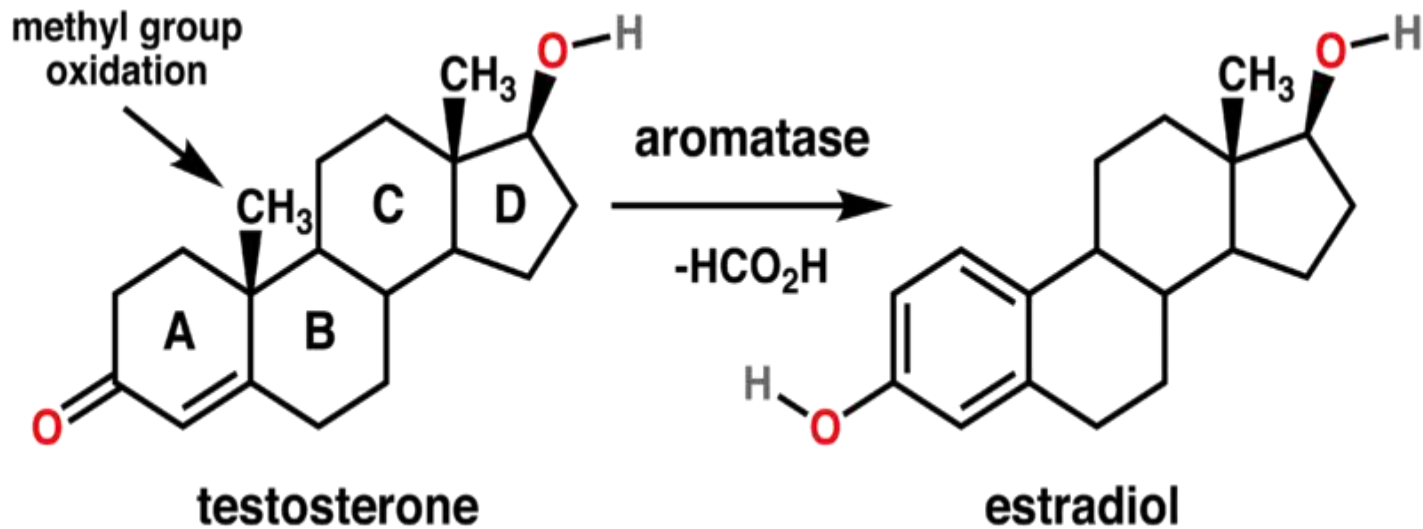
Nilutamid

+Apalutamid
+ a další

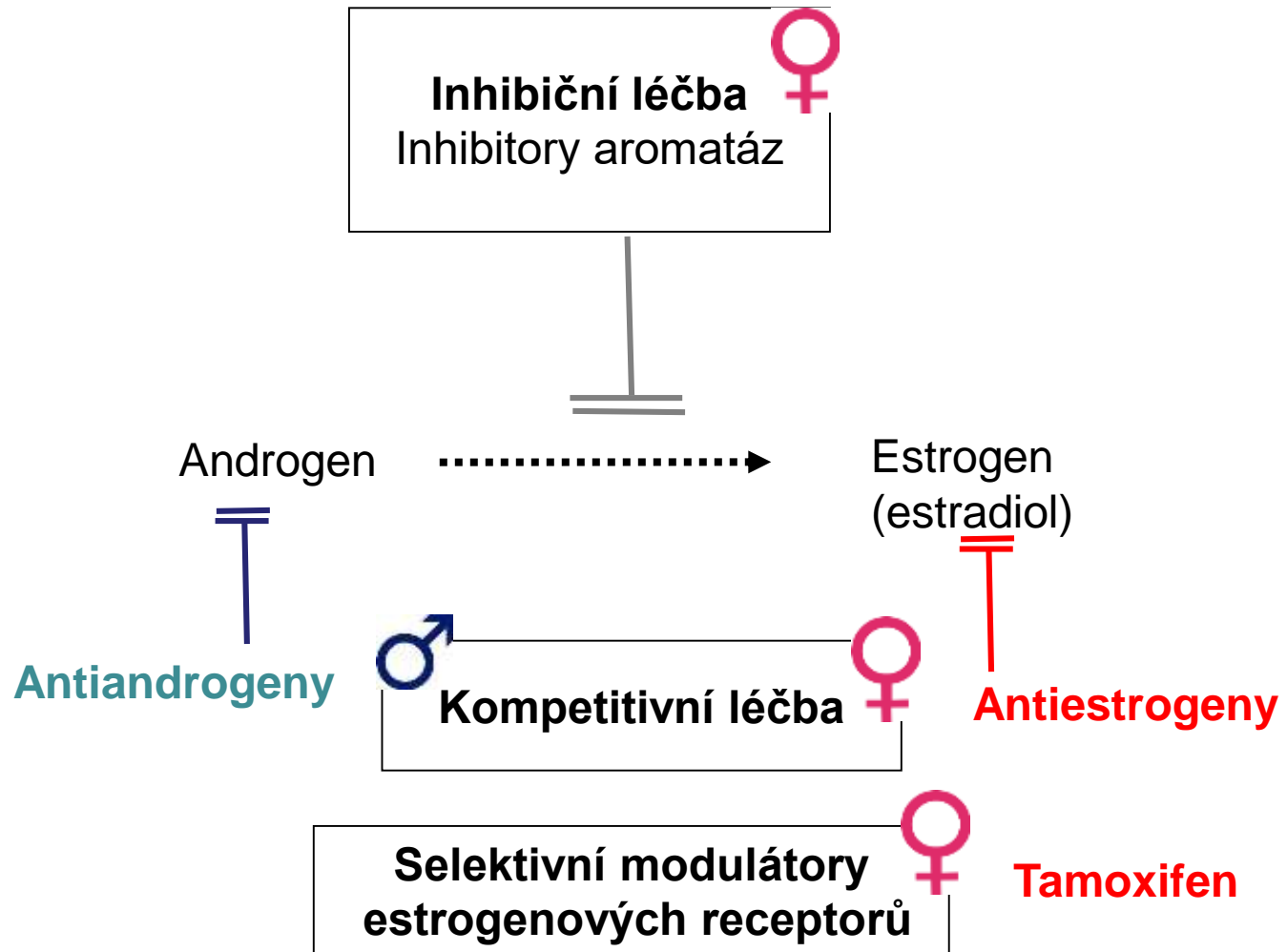
Estrogeny jsou syntetizovány **aromatázou** z androgenů

testosteron

estradiol

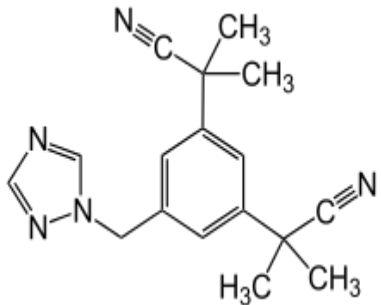


Možnosti léčby nádorů závislých na hormonech (nádory prsu a prostaty)

