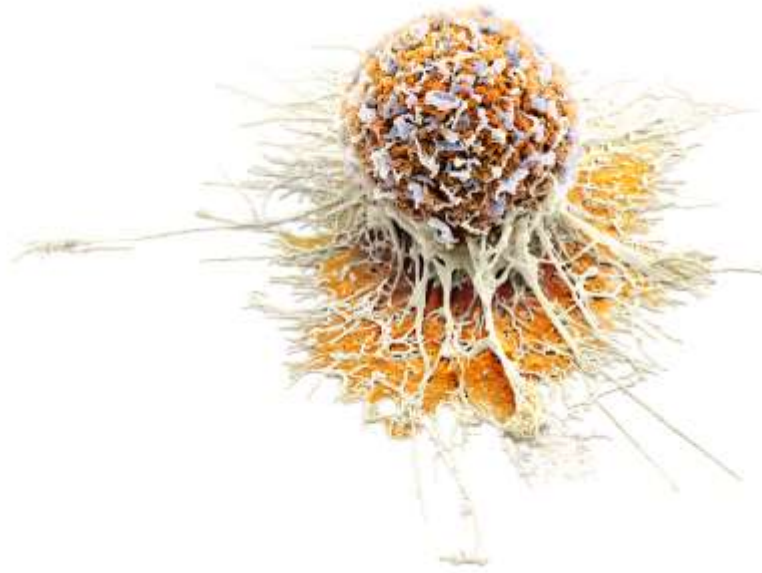


Cytostatika – mechanismus účinku, terapie a rezistence



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

Klasická Cytostatika

*genotoxické
látky
a
antimetabolity*

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

Antimetabolity
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

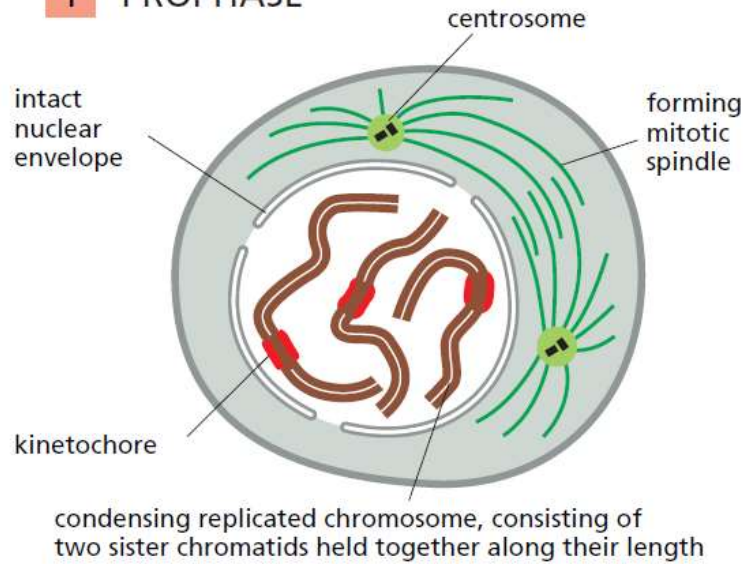
Antimetabolyty
a
hydroxyurea

Antimitotika
Látky s účinkem na mitotické vřeténko

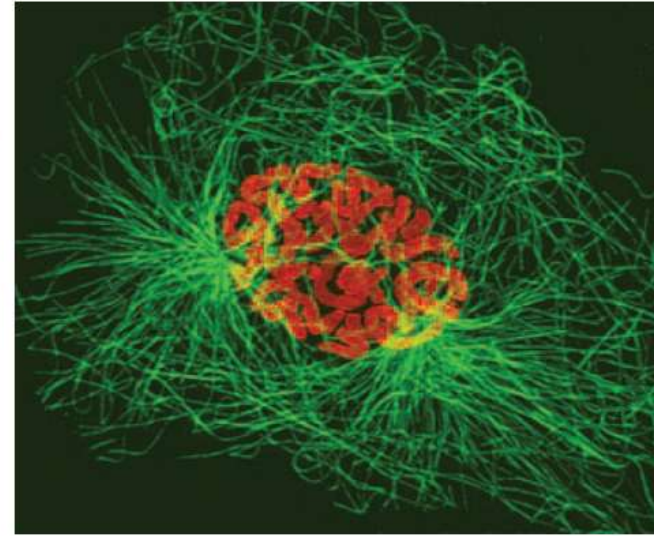
Inhibitory mikrotubulů dělicího vřeténka



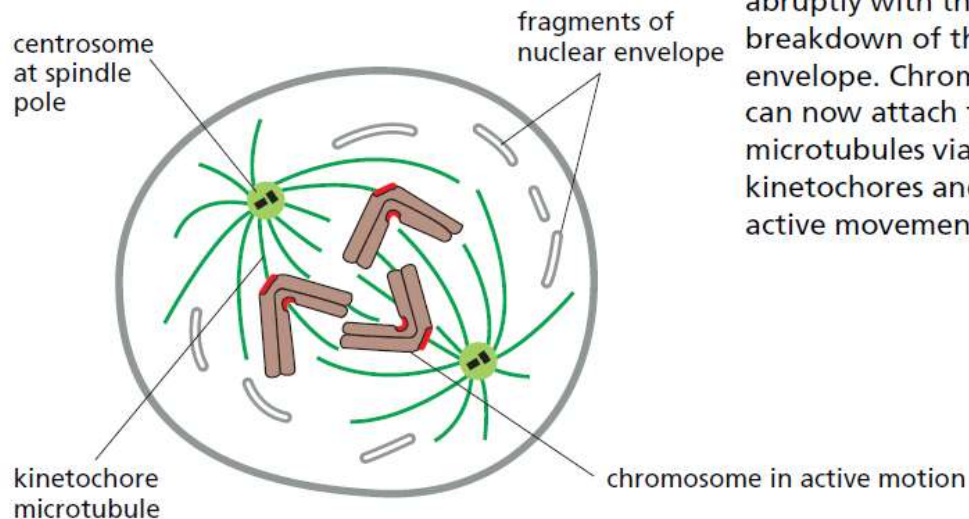
1 PROPHASE



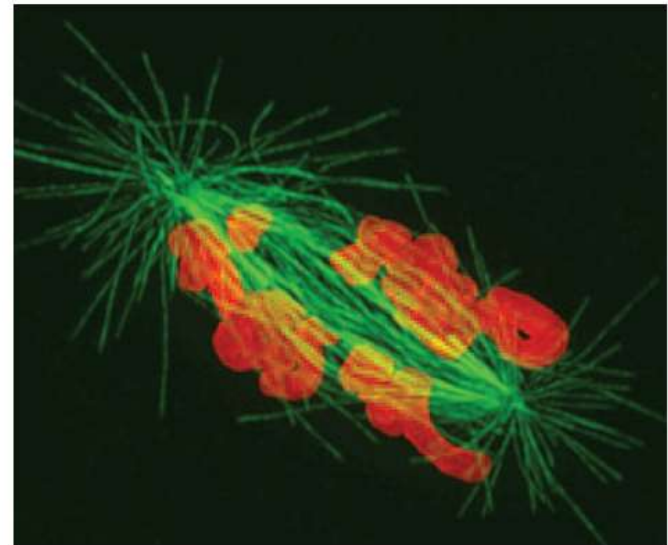
At **prophase**, the replicated chromosomes, each consisting of two closely associated sister chromatids, condense. Outside the nucleus, the mitotic spindle assembles between the two centrosomes, which have replicated and moved apart. For simplicity, only three chromosomes are shown. In diploid cells,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



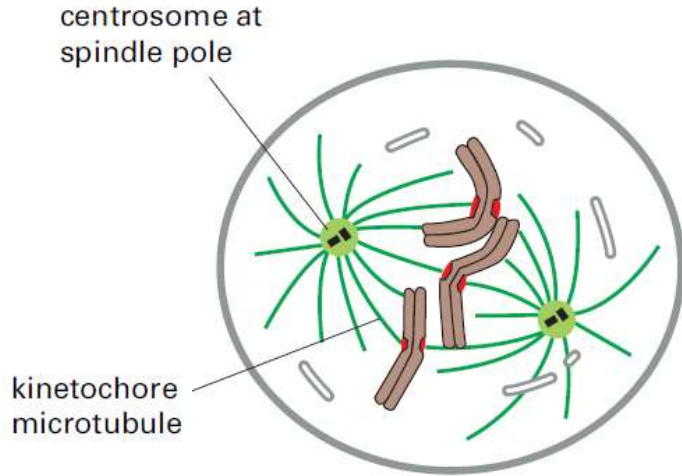
2 PROMETAPHASE



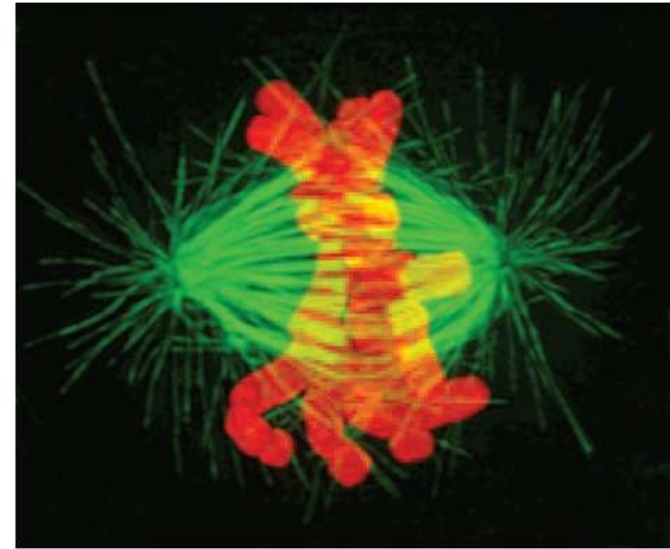
Prometaphase starts abruptly with the breakdown of the nuclear envelope. Chromosomes can now attach to spindle microtubules via their kinetochores and undergo active movement.



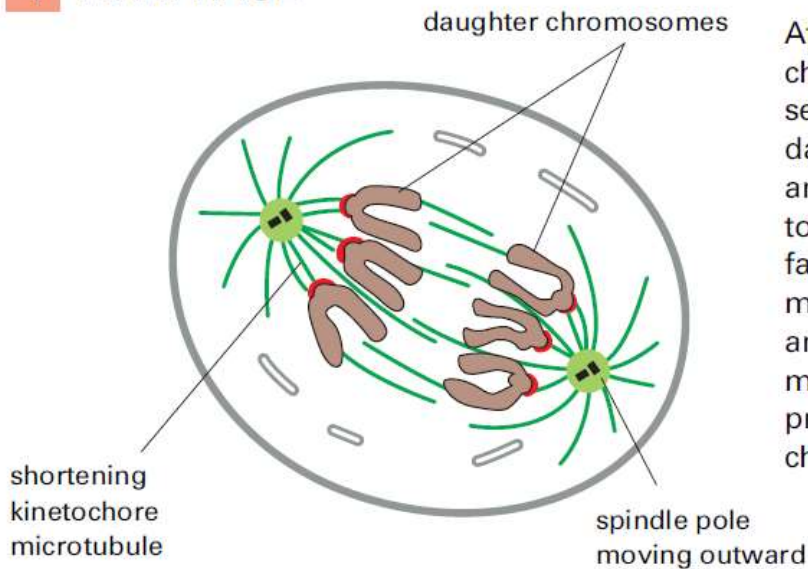
3 METAPHASE



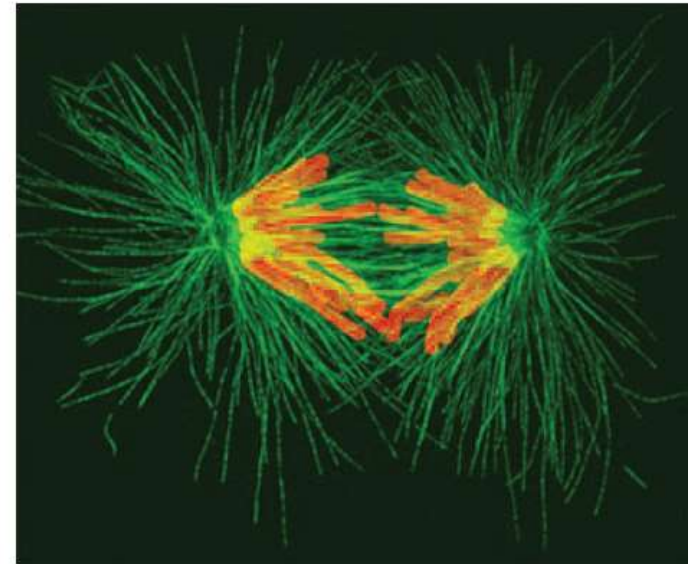
At **metaphase**, the chromosomes are aligned at the equator of the spindle, midway between the spindle poles. The kinetochore microtubules attach sister chromatids to opposite poles of the spindle.



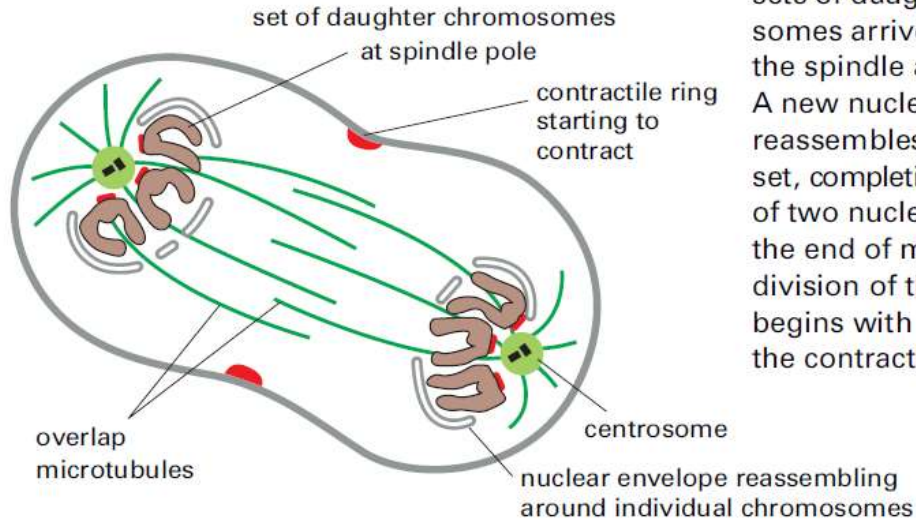
4 ANAPHASE



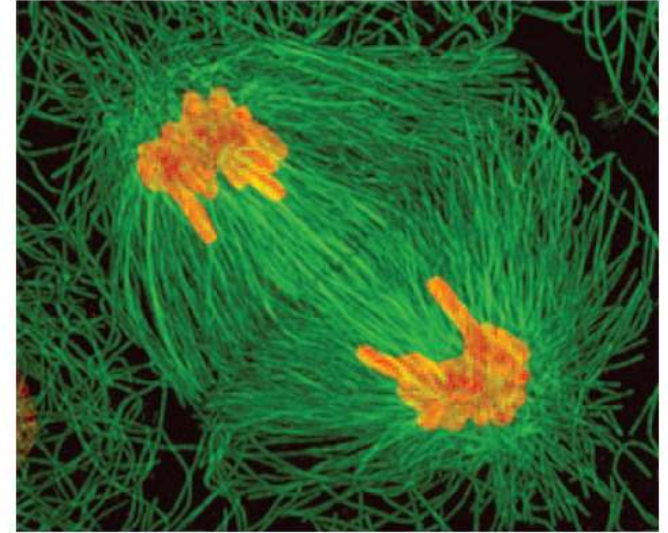
At **anaphase**, the sister chromatids synchronously separate to form two daughter chromosomes, and each is pulled slowly toward the spindle pole it faces. The kinetochore microtubules get shorter, and the spindle poles also move apart; both processes contribute to chromosome segregation.



