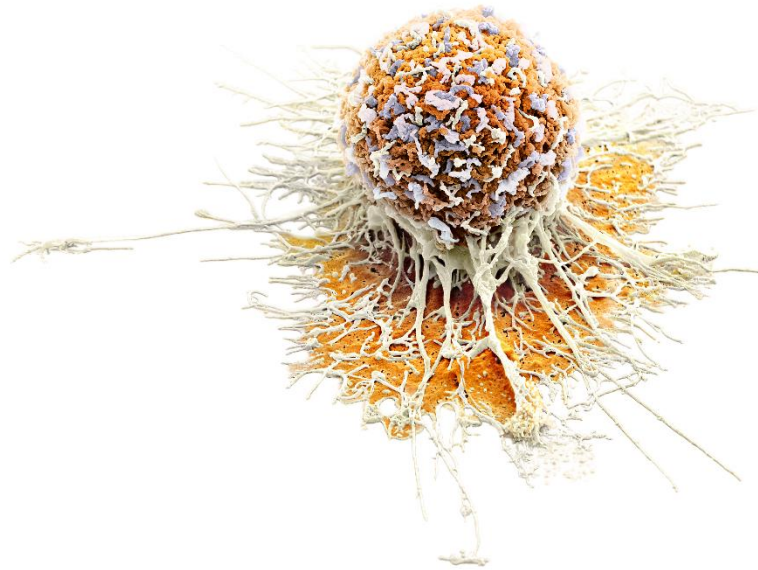


Cytostatika – mechanismus účinku, terapie a rezistence



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

Cílené a biologické terapie

Klasická cytostatika – nízká účinnost a negativní vedlejší efekty, riziko sekundárních malignit

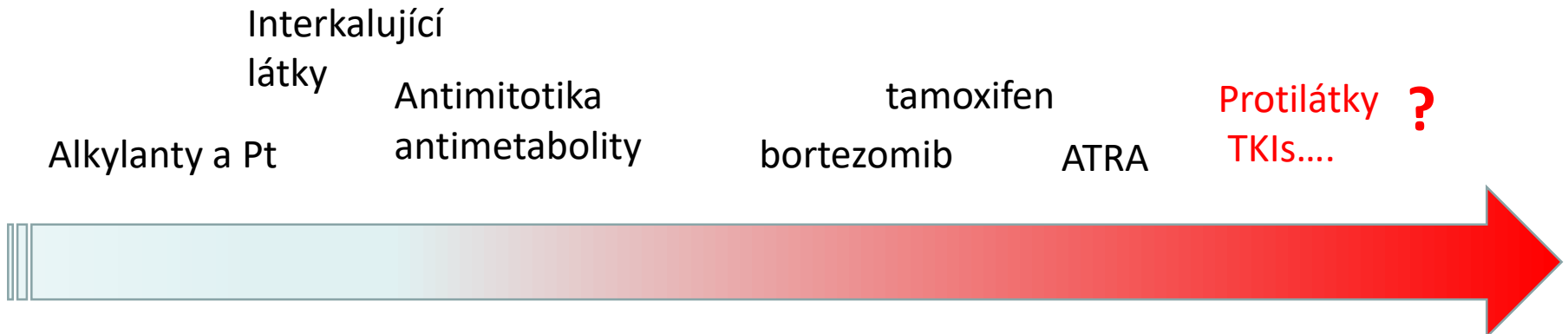
Specifičnost

Cílenost ?

Na rychle proliferující (nádorovou) buňku?

Na konkrétní molekulu?

Na konkrétní molekulu kvalitativně nebo kvantitativně změněnou?





Cílené (více či méně) **terapie**

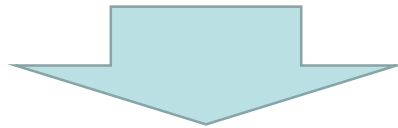
- Látky zasahují do epigenetické informace
- Látky ovlivňující syntézu a degradaci bílkovin
- Diferenciační terapie
- Fotodynamická terapie
- **Inhibitory tyrozinkináz**
- **Inhibitory Ser/Thr kináz a dalších proteinů**
- **Terapeutické protilátky**
- **CAR-T buňky**

Cílené a biologické terapie

Je snazší něco rozbít, než opravit

Terapeutické cíle nádorových buněk – (nejen) anti-onkogeny nebo onkogeny.

Gatekeepers and caretakers? (anti-onkogeny jako p53, DNA repair...)
Zpravidla utlumeny nebo inaktivovány/mutovány v nádorových buňkách
X je komplikované obnovit jejich aktivitu



Inaktivace pro-proliferačních proteinů over-exprimovaných, mutovaných nebo jinak aktivovaných

Cílené a biologické terapie

Je snazší něco rozbít, než opravit

Inaktivace pro-proliferačních proteinů (onkogenů) over-exprimovaných, mutovaných nebo jinak aktivovaných

Druggable targets

Inaktivovat lze proteiny s definovanou (enzymatickou) funkcí, které mají jasně **strukturovaný povrch**, vhodným cílem je např. „kapsa“ pro vazbu substrátu nebo místo interakce s jiným proteinem nebo molekulou.

(strukturní požadavek neplatí pro terapeutické protilátky)

? Přispívá protein svou (nadměrnou/změněnou) funkcí k onemocnění?

? Je tento protein druggable?

? Známe detailně jeho molekulární strukturu?

? Kde všude je exprimován? Jaká je jeho role v ostatních tkáních?

Cílená terapie - malé molekuly

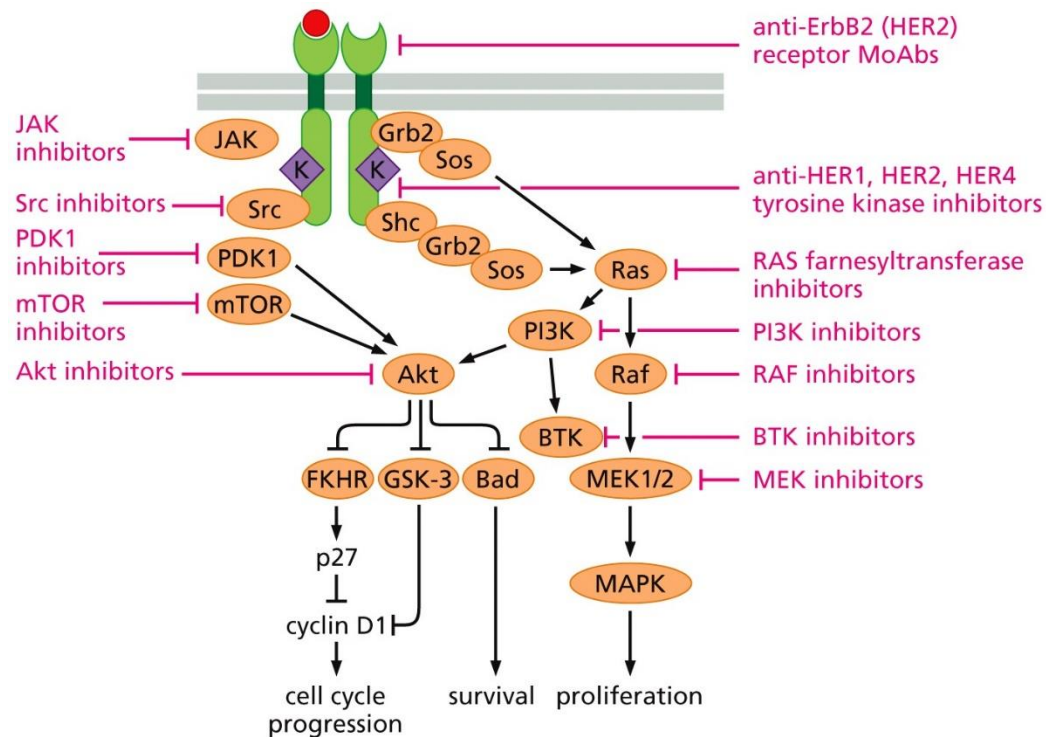
Jasná aktivita a struktura, snazší je inhibovat, než zvyšovat aktivitu

Inhibice enzymatické aktivity

Přes 500 kináz, cca 90 tyrozinkinázy. Vysoká homologie ATP-vazebné místo (dutina, zářez) receptorových i nereceptorových kináz
Možnost zásahu na více stupních (downstream signalizace)

P-P interakce

(snaha o interferenci s komplexy p53/Mdm2 a Bcl2/BH3 only proapoptotickými proteiny)



Cílené a biologické terapie

- **Inhibitory tyrozinkináz**
- **Inhibitory ser/thr kináz**
- **Inhibitory dalších bílkovin**
- **Terapeutické protilátky**
- **Imunoterapie a CAR-T buňky**

Inhibitory kináz a dalších bílkovin

Inhibitory tyrozinkináz

BCR-ABL

EGFR

BTK

PI3K δ

mBRAF

ALK

Inhibitory mTOR (Ser/Thr kináza)

mTOR

CDK4/6

Inhibitory dalších proteinů

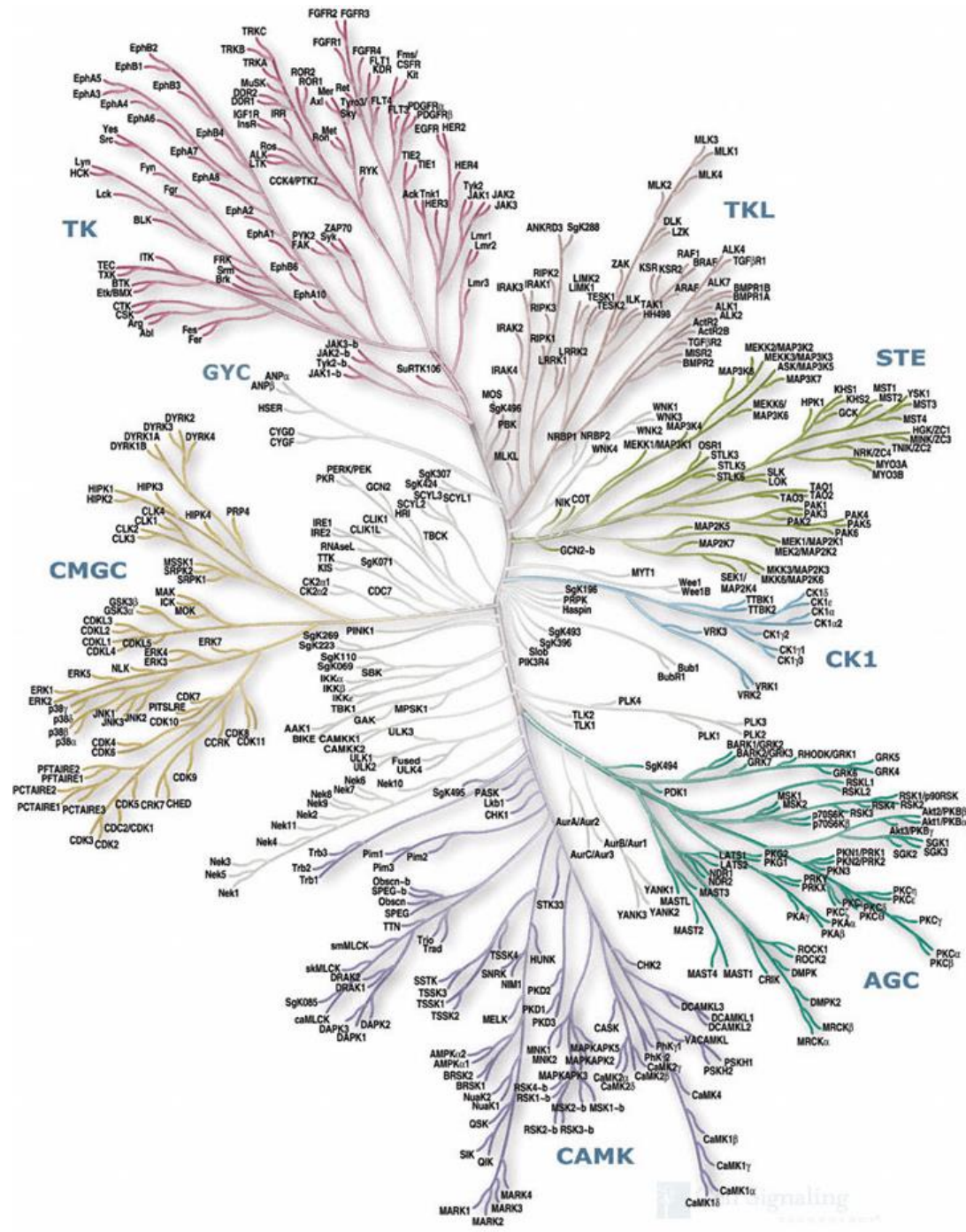
PARP

BCL2

EZH2

Exportin

Inhibitory proteazómu



Vysoká strukturální podobnost Ser/Thr kináz a tyrozinkináz

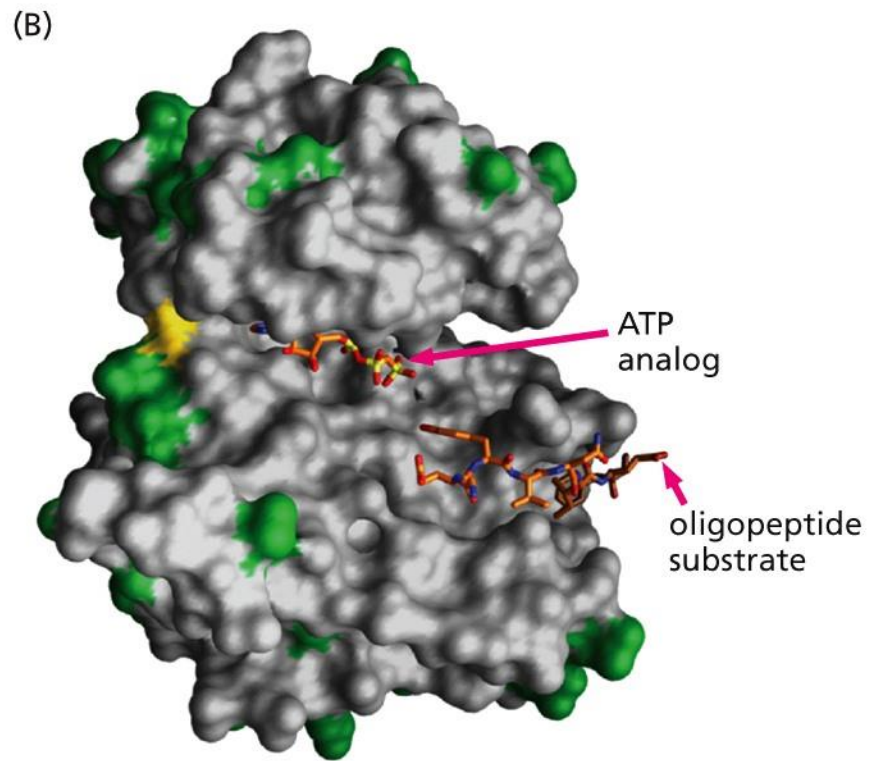
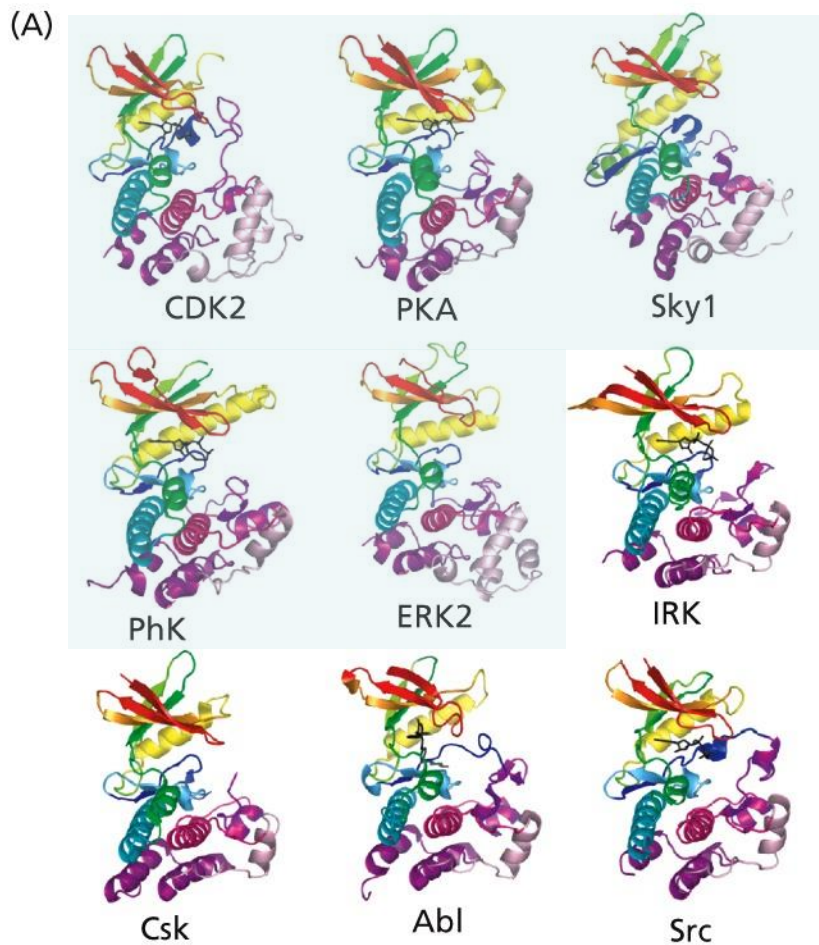
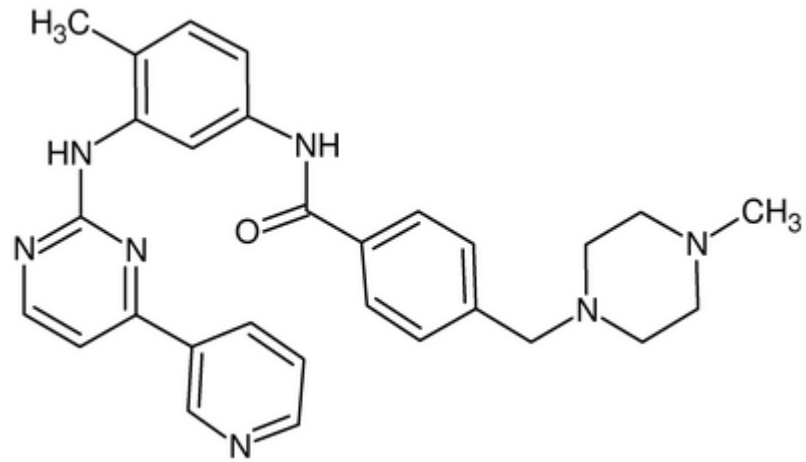


Figure 16.12 The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

Minimální rozdíly ve struktuře IRK a IGF-1R

Gleevec (imatinib mesylate)



Chronická myeloidní leukémie (CML)

95% pacientů s CML má translokaci t(9;22)

Vzniká tak filadelfský (Ph) chromozóm

Vzniká některá z variant fúzního

proteinu BCR-ABL
(konstitutivně aktivní tyrozinkináza)



Aktivace

Ras, PI3K-Akt/PKB, JAK-STAT,

Aktivace TF: Myc, Jun, NFκB

Výskyt různých variant

i v jiných typech leukemie (ALL, AML)

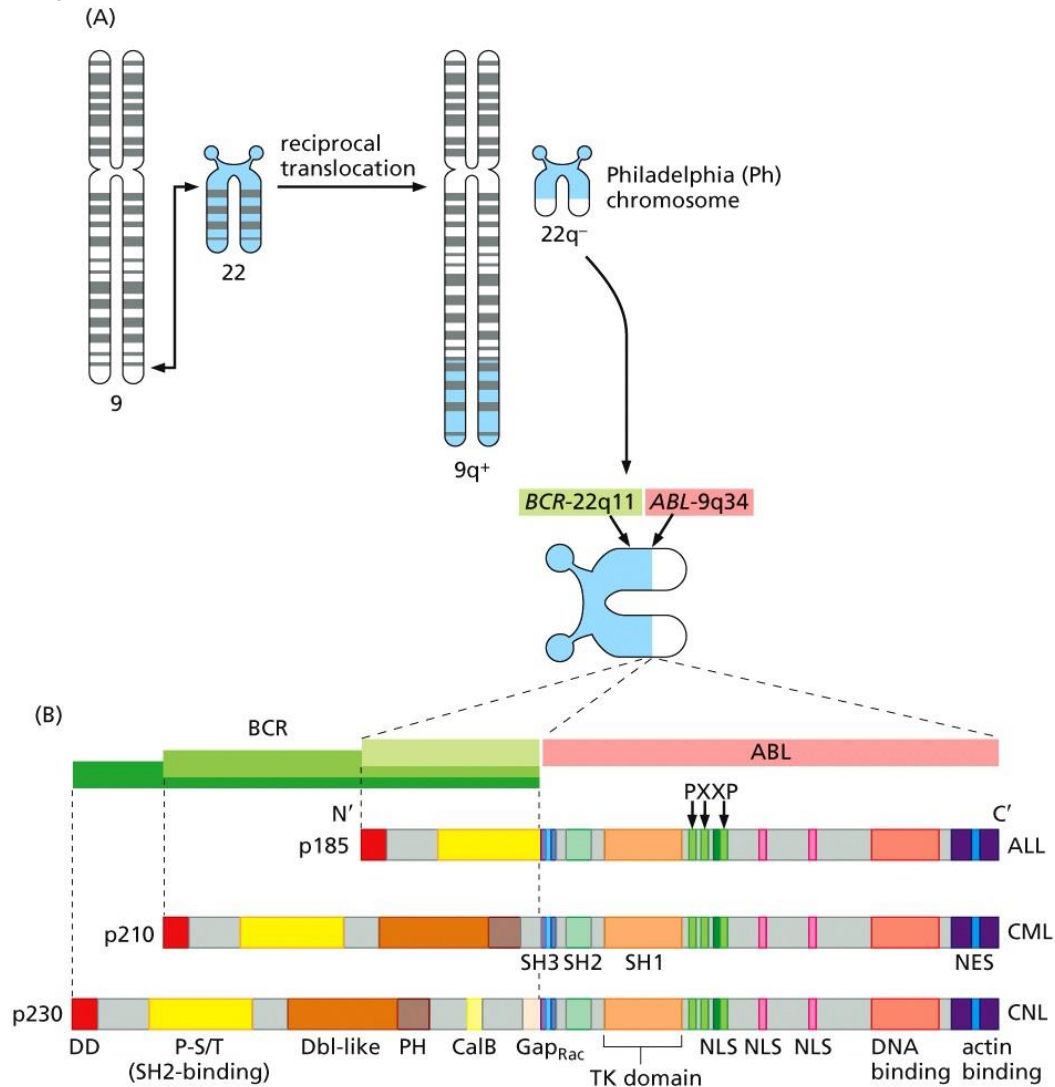


Figure 16.22 The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

Gleevec (imatinib mesylate)

Testy v 1996-2000

Schválen 2001 pro terapii CML

Vysoce specifický pro

ATP-vazebný zářez BCR-ABL

(Jen 4 TK jsou inaktivovány)

Nebrání vazbě ATP, ale stabilizuje
BCR-ABL v inaktivní podobě.