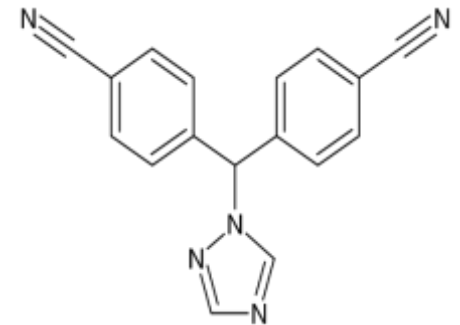


Inhibitory aromatázy

Terapie karcinomu prsu

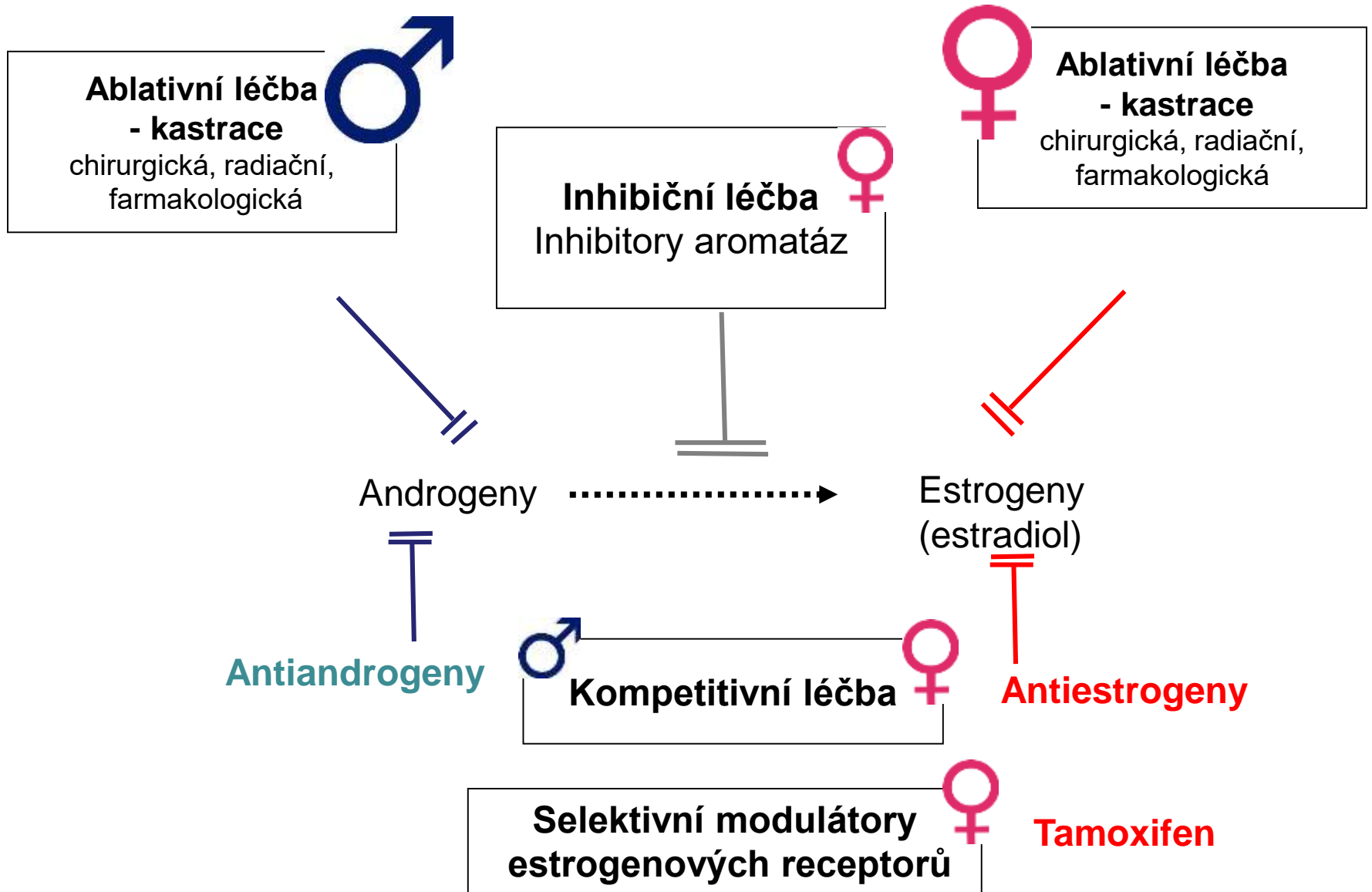


Anastrozol

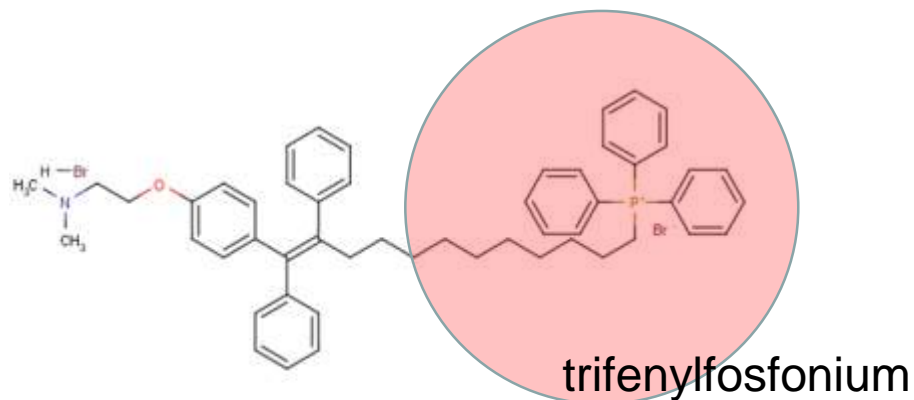
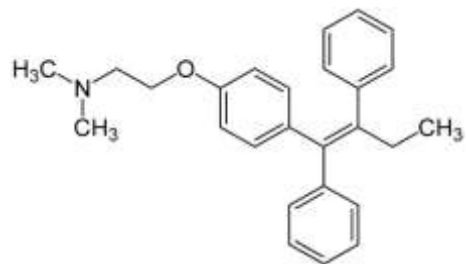


Letrozol

Možnosti léčby nádorů závislých na hormonech (nádory prsu a prostaty)



Tamoxifen a mito-TAM



Směřování do mitochondrií

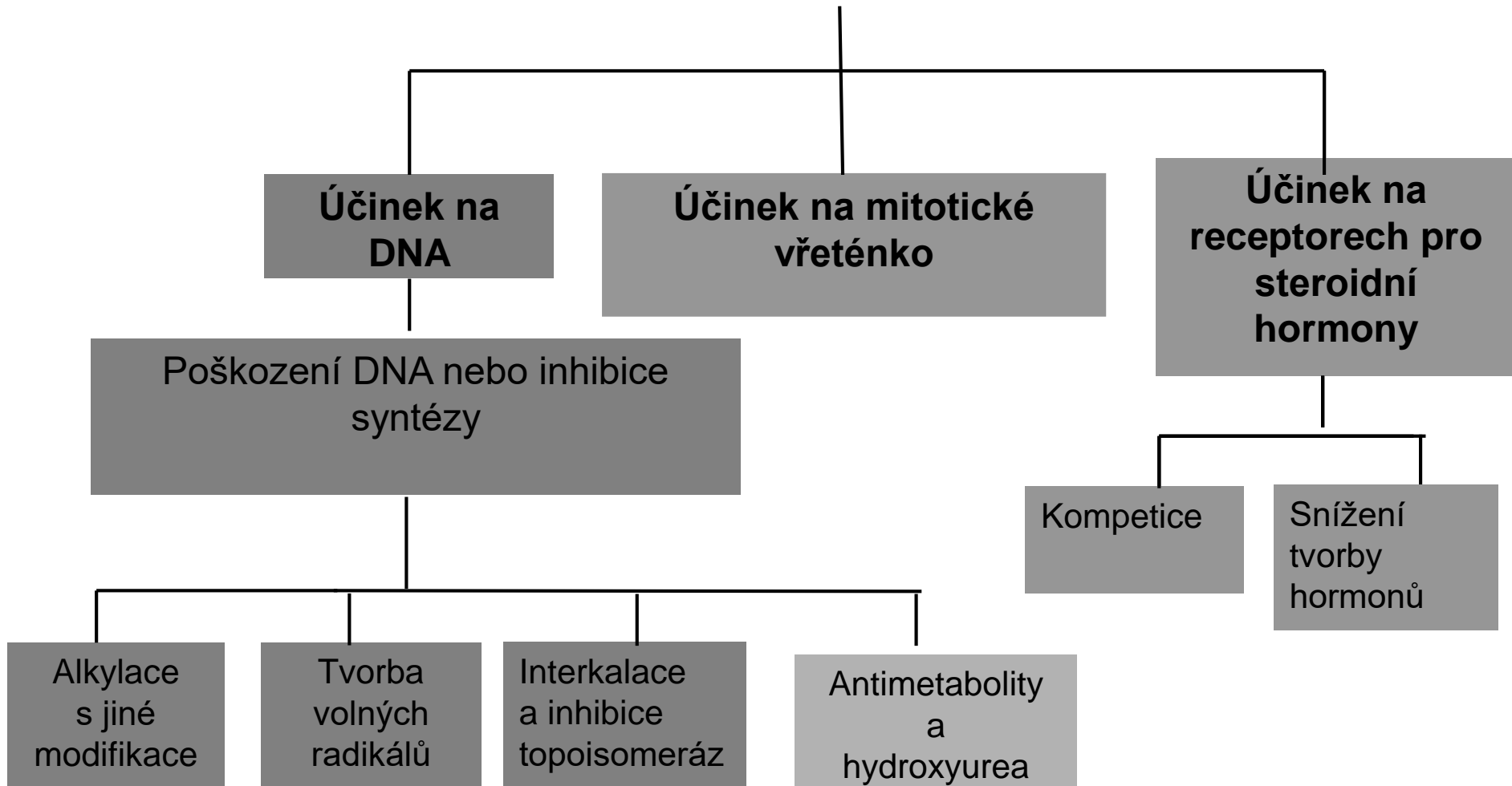


Inhibice komplexu I. interakci s tamoxifenem



Buněčná smrt

Klasická Cytostatika



Jiná než „klasická“ cytostatika?



Cílené (více či méně) **terapie**

- Látky zasahují do epigenetické informace
- Látky ovlivňující syntézu a degradaci bílkovin
- Diferenciační terapie
- Fotodynamická terapie
- Inhibitory kináz
- Inhibitory mTOR, PARP, CDK4/6, Bcl-2, IDH2
- Terapeutické protilátky
- CAR-T buňky



Cílené (více či méně) terapie

- Látky zasahují do epigenetické informace
- Látky ovlivňující syntézu a degradaci bílkovin
- Diferenciační terapie
- Fotodynamická terapie
- Inhibitory kináz
- Inhibitory mTOR, PARP, CDK4/6, Bcl-2, IDH2
- Terapeutické protilátky
- CAR-T buňky

LÁTKY OVLIVŇUJÍCÍ EPIGENETICKÉ ZNAKY

Epigenetické – děditelné znaky nezpůsobené změnami v sekvenci DNA

Změna struktury a aktivity chromatinu

DNA modifikace (metylace)

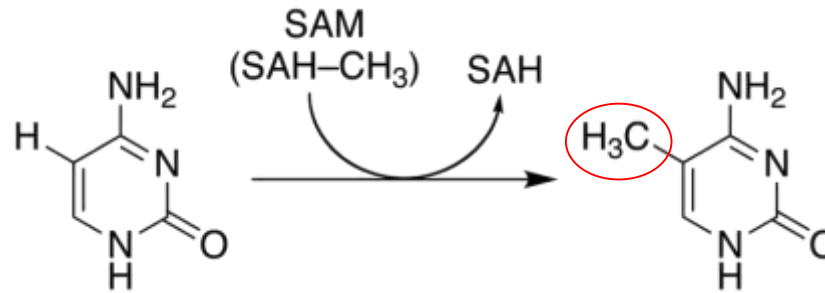
Modifikace histonů (acetylace, metylace...)

Výsledkem působení látek směřovaných na epigenetické změny je **změna exprese mRNA a proteinů**

Inhibitory DNA metyltransferáz (DNMT)

Inhibitory histondeacetyláz (HDAC)

Inhibitory DNA metyltransferáz (DNMTi)



60% and 90% CpG je u savců metylováno.

Pro nádory je typická **obecná HYPOMETYLACE** ale i **specifická HYPERMETYLACE (silencing)** tumorsupresorových genů.