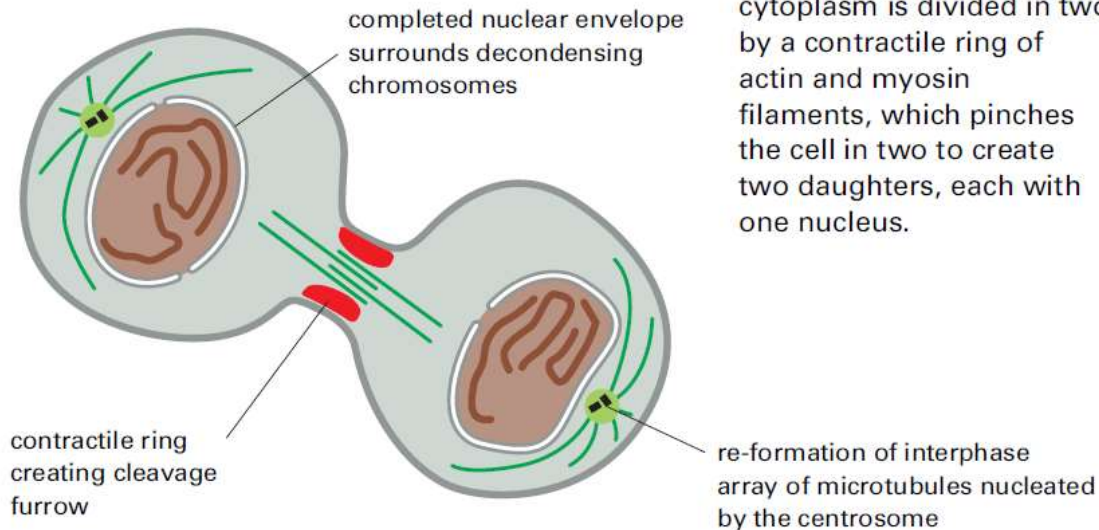
5 TELOPHASE



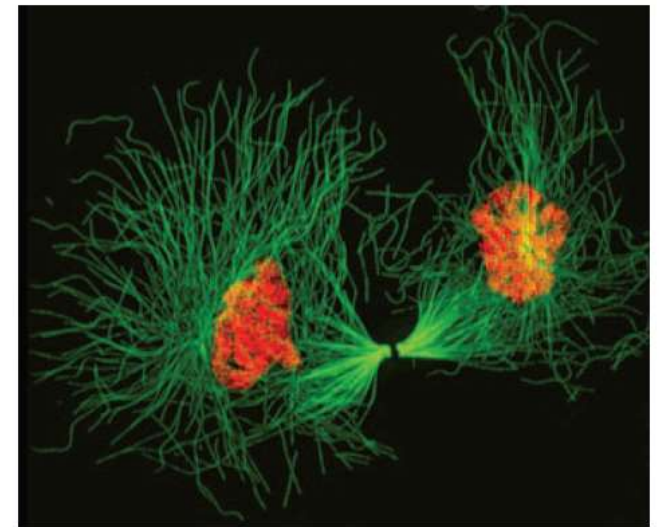
During **telophase**, the two sets of daughter chromosomes arrive at the poles of the spindle and decondense. A new nuclear envelope reassembles around each set, completing the formation of two nuclei and marking the end of mitosis. The division of the cytoplasm begins with contraction of the contractile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



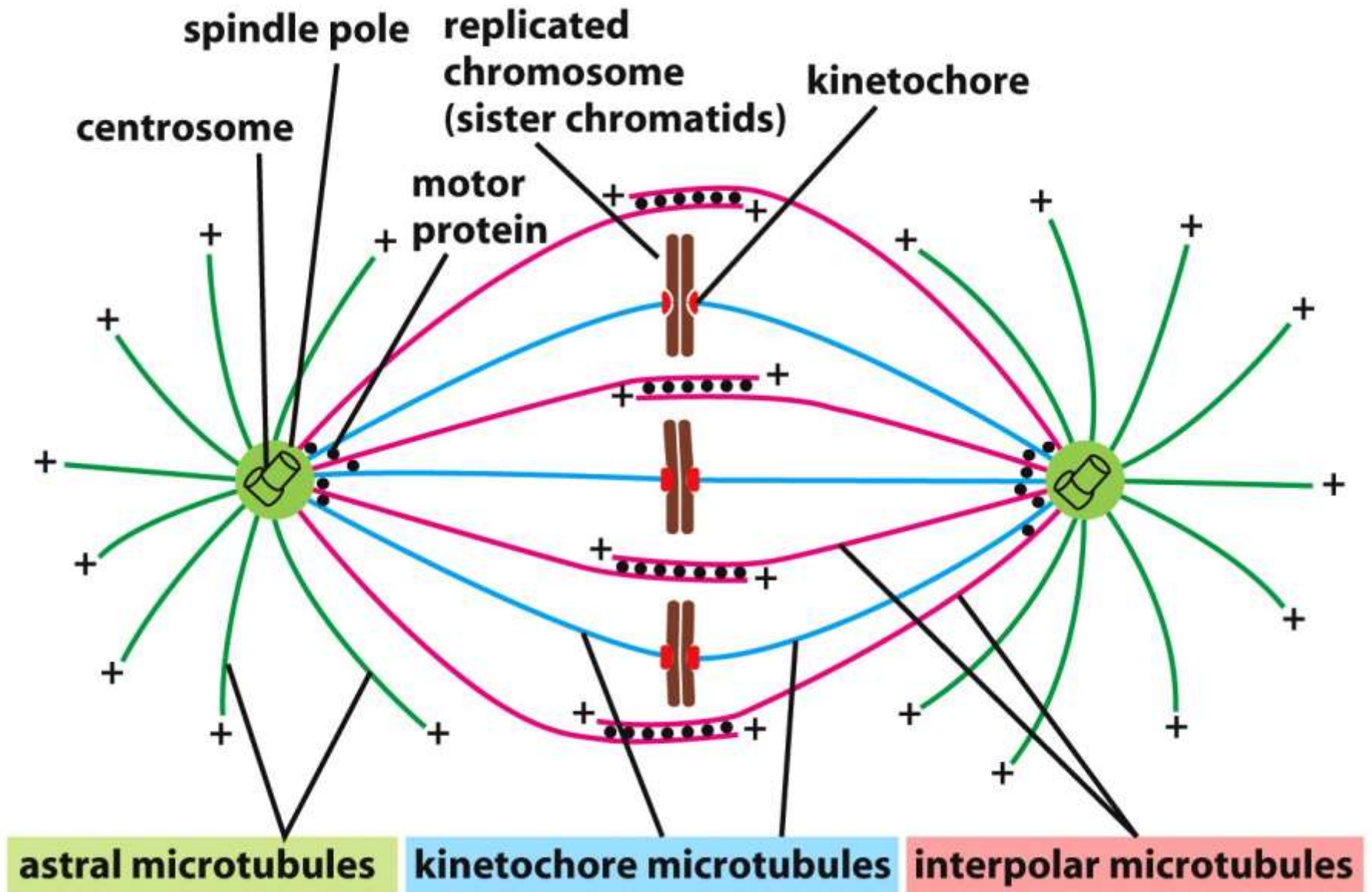


Figure 17-28 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

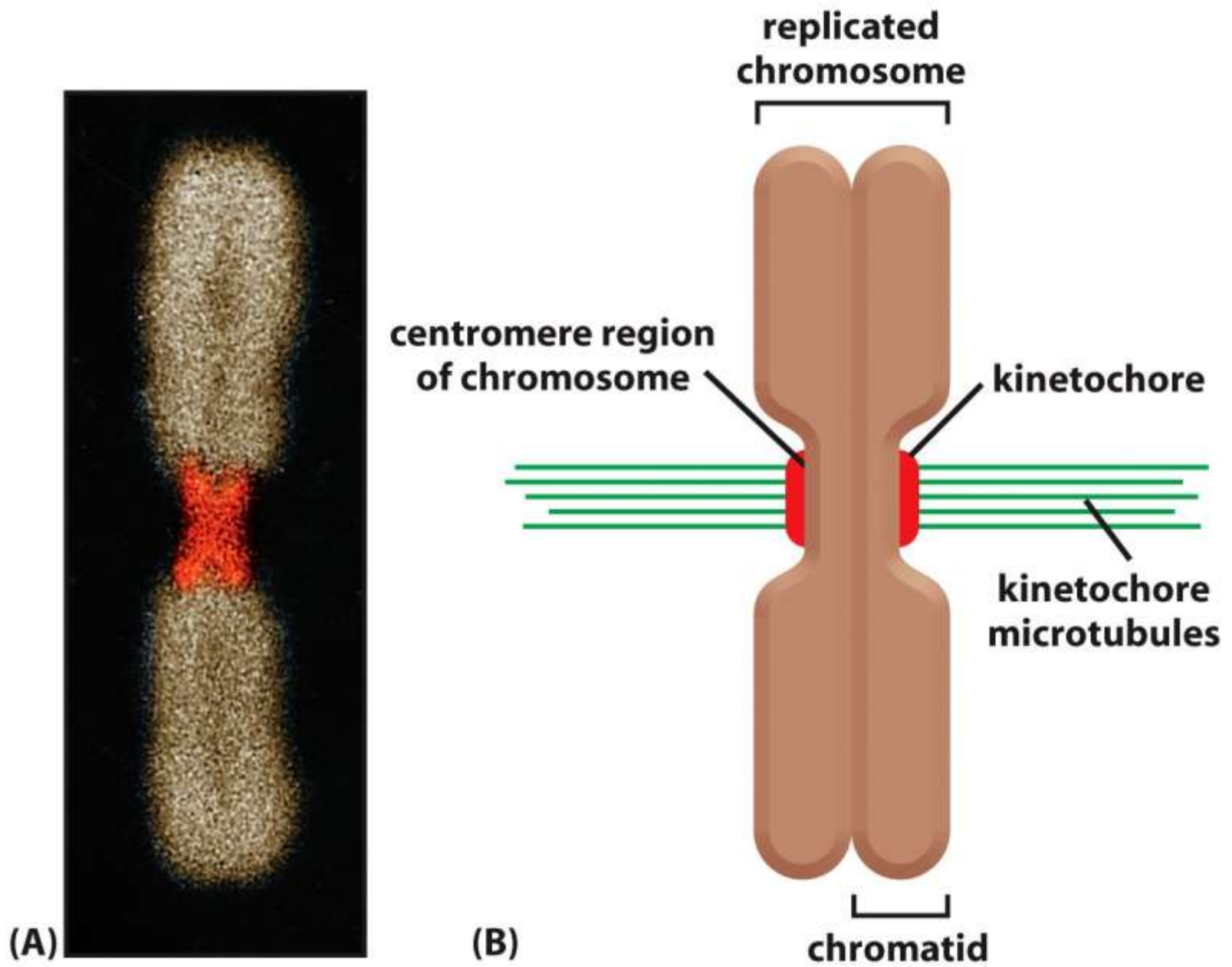
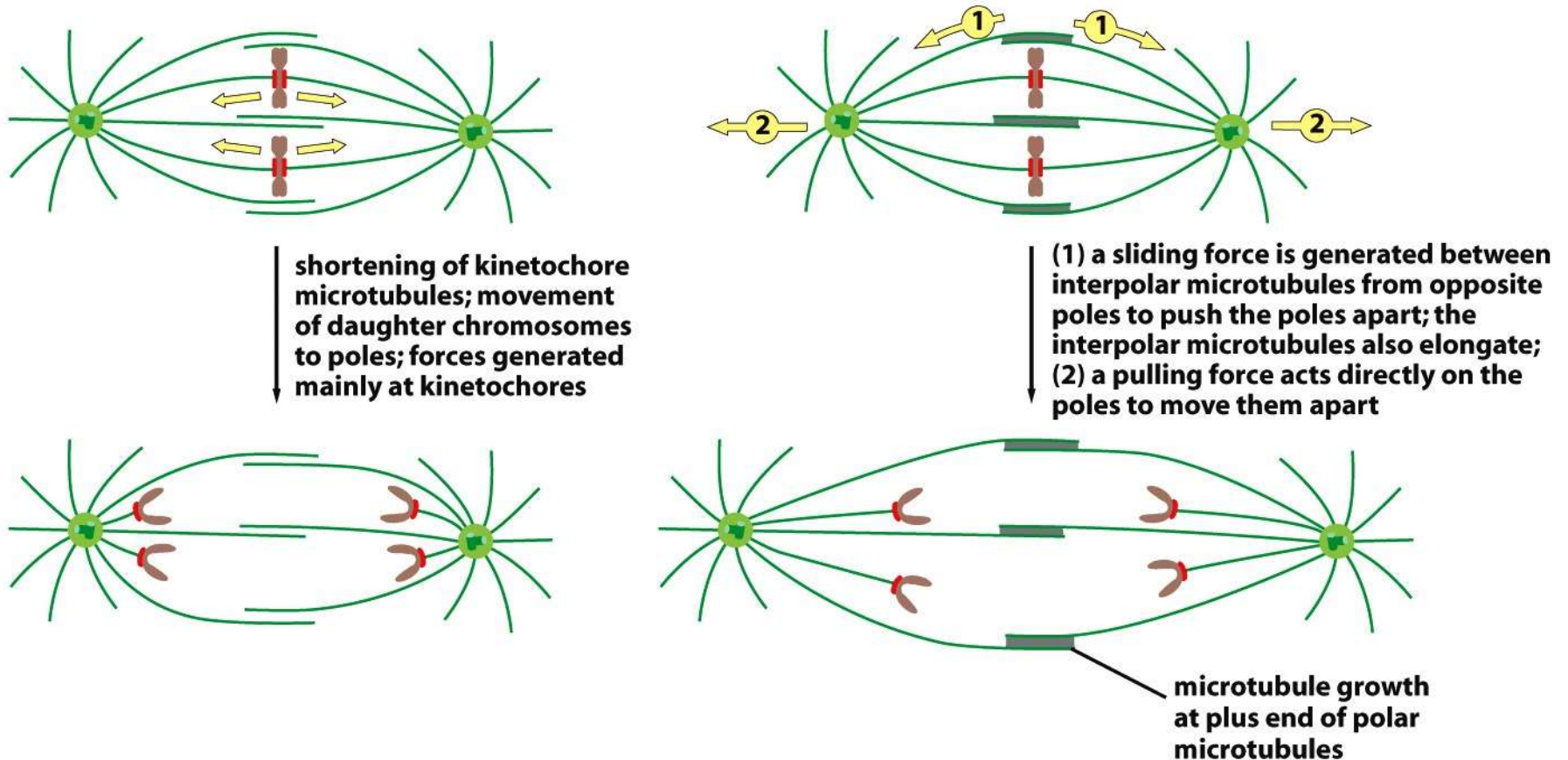