Navozuje dlouhodobou
remisi u většiny pacientů s CML.

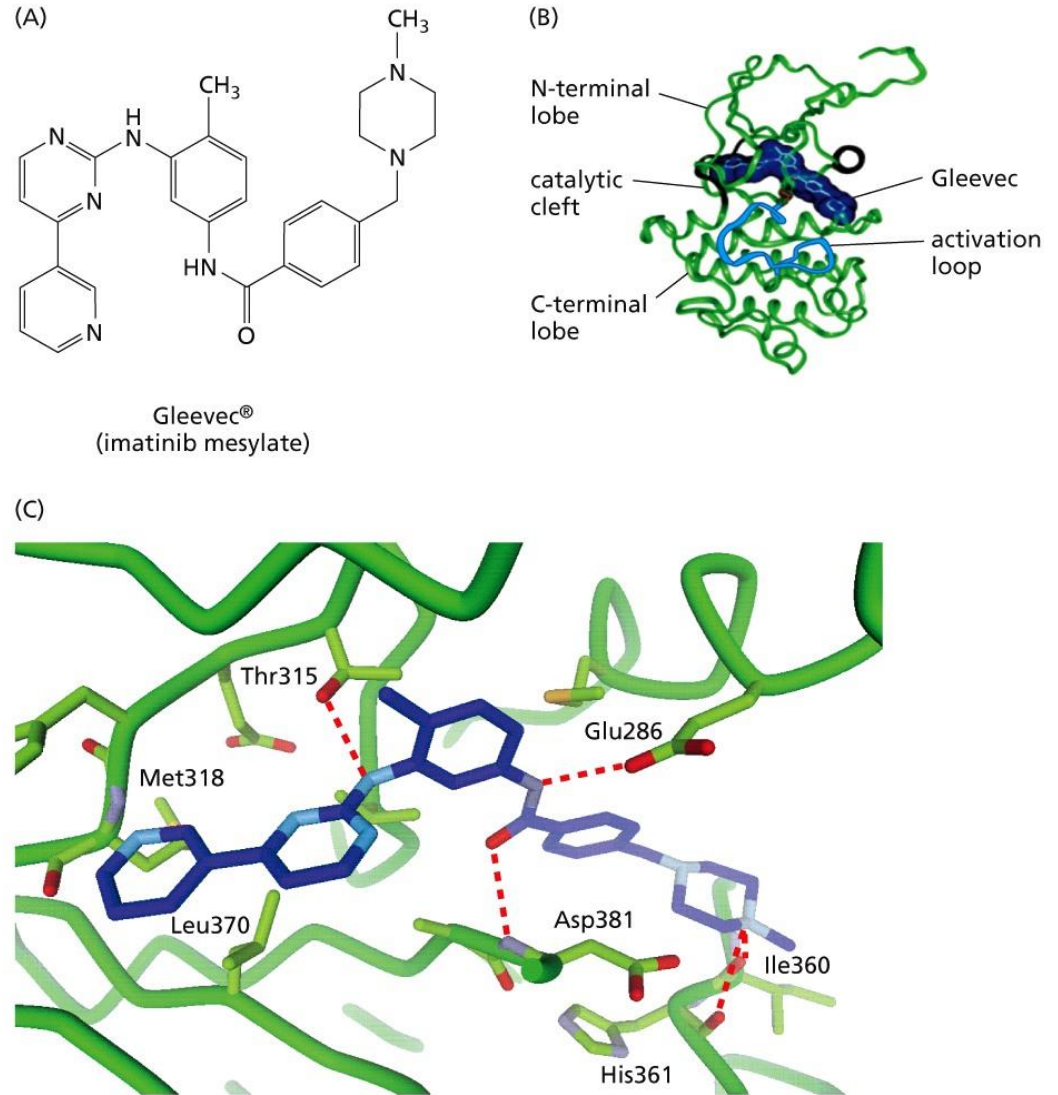


Figure 16.10 The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

Gleevec (imatinib mesylate)

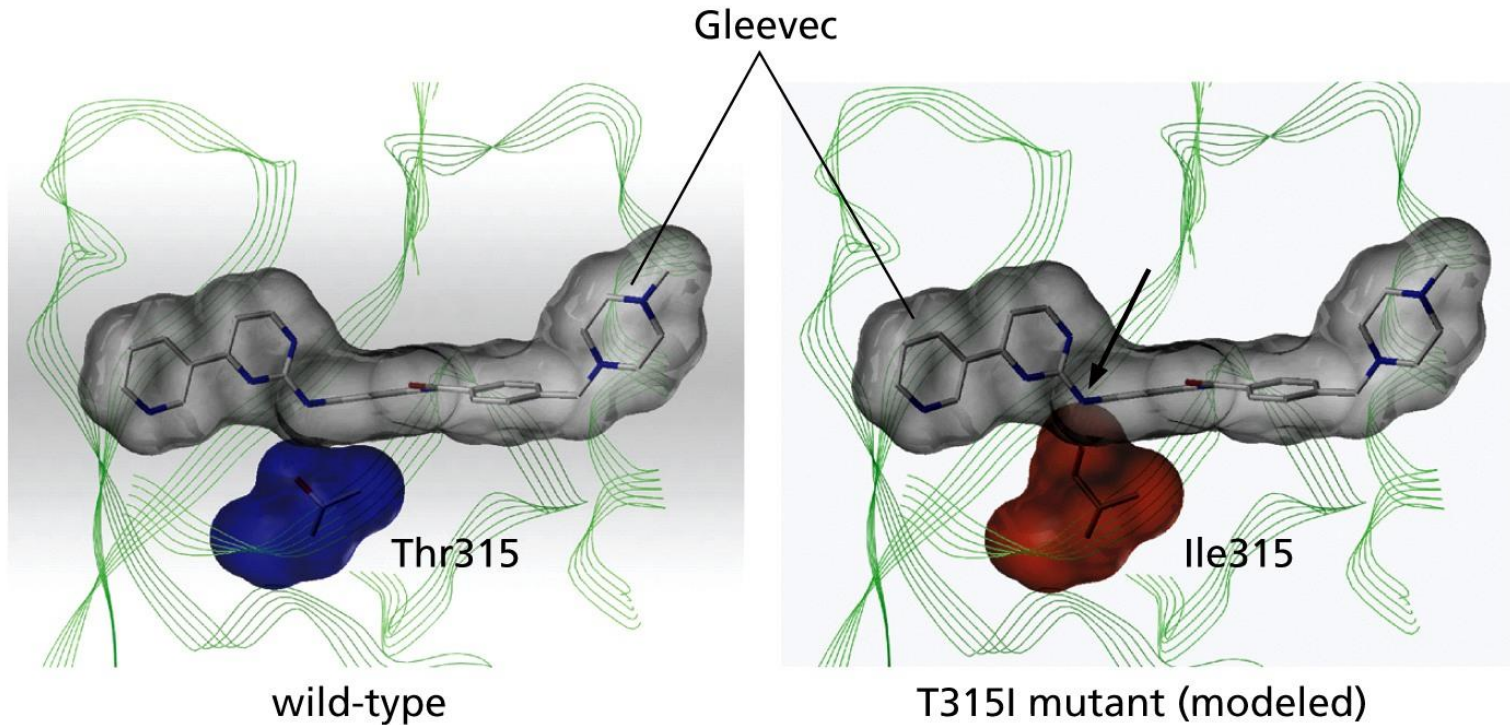


Figure 16.24b The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

Část pacientů s CML získá rezistenci na imatinib, často **mutací vazebného místa**
- Vyvinuta řada inhibitorů nových – **nilotinib, dasatinib, ponatinib**

Off-target aktivita imatinibu

Gleevec (imatinib mesylate)

Jen 4 z 90 TK jsou inaktivovány (BCR-ABL, v-ABL, PDGFR, Kit)

Jednou z nich **Kit receptor** aktivovaný/mutovaný u vzácných a těžko léčitelných **gastro-intestinálních stromálních tumorů (GIST)**

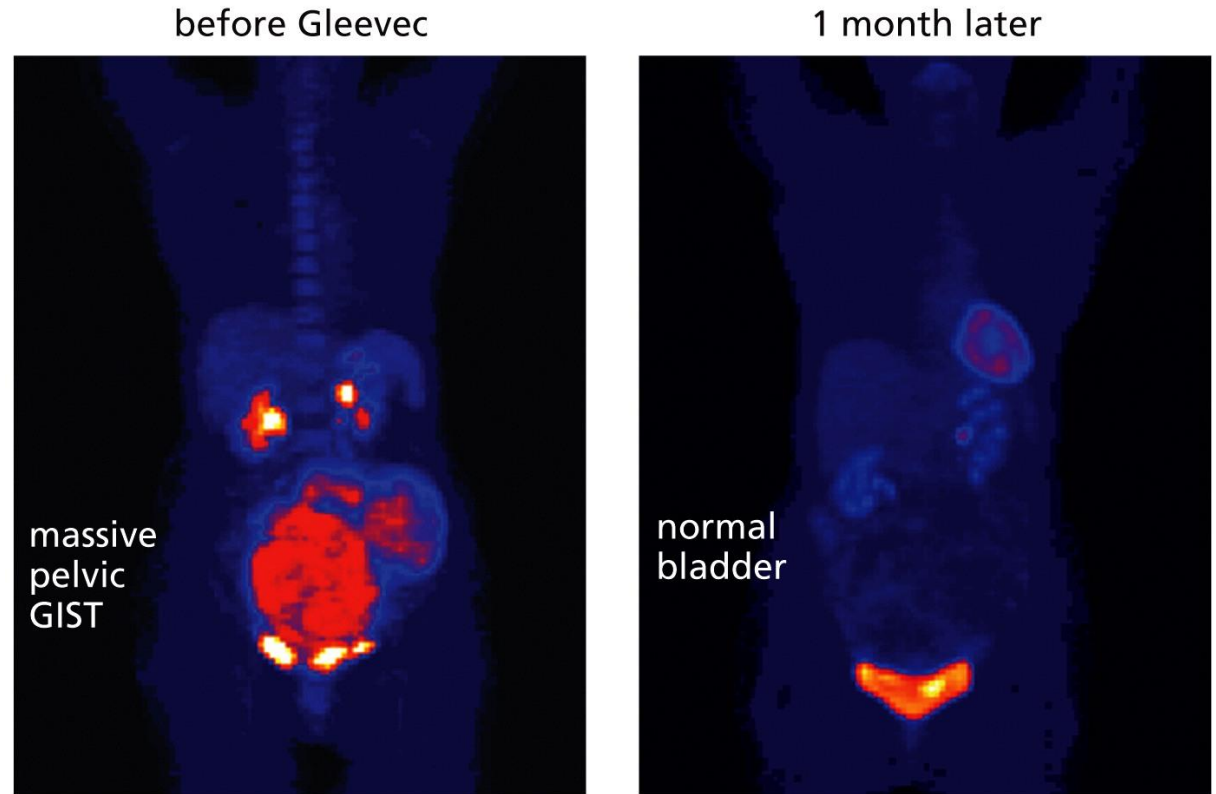


Figure 16.27a The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

Inhibitory receptorové tyrozinkinázy EGFR-1/HER1

(epidermal growth factor receptor 1)

EGFR je aktivován/overexprimován u 1/3 karcinomů

Může vytvářet heterodimery s HER2

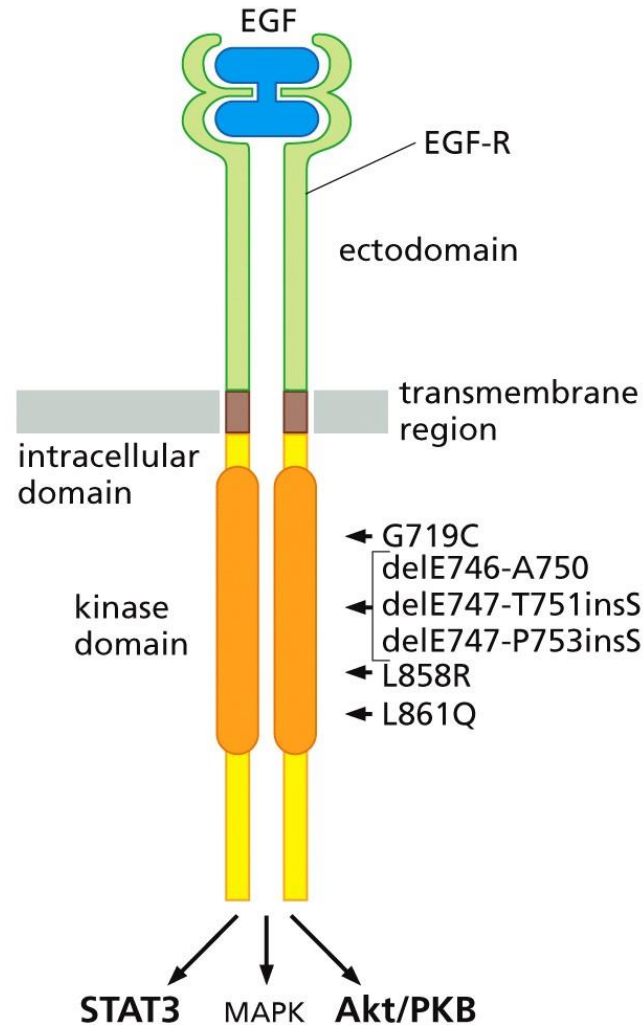


Figure 16.30b The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

Tarceva (erlotinib) a Iressa (gefitinib)

Blokace ATP vazebného místa, terapie ca. plic

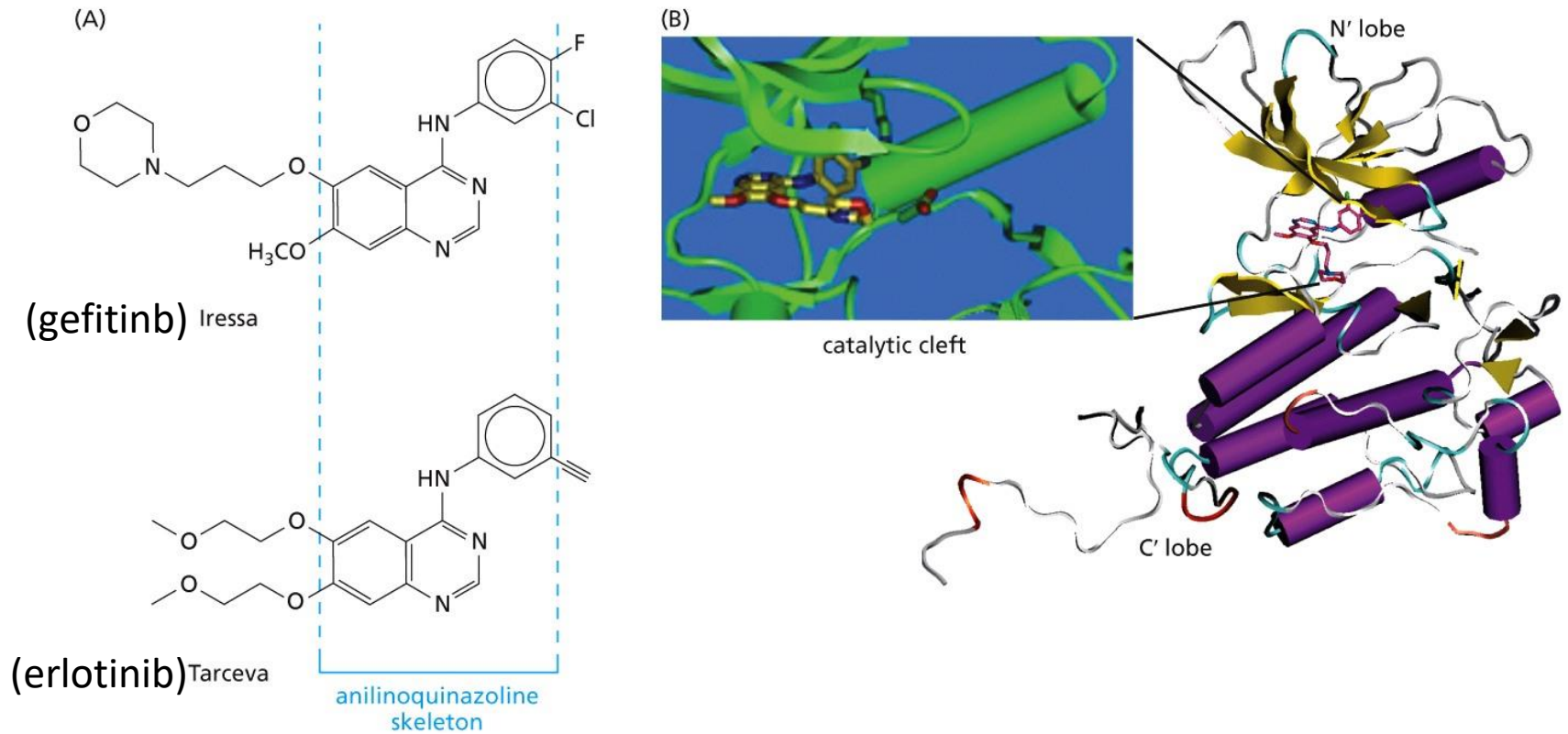


Figure 16.29 The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

Tarceva (erlotinib)

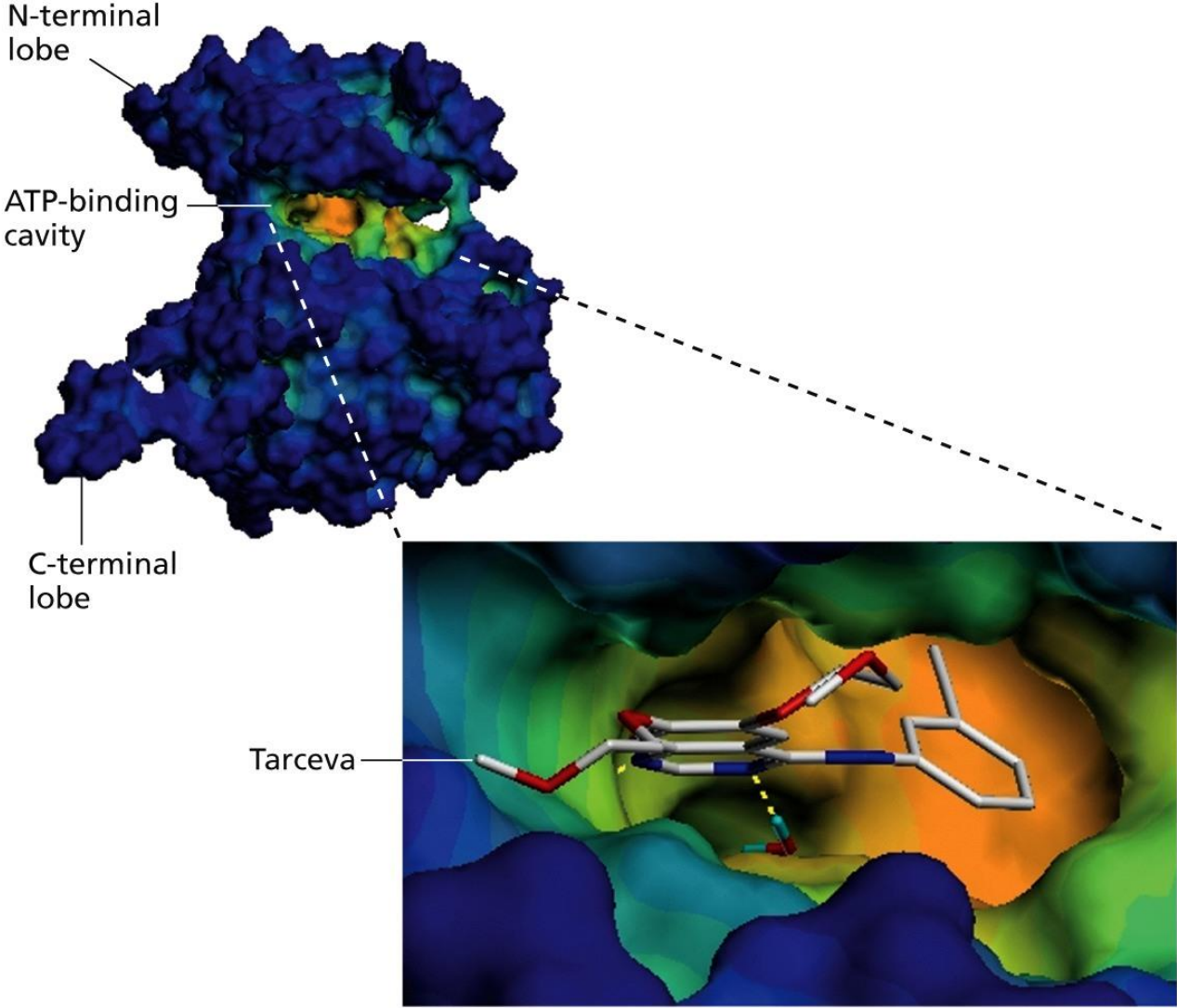


Figure 16.13 The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

Tarceva (erlotinib) a Iressa (gefitinib)