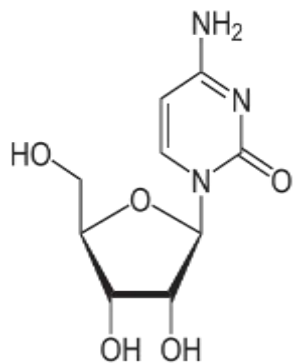
DNA metyltransferázy lze blokovat **aza-analogy cytosinu**

Aza-cytidin

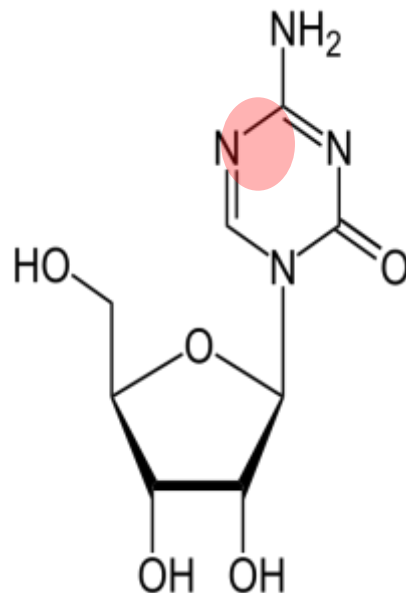
Decitabin (2' deoxy- 5' aza cytidin)

Výsledkem působení látek směřovaných na epigenetické změny je **změna exprese mRNA a proteinů**

AZA-CYTIDIN
(Vidaza)

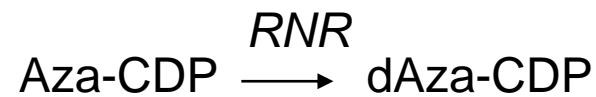


cytidin



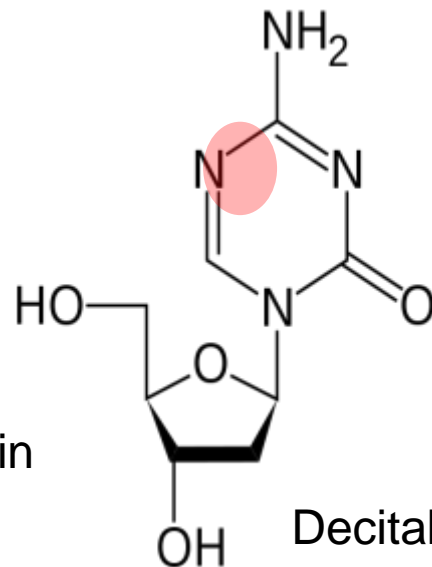
Aza-cytidin

Fosforylován
Inkorporovávnce do RNA



Inkorporace do DNA
**Vede k inhibici metylace
DNA
blokádou DNA
metyltransferáz (DNMT)**

DECITABIN
2' deoxy- 5' aza cytidin

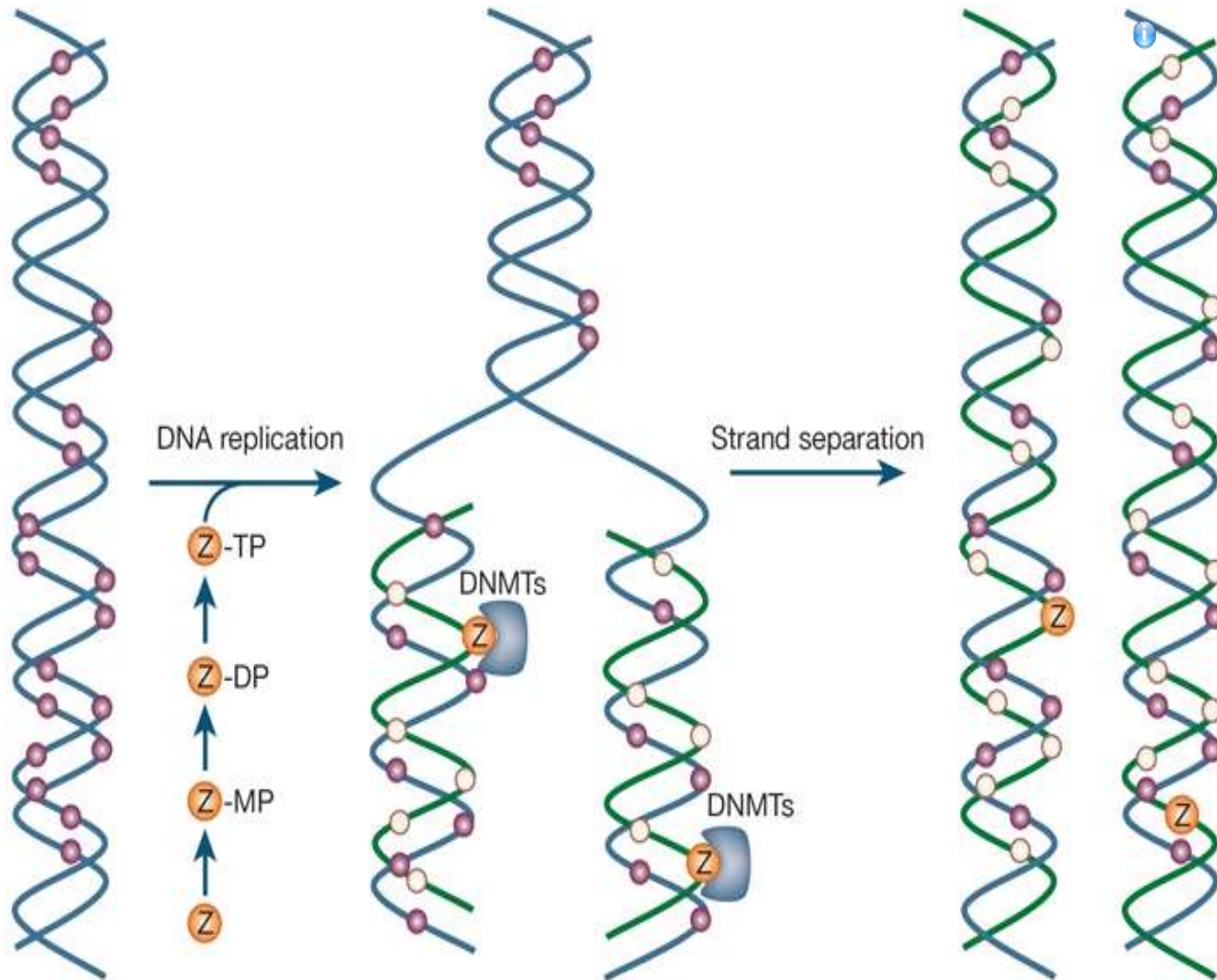


Decitabin

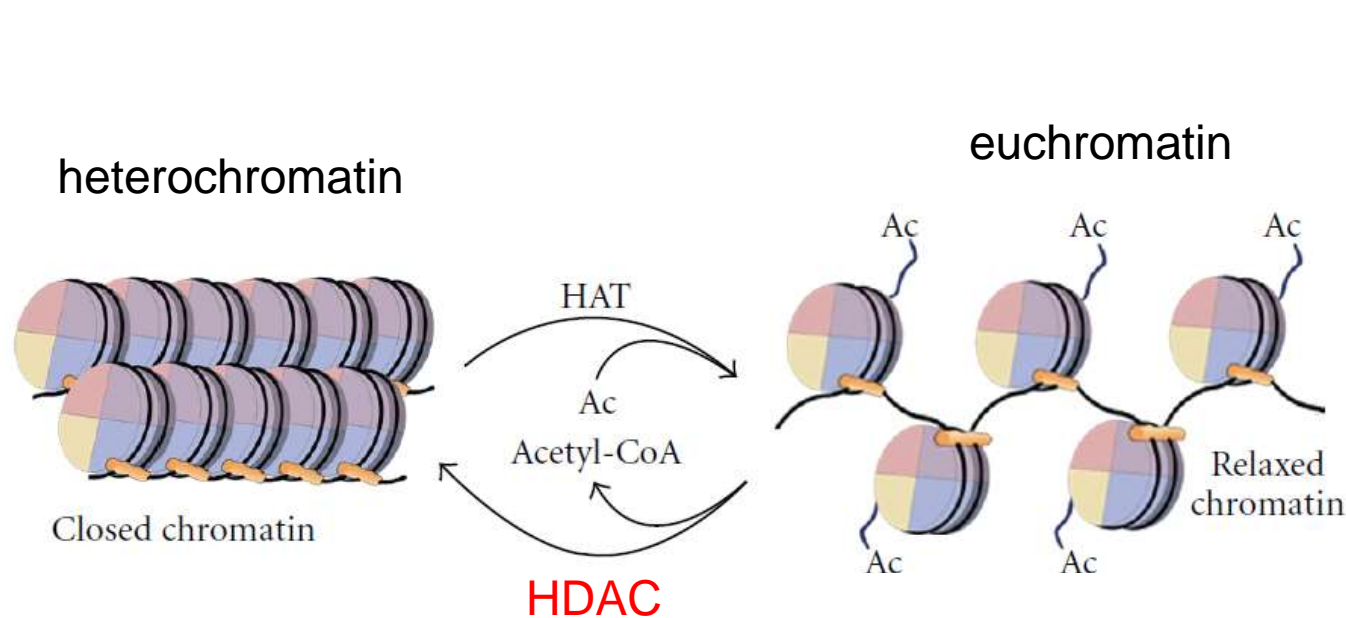


Po inkorporaci do DNA vytvářejí aza-báze kovalentní vazby s DNMT, imobilizují je tak a brání metylaci nových řetězců.

Vede k **obnově exprese** mnoha (tumorsupresorových) genů.