Figure 17-36a,b *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

Odlišná funkce kinetochorových a interpolárních mikrotubulů při anafázi



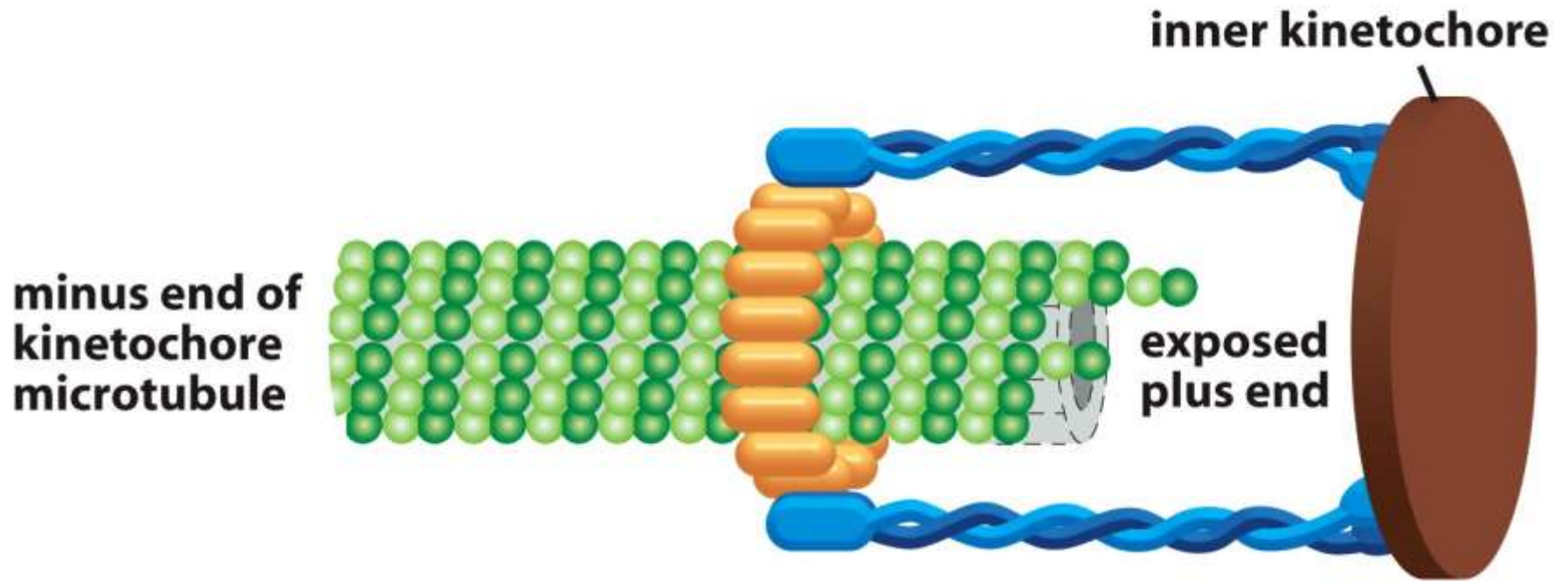


Figure 17-37 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

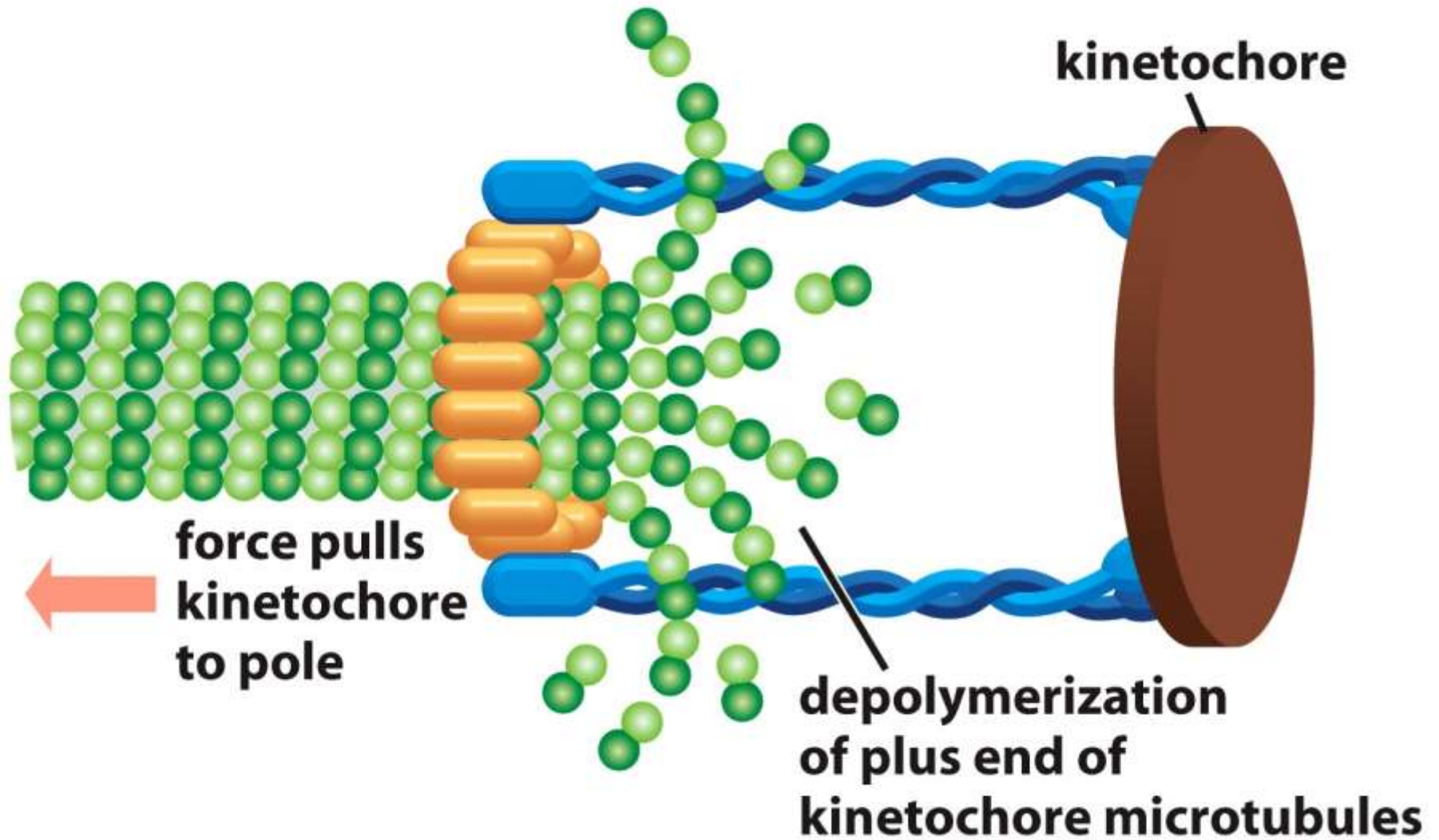


Figure 17-40 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

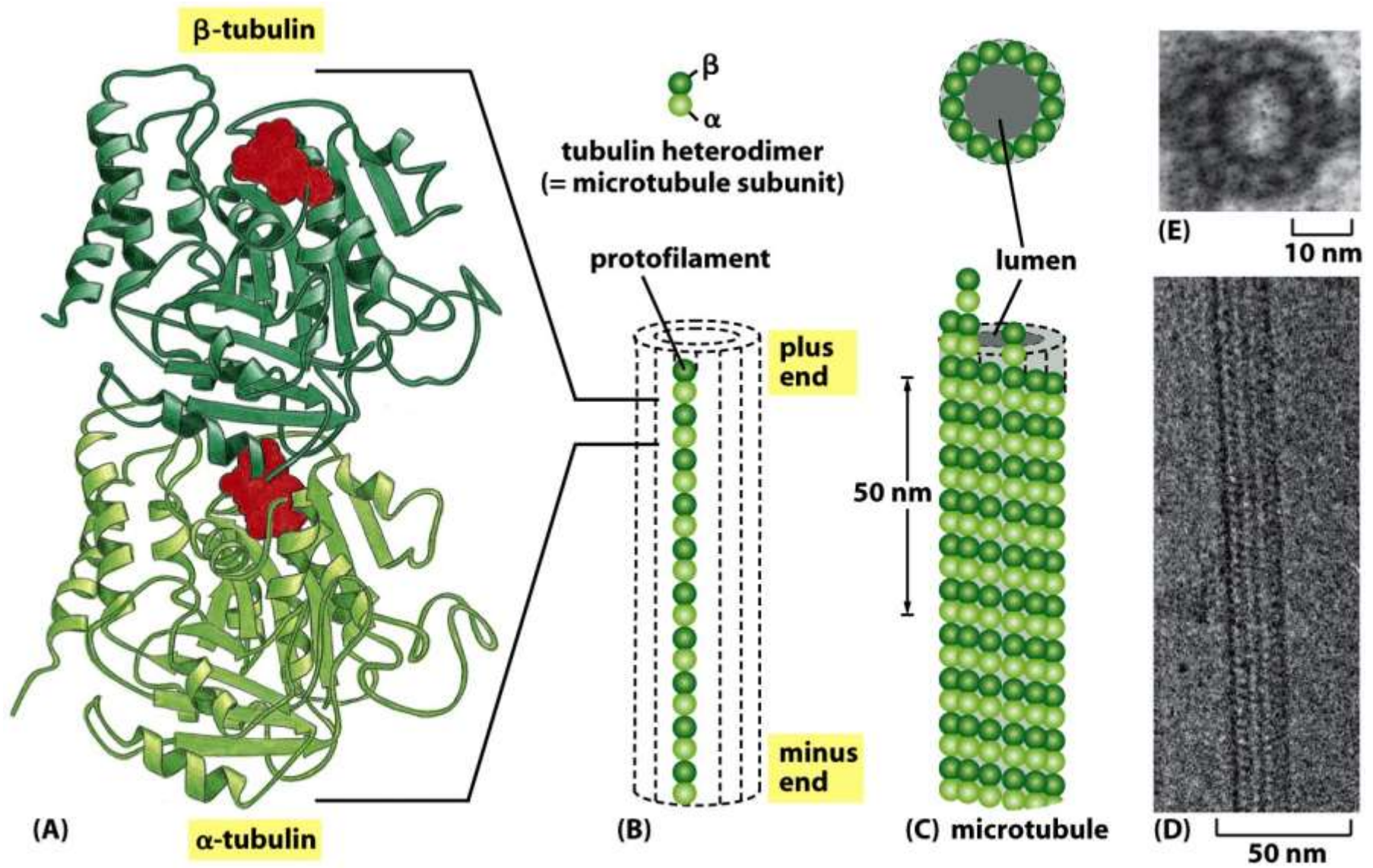
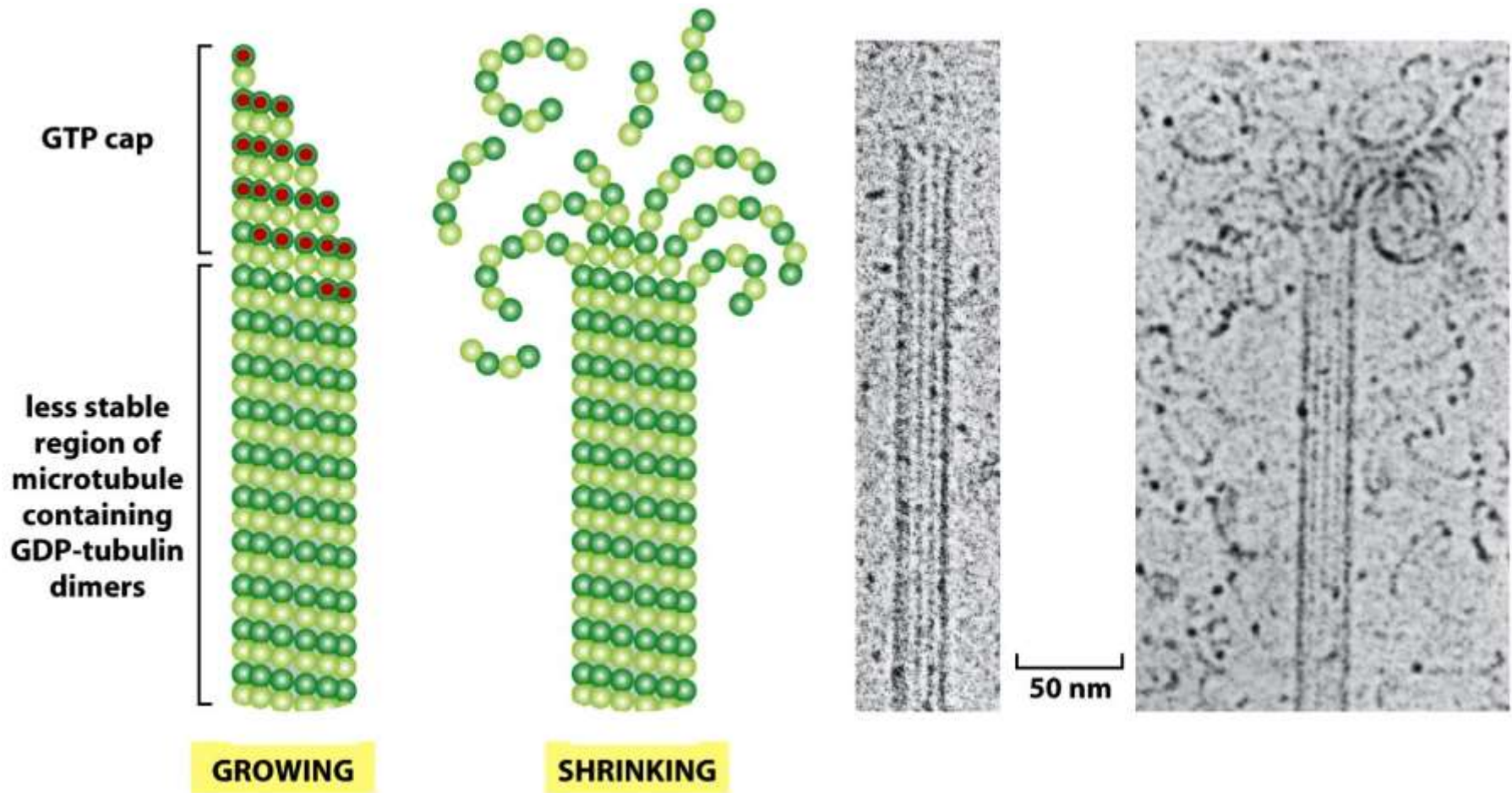
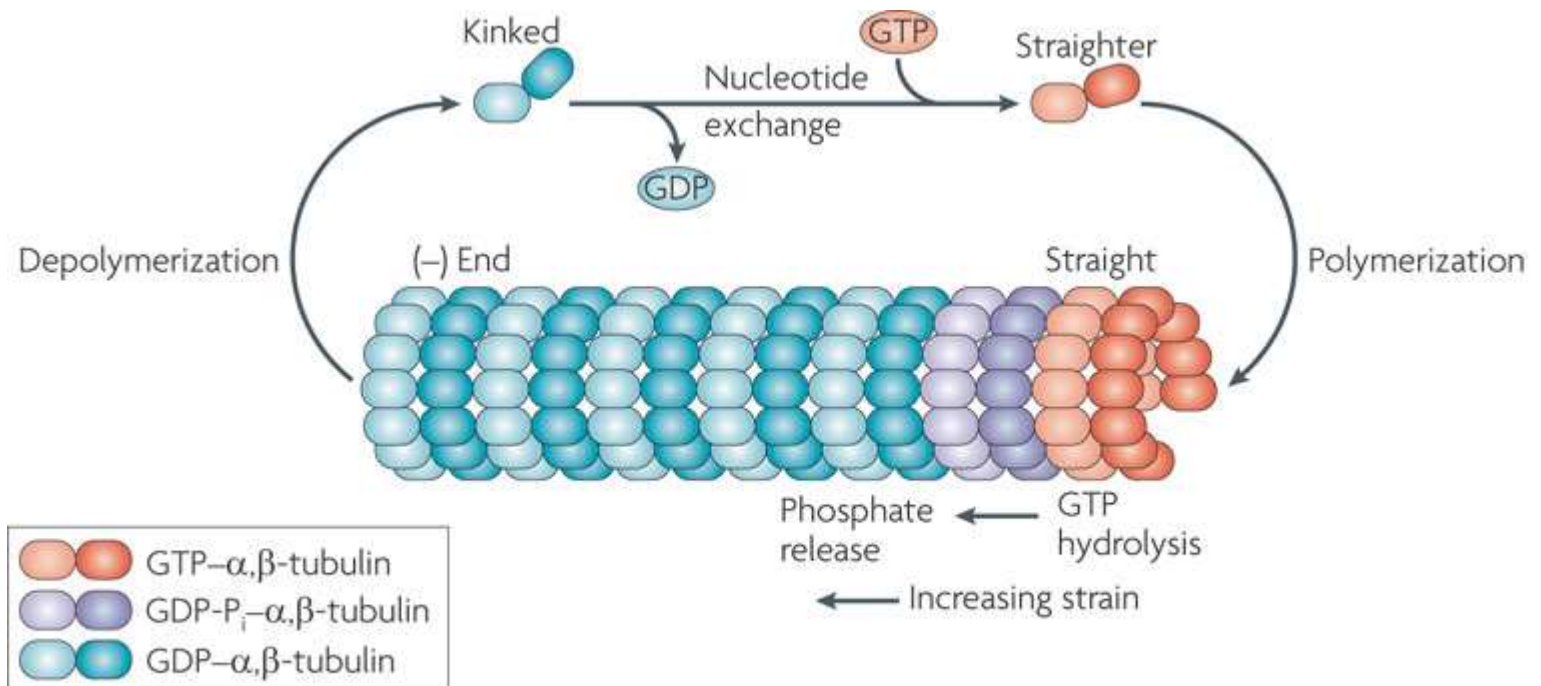