2004-2005 Schváleny pro terapii nemalobuněčného karcinomu plic

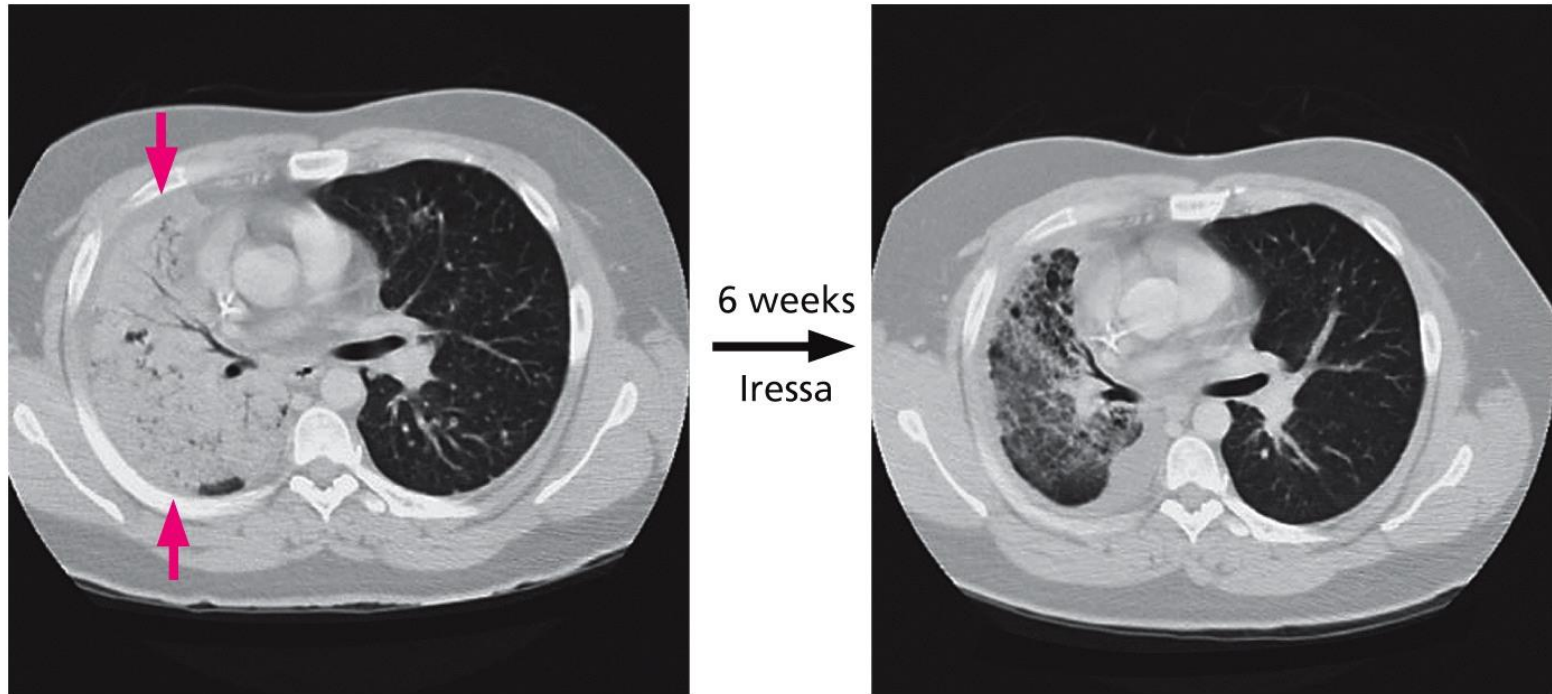


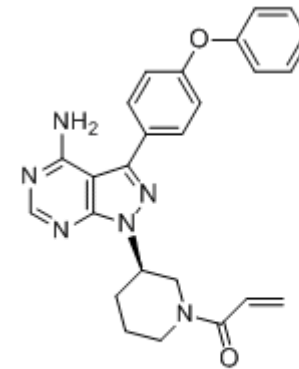
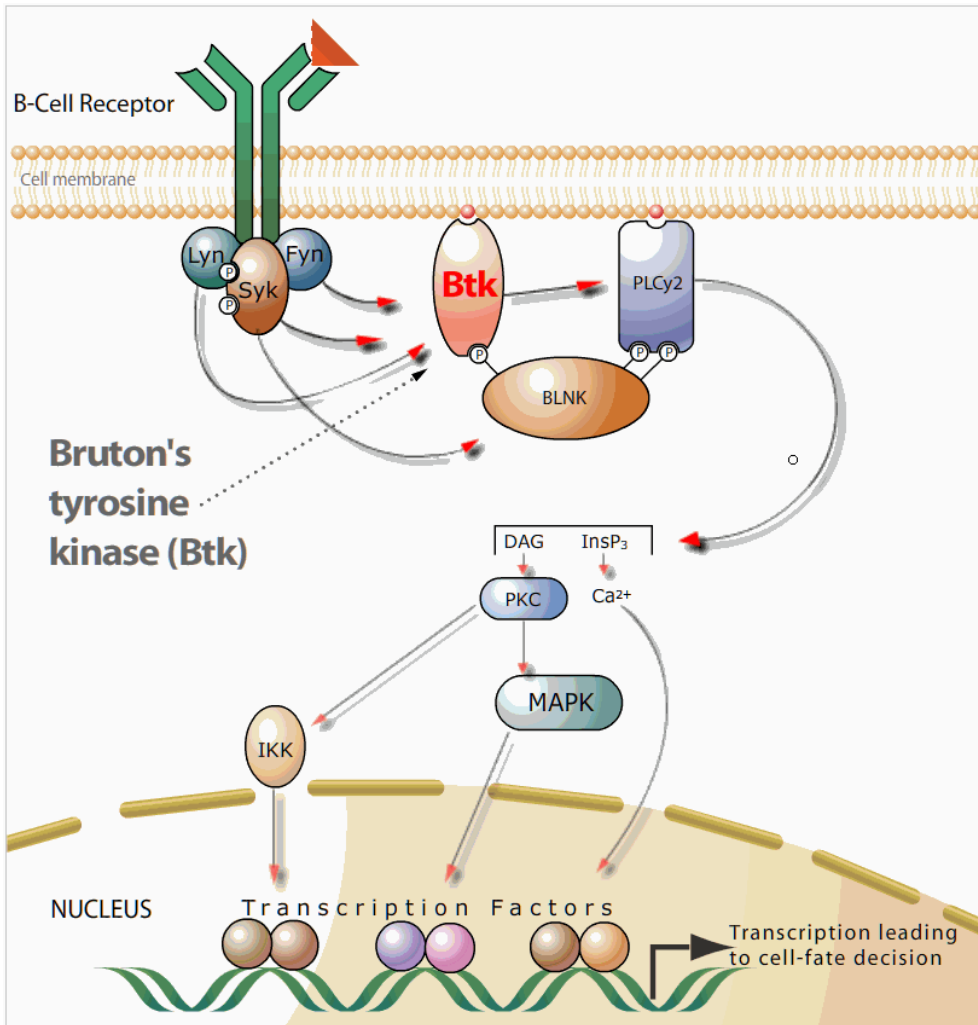
Figure 16.30a The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

Ústup nemalobuněčného karcinomu plic po 6 týdnech terapie gefitinibem (Iressa)

Inhibitory BTK (Bruton's tyrosine kinase)

BTK se podílí na B-buněčné signalizaci (přežití, maturace a proliferace B-buněk)

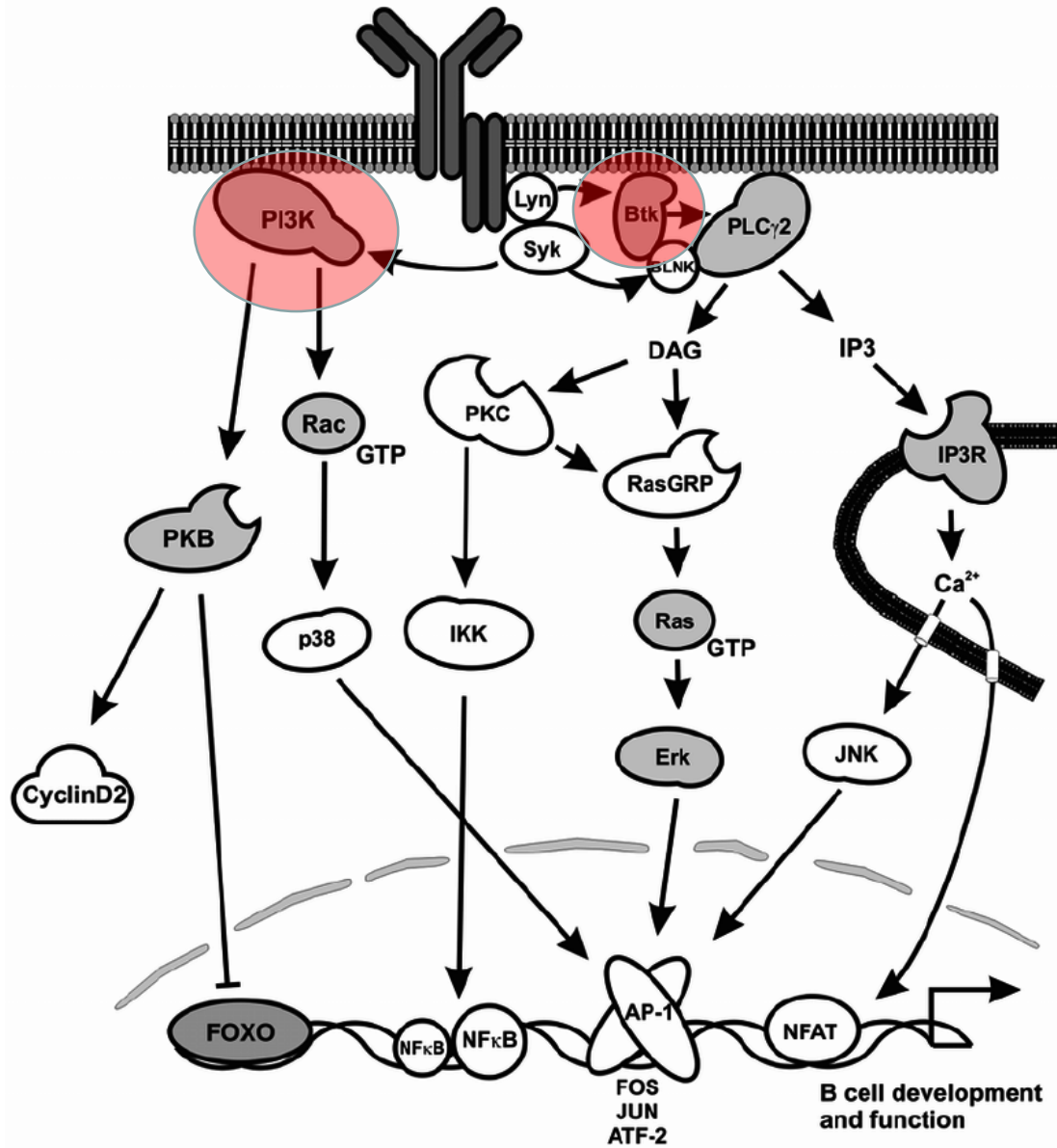
Schválen 2013 k terapii některých B-buněčných lymfomů a CLL



ibrutinib

acalabrutinib
zanubrutinib

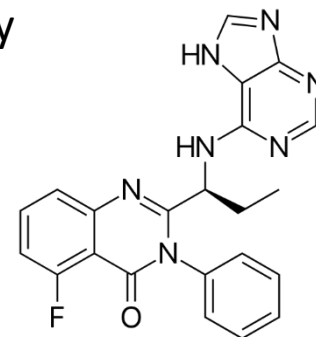
B-buněčná signalizace



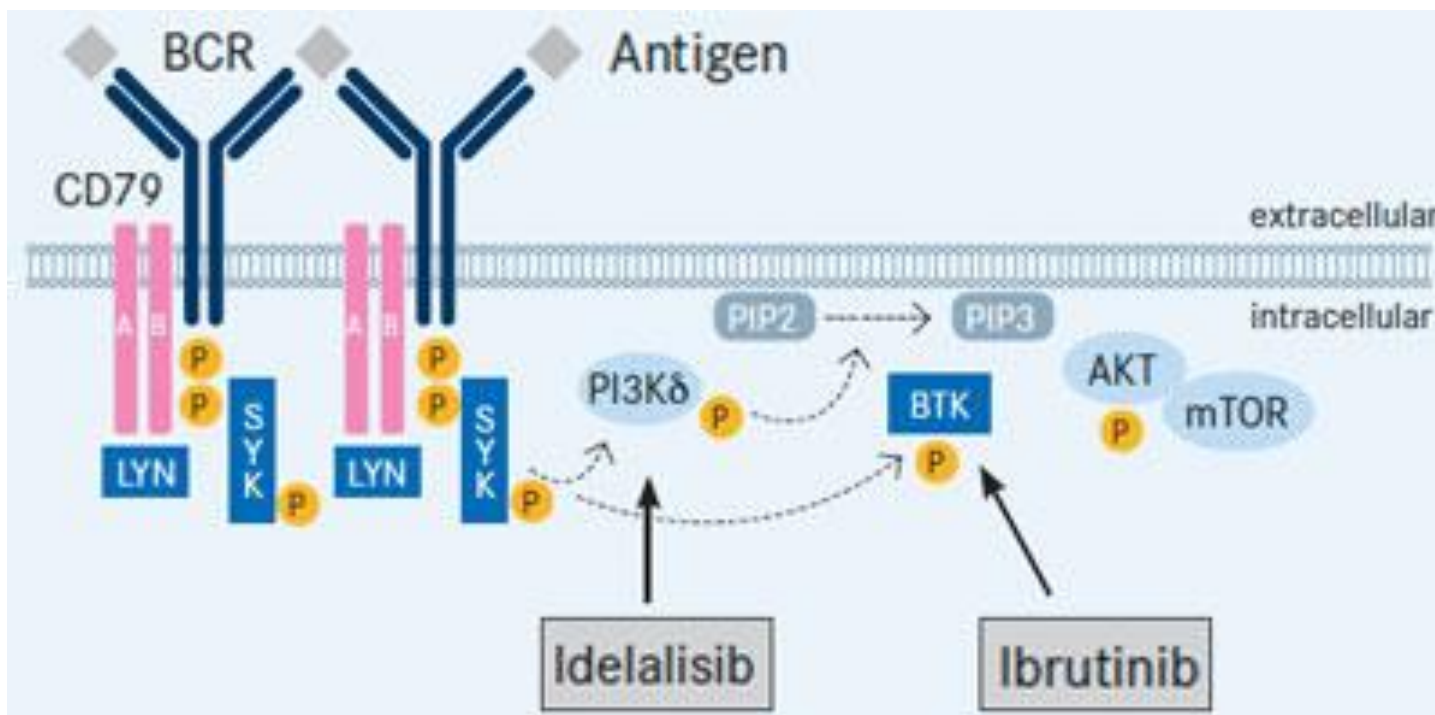
Inhibitory fosfoinositid 3-kinázy (PI3K) – **idelalisib, copanlisib**

PI3K delta se podílí na B-buněčné signalizaci (přežití, maturace a proliferace B-buněk)

leukémie a lymfomy

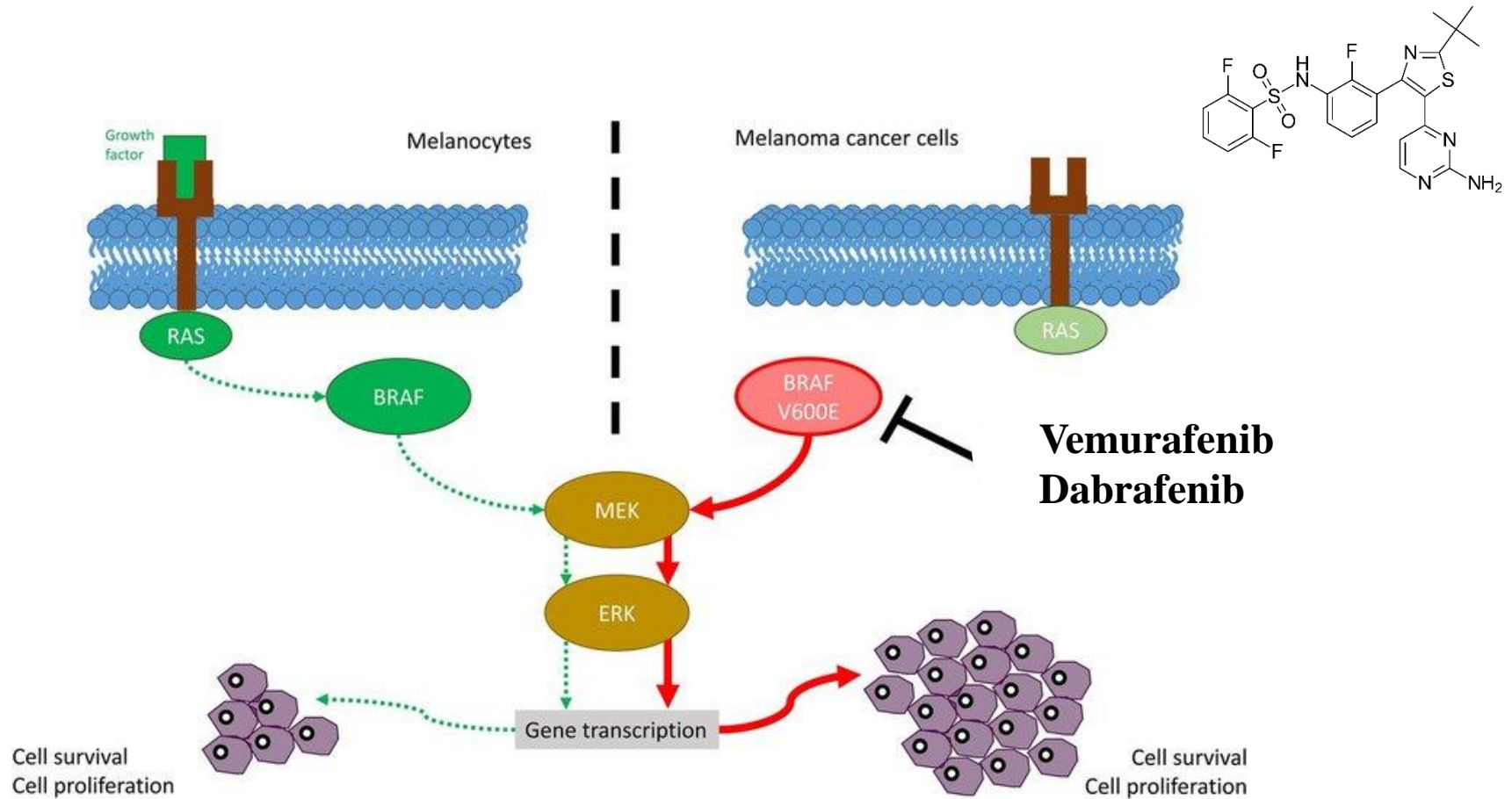


idelalisib



Inhibitor mutované BRAF kinázy – **vemurafenib, dabrafenib**

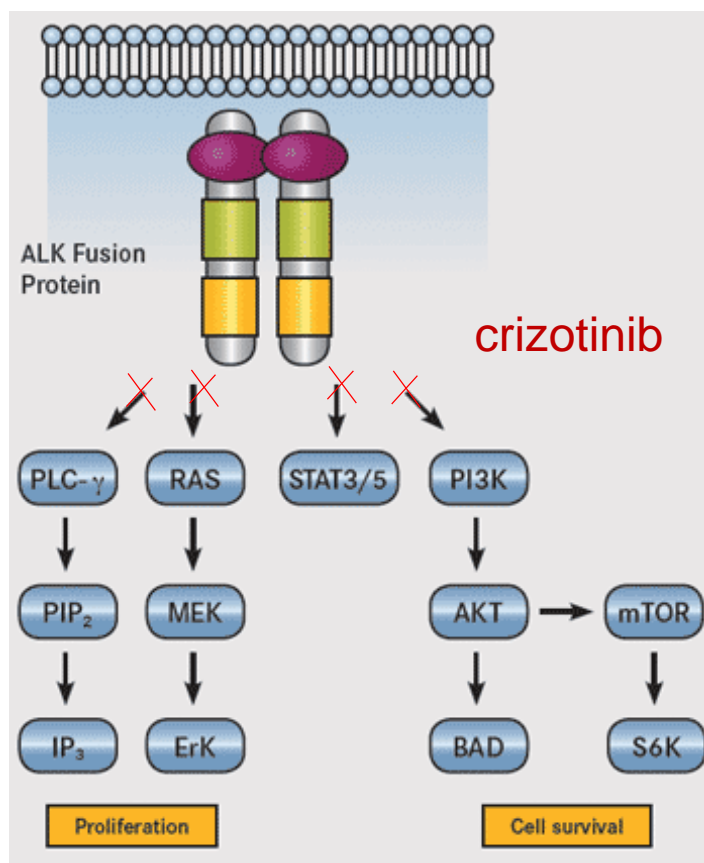
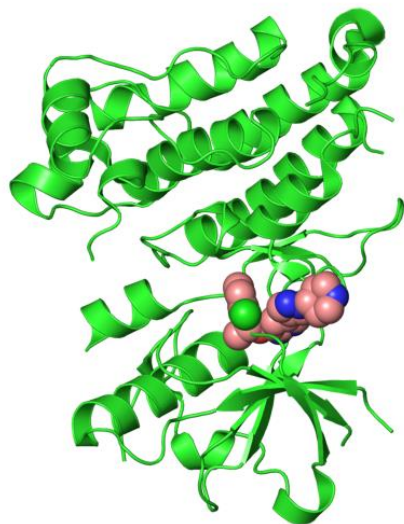
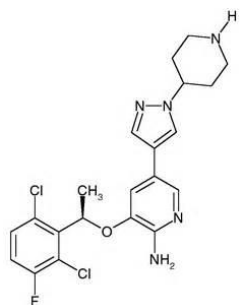
Vemurafenib (Zelboraf) schválen pro léčbu metastazujícího melanomu s V600E **mutací** BRAF



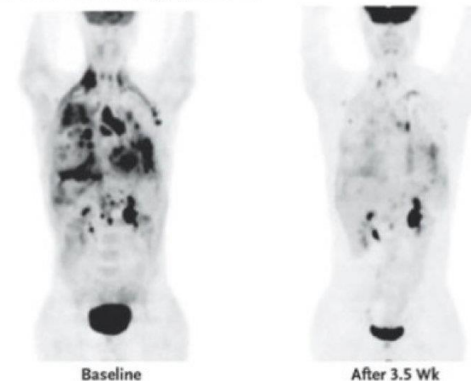
Inhibitor ALK (anaplastic lymphoma kinase) - **crizotinib**

Schválen pro léčbu karcinomů prsu a některých lymfomů a karcinomů plic

ALK je aktivována mutací, over-expresí nebo translokací s výsledným fúzním produktem. ALK Aktivuje PI3K a PLC-gamma a další kinázy



Positron-Emission Tomographic Scans



ALK-pozitivní karcinom plic po terapii

Multikinázové inhibitory

Sunitinib (EGFRA, EGFRB, KIT, RET, FLT3, VEGFR1-3...)