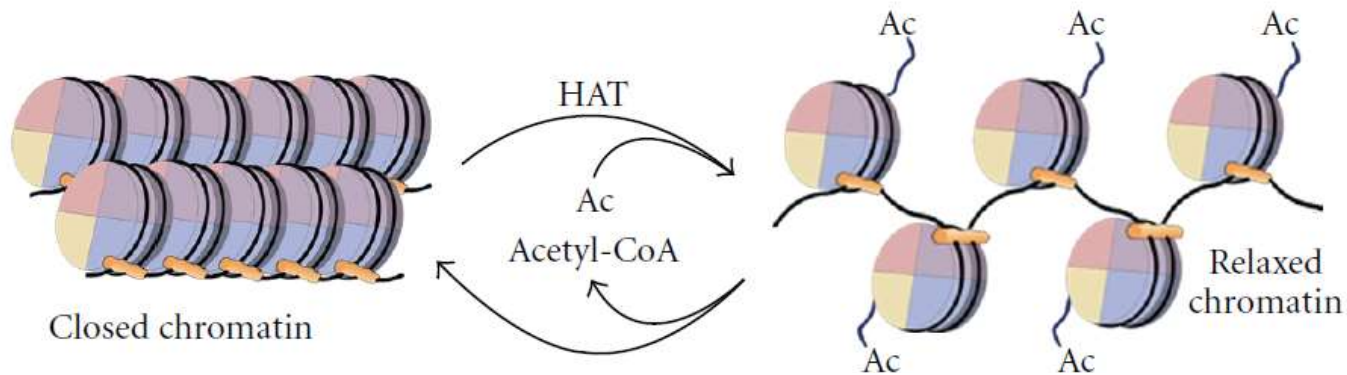
Inhibitory histondeacetyláz (HDACi)



Acetylase core histonů vede k **otevření** struktury chromatinu → euchromatin

Deacetylase core histonů vede k **uzavření** struktury chromatinu → heterochromatin

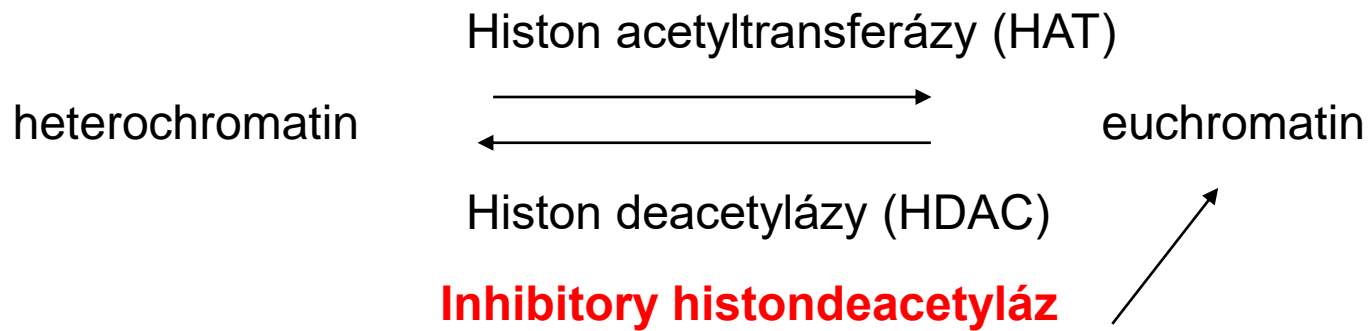
V nádorové buňce převažuje deacetylase nad acetylací (silencing tumorsupresorů)



HDAC

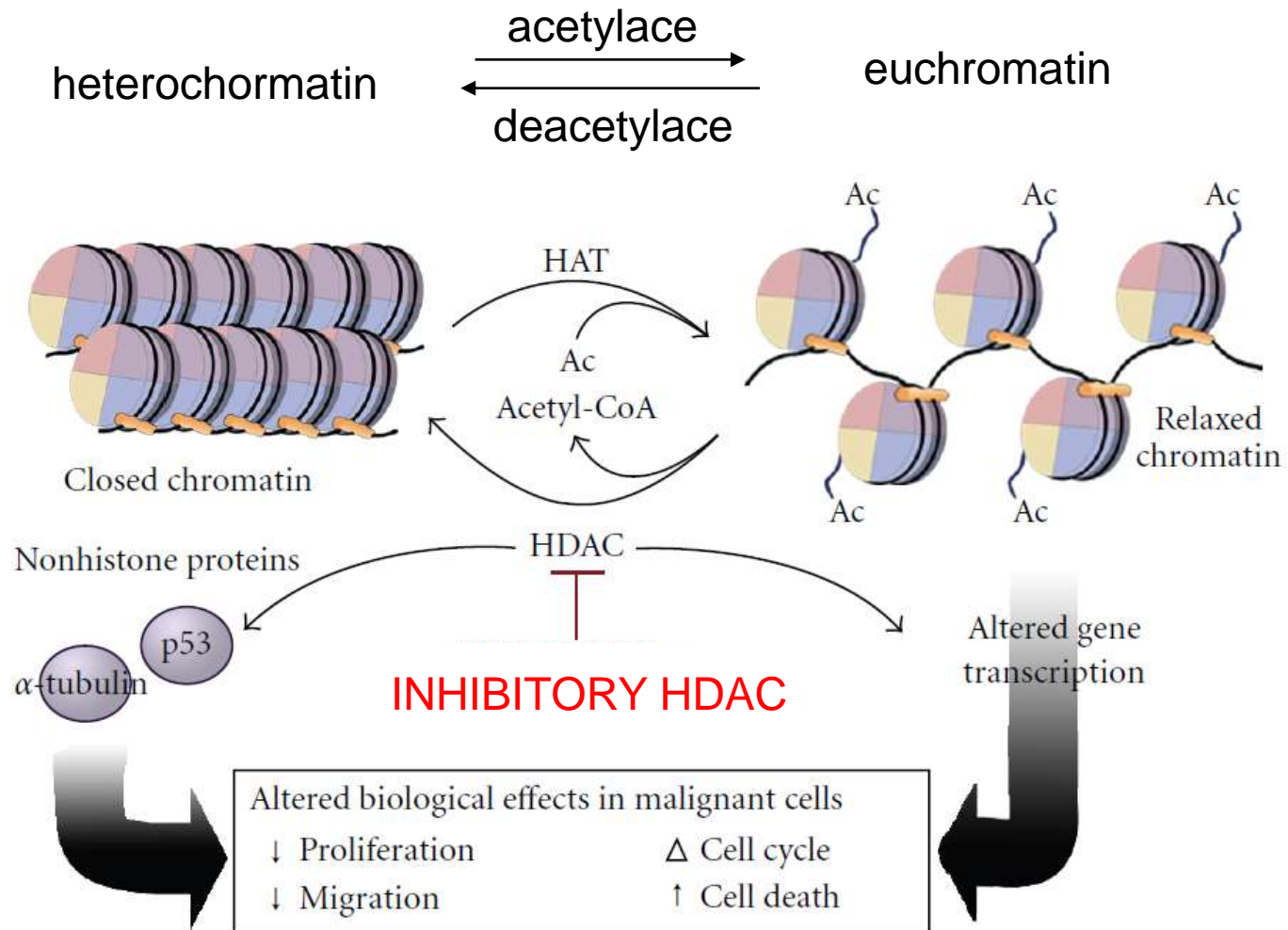


Inhibice HDAC



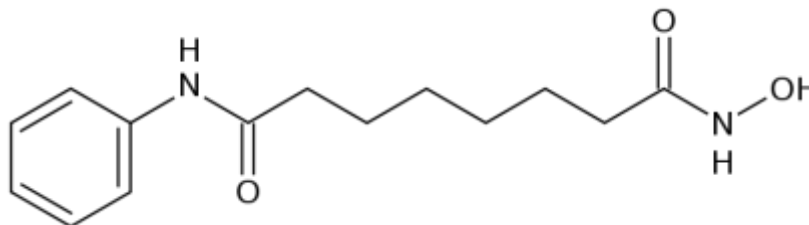
Cílem HDACi je spustit expresi vypnutých (tumorsupresorových) genů

Inhibitory histondeacetyláz



Inhibitory histondeacetyláz (HDACi)

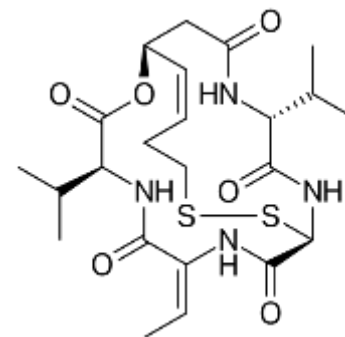
Vorinostat (SAHA, kyselina suberanilohydroxamová)



+ Belinostat, Panobinostat

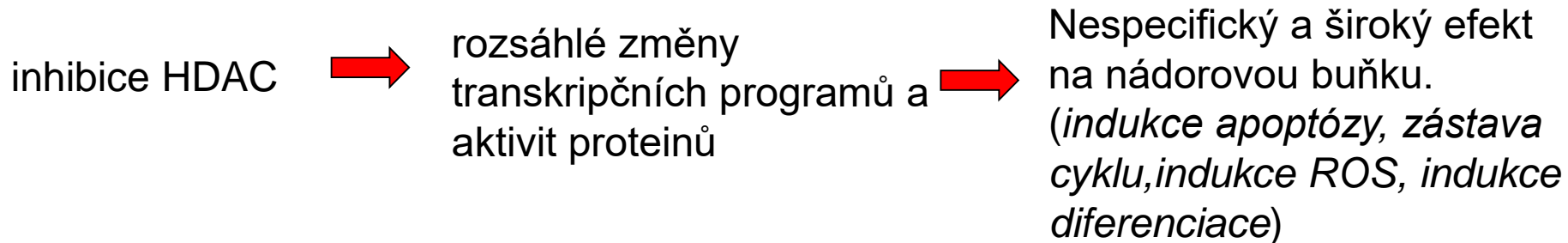
Romidepsin

produkt *Chromobacterium violaceum*



Vedlejší (off target) HDACi

„snížení“ hypoacetylace dalších (nehistonových) proteinů – **zvýšení jejich stability**
(p53, tubulin, HSP90...)