Figure 16-11 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

Dynamická instabilita mikrotubulů



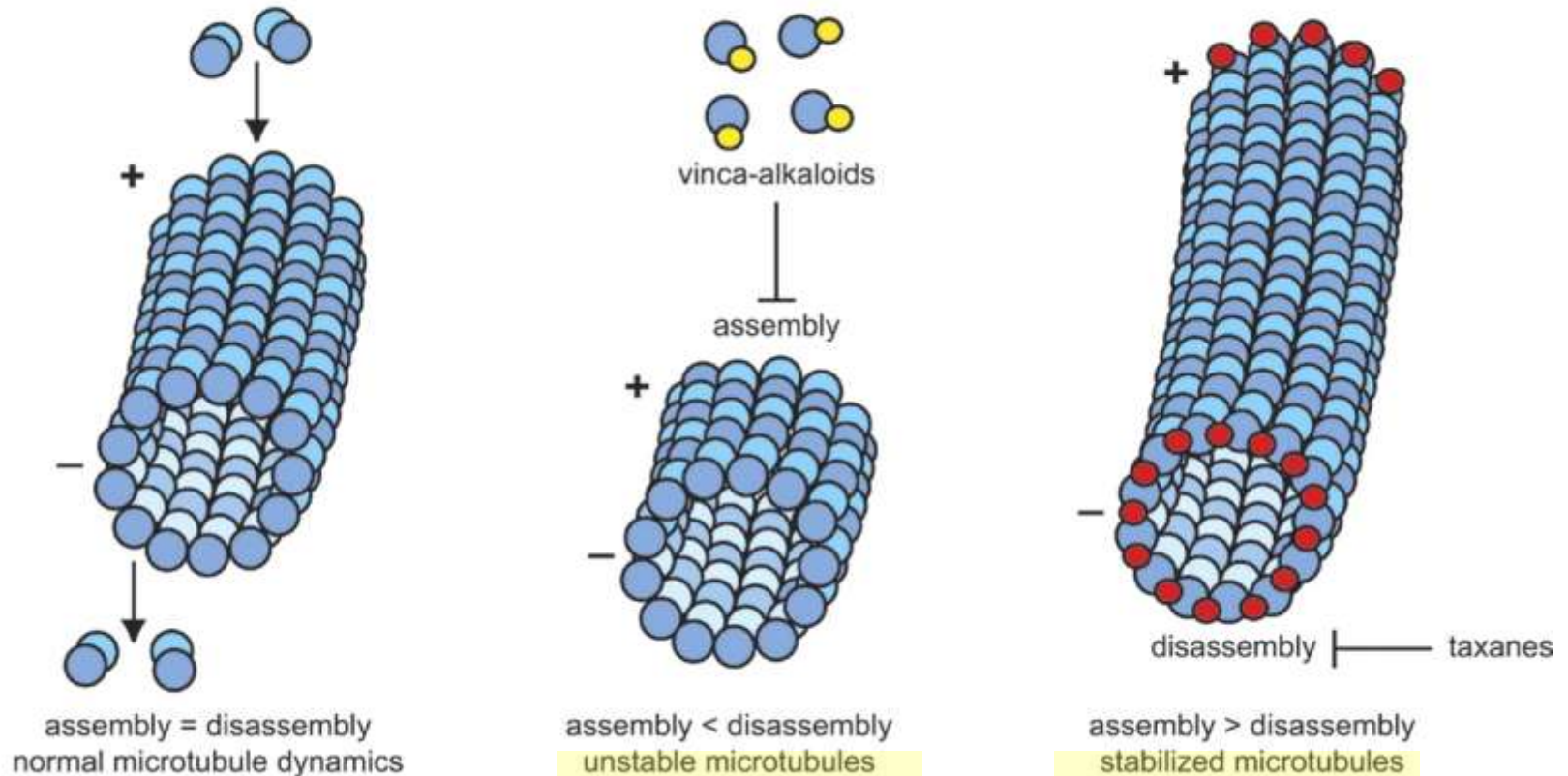
Dynamická instabilita mikrotubulů



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

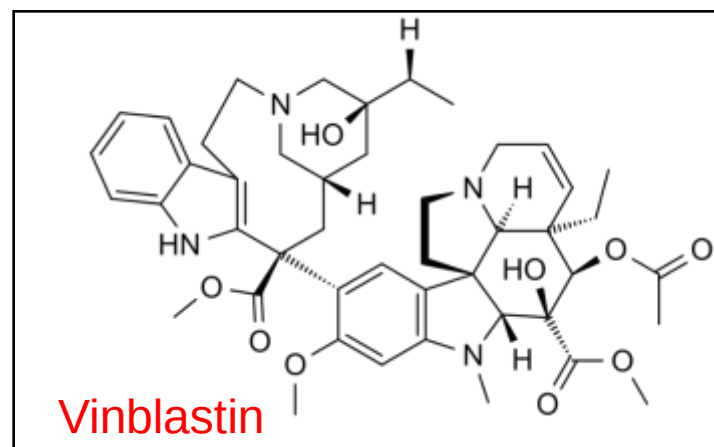
Vinca rosea (barvínek růžový)

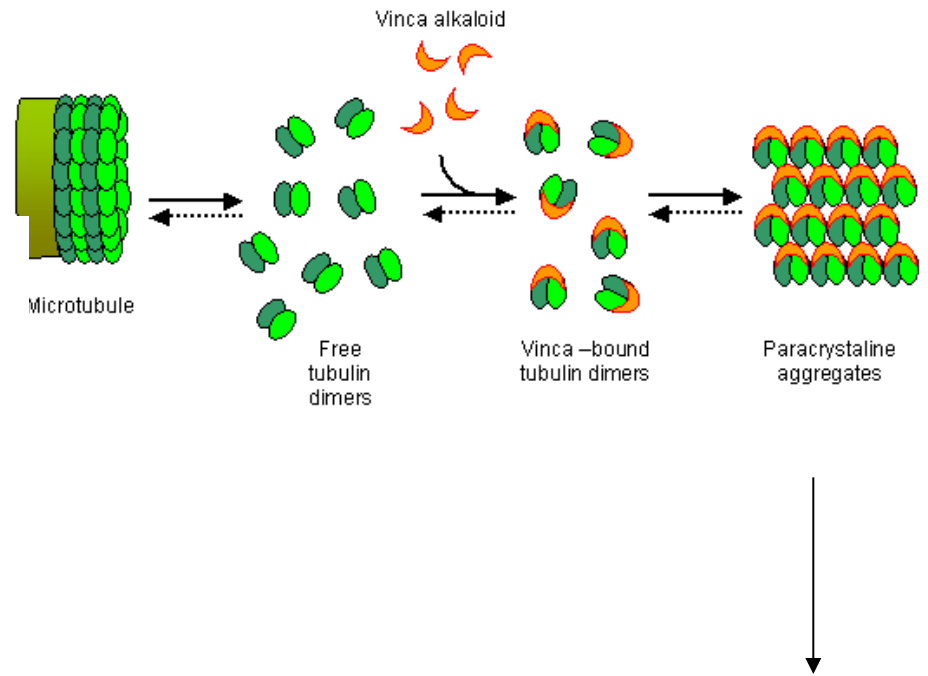
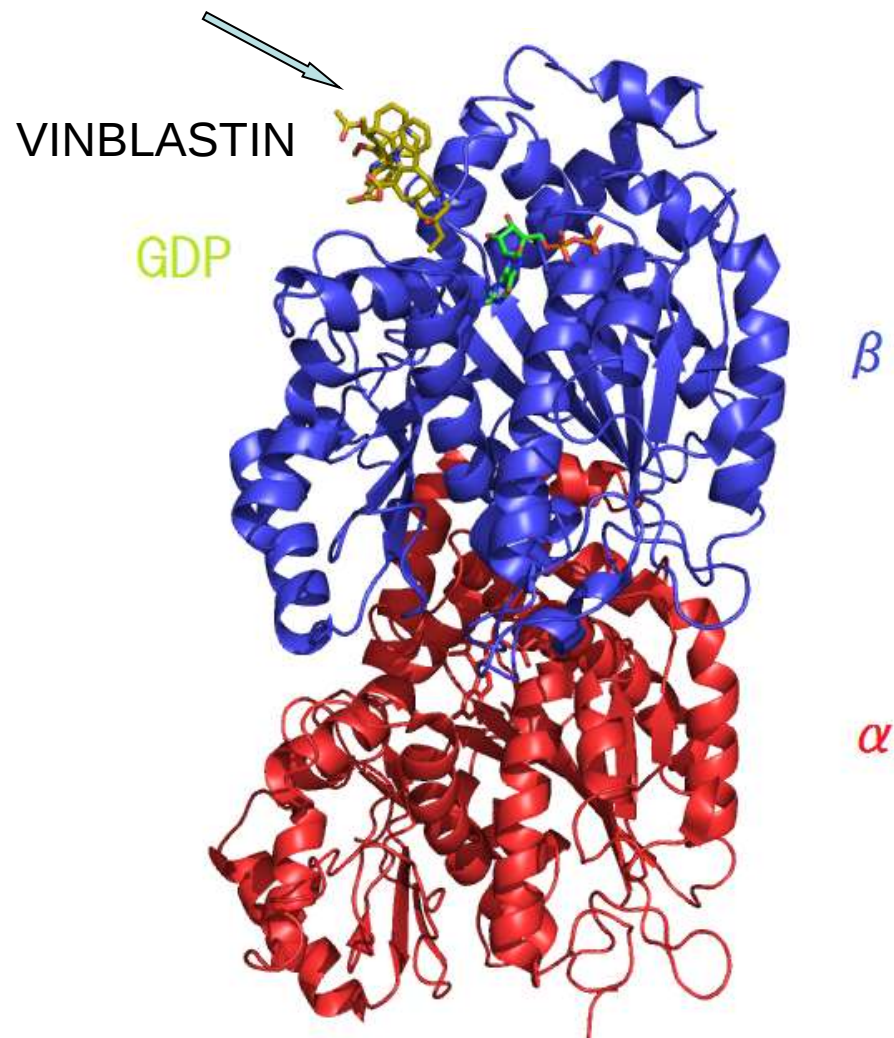
VINBLASTIN