Ponitinib (BCR-ABL, SRC, VEGFR1-3...)

Sorafenib (PDGFRB, VEGFR, KIT, FLT...)

Již více než 40 schválených TKI!

Cílené a biologické terapie

- Inhibitory tyrozinkináz
- **Inhibitory ser/thr kináz**
- Inhibitory dalších bílkovin
- Terapeutické protilátky
- Imunoterapie a CAR-T buňky

Inhibitory mTOR

mTOR – mammalian target of rapamycin
Ser/Thr kináza

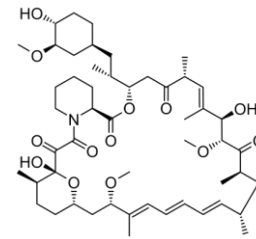
Buněčný růst, proliferace, motilita, proteosyntéza, angiogeneze
Integruje signály z mnoha drah –
tlak kyslíku, dostupnost nutrientů, hladiny ATP, mitogenní signály...

Rapamycin – antibiotikum ze Streptomycety
z velikonočních ostrovů (1960s)

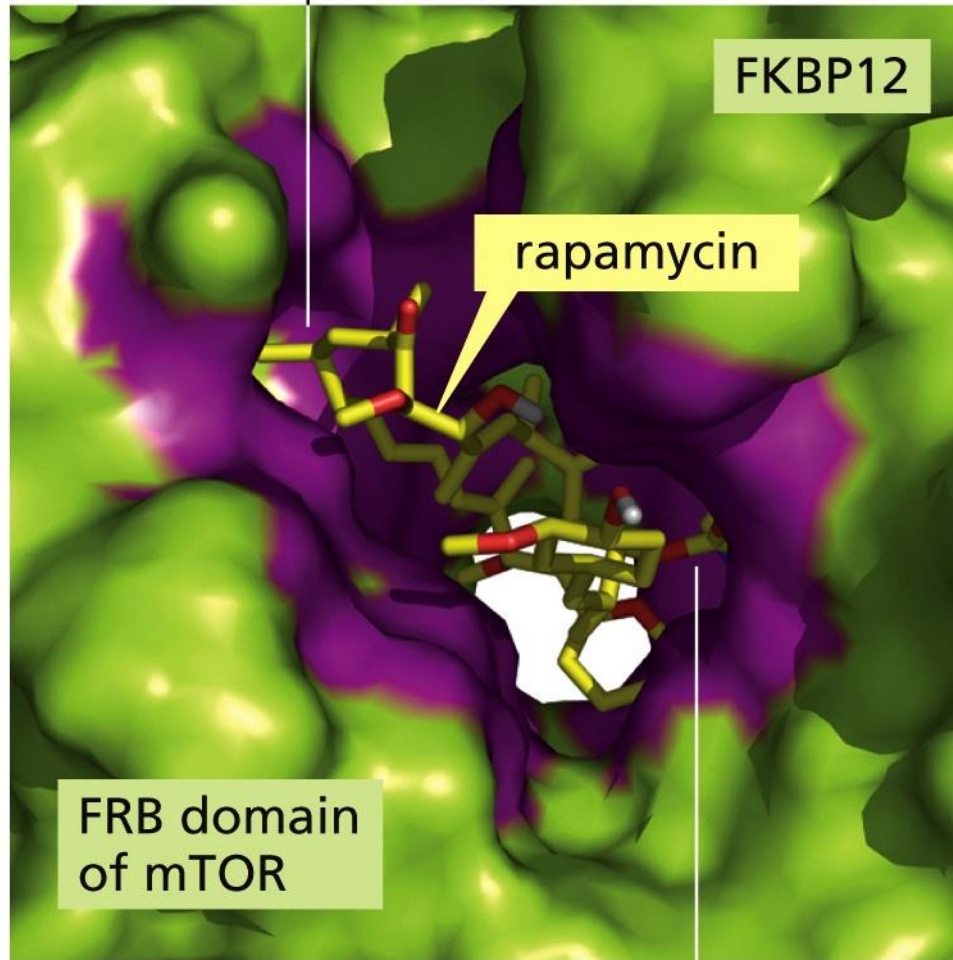
Později demonstrovány imunosupresivní
účinky a identifikován cílový protein

mTOR (mammalian target of rapamycin)

Temsirolimus – schválen pro terapii karcinomu ledvin



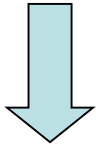
deep burial of rapamycin
methyl group in mTOR



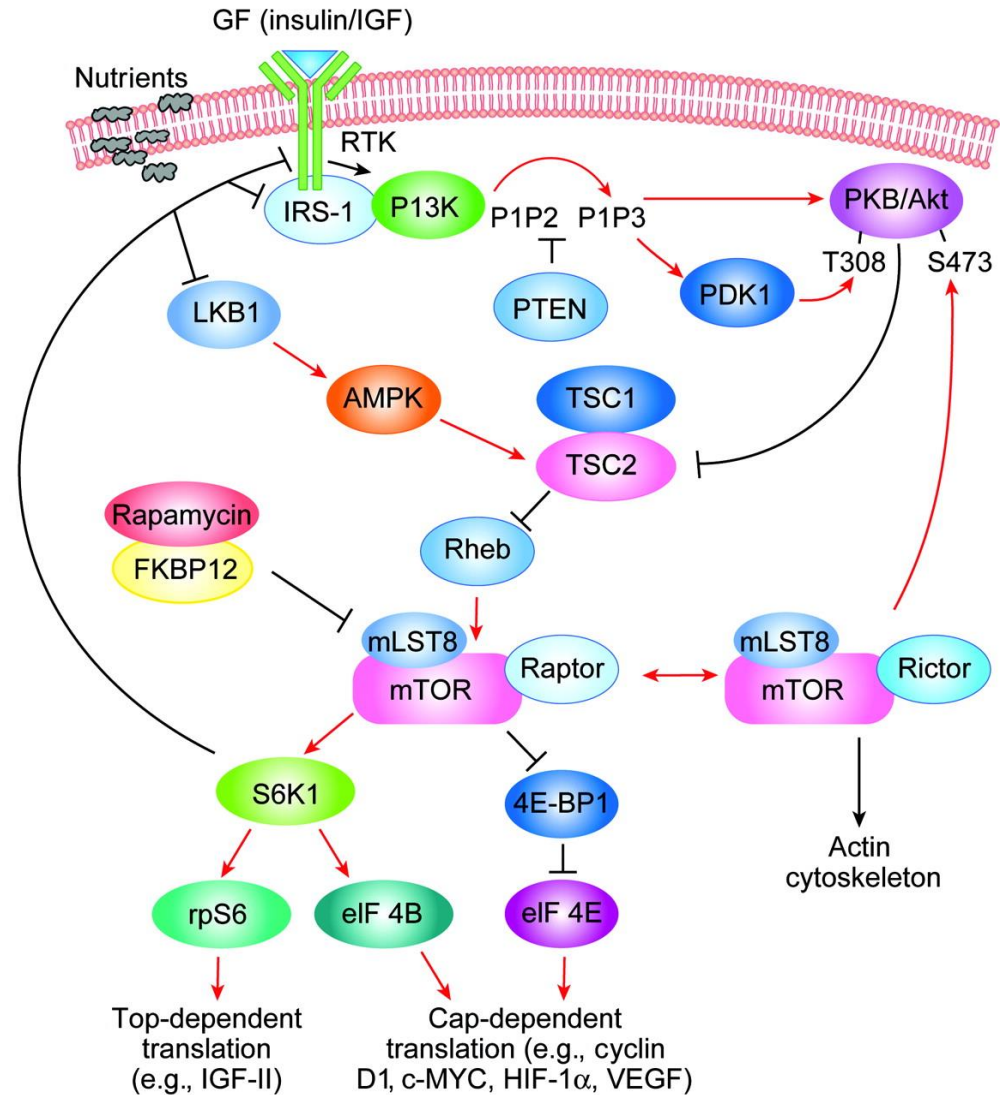
deep burial of rapamycin
pipercolinyl group in FKBP12

mTOR funguje ve dvou komplexech **MTORC1** a **MTORC2**
 (s proteiny **Raptor** a **Rictor**) s odlišnou funkcí

Temsirolimus



Inaktivace Akt/PKB
 a dalších drah

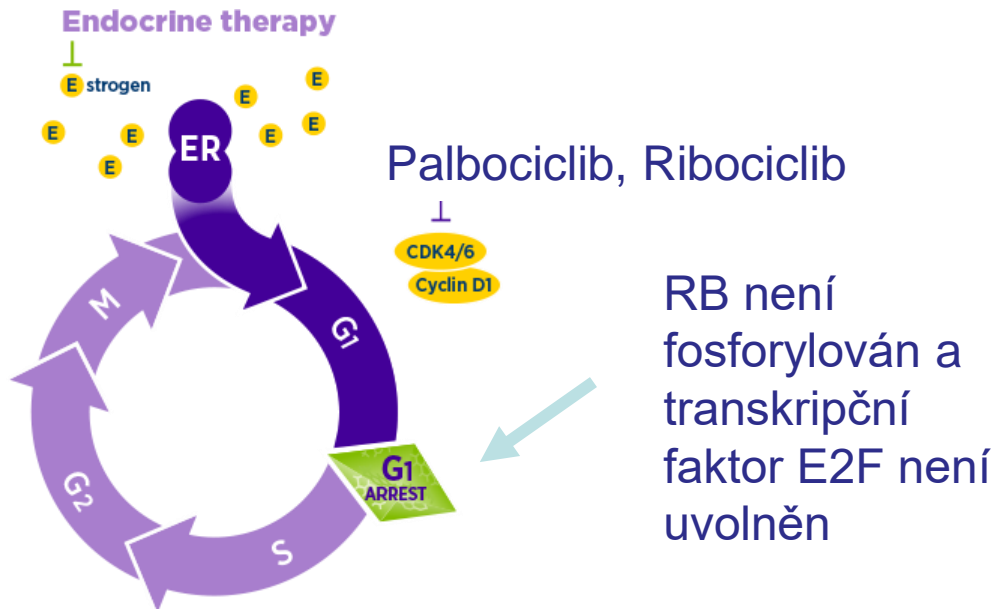
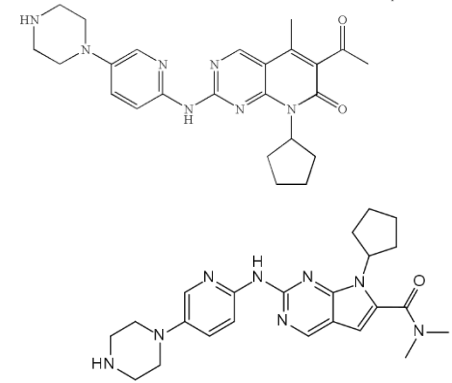


Inhibitory CDK4/6 (Ser/thr kináza)

Palbociclib (2017)

Ribociclib (2017)

v kombinaci s anti-estrogenovou terapií schváleny pro terapii hormone receptor (HR)-pozitivních, human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-negativních pokročilých nebo metastazujících karcinomů prsou
(efekt: inhibice G1-S přechodu, G1 arrest)



Cílené a biologické terapie

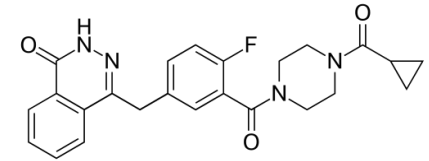
- Inhibitory tyrozinkináz
- Inhibitory ser/thr kináz
- **Inhibitory dalších bílkovin**
- Terapeutické protilátky
- Imunoterapie a CAR-T buňky

Inhibitory poly [ADP-ribózo] polymerázy 1 (PARP)

Olaparib (Lynparza)

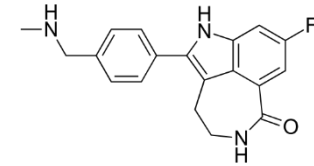
Inhibuje enzym PARP-1 (BER DNA repair)

Schválen 2014 (karcinom ovária s BRCA mutací)

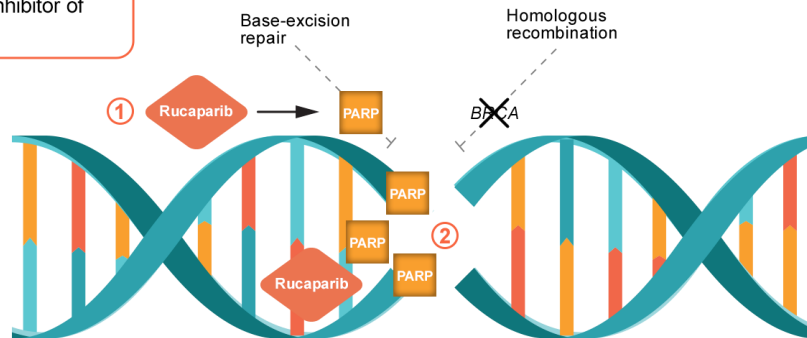


Rucaparib (Rubraca)

Schválen 2016 (karcinom ovária s BRCA mutací)



Rucaparib is an inhibitor of PARPs 1-3



Based on in vitro studies, cytotoxicity induced by rucaparib involves:

- ① Inhibition of PARP enzymatic activity
- ② Increased formation of PARP-DNA complexes resulting in DNA damage, apoptosis, and cell death

Inhibitor anti-apoptického proteinu Bcl-2

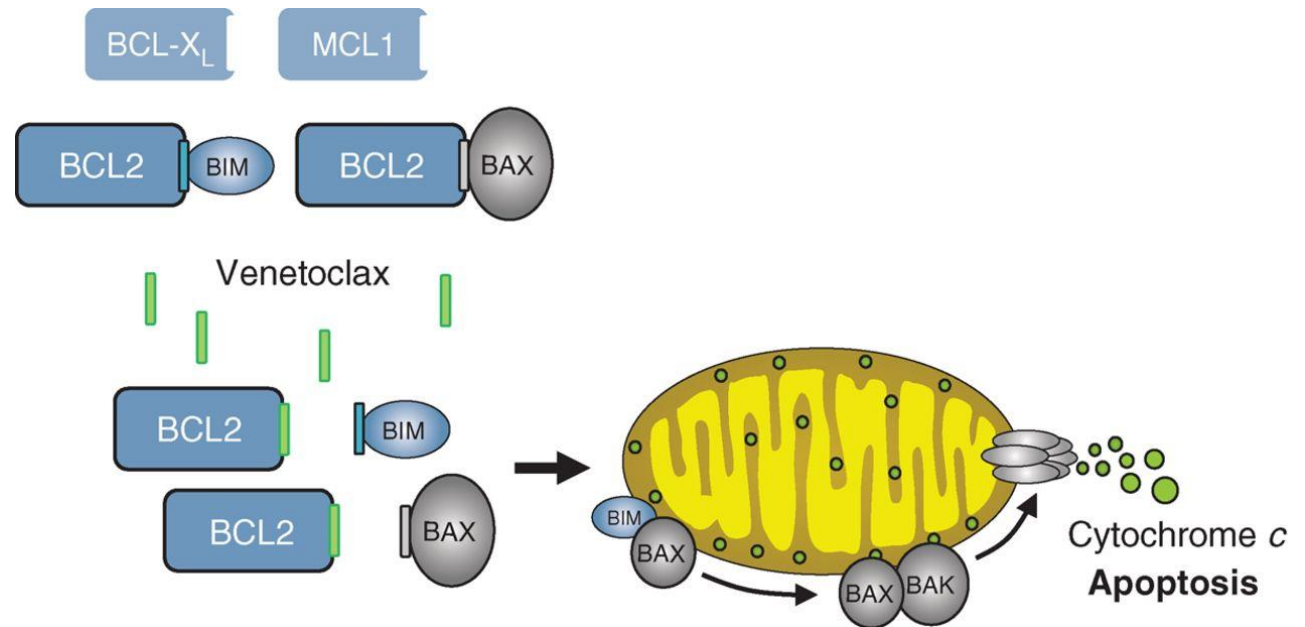
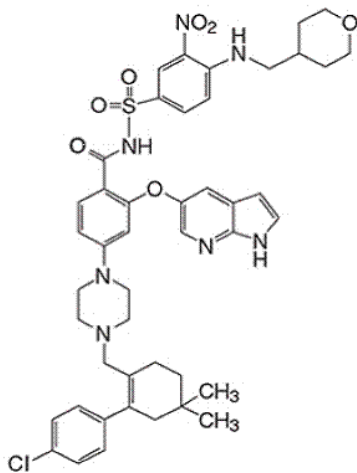
Abt199/VENETOCLAX

(schválen 2016 pro některé typy leukemií)

Blokuje efekt anti-apoptického proteinu Bcl-2.

Inhibovaný Bcl-2 nemůže vázat pro-apoptické Bim a Bax

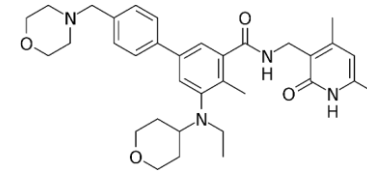
→ Aktivace vnitřní dráhy apoptózy



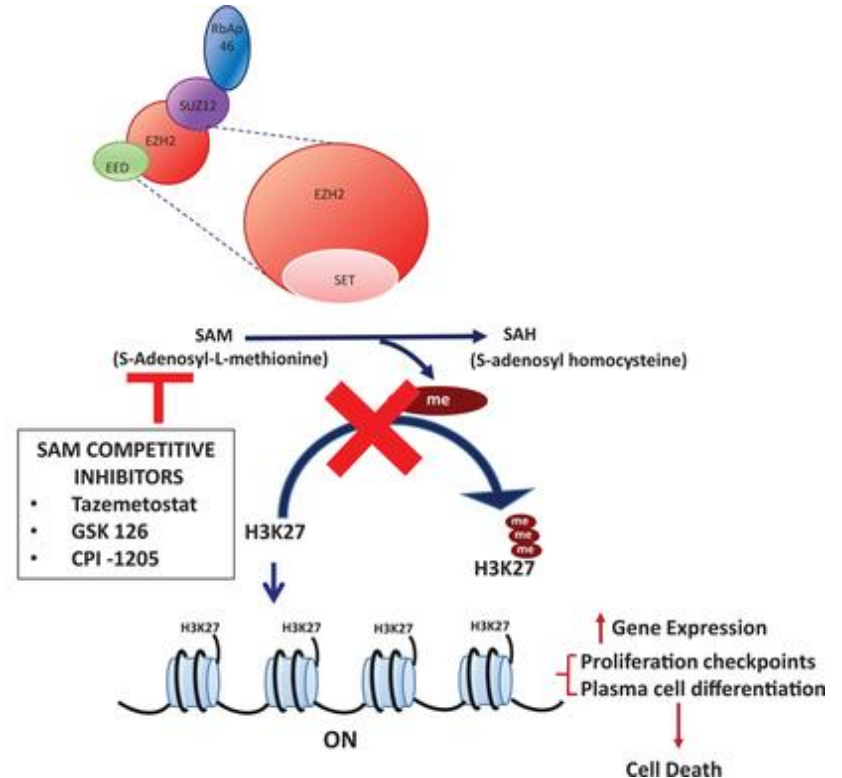
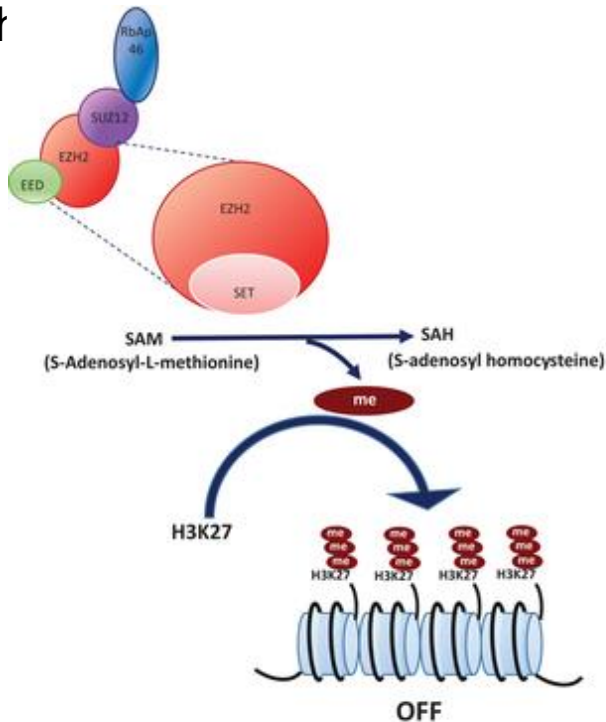
Schváleno 2020-2021

Inhibitor histonmetyltransferázy EZH2

TAZVERIK (tazemetostat) – inhibitor wt i mutované histonmetyltransferázy **EZH2**, (SAM kompetitor)
Terapie některých sarkomů