**Inhibitory IDH1, IDH2 se specifickými gain-of-function mutacemi
(vzniká 2-hydroxyglutarát místo alfa-ketoglutarát)**

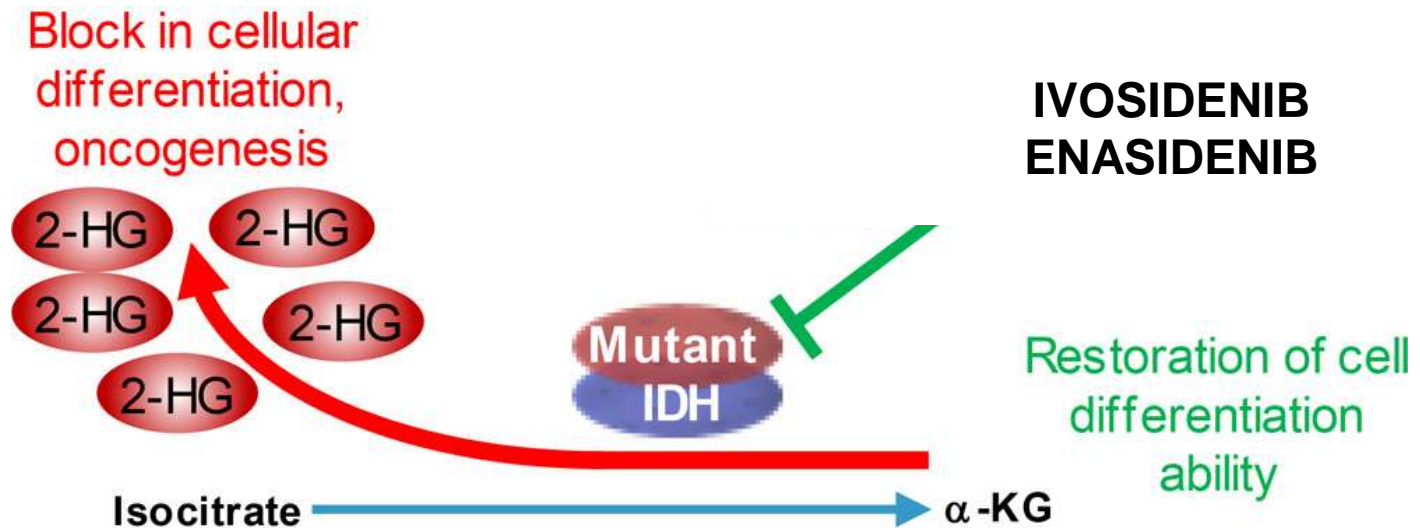
Inhibitory isocitrát dehydrogenázy 1 a 2

**IDH1, IDH2 se specifickými gain-of-function mutacemi
(vzniká 2-hydroxyglutarát místo alfa-ketoglutarát)**

Inhibitory isocitrát dehydrogenázy 1 a 2 (terapie AML)

IDH1, IDH2 se specifickými gain-of-function mutacemi
(vzniká 2-hydroxyglutarát místo alfa-ketoglutarát)

2-Hydroxyglutarát je onko-metabolit (inhibuje např. demetylázy DNA a histonů)



Ivosidenib (inhibitor mutované IDH1 (cytosol))

Enasidenib (inhibitor mutované IDH2 (mitochondrie))



Cílené (více či méně) terapie

- Látky zasahují do epigenetické informace
- Látky ovlivňující syntézu a degradaci bílkovin
- Diferenciační terapie
- Fotodynamická terapie
- Inhibitory kináz
- Inhibitory mTOR, PARP, CDK4/6, Bcl-2, IDH2
- Terapeutické protilátky
- CAR-T buňky

LÁTKY OVLIVŇUJÍCÍ SYNTÉZU A DEGRADACI PROTEINŮ

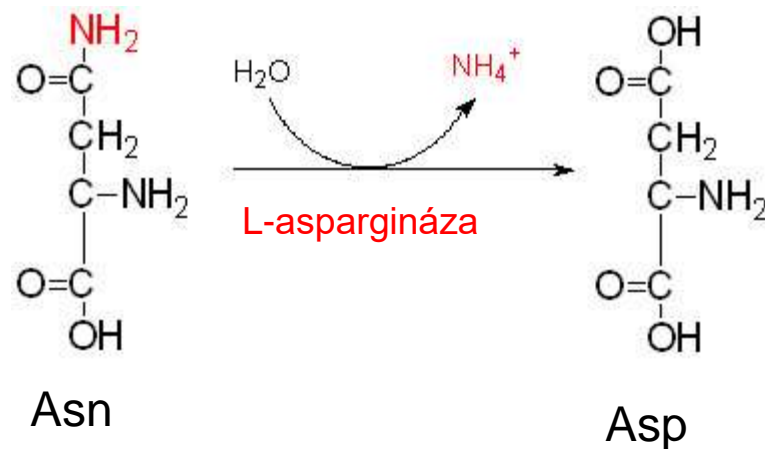
L-aspargináza

Inhibitory translace

Inhibitory proteazómu

Některé nádorové buňky (ALL)
nedovedou syntetizovat neesenciální amk **asparagin...**

Jsou závislé na asparaginu v cirkulaci



Podání **L- asparaginázy** sníží dostupný Asn v cirkulaci a nádor hladoví

L-asparagináza (Elspar) produkt *E.coli*, pouze
pro léčbu ALL



LÁTKY OVLIVŇUJÍCÍ SYNTÉZU A DEGRADACI PROTEINŮ

L-aspargináza

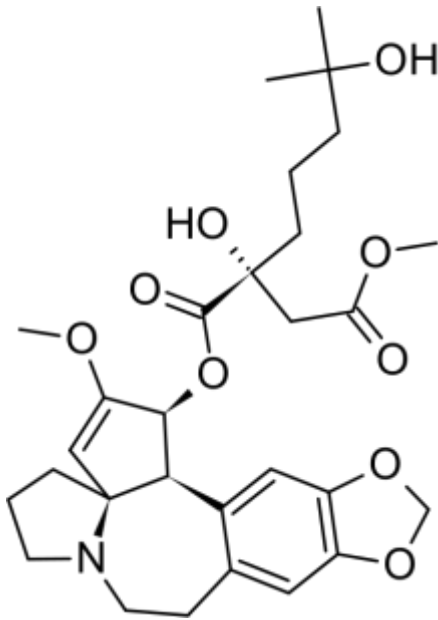
Inhibitory translace

Inhibitory proteazómu

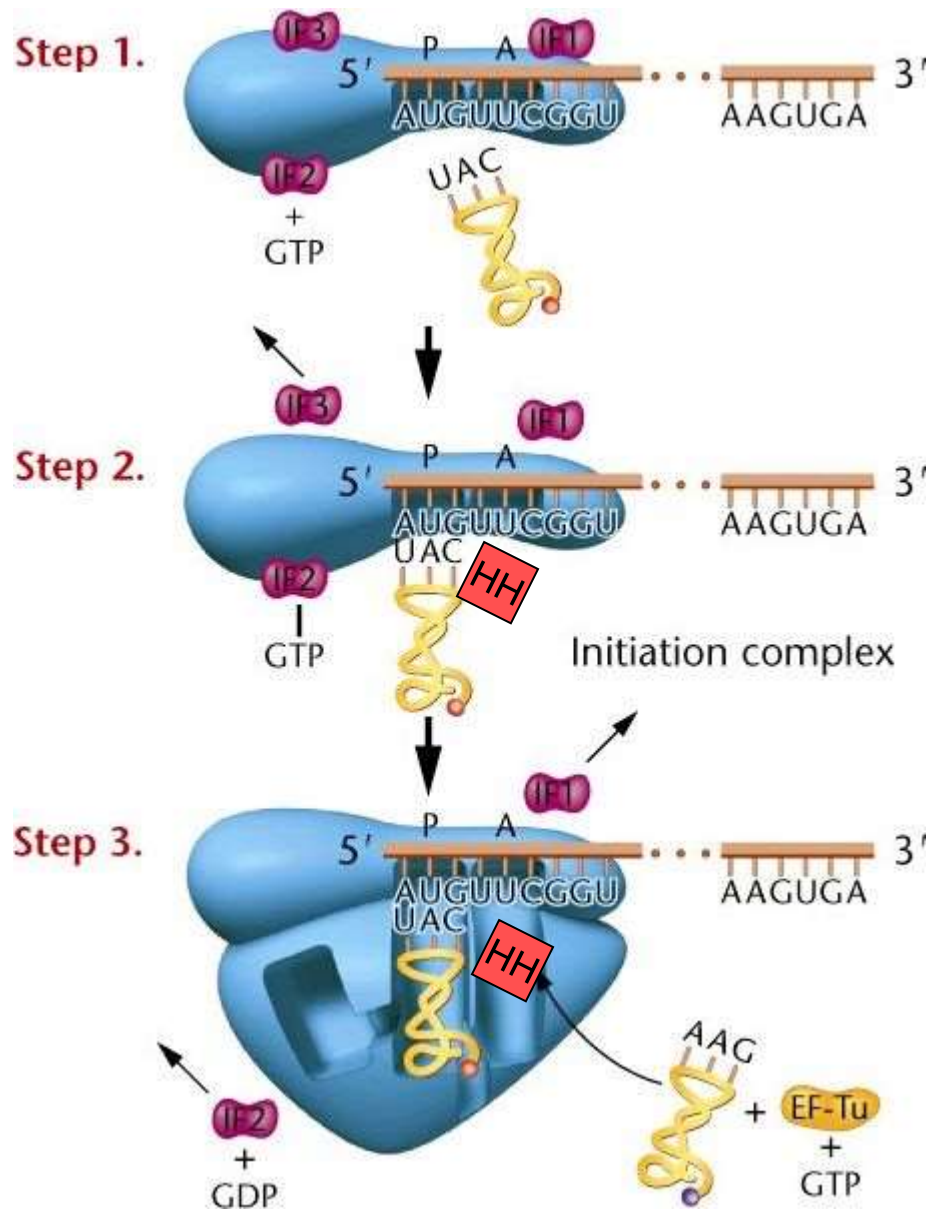
Inhibice translace

Homoharringtonin (omacetaxin mepesukcinát)

Cephalotaxus harringtonii (hlavotis peckovicový)



Inhibice translace blokem prvního elongačního kroku (AMK po Met). Interaguje s A-místem na ribozómu a brání správnému umístění aminokyseliny z přicházející aminoacyl-tRNA. **Funguje v první elongaci při translaci, nebrání však translaci, která již začala.**