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

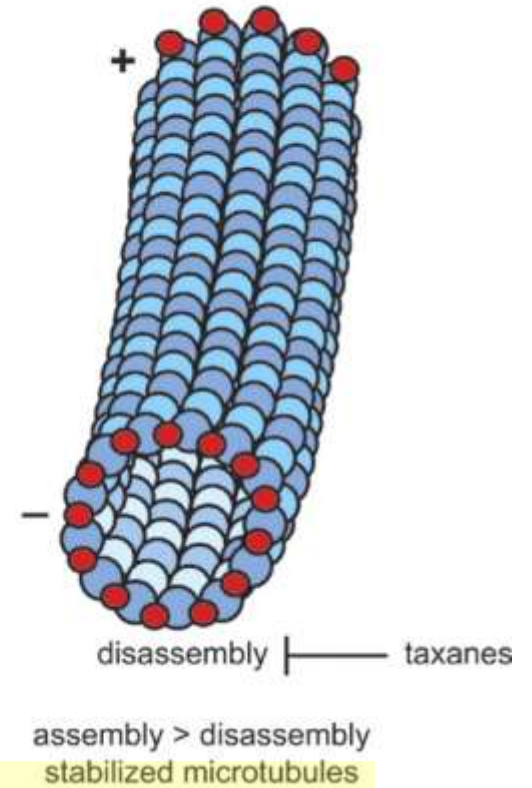
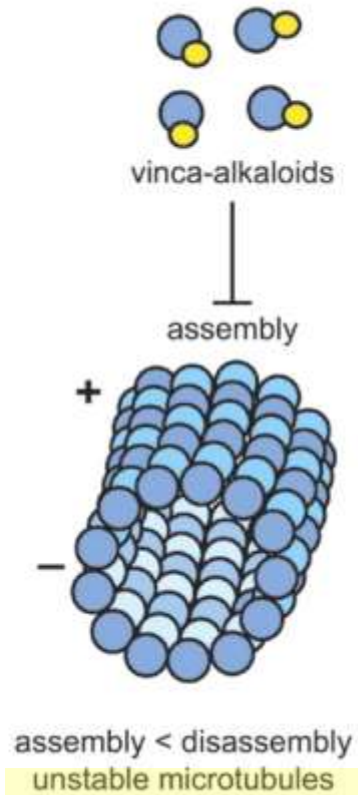
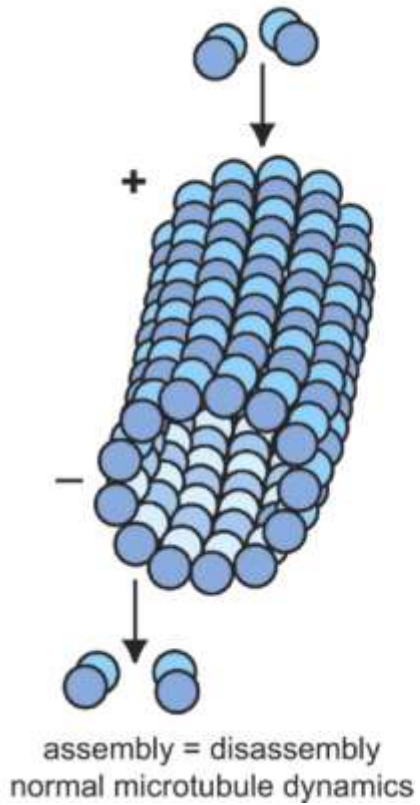
VINKRISTIN

VINORELBIN (poosyntetický derivát)





Nedojde k anafázi,
nebo je v ní buňka
zastavena

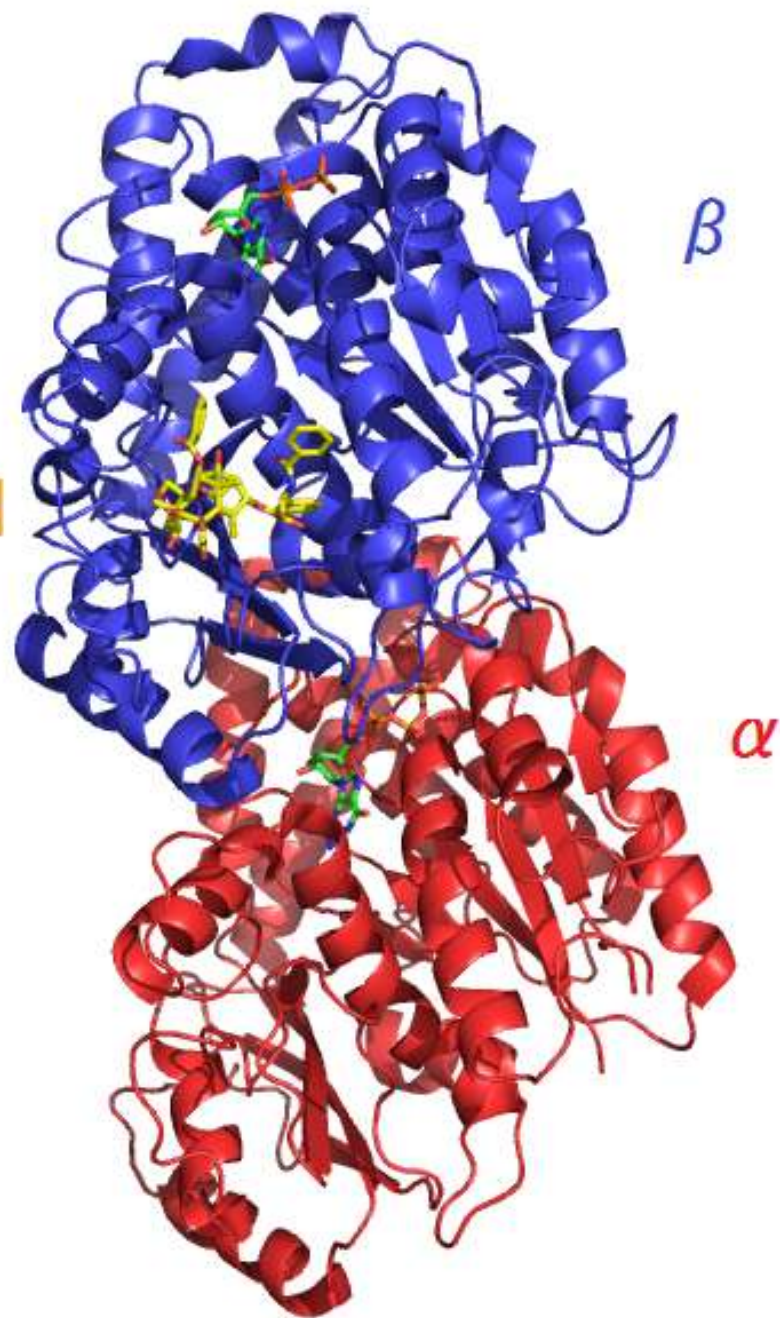


INHIBITORY DEPOLYMERACE MT (stabilizanty)

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)

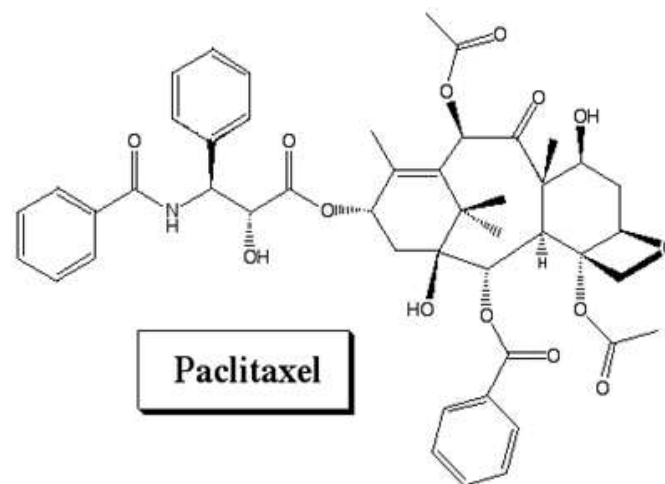
paclitaxel



Paclitaxel & Docetaxel



Tis krátkolistý *Taxus brevifolia* (kůra)

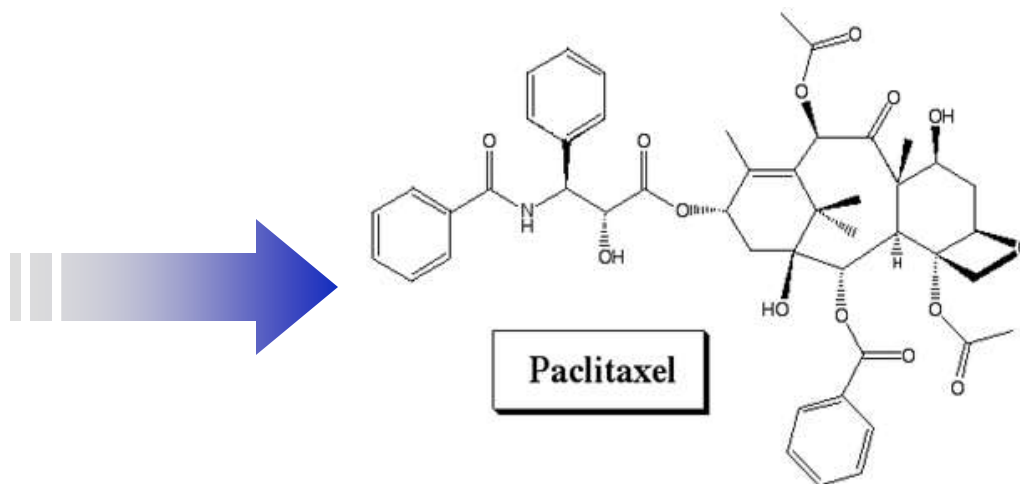


! Izolace taxolu z *Taxus brevifolia* pro léčbu karcinomu ovária a melanomů jen v USA by vyžadovala 360 000 stromů ročně!

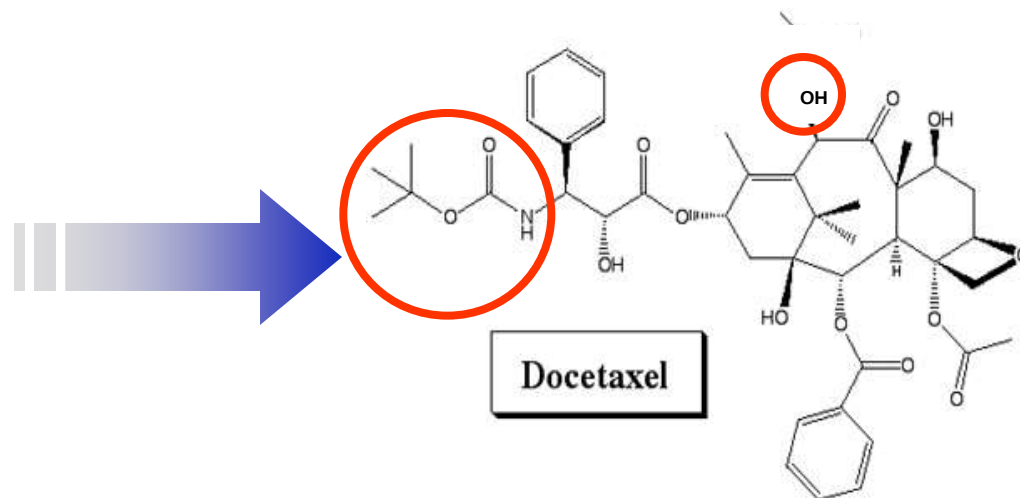
Paclitaxel & Docetaxel



Tis krátkolistý *Taxus brevifolia* (kůra)



Tis červený *Taxus baccata* (jehličí)



TAXANY



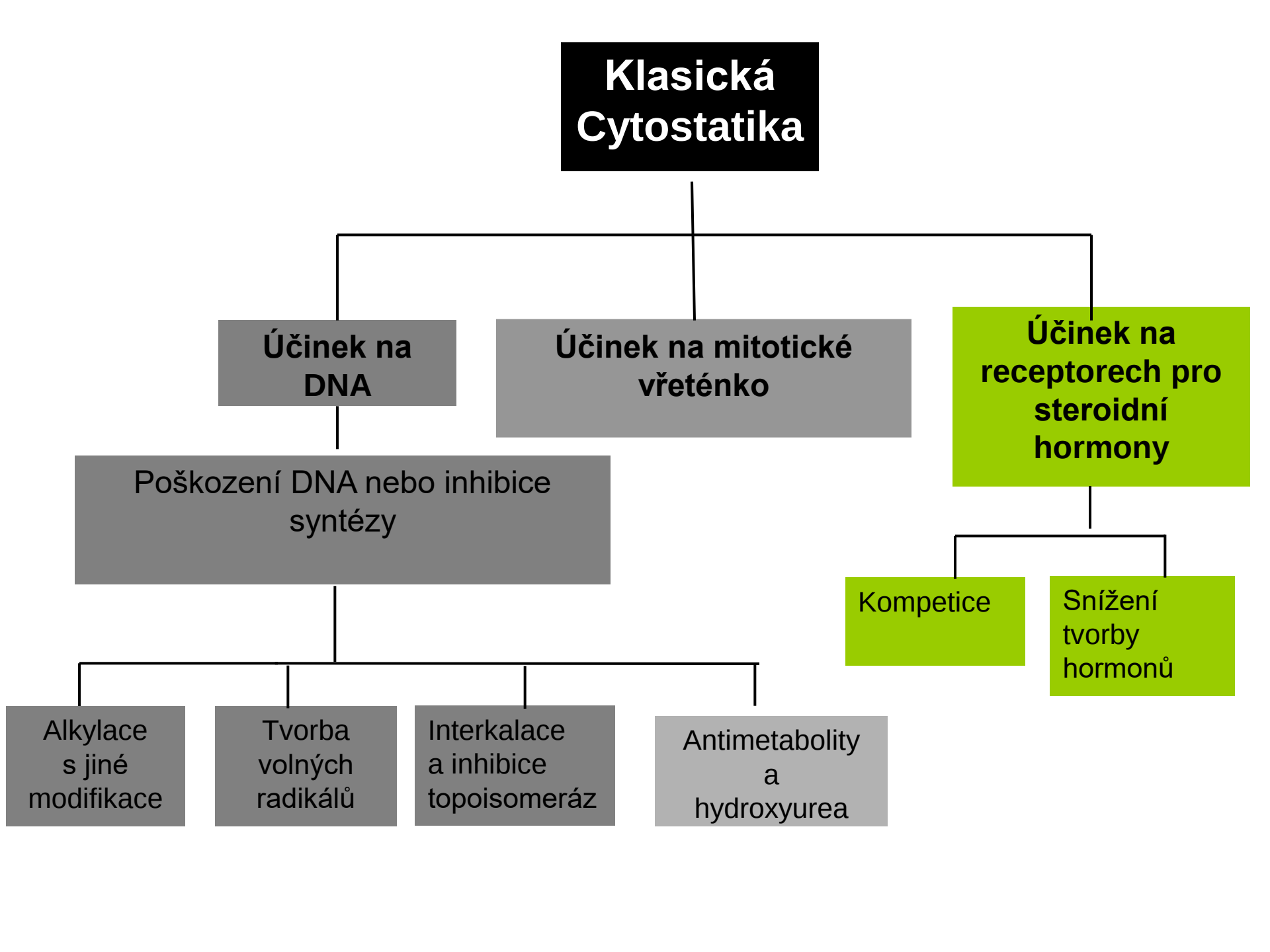
Taxany jsou ve skutečnosti syntetizovány symbiotickou houbou v kůře.