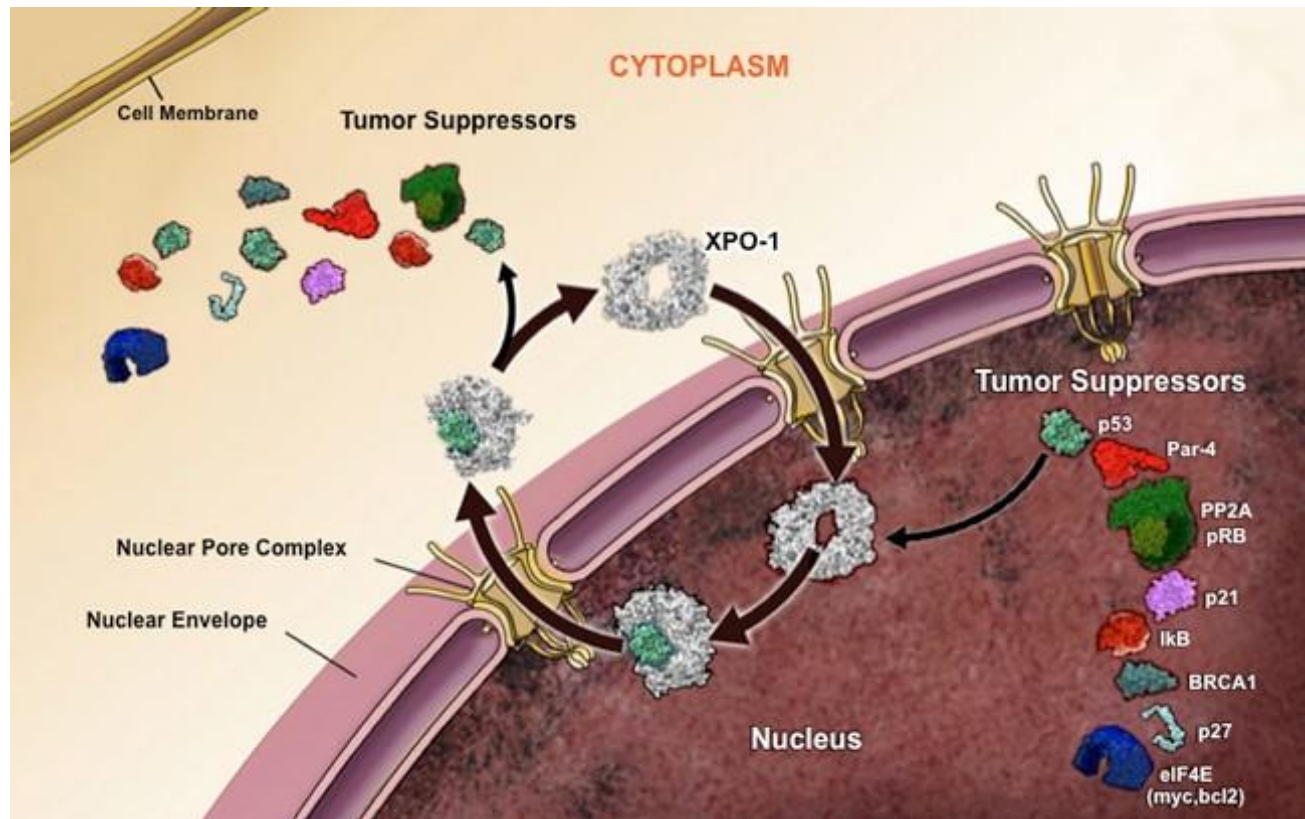
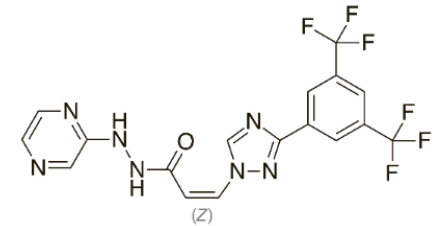
EZH2 je součástí komplexu, který katalyzuje mono-, di-, and trimetylaci lyzinu 27 na histonu H3. Inhibice uvolňuje transkripční represi a vede ke změně transkripční



Inhibitor exportinu 1

Selinexor (XPOVIO) je inhibitor nukleárního exportu (mnohočetný myelom)

Inhibuje exportin 1 (receptor pro transportní signál) a blokuje transport některých proteinů a mRNA mezi jádrem a cytosolem



Cílené a biologické terapie

- Inhibitory tyrozinkináz
- Inhibitory ser/thr kináz
- Inhibitory dalších bílkovin
- **Terapeutické protilátky a jejich konjugáty**
- Imunoterapie a CAR-T buňky

Terapeutické protilátky a protilátkové konjugáty

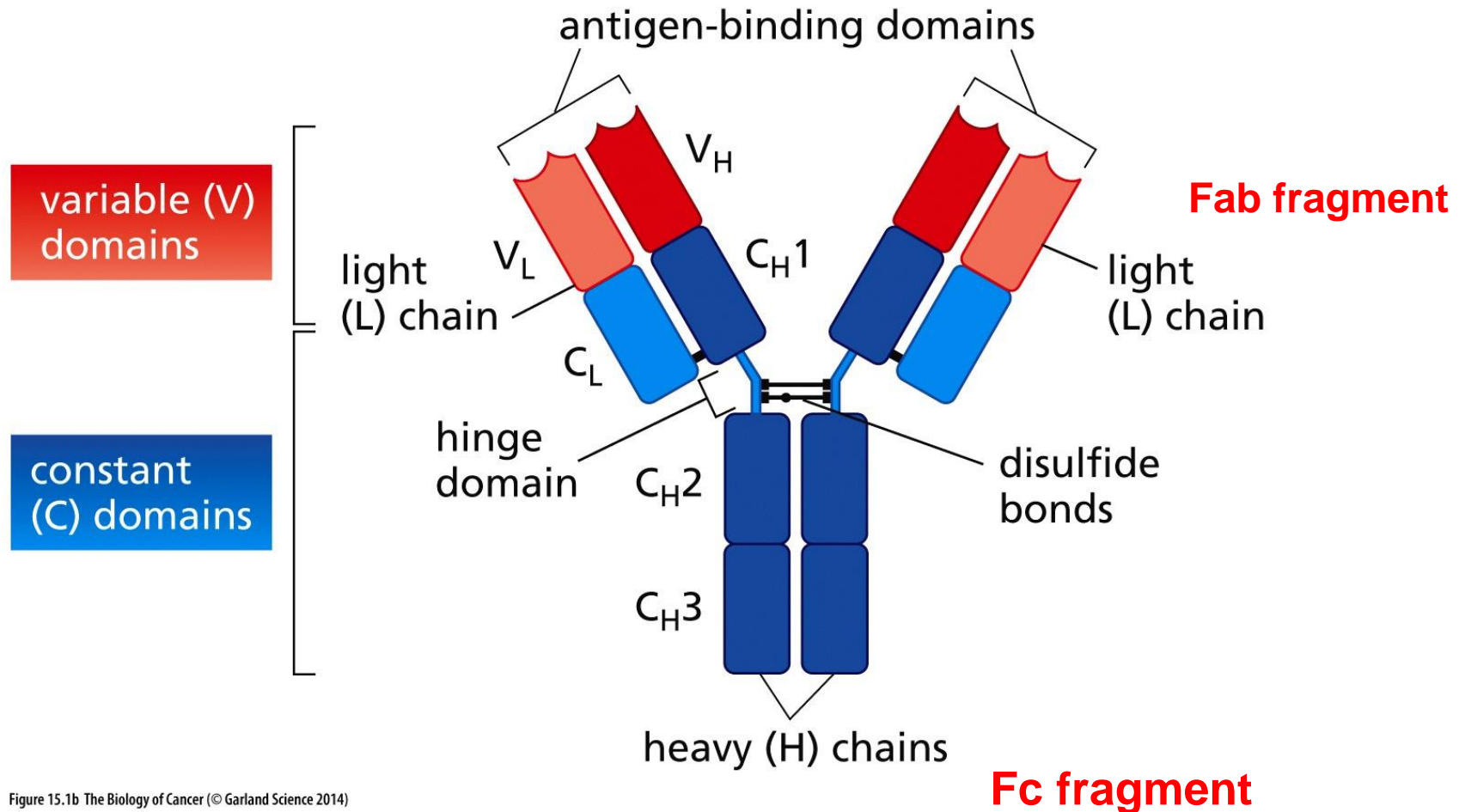
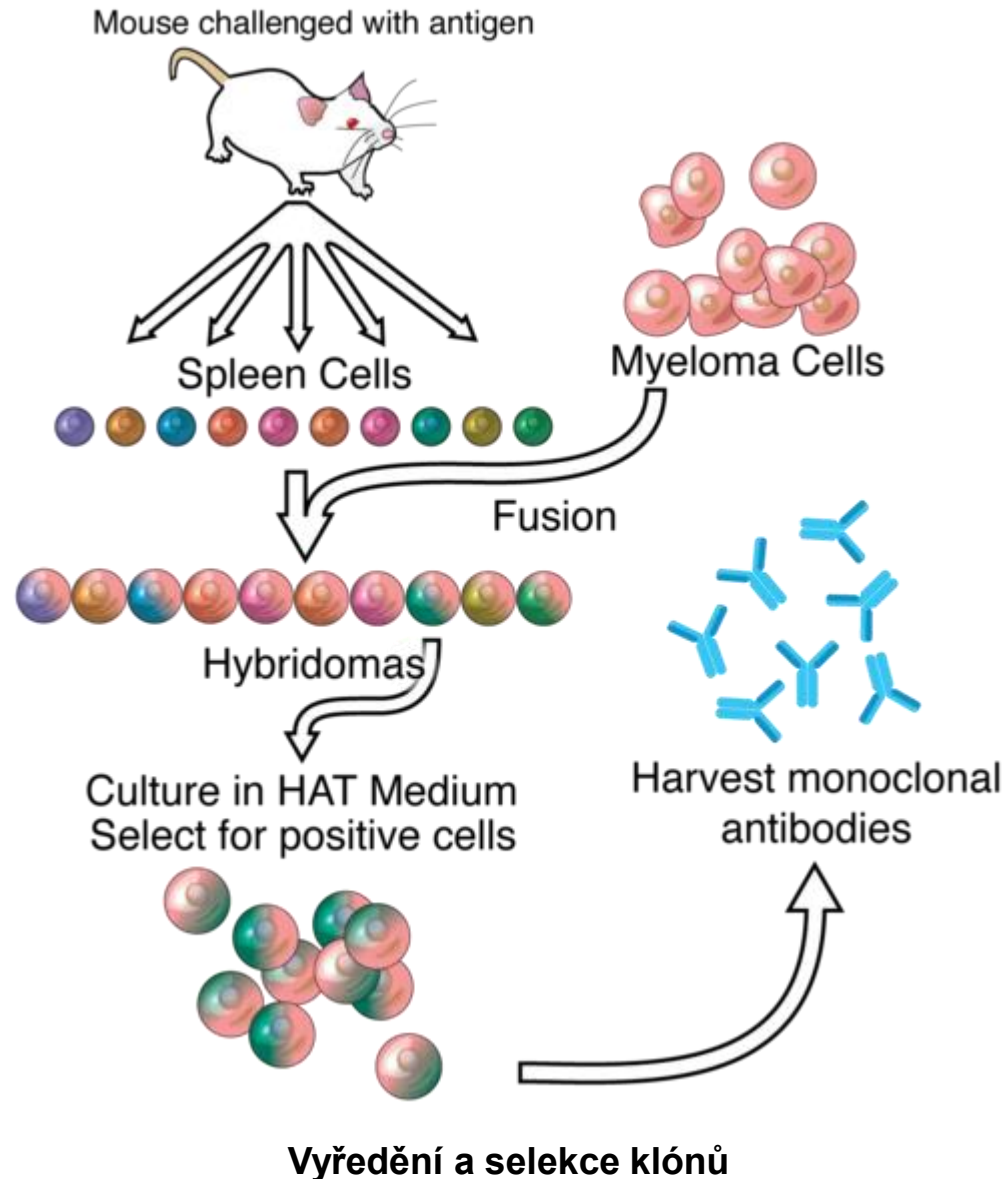


Figure 15.1b The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

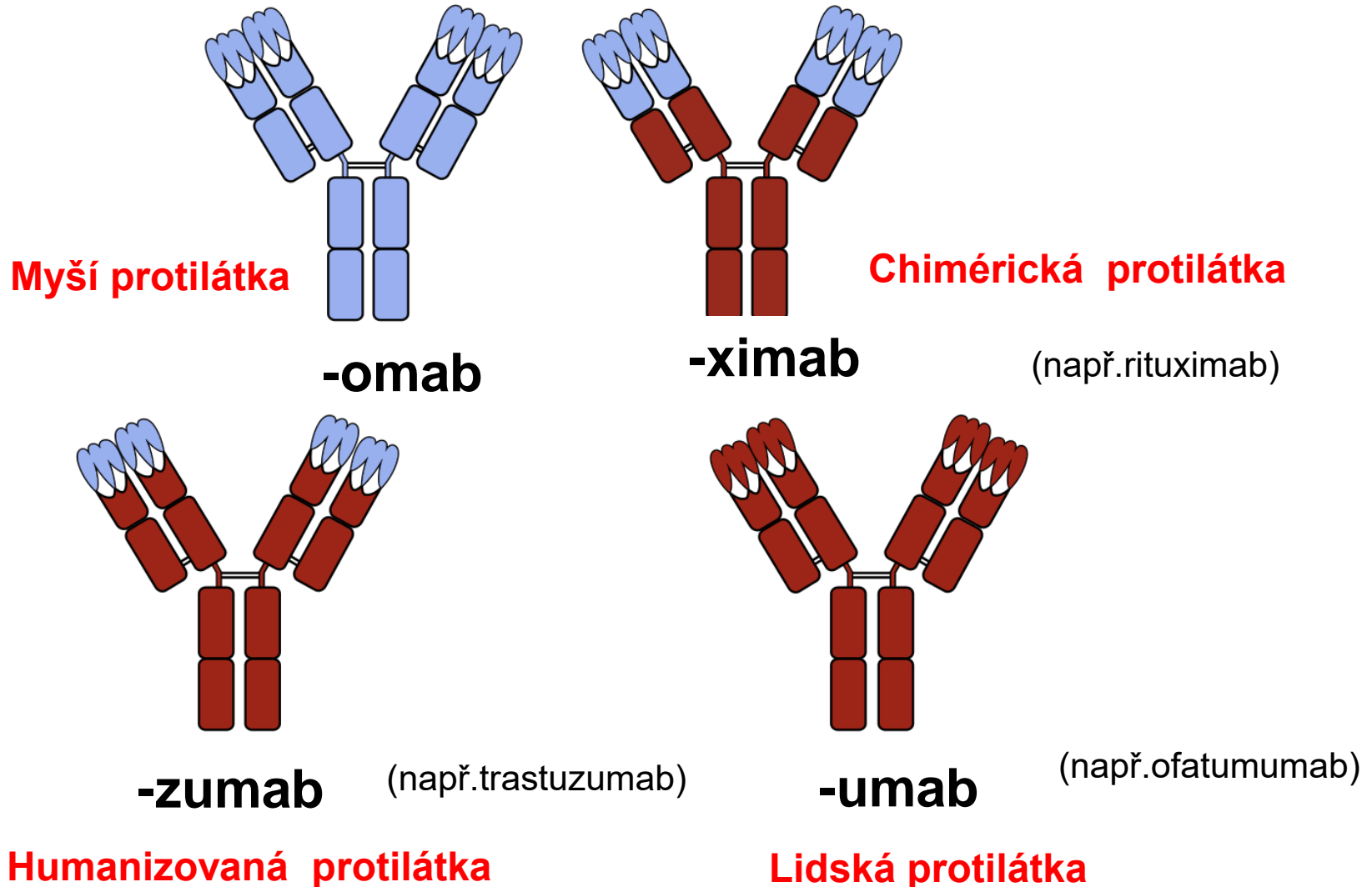
Monoklonální protilátky a hybridomy



Myelomům chybí HGPRT (salvage purinů) a pokud aminopterin v HAT médiu naruší i de novo syntézu - přežijí jen fúzané lymfocyty s myelomy. Samotné lymfocyty mají omezenou životnost.

Jak se ale vyhnout lidské imunitní odpovědi na myší protilátky při dlouhodobém/opakovaném podání ?

Monoklonální protilátky - nomenklatura



Terapeutické protilátky – mechanismus účinku

Fab fragmenty – vážou se na nádorový antigen (nejčastěji povrchový receptor nebo jeho solubilní ligand)

Fc fragmenty - přitahují imunitní buňky a aktivují komplement

- Protilátky narušují signalizaci od receptoru dovnitř buňky (**přímá toxicita**)
- Fc fragmenty **aktivují komplement** – lýza buněk a atrakce imunitních buněk (complement dependent cytotoxicity)
- Fc fragmenty **přitahují imunitní buňky**, hlavně cytotoxické T-lymfocyty, NK buňky a makrofágy – indukce fagocytózy nebo apoptózy cytotox. látkami (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity)

anti CD20

(**Rituximab**)

lymfomy a některé leukemie (1998)

anti HER2/ERBB2/neu

(**Herceptin** alias trastuzumab, pertuzumab)

karcinom prsu (2000)

anti EGFR-1/ HER1/ERBB/ - epidermal growth factor receptor

(**Cetuximab, necitumumab, panitumumab**)

kolorektální karcinom (2004), některé karcinomy plic

anti VEGF (ligand receptoru VEGFR, vascular endothelial growth factor)

(**Avastin** alias Bevacizumab)

Inhibitor angiogeneze, širší spektrum solidních nádorů (2005)

Anti PDGFR (platelet-derived growth factor receptor)

(**Olaratumab**, sarkomy (2016)

anti CD20

(Rituximab)

lymfomy a některé leukemie (1998)

CD 20

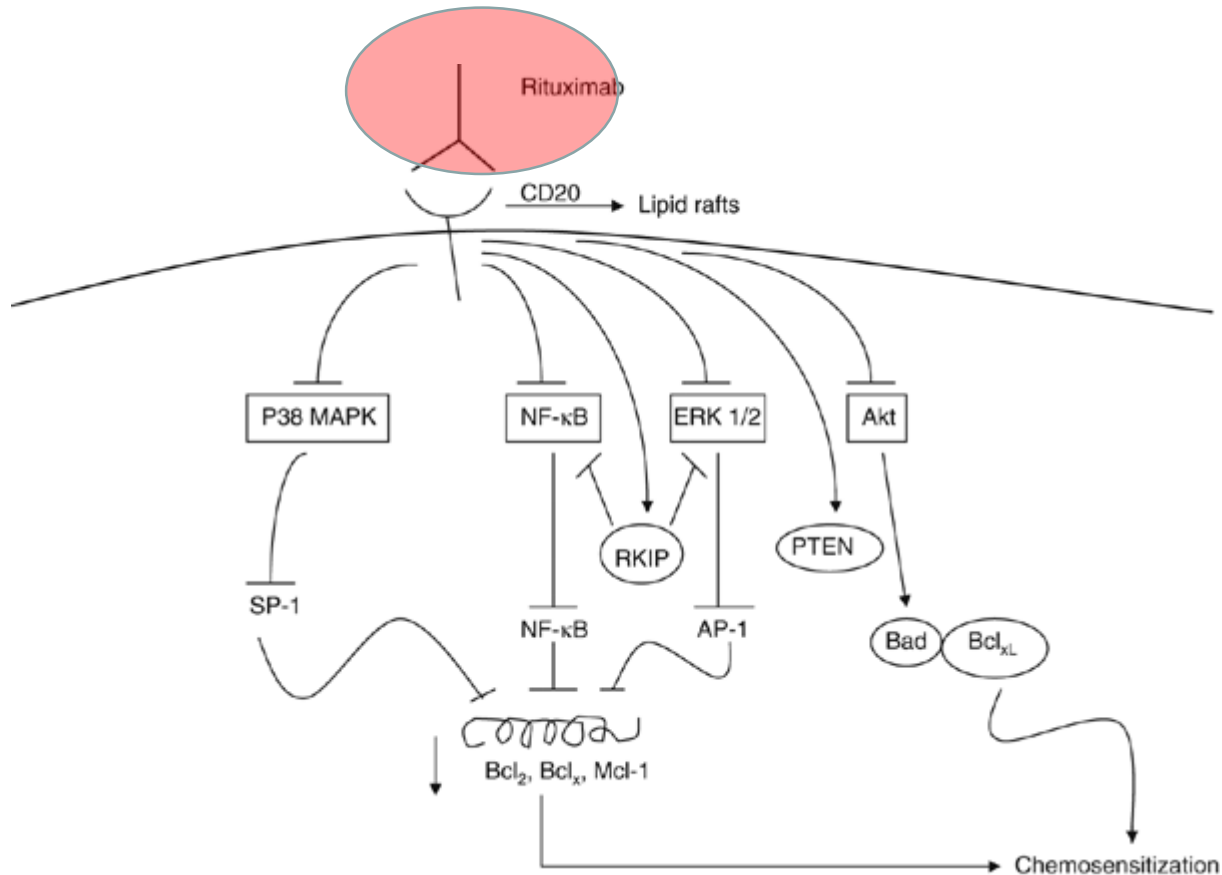
exprimován na povrchu B-lymfocytů důležitý pro jejich maturaci