LÁTKY OVLIVŇUJÍCÍ SYNTÉZU A DEGRADACI PROTEINŮ

L-aspargináza

Inhibitory translace

Inhibitory proteazómu

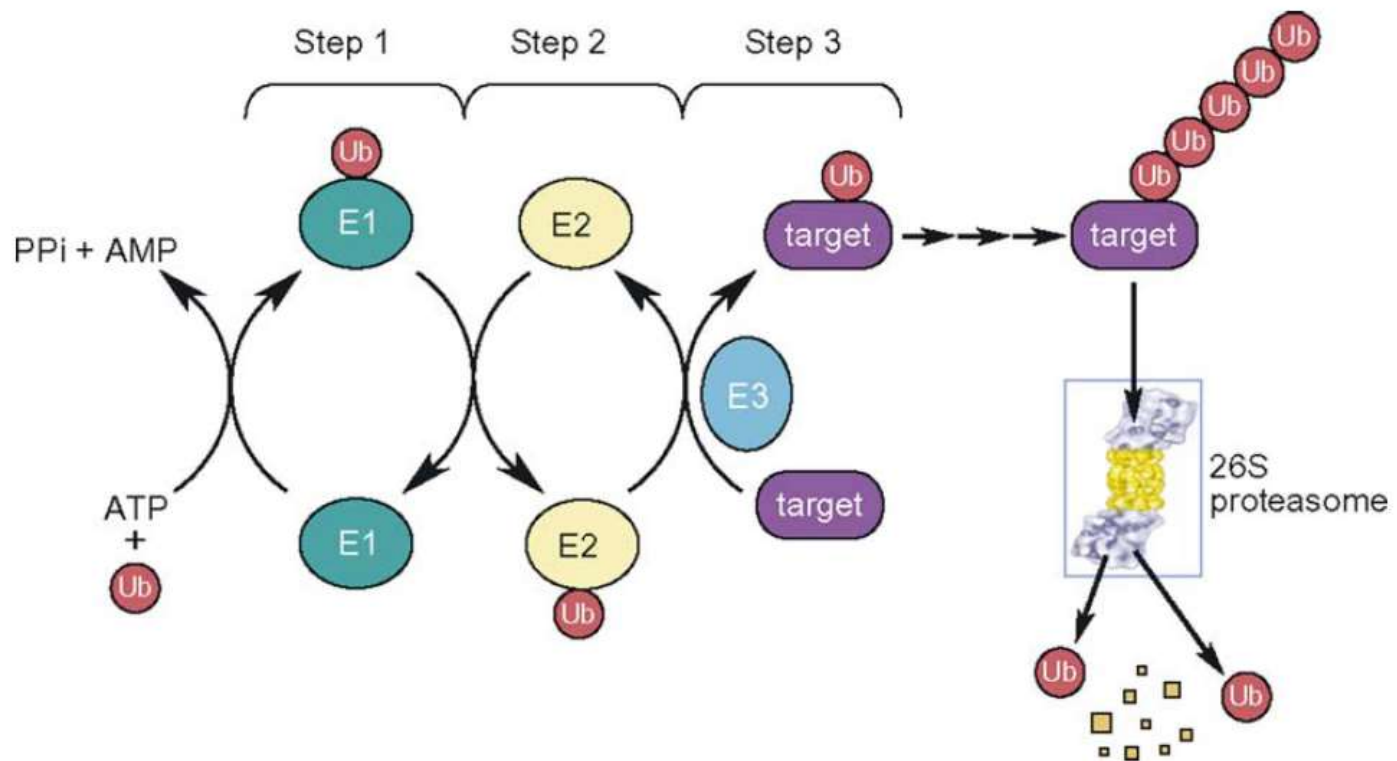
Inhibice degradace proteinů

Polyubiquitinylace proteinů



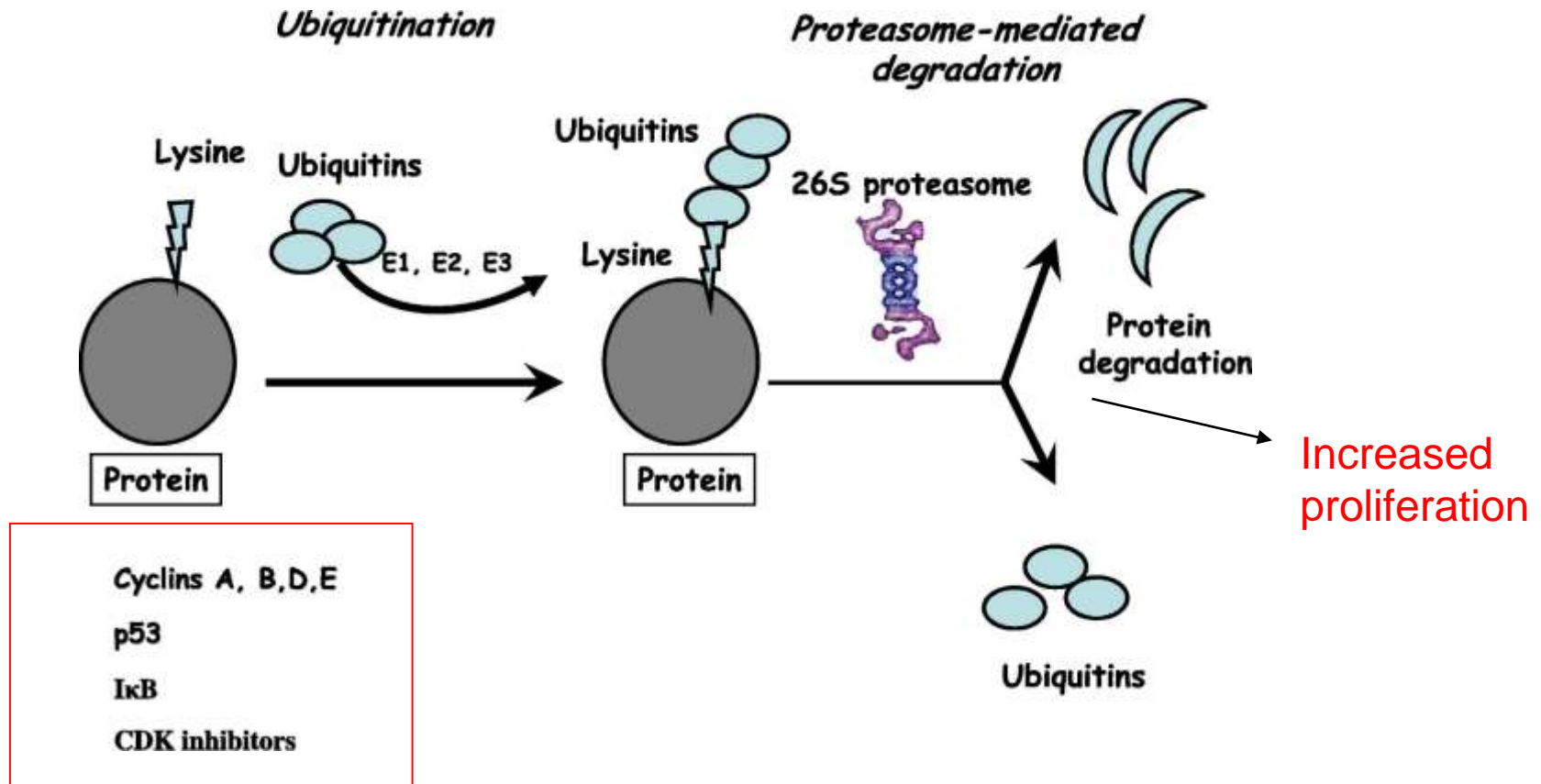
Degradace v proteazomu

Ubiquitin ligázy X deubiquitinylační enzymy



Degradace tumorsupresorů v proteazomu je zvýšená u nádorových buněk

(I κ B, cykliny, p53, BAX, NOXA, p21, p27..)



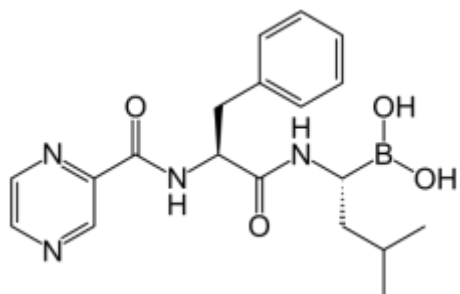
Cyclins A, B, D, E

p53

I κ B

CDK inhibitors

Bortezomib (Velcade, dipeptidový derivát kyseliny boronové)

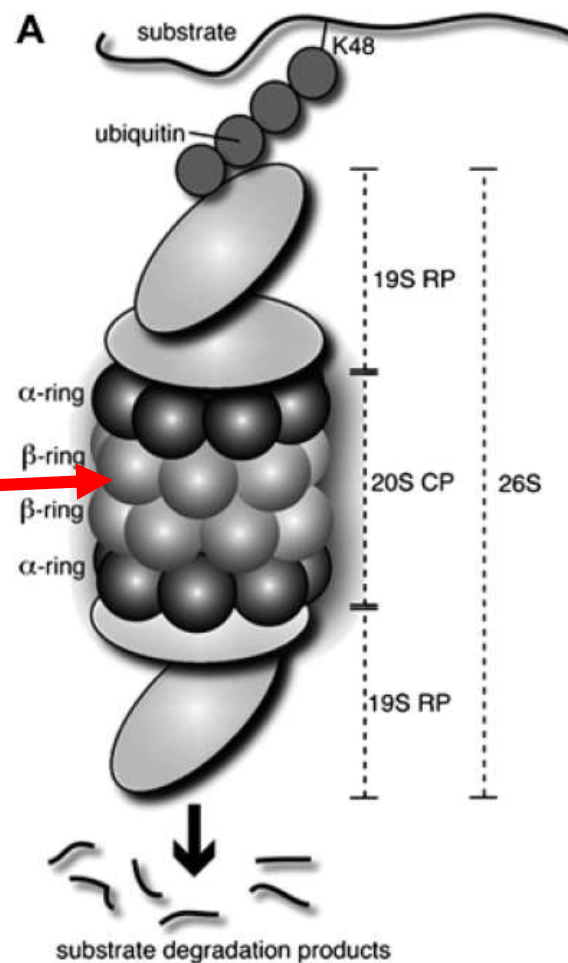


Bortezomib

vazba na podjednotku $\beta 5$

Inhibuje chymotryosin-like aktivitu
(specificita - Tyr, Phe, Trp)