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

PACLITAXEL + DOCETAXEL

Klasická Cytostatika



```
graph TD; A[Klasická Cytostatika] --> B[Účinek na DNA]; A --> C[Účinek na mitotické vřeténko]; A --> D[Účinek na receptorech pro steroidní hormony]; B --> E[Poškození DNA nebo inhibice syntézy]; E --> F[Alkylace s jiné modifikace]; E --> G[Tvorba volných radikálů]; E --> H[Interkalace a inhibice topoisomeráz]; E --> I[Antimetaboly a hydroxyurea]; D --> J[Kompetice]; D --> K[Snížení tvorby hormonů];
```

**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 (u části žen) k ústupu nádorů!



Charles Huggins

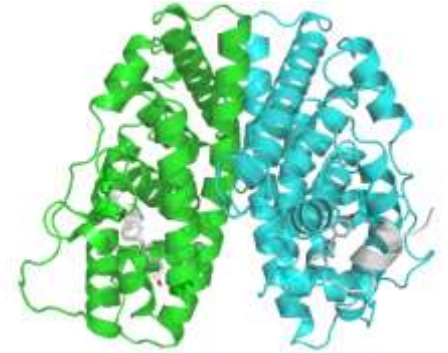
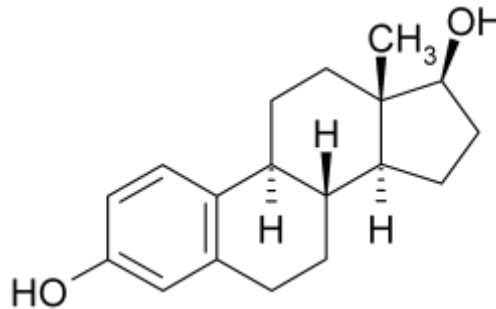
1930-1940s kastrace psa s nádorem prostaty vede ke
zmenšení nádoru, později pomocí „feminizace nebo „chemické
kastrace“ u mužů podobný efekt

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

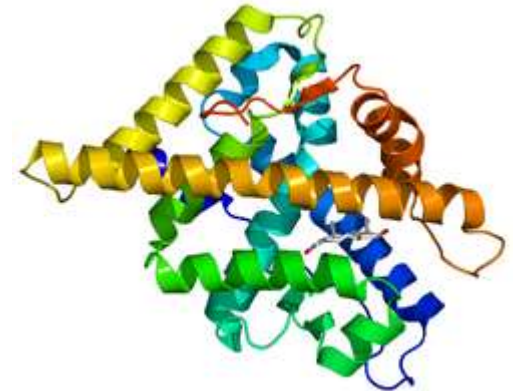
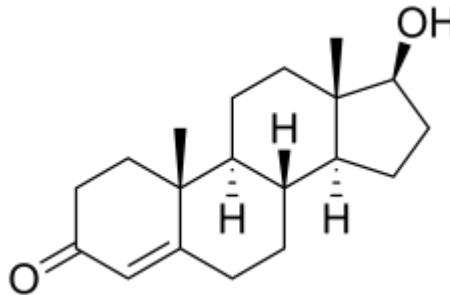
1930s – struktura estrogeneru a testosteronu

1968 – objeven estrogenový receptor (ER)

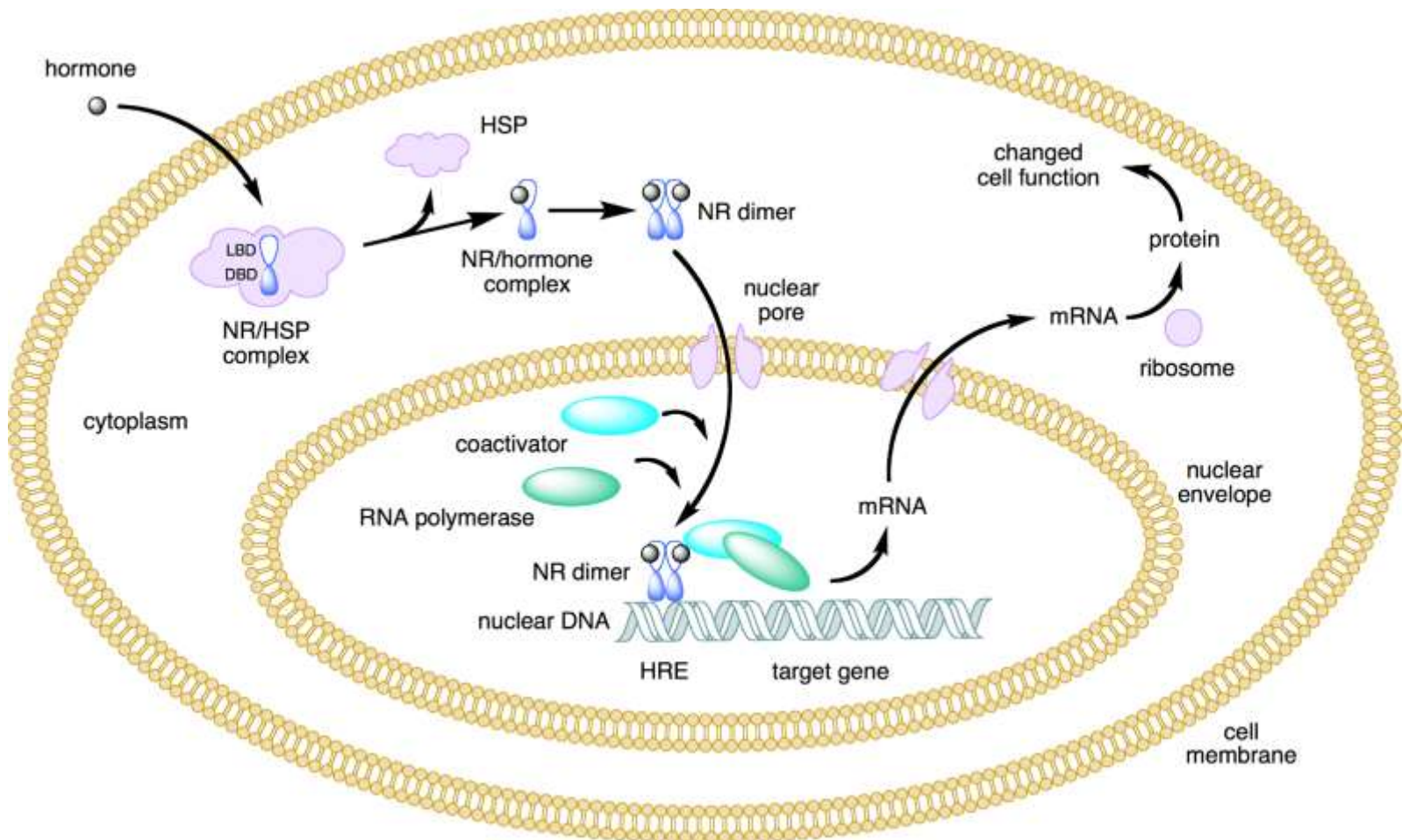
Vazba estrogeneru na **estrogenový receptor** (ER, nemembránový jaderný receptor) vede k jeho dimerizaci, lokalizaci do jádra, a transkripční regulaci vedoucí k proliferaci



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



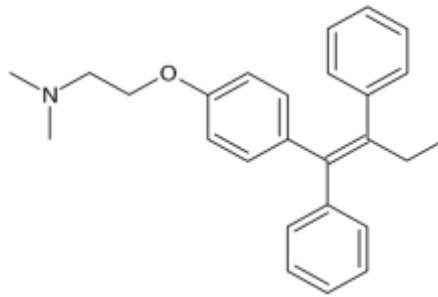
Po navázání hormonu na jaderný receptor (NR) dojde k uvolnění HSP, dimerizaci receptoru a přesunu do jádra a následné transkripční regulaci vazbou na HRE (hormone-response elements)



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

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

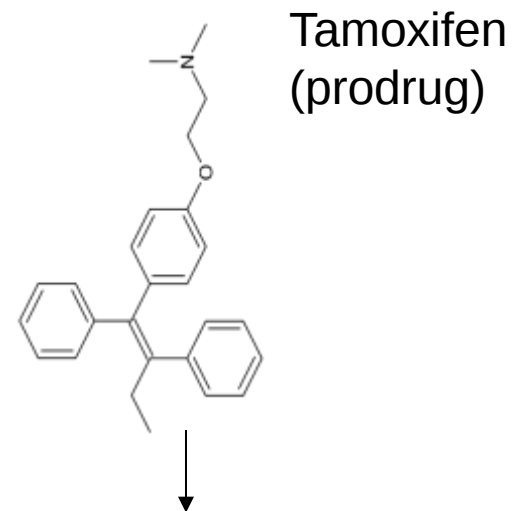
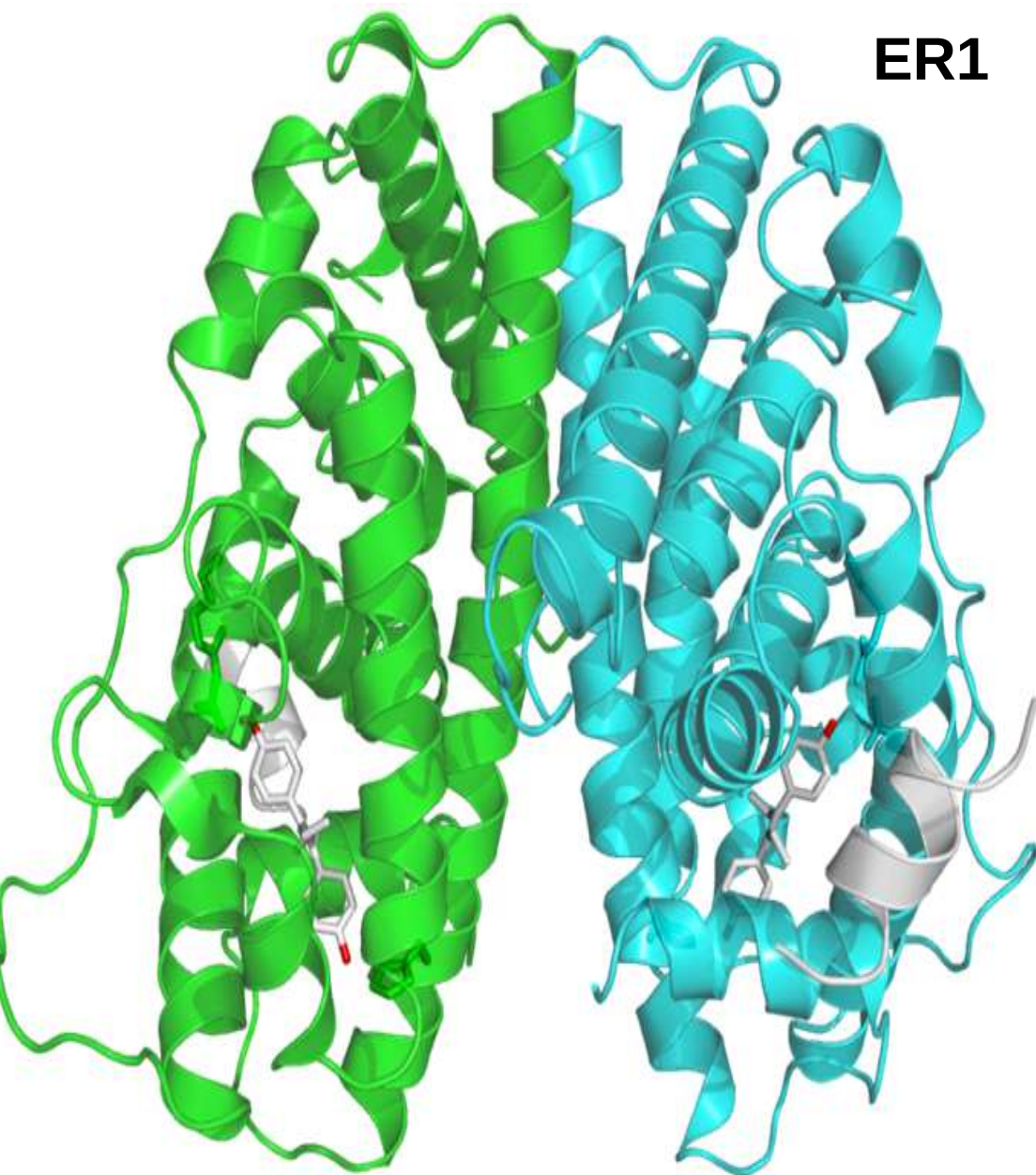
Klinické testy k potlačení nádorů prsu 1969-1970s



TAMOXIFEN

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

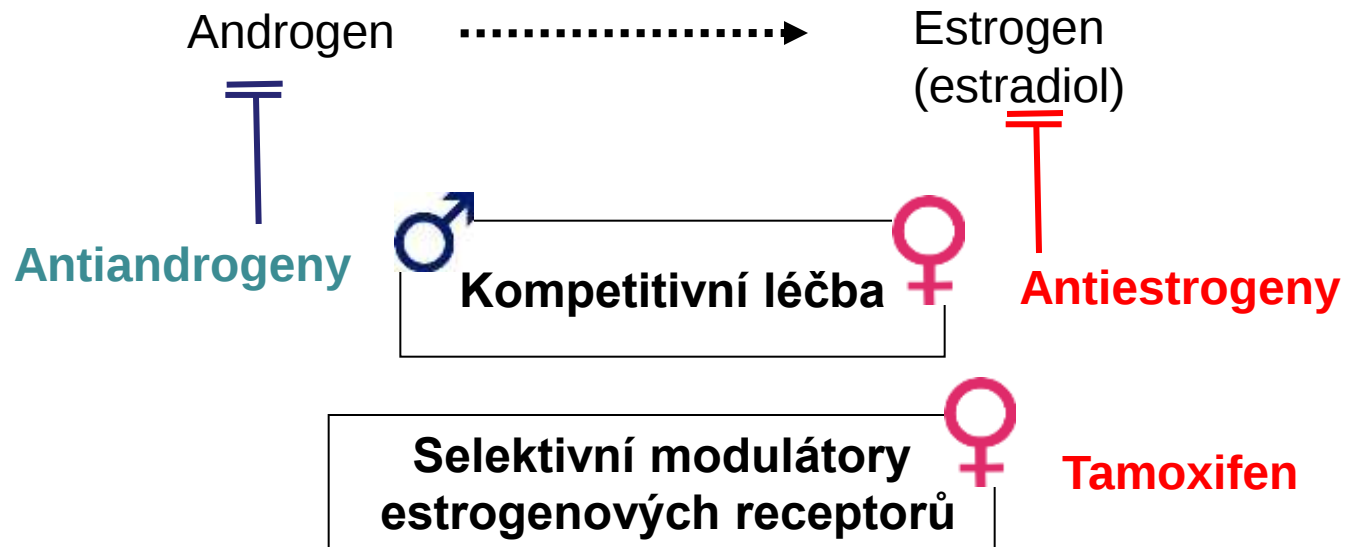
Není to typický antiestrogen, ale **selektivní modulátor ERs**