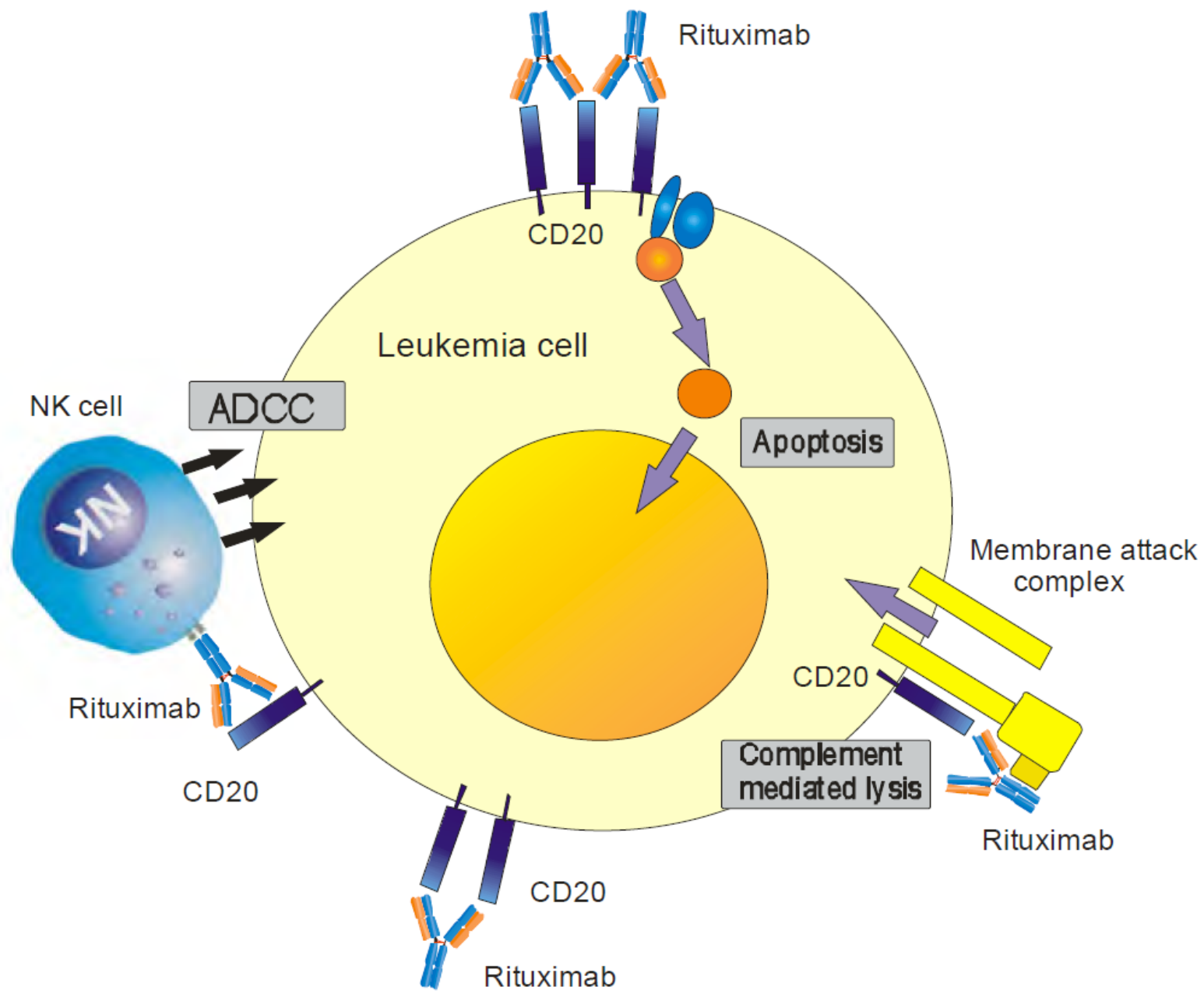
Kaskáda:

MAPK

NFκB

PI3K/Akt





Anti HER2 (Herceptin alias trastuzumab, pertuzumab)

(2000 schválen pro terapii HER+ karcinomu prsu)

HER2/EGFR2/neu

Receptorová tyrozinkináza

(human epidermal growth factor receptor 2)

Kaskáda:

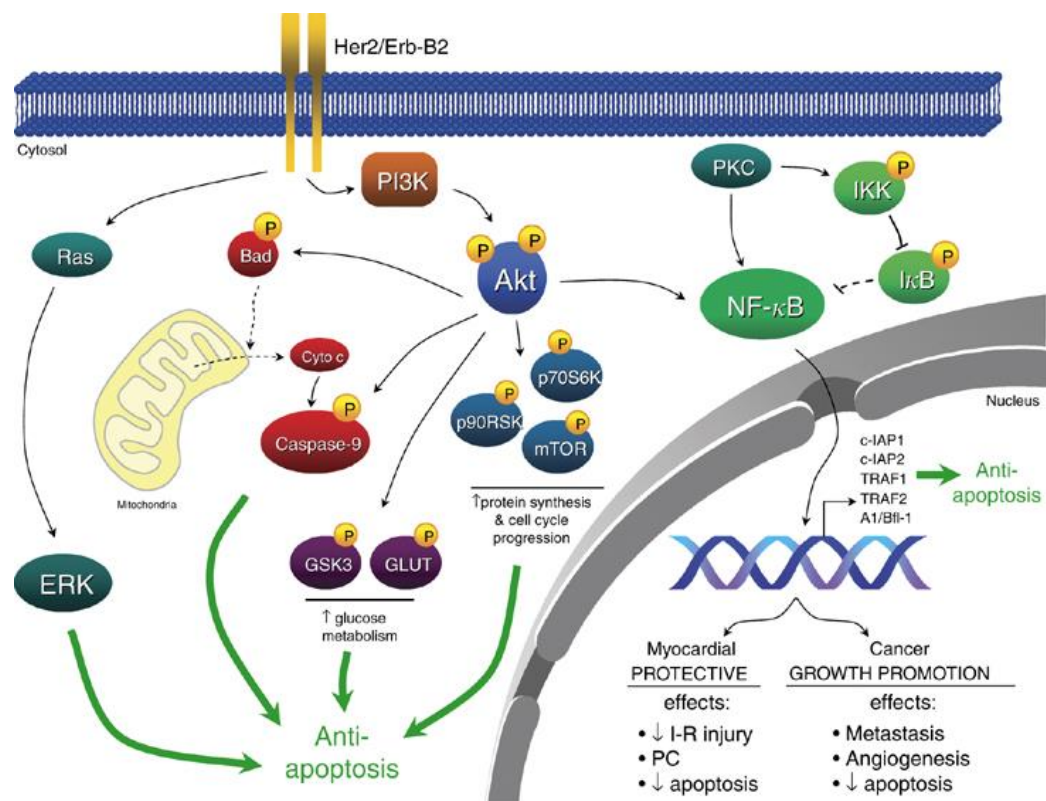
PI3K/Akt

RAS

PKC

....

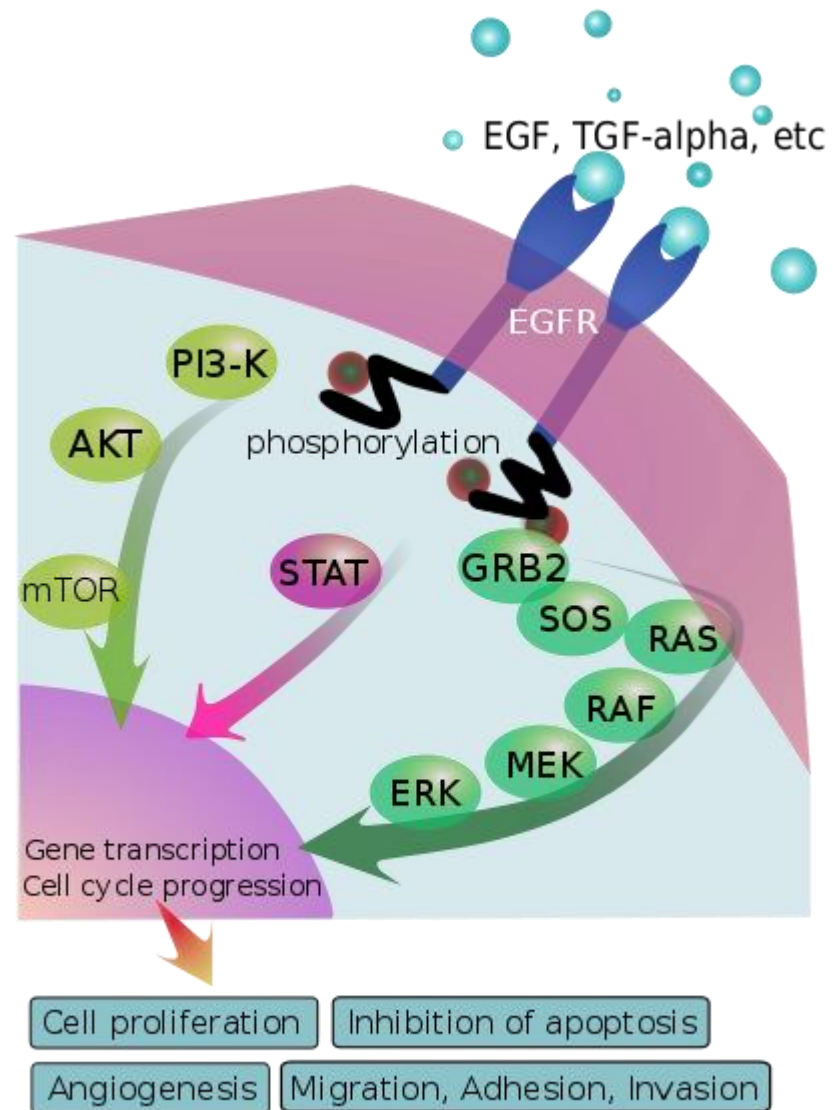
Amplifikován nebo overexprimován
u 15-30 procent nádrou prsu



anti HER1/EGFR-1/ERBB
(Cetuximab, necitumumab, panitumumab)
kolorektální karcinom a nádory hlavy a krku

EGFR/ HER1/EGFR
(human epidermal growth factor receptor 1)
mutace a overexprese u různých nádorů

Kaskáda:
RAS
STAT
PI3K/Akt



anti VEGF-A (Avastin alias Bevacizumab)

Schválen jako inhibitor angiogeneze

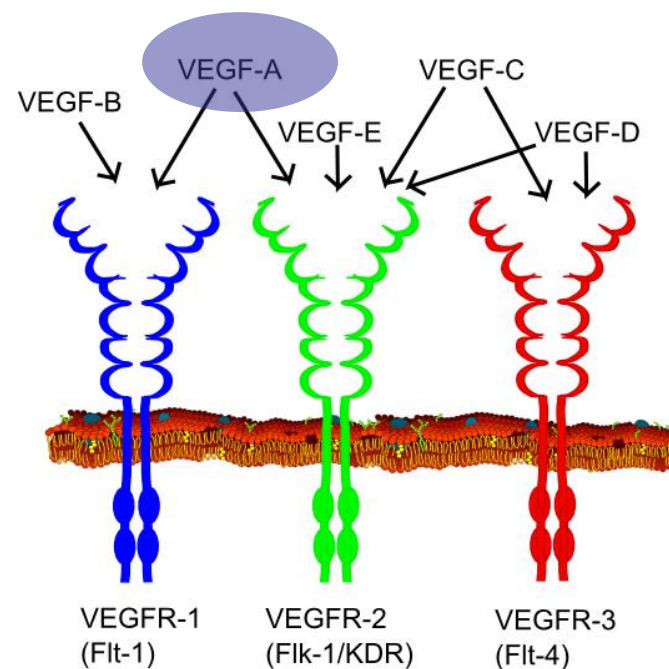
Širší spektrum solidních nádorů

VEGF-A (vascular endothelial growth factor)

je ligand receptoru VEGFR

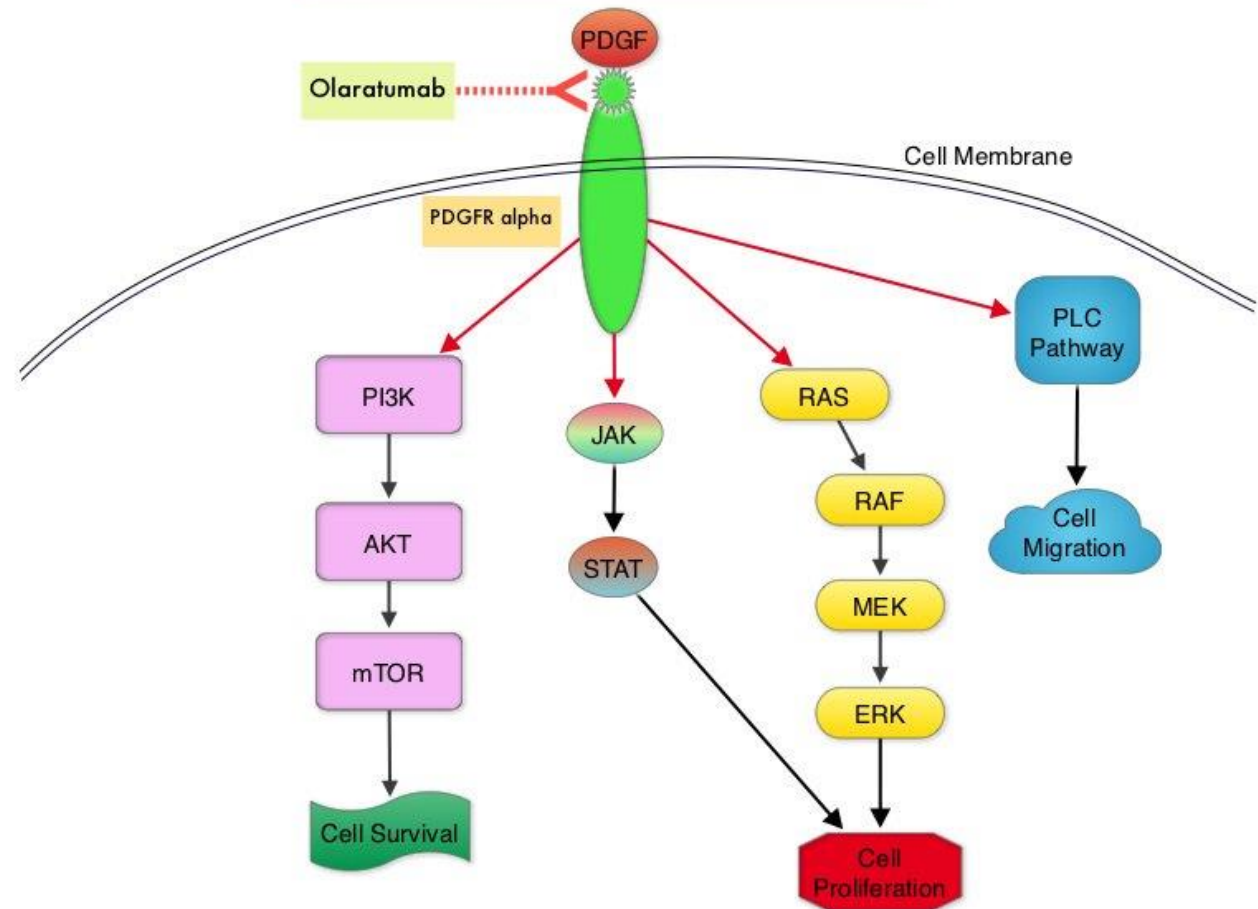
SIGNALIZACE ZODPOVĚDNÁ ZA ANGIOGENEZI

(migrace endotelových buněk, jejich dělení, aktivita MMP)



Anti PDGFR (platelet-derived growth factor receptor)
(Olaratumab, sarkomy (2016))

Olaratumab-Mechanism of Action



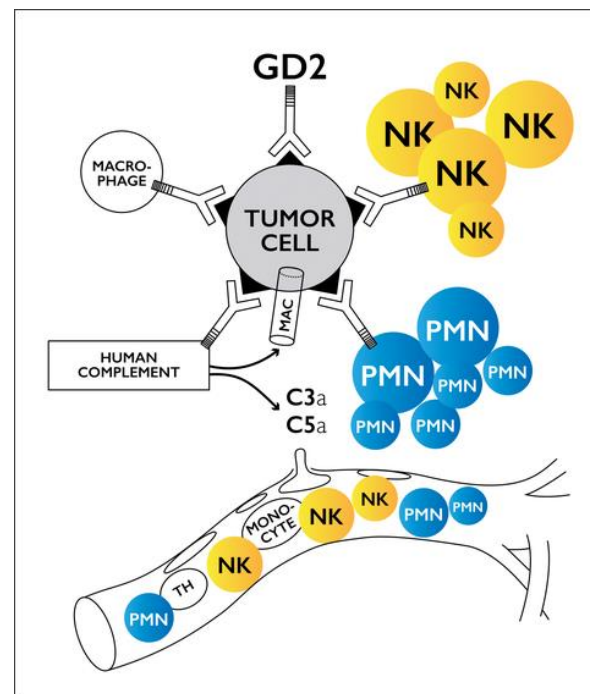
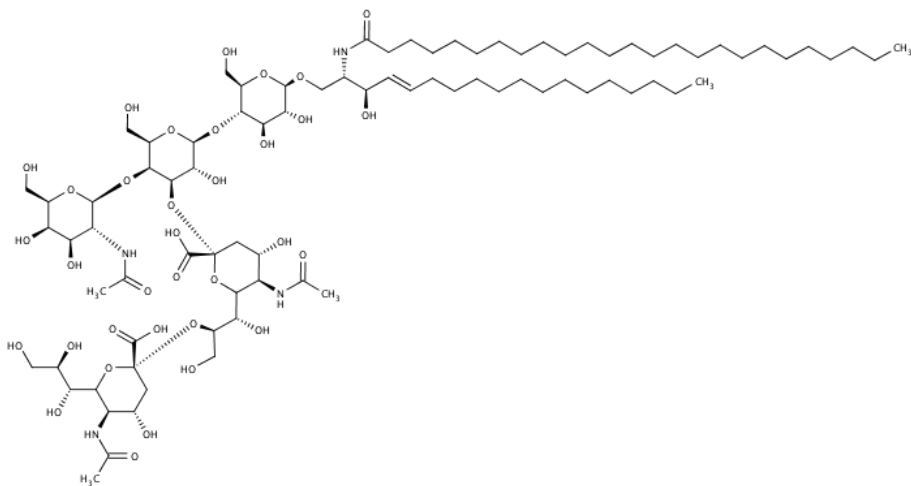
Schváleno 2020-2021

Danyelza (Naxitamab)

monoklonální protilátka proti glykolipidu GD2 na povrchu buněk

Některé neuroblastomy

GD2 – na povrchu nádorů neuroektodermálních buněk



Terapeutické protilátky – mechanismus účinku

Fab fragmenty – vážou se na nádorový antigen (nejčastěji povrchový receptor nebo jeho solubilní ligand)

Fc fragmenty - přitahují imunitní buňky a aktivují komplement

- Protilátky narušují signalizaci od receptoru dovnitř buňky (**přímá toxicita**)
- Fc fragmenty **aktivují komplement** – lýza buněk a atrakce imunitních buněk (complement dependent cytotoxicity)
- Fc fragmenty **přitahují imunitní buňky**, hlavně cytotoxické T-lymfocyty, NK buňky a makrofágy – indukce fagocytózy nebo apoptózy cytotox. látkami (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity)

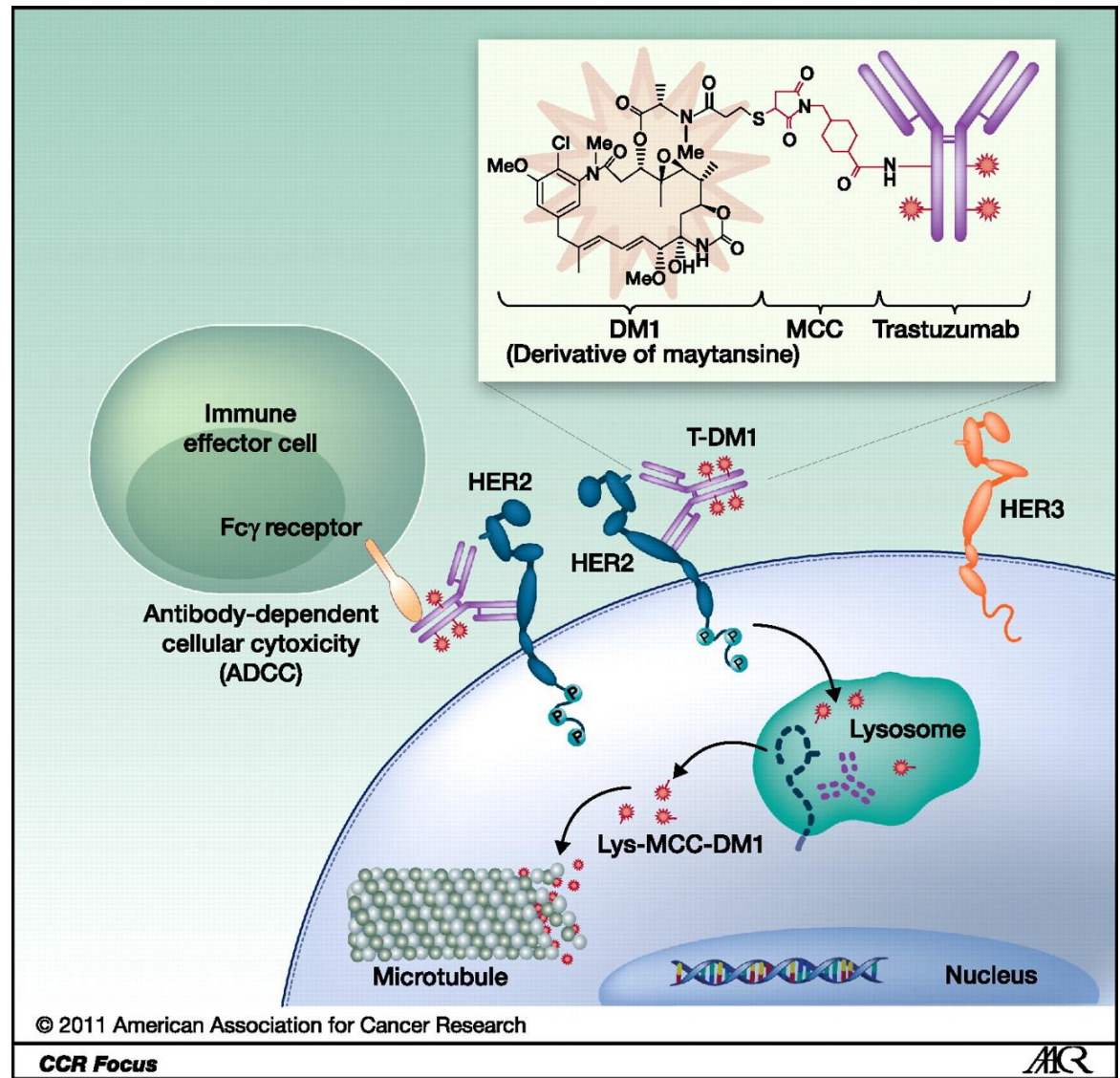
Konjugované protilátky mohou nést k buňce nebo do ní cytotoxické látky-
Cytostatika nebo radiokativní zářiče

Konjugované terapeutické protilátky

- s cytostatikem
- s radioaktivním izotopem

Konjugované protilátky s cytostatikem

Anti HER2 (trastuzumab)+inhibitor polymerace MT(maytansin)



Použití:
Karcinomy prsu
HER2+
adenokarcinom
žaludku a jícnu

Konjugované protilátky s cytostatikem

Brentuximab vedotin (Adcetris)

Anti CD30 protilátka konjugovaná s *monomethylauristatinem (inhibitor polymerace MT)*