+ Carfilzomib + Ixazomib

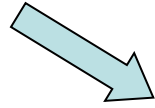




Cílené (více či méně) terapie

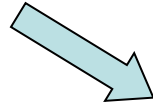
- Látky zasahují do epigenetické informace
- Látky ovlivňující syntézu a degradaci bílkovin
- **Diferenciační terapie**
- Fotodynamická terapie
- Inhibitory kináz
- Inhibitory mTOR, PARP, CDK4/6, Bcl-2, IDH2
- Terapeutické protilátky
- CAR-T buňky

Maligní fenotyp je často asociován s defektem diferenciacie



Diferenciační terapie

Maligní fenotyp je často asociován s defektem diferenciacie

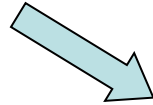


Diferenciační terapie

Receptor kyseliny retinové

Za normálních okolností nukleární receptor **Retinoic acid receptor alfa (RAR α)** reguluje expresi proteinů diferenciačního programu (například granulocytů) RAR α funguje jako transkripční aktivátor **v heterodimeru s RXR** vazbou na RAREs (retinoic acid responsive elements)

Maligní fenotyp je často asociován s defektem diferenciacie



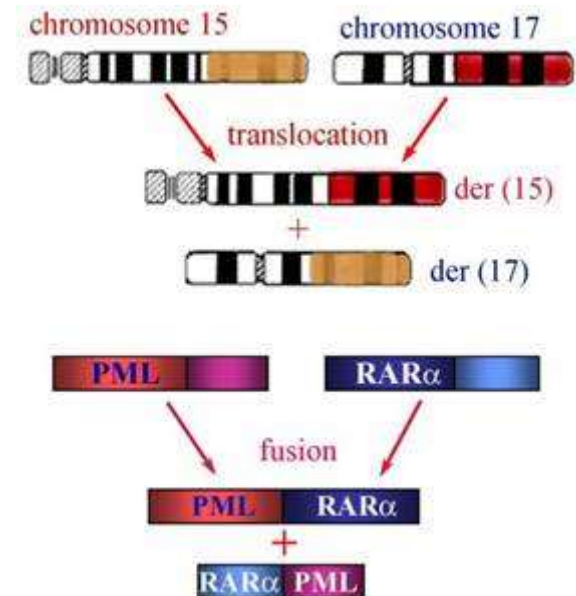
Diferenciační terapie

Receptor kyseliny retinové

Za normálních okolností nukleární receptor **Retinoic acid receptor alfa** ($RAR\alpha$) reguluje expresi proteinů diferenciačního programu (například granulocytů) $RAR\alpha$ funguje jako transkripční aktivátor v heterodimeru s RXR. Dimer se váže na RAREs (retinoic acid responsive elements)

Promyelocytární leukemie (PML) $t(15;17)$

Normální diferenciační program je blokován (nedozrávají z promyelocytů neutrofilů) vznikem fuzního proteinu **PML- $RAR\alpha$** který **blokuje transkripci** směřující k diferenciaci (váže represory a histondeacetylázy)

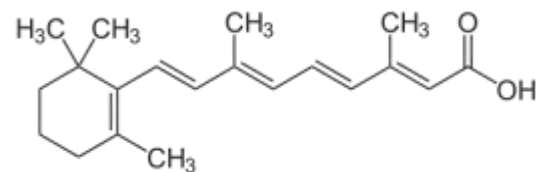


Komplex PML-RAR α je po navázání jedné ze strukturních variant kyseliny retinové

- **all-trans retinové kyseliny (ATRA, Trentoin)** uvolněn z vazby na DNA a degradován v proteazomu

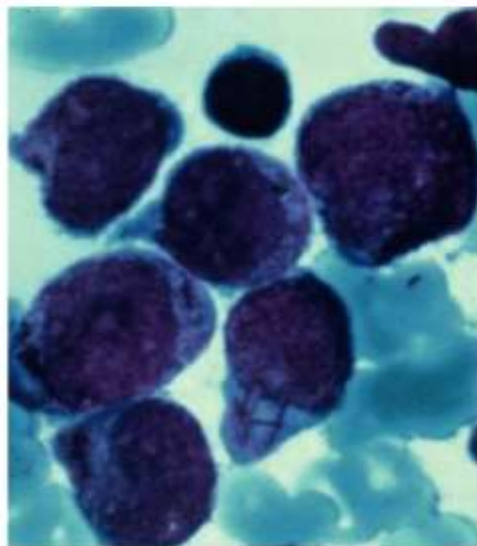


Exprese diferenciačního programu je obnovena.

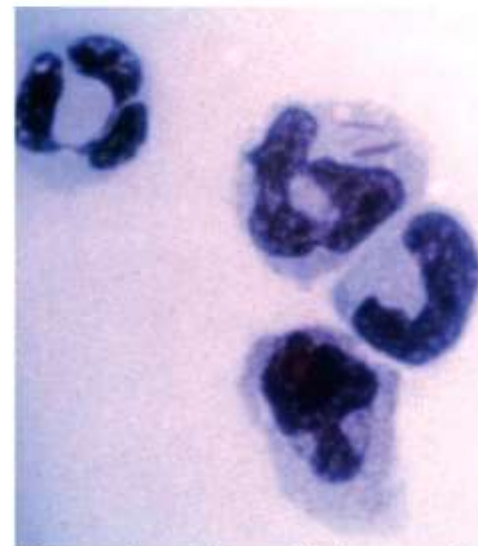
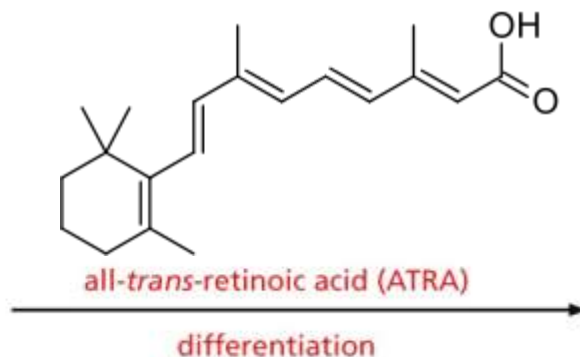


Retinoic acid
(směs izomerů)

(B)



promyelocytes



polymorphonuclear cells (neutrophils)