Tamoxifen hydroxylován
jaterními enzymy

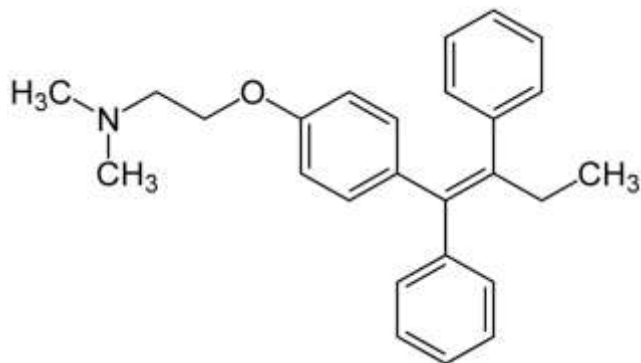
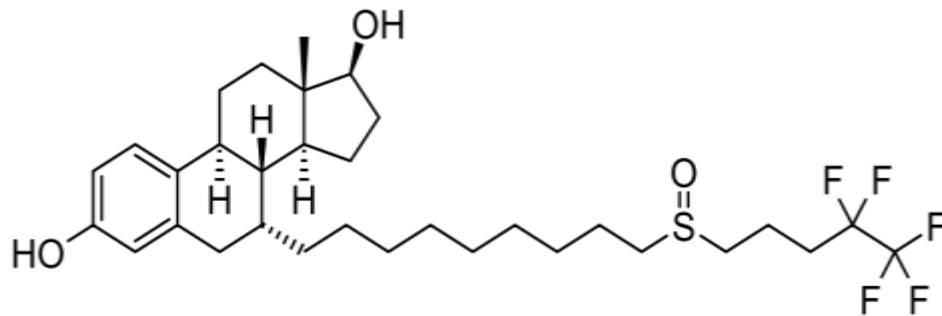
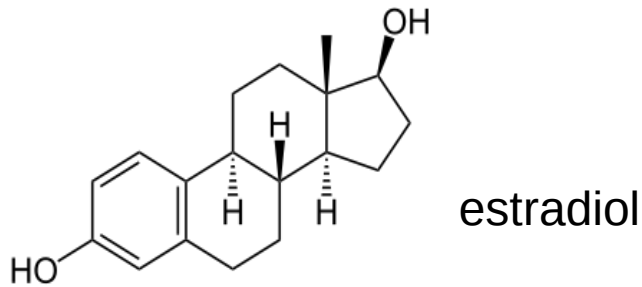


Možnosti léčby nádorů závislých na hormonech (nádory prsu a prostaty)

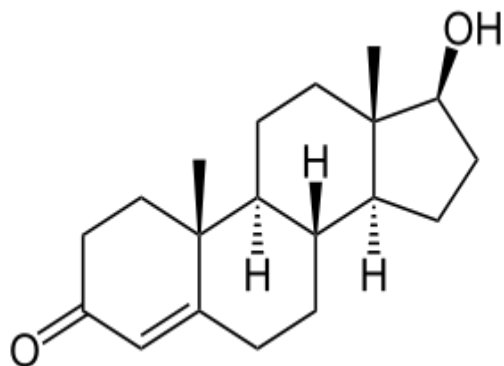


Antiestrogeny a selektivní modulátory ER (SERM)

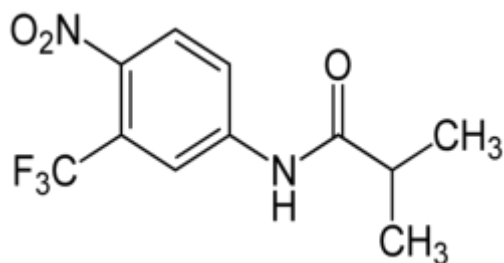
kompetice s estrogeny o vazbu na ER receptory nebo blok receptoru



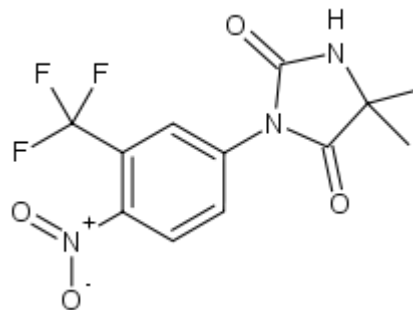
Antiandrogeny - kompetice s testosteronem a dihydrotestosteronem
O vazbu na androgenový receptor
(terapie karcinomu prostaty, v kombinaci s kastrací)



testosteron



Flutamid



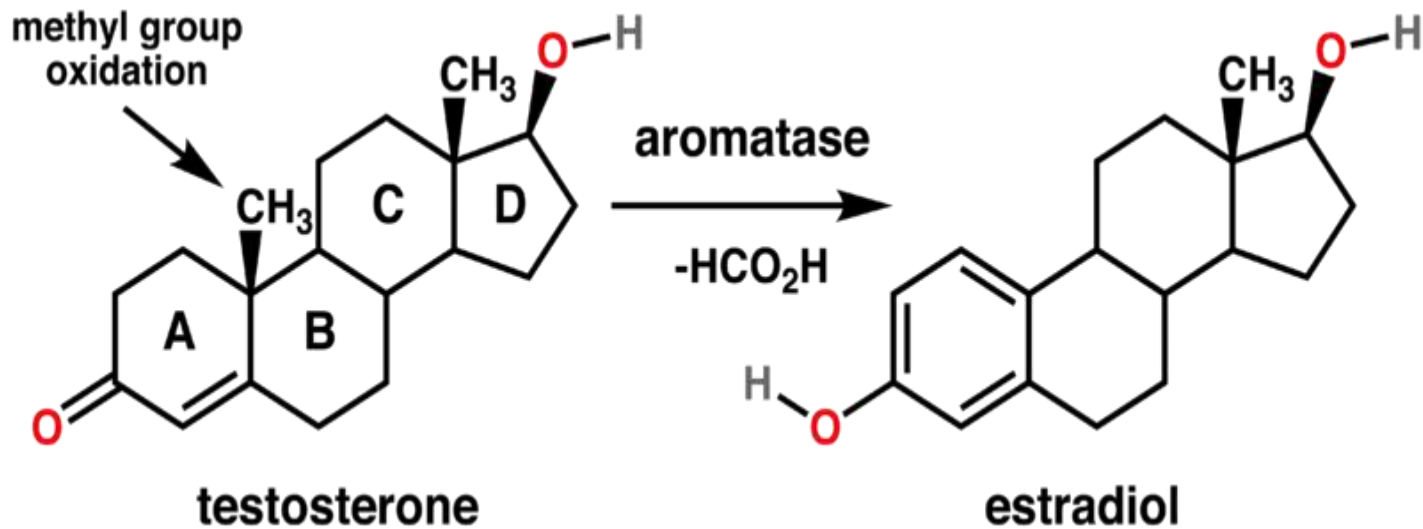
Nilutamid

+Apalutamid
+ a další

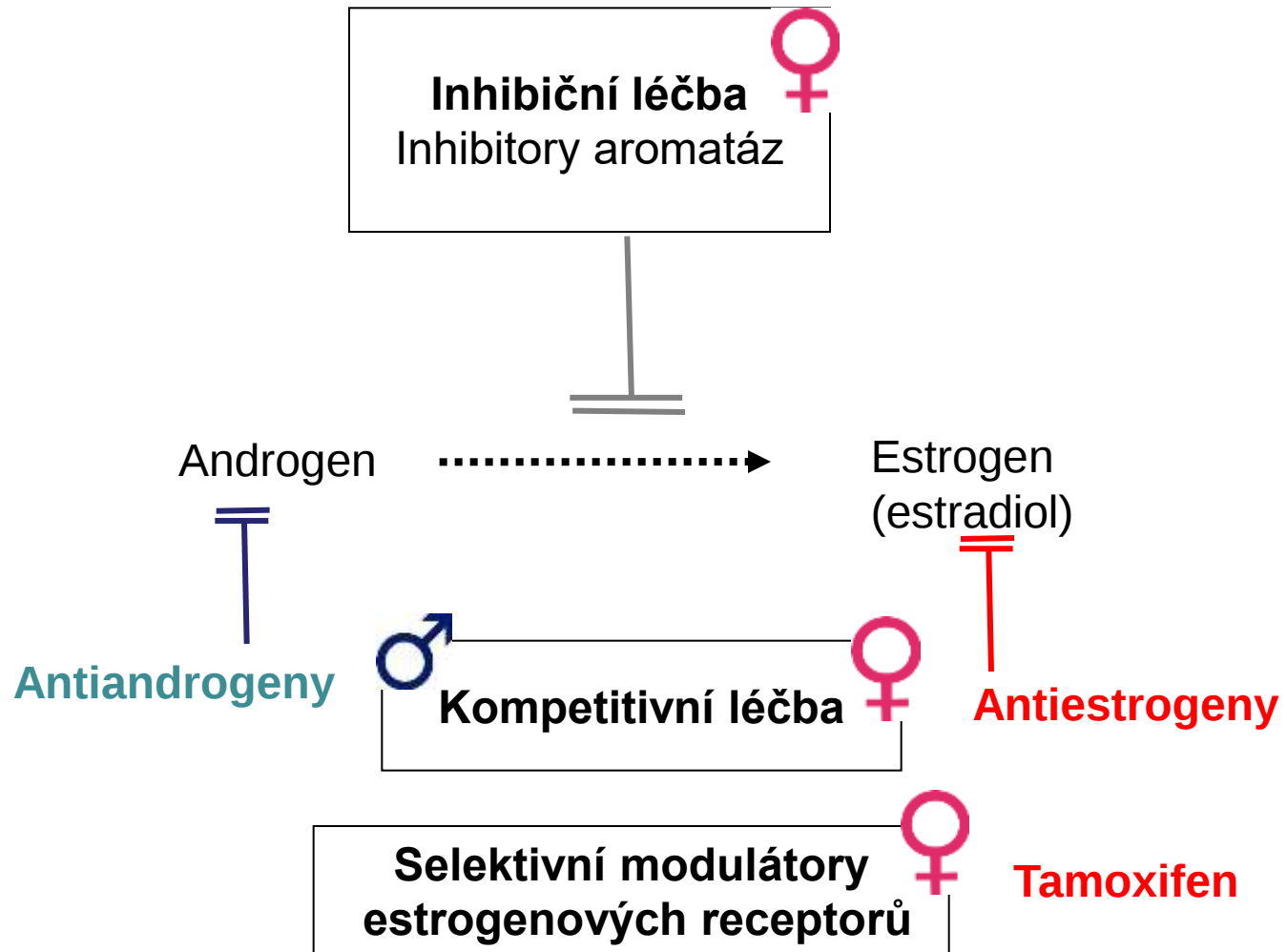
Estrogeny jsou syntetizovány **aromatázou** z androgenů

testosteron

estradiol

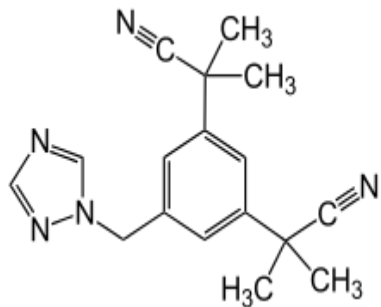


Možnosti léčby nádorů závislých na hormonech (nádory prsu a prostaty)