Pro terapii některých lymfomů

Antibody

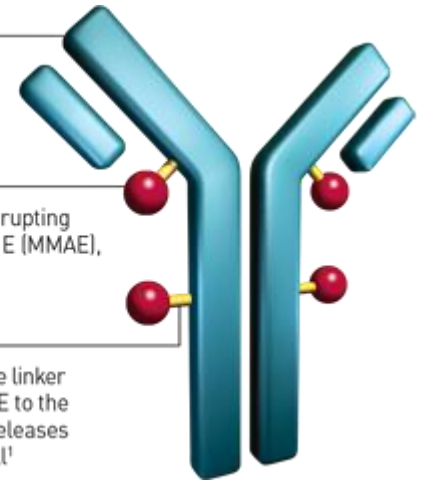
The antibody, brentuximab, specific for CD30¹

Cytotoxic agent

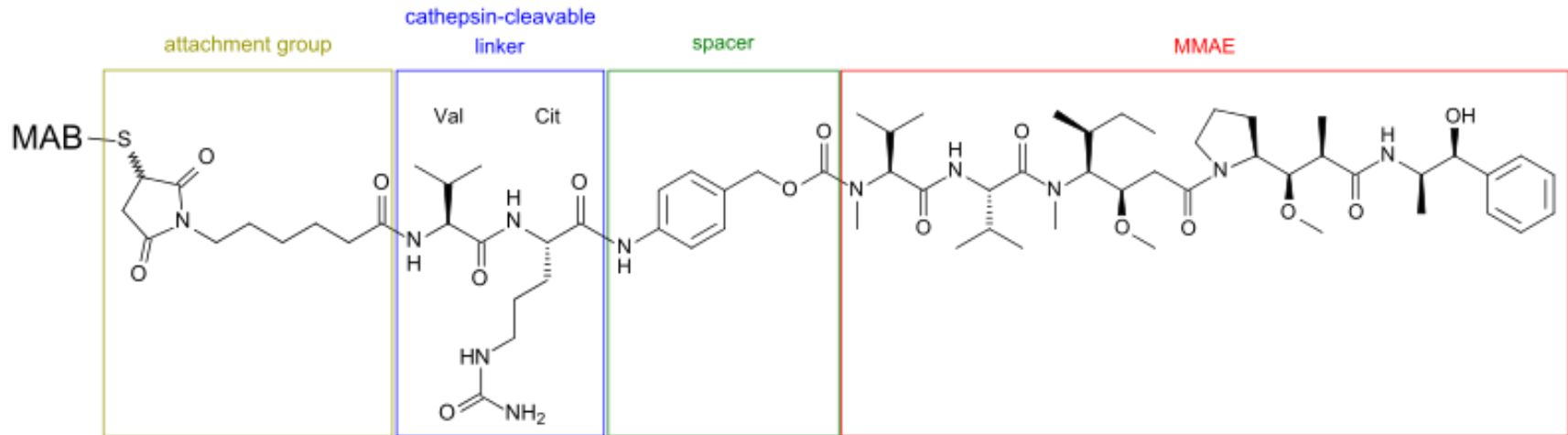
The synthetic microtubule-disrupting agent, monomethyl auristatin E (MMAE), that induces target cell death¹

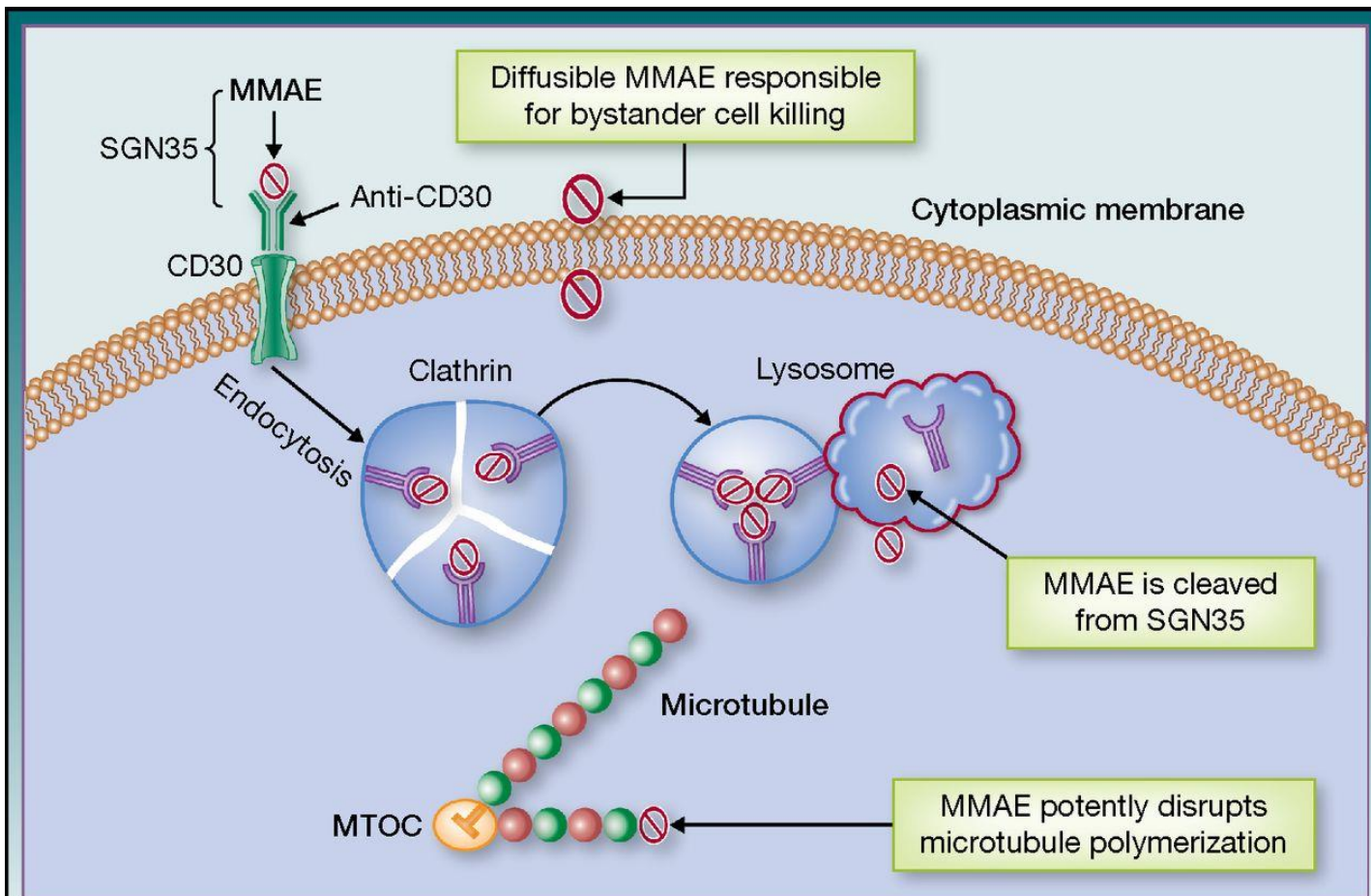
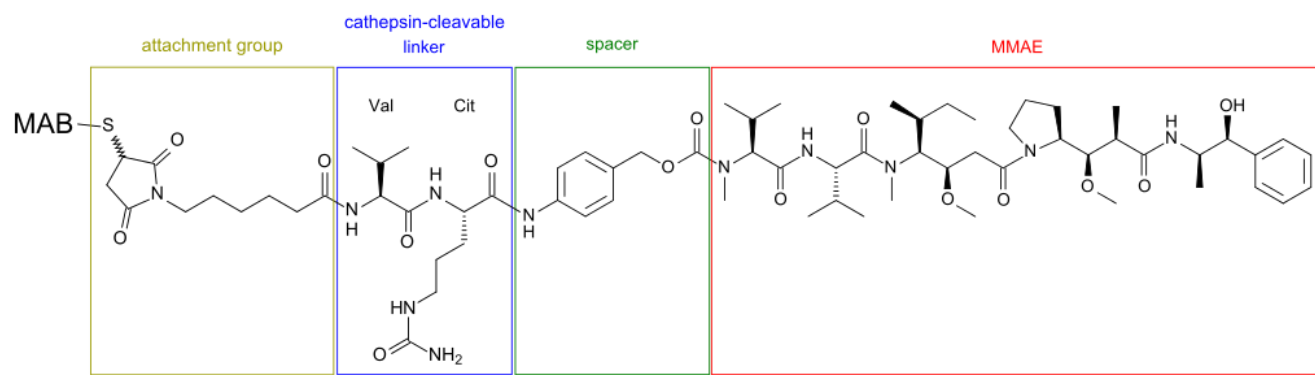
Linker

A synthetic protease-cleavable linker that covalently attaches MMAE to the CD30-directed antibody and releases the agent within the target cell¹



Internalizace a uvolnění cytostatika katepsinem/ny





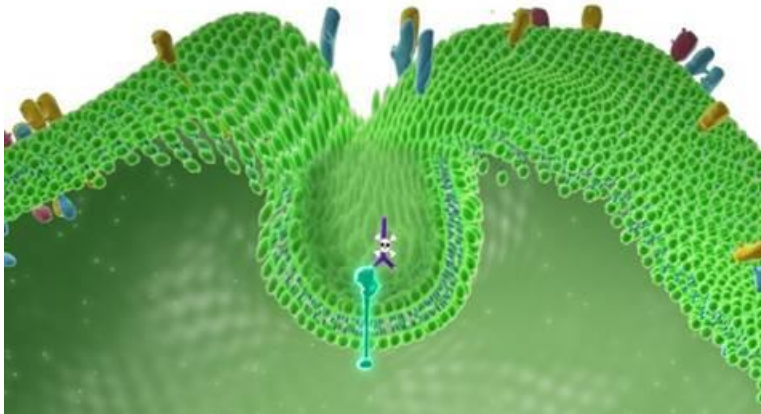
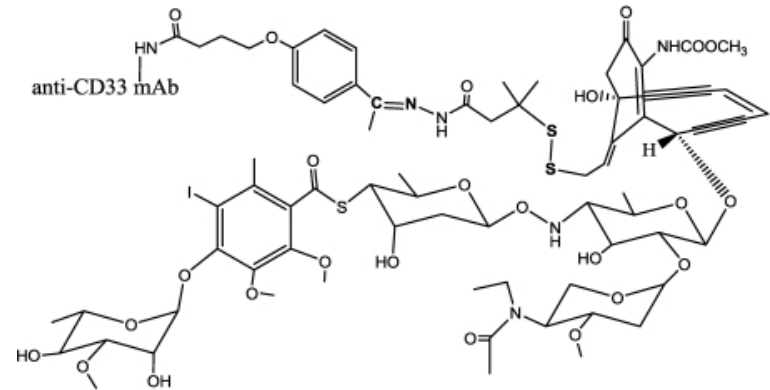
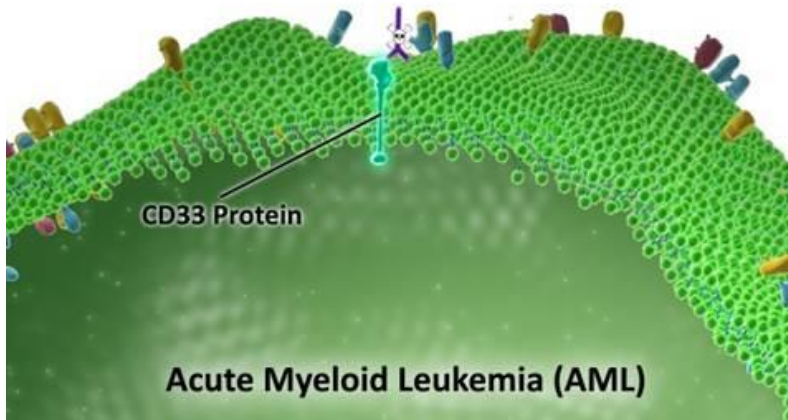
Konjugované protilátky s cytostatikem

Mylotarg (anti CD33 + bakteriální antibiotikum kalicheamycin)

Besponsa (anti CD22 + bakteriální antibiotikum kalicheamycin)

Leukemie a lymfomy

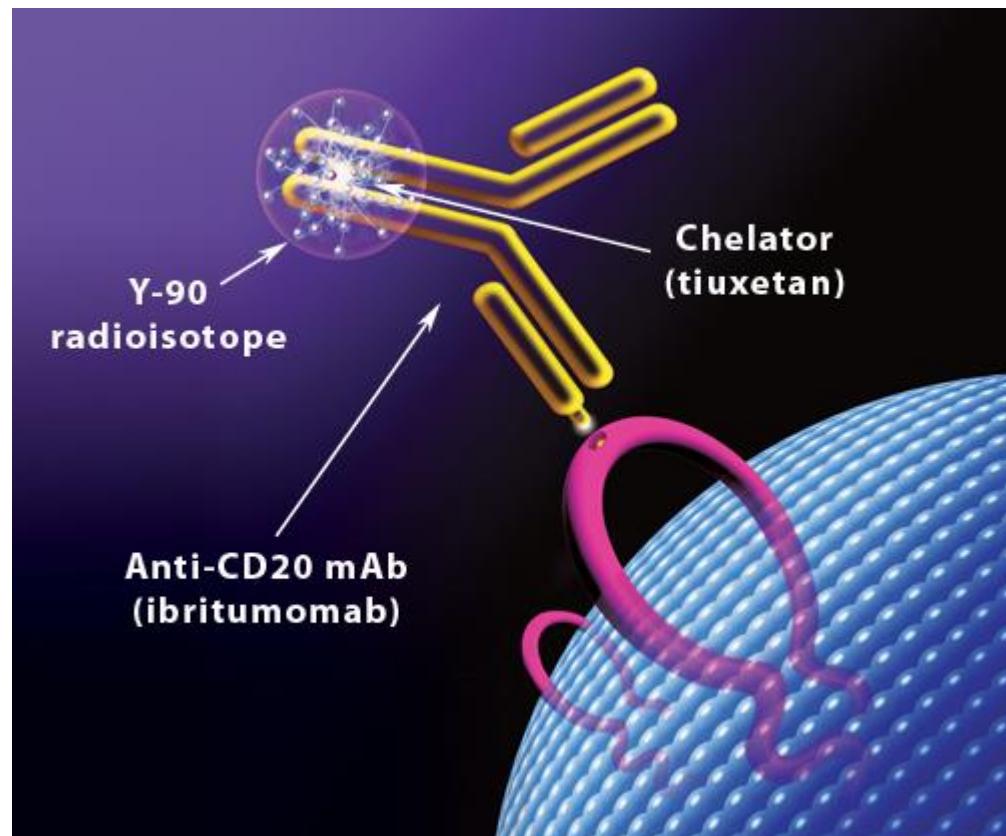
Po internalizaci a okyselení dojde k uvolnění kalicheamycinu. Vazba na DNA a vytváření ds zlomů.



Konjugované protilátky s radioaktivním zářičem

Bexxar (anti CD20 + iód 131)

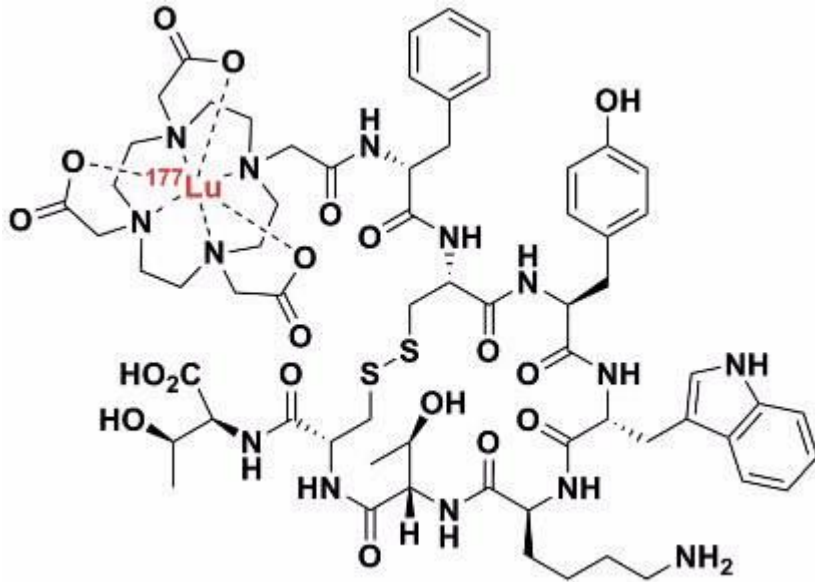
Zevalin (anti CD20 + indium 120 nebo yttrium 90)



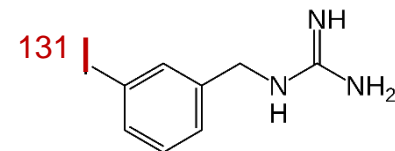
Použití:
Některé lymfomy a
CLL

Jiné biomolekuly s konjugovaným radioaktivním zářičem

Lutathera – peptid s konjugovaným izotopem ^{177}Lu ,
rozeznáván somatostatinovým receptorem 2 (neuroendokrinní nádory)



lobenguane – analog noradrenalinu rozeznáváný receptorem jako noradrenalin
konjugovaný s ^{131}I
(neuroendokrinní nádory nadledvin)



Cílené a biologické terapie

- **Inhibitory tyrozinkináz**
- **Inhibitory ser/thr kináz**
- **Inhibitory dalších bílkovin**
- **Terapeutické protilátky a jejich konjugáty**
- **Imunoterapie a CAR-T buňky**

Inhibice imunitního checkpointu (immune checkpoint inhibitors)

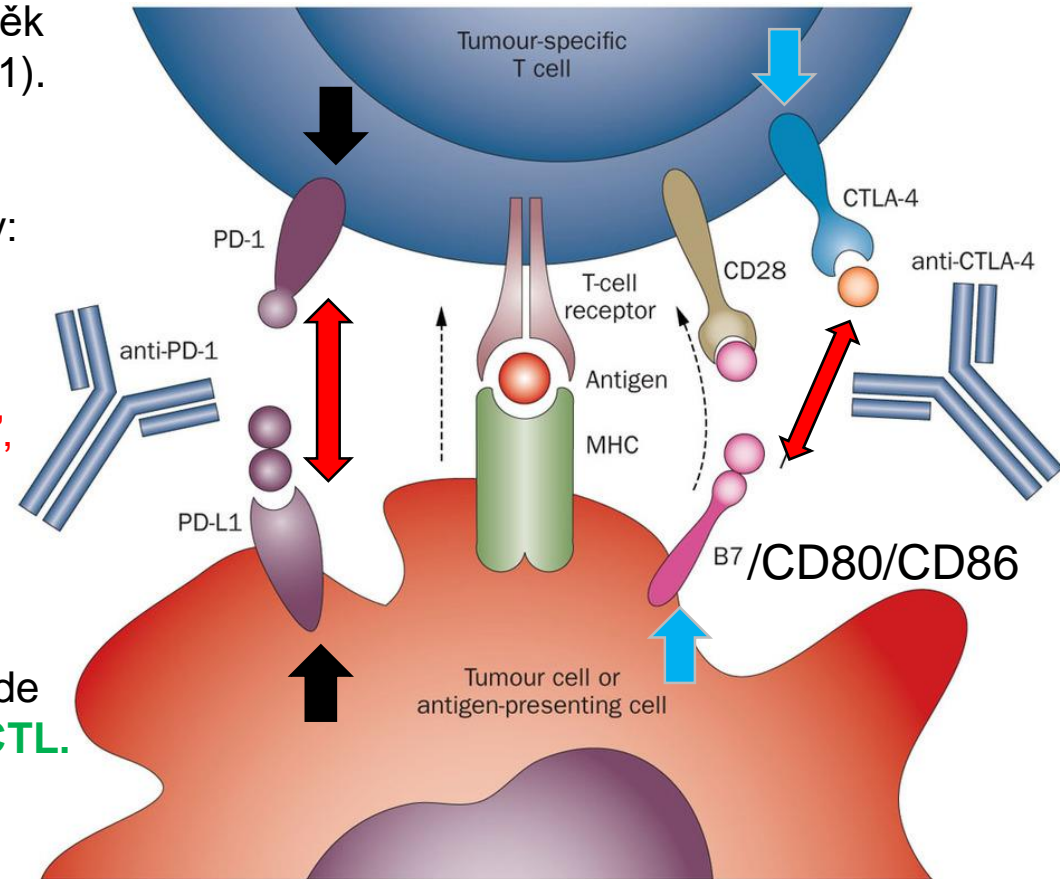
cíl: odstraněná suprese cytotoxické odpovědi T-buněk

Nádory a APC exprimují na povrchu buněk **PD-L1** (programmed cell death 1 ligand 1).
APC exprimují **CD80/CD86/B7**

PD-L1 a B7 interagují se svými protějšky:
PD1 receptorem a
CTLA-4 na povrchu T-buněk.