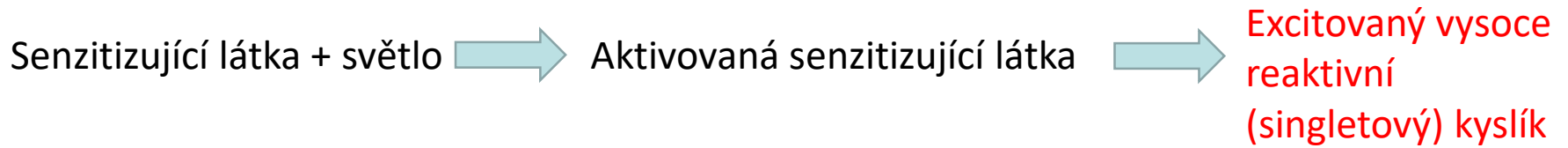


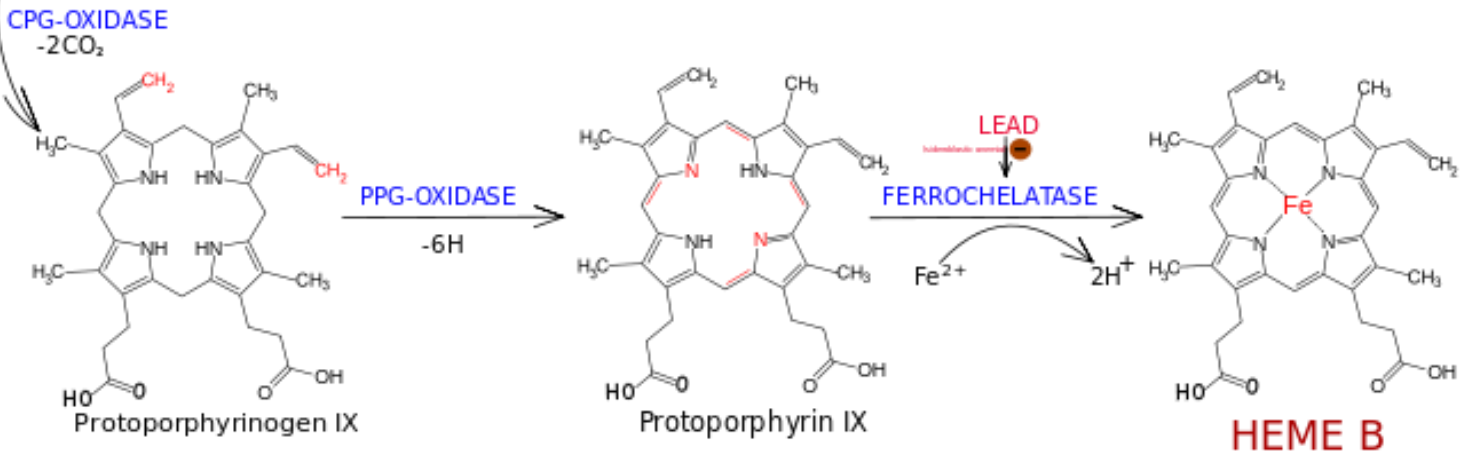
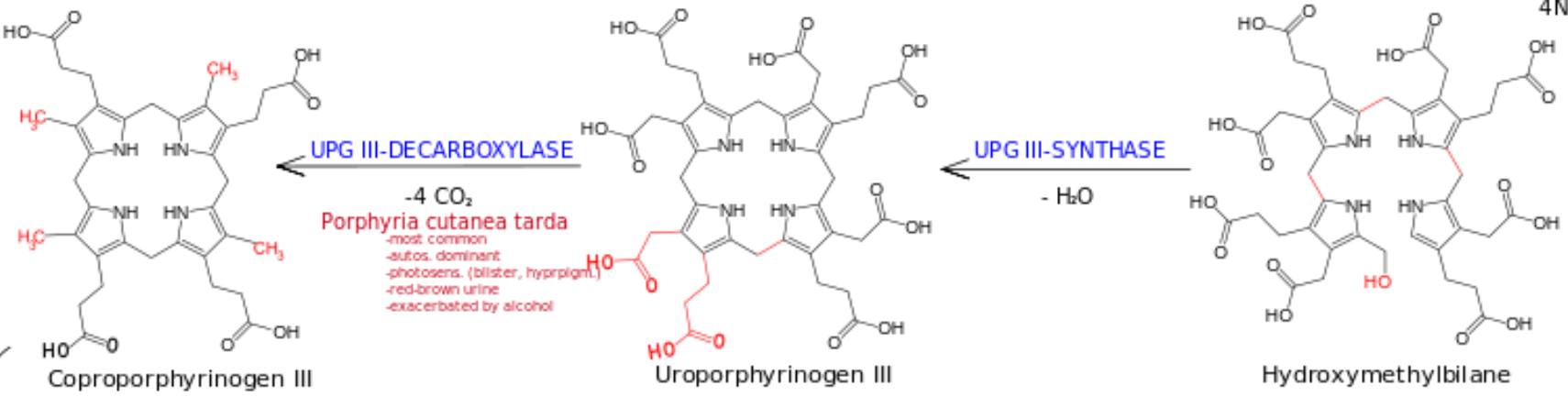
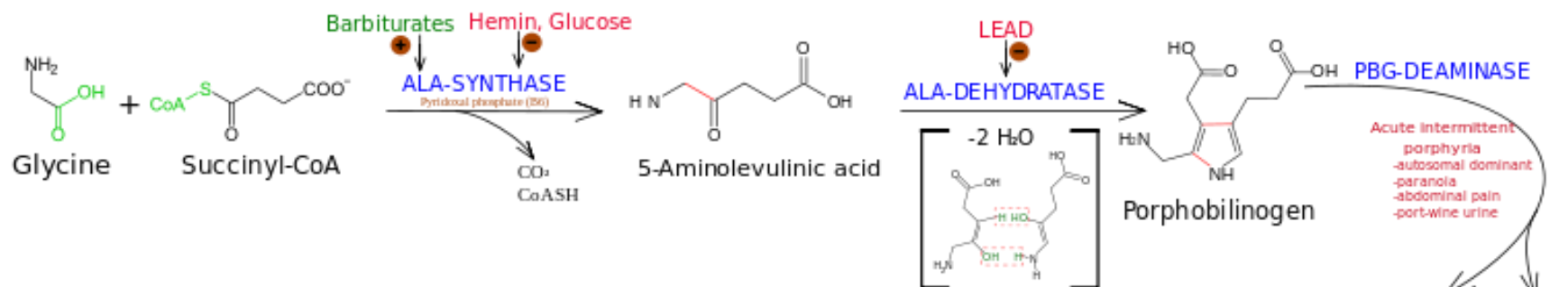
Cílené (více či méně) terapie

- Látky zasahují do epigenetické informace
- Látky ovlivňující syntézu a degradaci bílkovin
- Diferenciační terapie
- **Fotodynamická terapie**
- Inhibitory kináz
- Inhibitory mTOR, PARP, CDK4/6, Bcl-2, IDH2
- Terapeutické protilátky
- CAR-T buňky

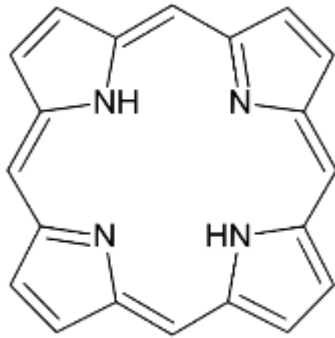
Fotodynamická terapie (PDT)

Využívá kombinace fotosenzitizující látky a světla.
Dochází ke generaci reaktivního singletového kyslíku, který způsobí poškození nádorové tkáně





Nádorové buňky obsahují/kumulují vyšší množství porfyrinů než zdravé

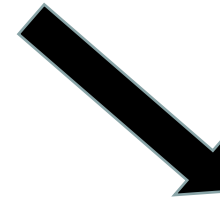


porfyrin

Deriváty porfyrinu
nebo jeho
prekurzory
(Photofrim,
kyselina
aminolevulová)


630 nm

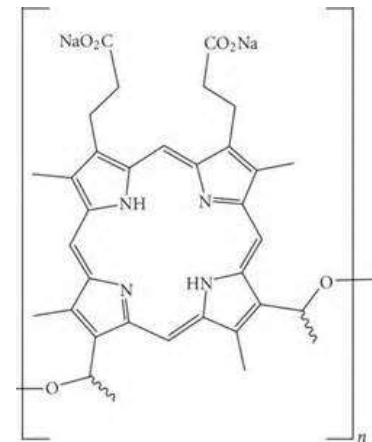
$^1\text{O}_2$ singletový kysík



Oxidativní poškození
buněčných struktur (MK, proteiny, NA...)
APOPTÓZA

Aplikace buď lokální (krém- **kyselina aminolevulová**)
nebo systemická (porfyriny (**Photofrin**))

Photofrin

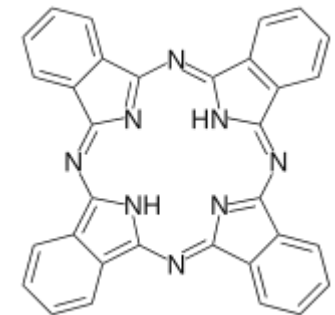


Využití „kam lze posvítit“ – karcinomy kůže a kožní T-buněčné lymfomy

Klinické studie (pomocí endoskopie) některé **nádory jícnu a plic**
nádory děložního čípku
močového měchýře
Štítné žlázy

Komplikací PD terapie je následná citlivost kůže na světlo

Kromě porfyrinů v testech také **ftalocyaniny** a jejich komplexy s kovy



Kumulace aminolevulinátu v nádorové tkáni

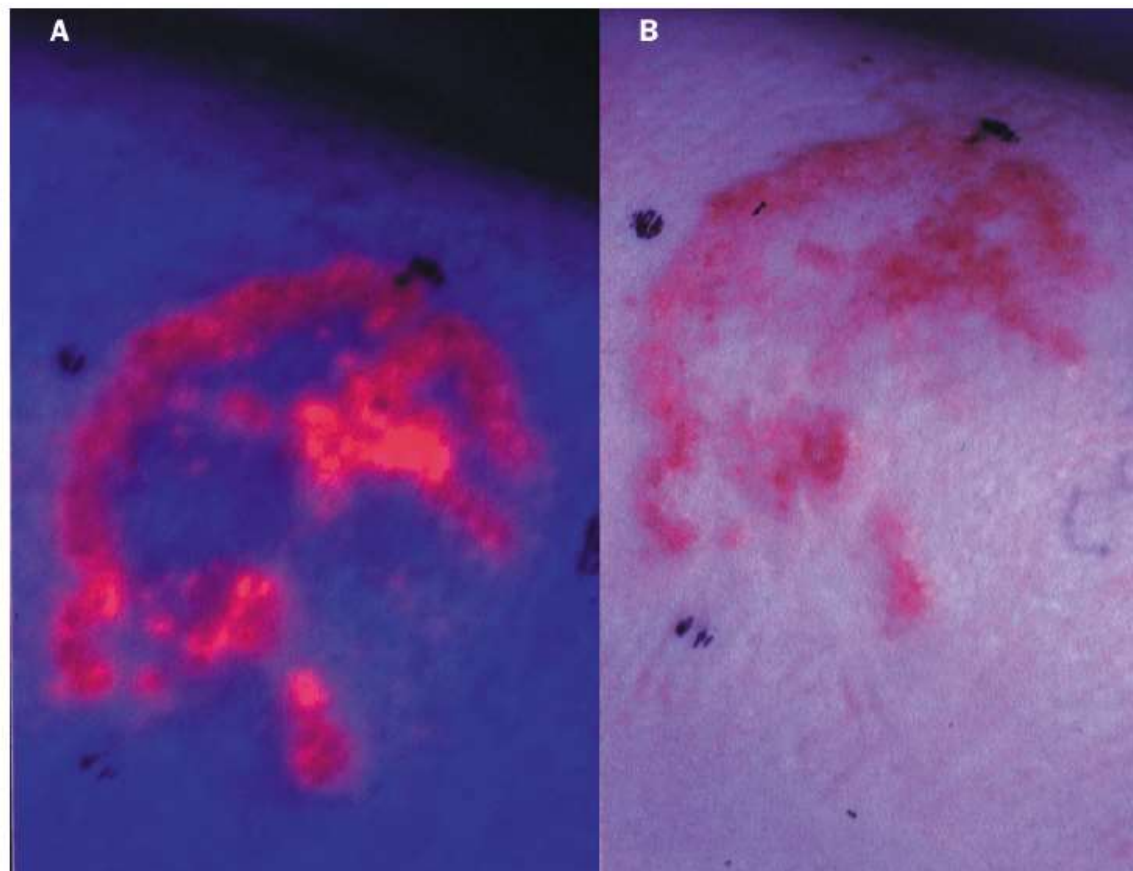


Figure 4. Tumour selectivity of methyl aminolevulinate. The pattern of fluorescence induced by methyl aminolevulinate is clearly limited to abnormal tissue (A), when compared with the outline of the tumour as seen under white light (B).