Tyto interakce oslabují imunitní dopověď, představují „**BRZDU**“ (brání aktivaci a proliferaci T- buněk)

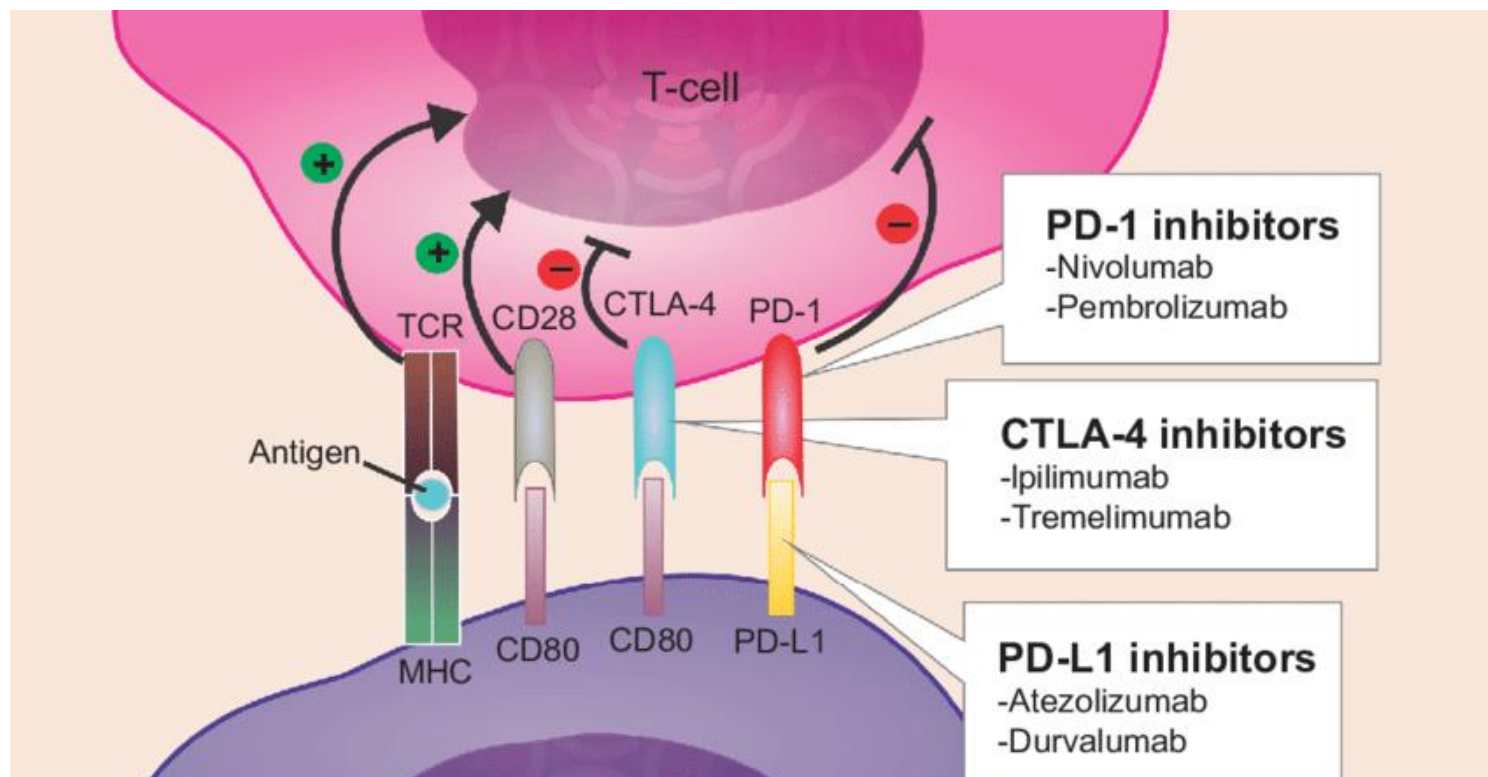
Uvolnění „brzdy“ kompeticí s **protilátkou proti PD1 nebo PD-L1 nebo CTLA-4** vede ke **spuštění imunitní odpovědi přes CTL**.



Ipilimumab, tremelimumab - anti-CTLA-4

Nivolumab, pembrolizumab - anti-PD-1

Atezolizumab, durvalumab - anti-PD-L1



Cíl: aktivace CTL narušením negativní signalizací mezi nádorem a T-buňkami a dendritickými buňkami a T-buňkami

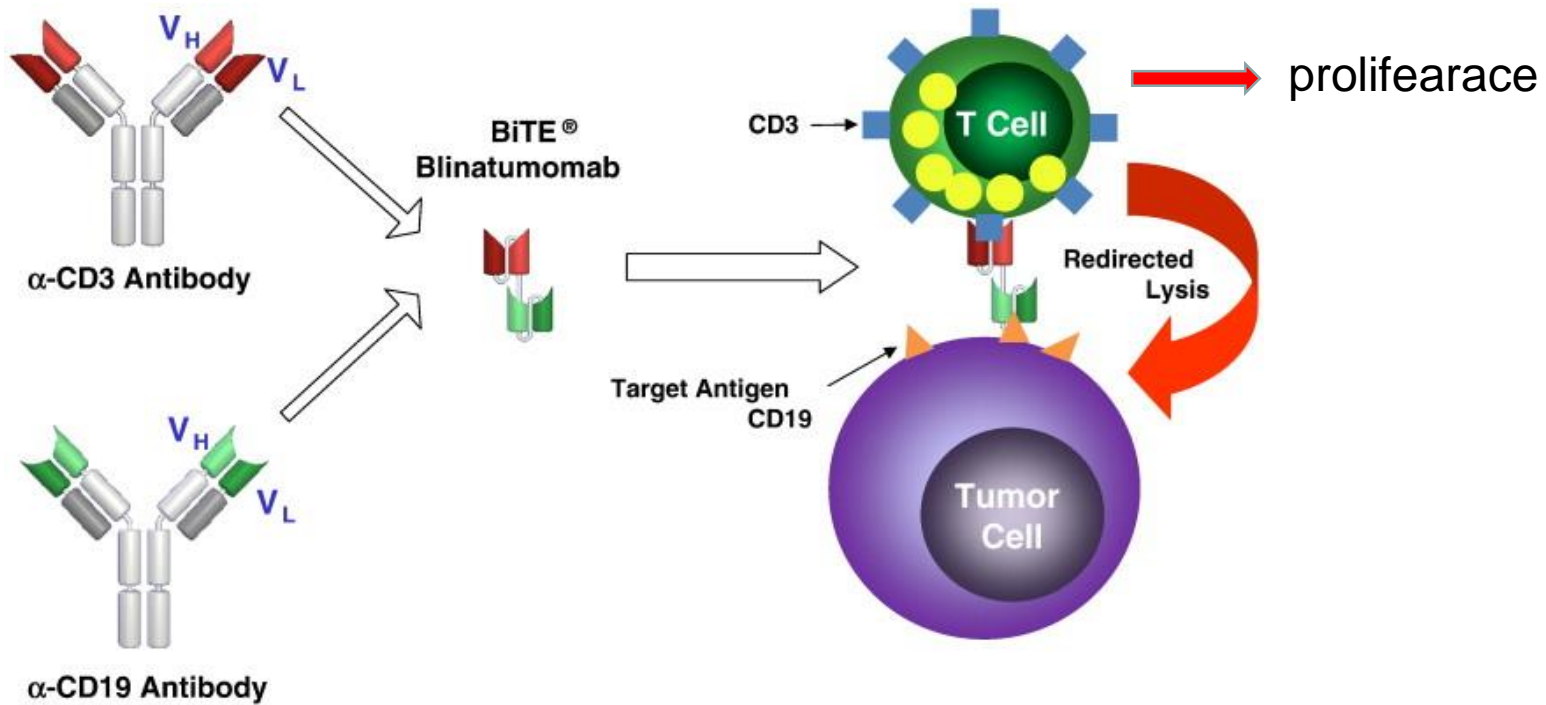
BiTEs (bispecific T-cell Engagers)

Blinatumomab (BLINCYTO)

– chiméra s dvěma vazebnými místy: **anti CD19** (na maligních a normálních B-buňkách) a **anti CD3** (na T-buňkách, část TCR)

Cíl: „**Spoj nádor s T-buňkami a aktivuj je**“

Schváleno pro některé B-buněčné leukemie

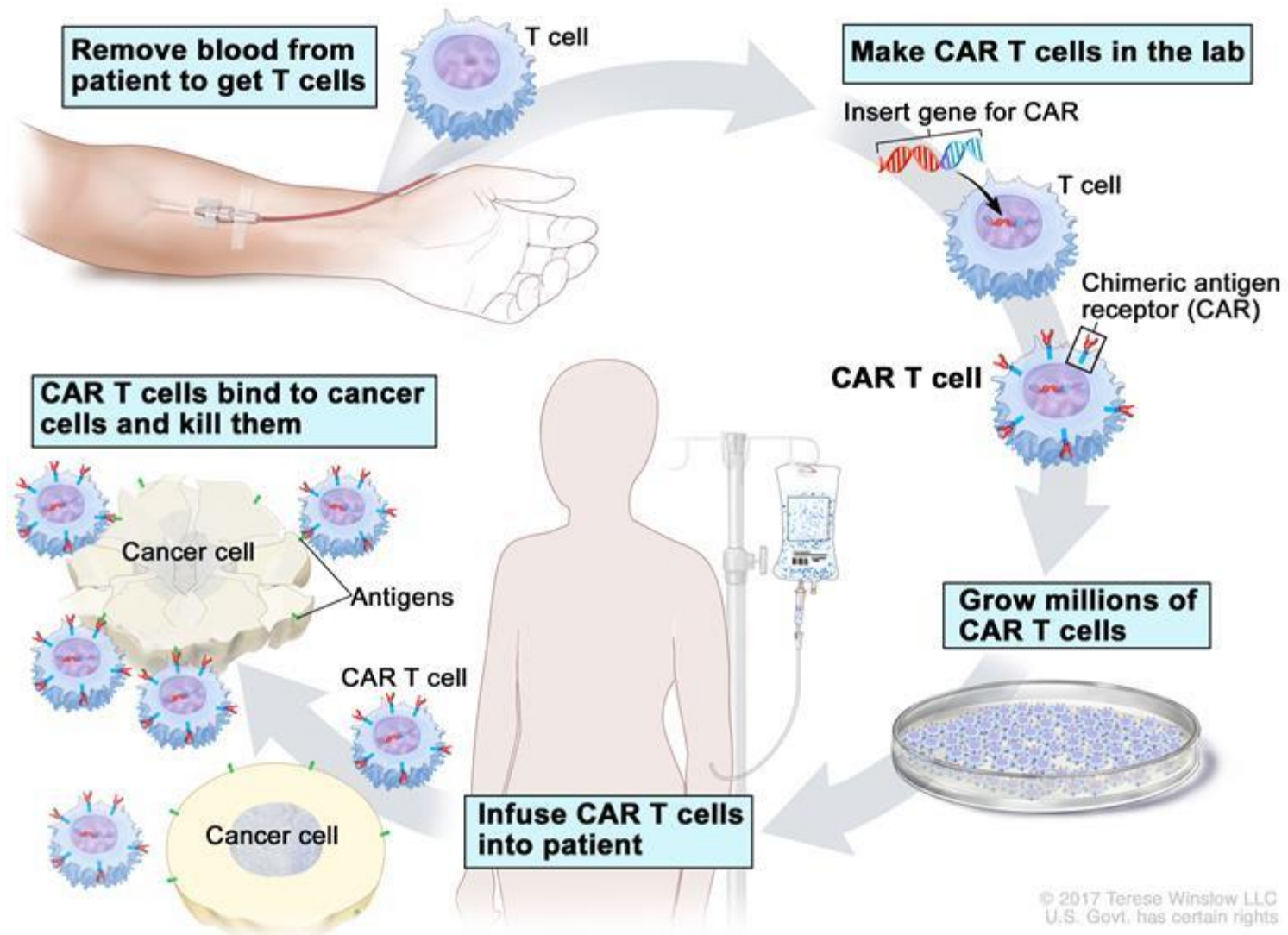


CAR-T buňky

T-lymfocyty exprimující chimerický transgenní antigenní receptor

Úprava T-buněk tak, aby rozeznávaly nějaký povrchový marker nádorových buněk

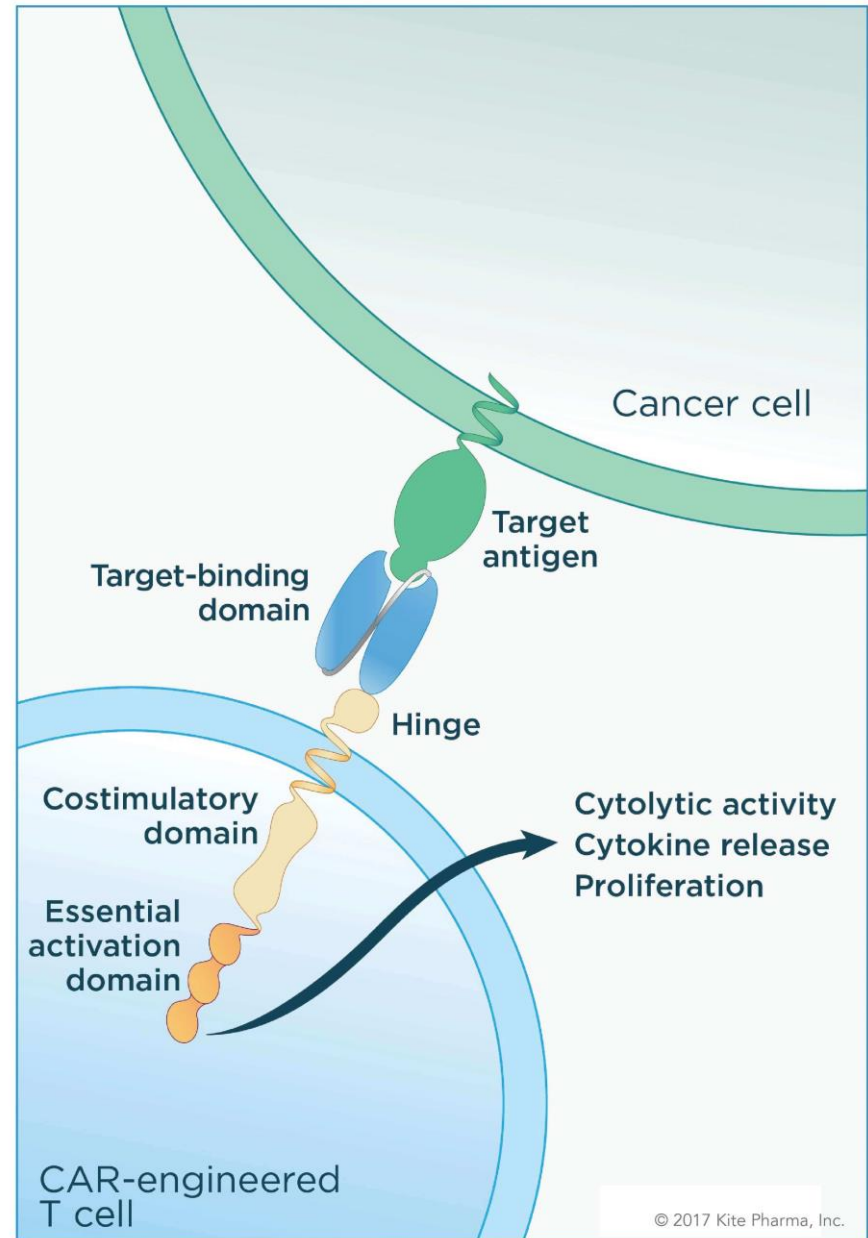
CAR T-cell Therapy



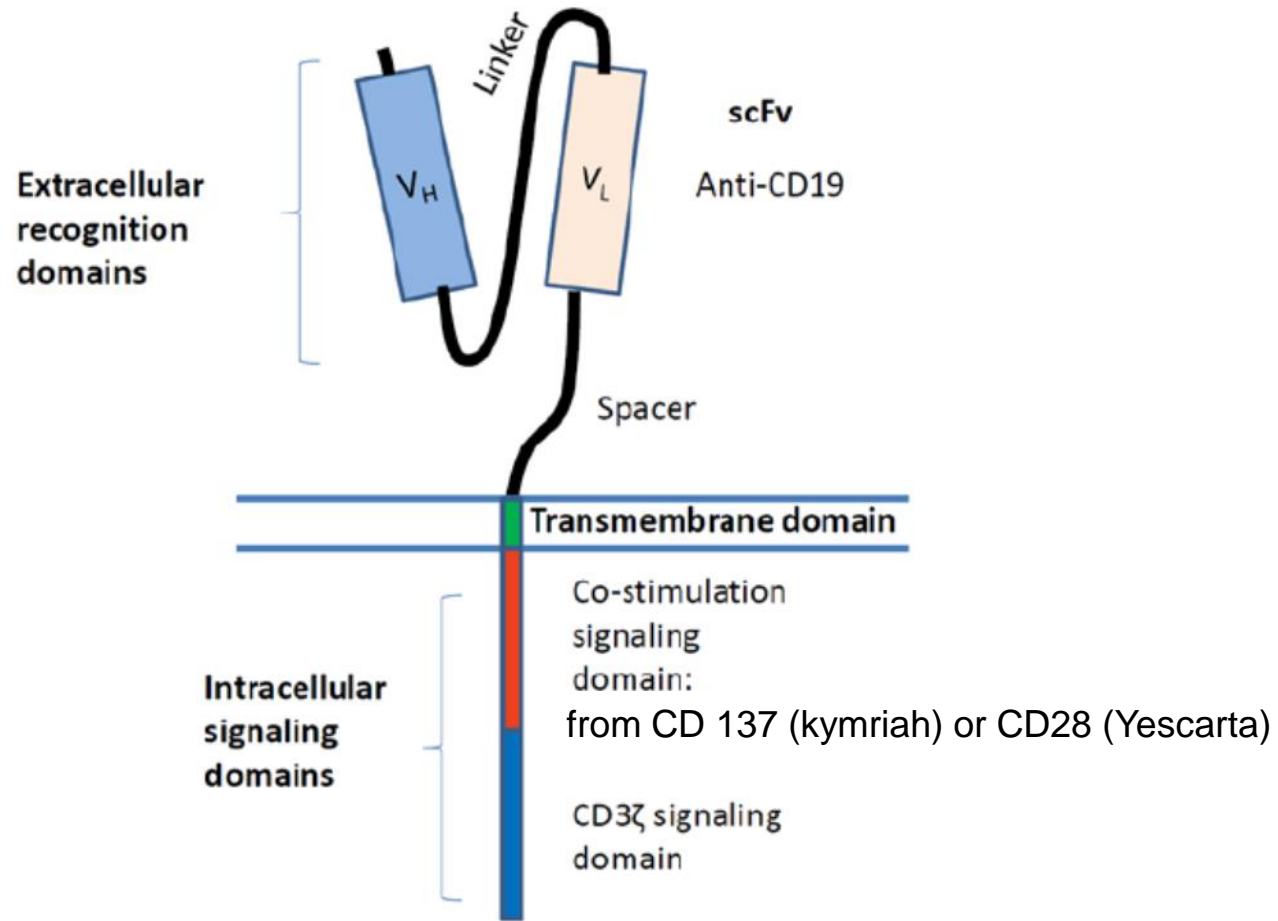
CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR (CAR)

Kymriah (anti CD19 CAR)
Yescarta (anti CD19 CAR)

Izolace a modifikace T-buněk pacienta tak aby rozeznávaly protein over-exprimovaný na povrchu nádorové buňky a spustily cytotoxickou odpověď

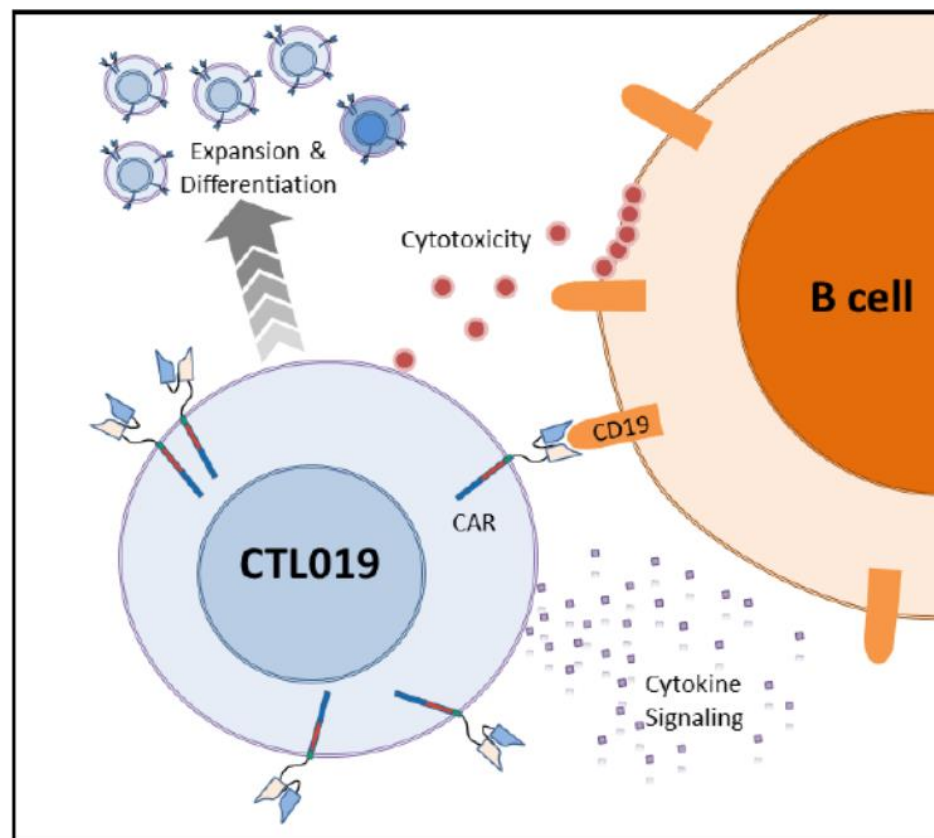


A fragment which recognizes CD19 is fused to intracellular signaling domains **critical for initiating T-cell activation and anti-tumor activity and expansion**



Kymriah and Yescarta (anti CD19 CAR)

Viral transduction (lentivirus, retrovirus) with a transgene encoding a chimeric antigen receptor (CAR) to identify and eliminate CD19-expressing malignant (and non-malignant) cells.



Upon binding to CD19-expressing cells, the CAR transmits a signal to promote T-cell expansion, activation, target cell elimination, and persistence of Kymriah. **The transduced T cells expand in vivo to engage and eliminate CD19-expressing cells.**

Terapeutické a preventivní vakcíny

Terapeutická vakcína

Sipuleucel T (2010, k terapii karcinomu prostaty)

„vakcína“ musí být vyrobena pacientovi na míru jedná se o jeho vlastní stimulované APC

- pacientovi se odeberou leukocyty (především APC/dendritické buňky)
- ty se inkubují s fuzním proteinem PAP-GMCSF
(**prostatic acid phosphatase** (antigen ca prostaty) a růstový faktor **granulocyte-macrophage stimulating factor** stimuluje APC k maturaci)
- takto aktivované se vrátí pacientovi a **aktivují imunitní odpověď** proti PAP na nádoru.

Terapie se zpravidla 3x opakuje (100000 USD), schválen 2010

Preventivní protinádorové vakcíny

(HPVs) **Human papilloma virus** - 150 příbuzných virů

HPV 6, 11, 16,18 – vysoce rizikové - **děložního čípku**, pochvy, dělohy, penisu, rekta, úst a hrtanu...

Cervarix – HPV 16, HPV 18

Gardasil - HPV 6, HPV 11, HPV 16, HPV 18

Gardasil 9 - HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58