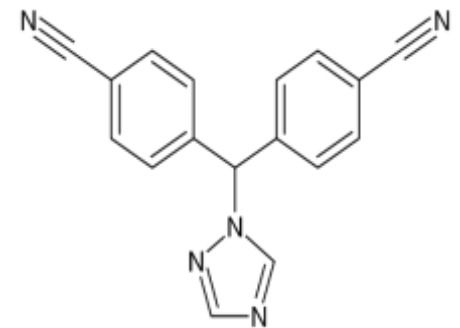


Inhibitory aromatázy

Terapie karcinomu prsu

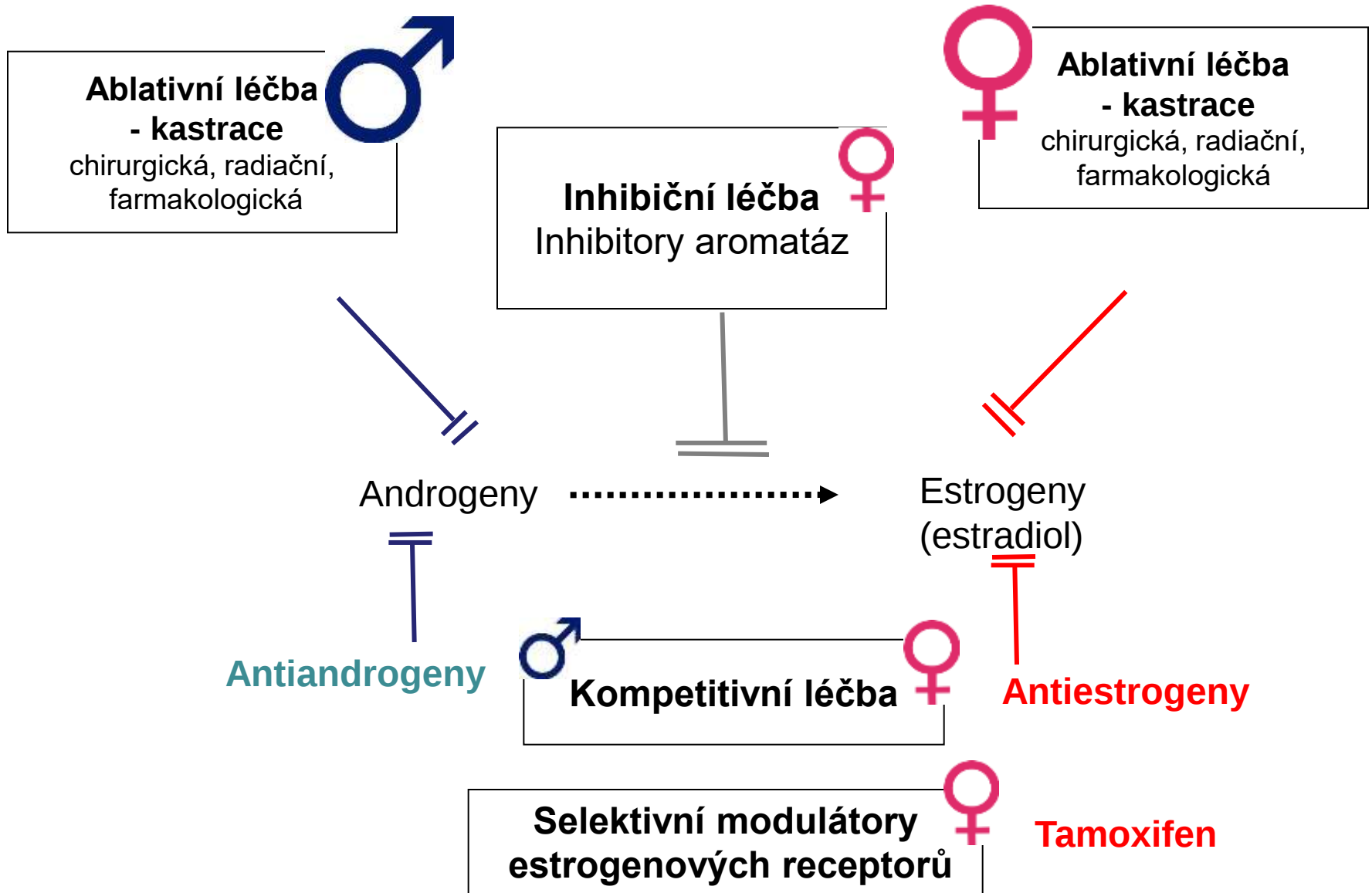


Anastrozol

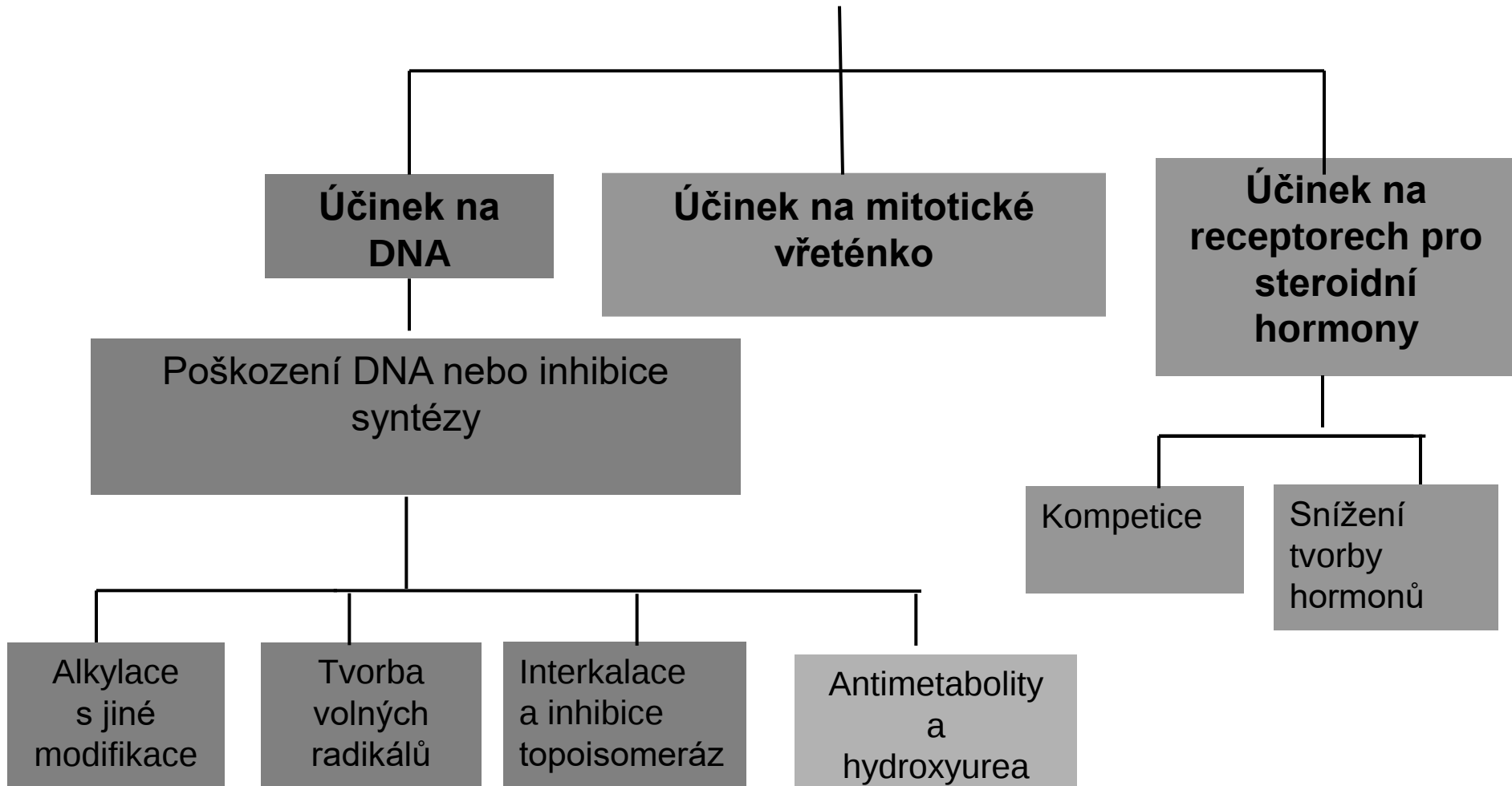


Letrozol

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



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

LÁTKY OVLIVŇUJÍCÍ EPIGENETICKÉ ZNAKY

Epigenetické – děditelné znaky nezpůsobené změnami v sekvenci DNA

Změna struktury a aktivity chromatinu

DNA modifikace (methylace)

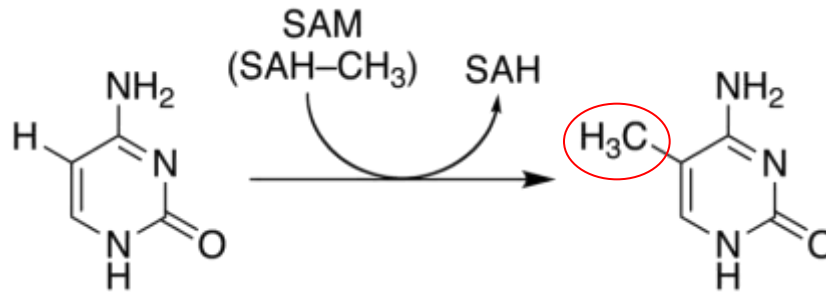
Modifikace histonů (acetylace, methylace...)

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.

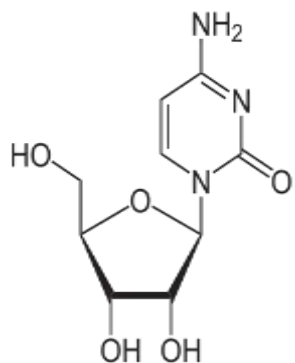
DNA metyltransferázy lze blokovat **aza-analogy cytosinu**

Aza-cytidin

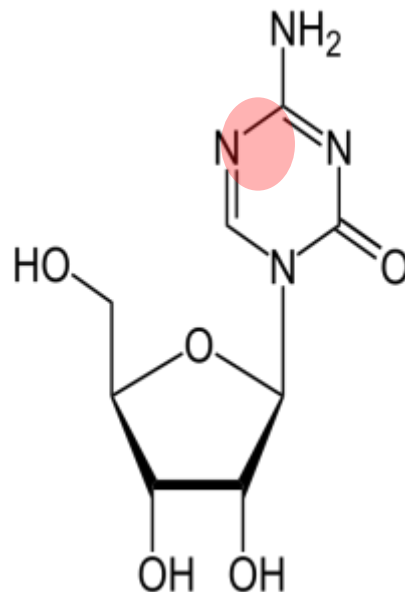
Decitabin (2′deoxy- 5′aza cytidin)

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

AZA-CYTIDIN (Vidaza)

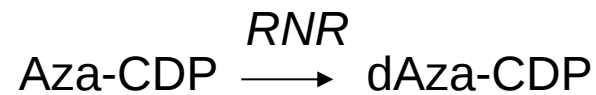


cytidin



Aza-cytidin

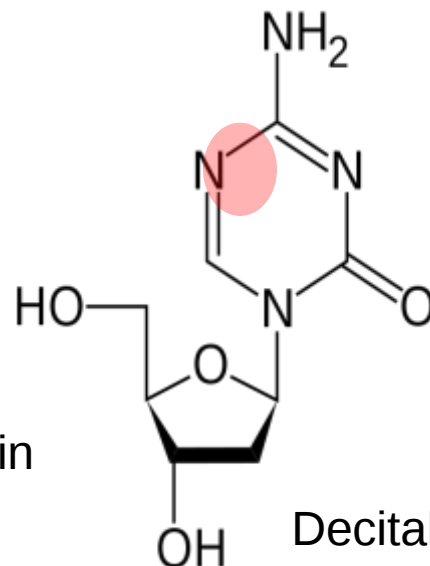
Fosforylován
Inkorporovávce do RNA



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

DECITABIN

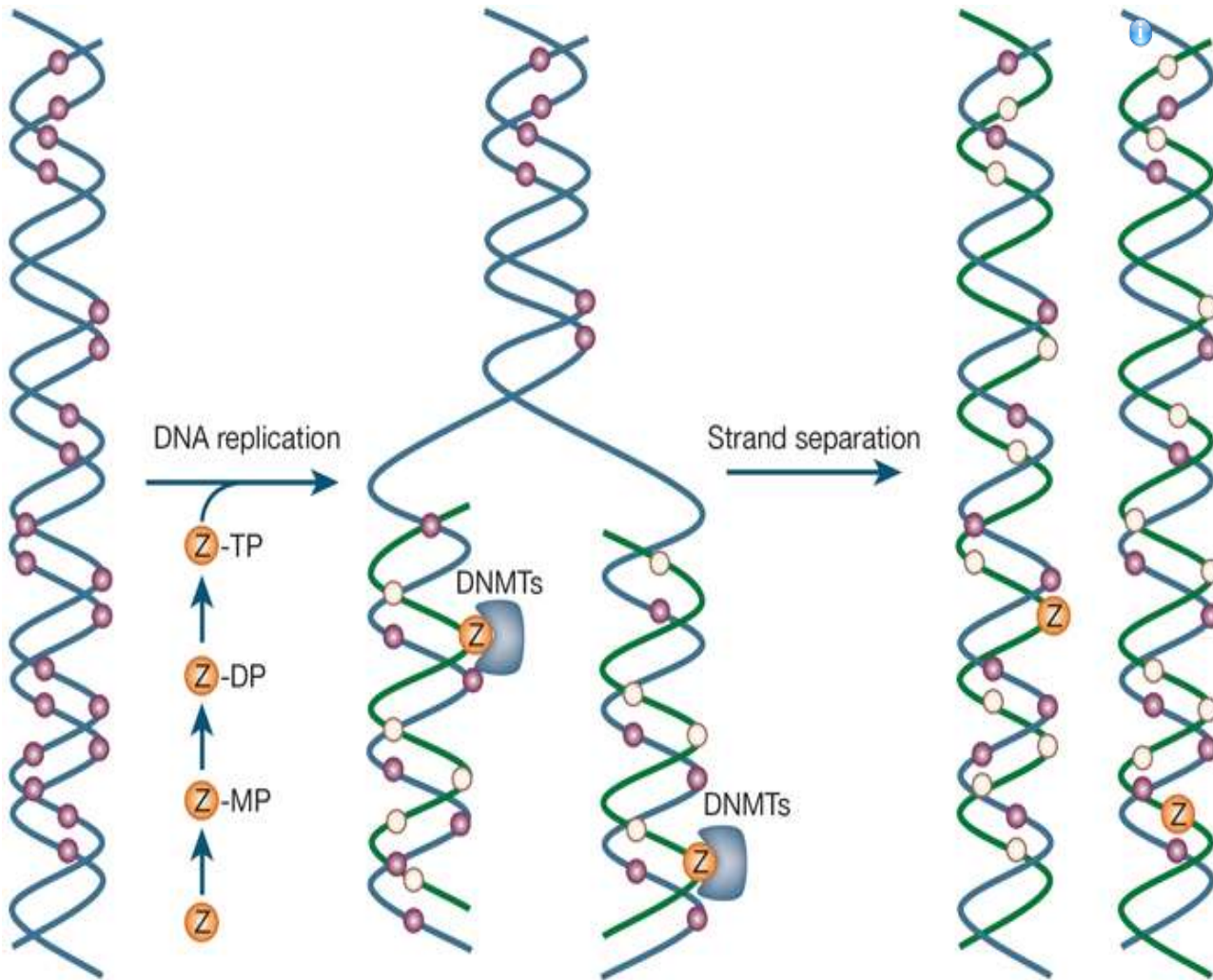
2'-deoxy- 5'-aza cytidin



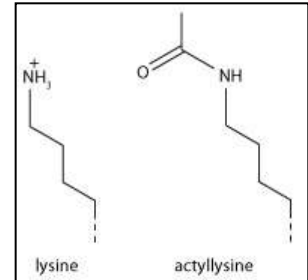
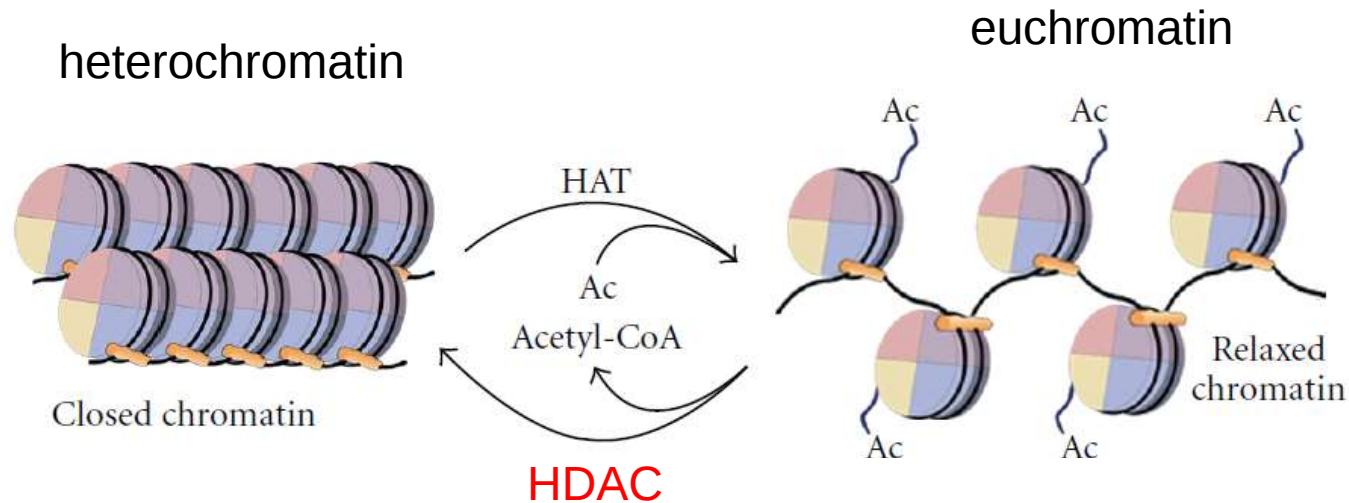
Decitabin

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

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



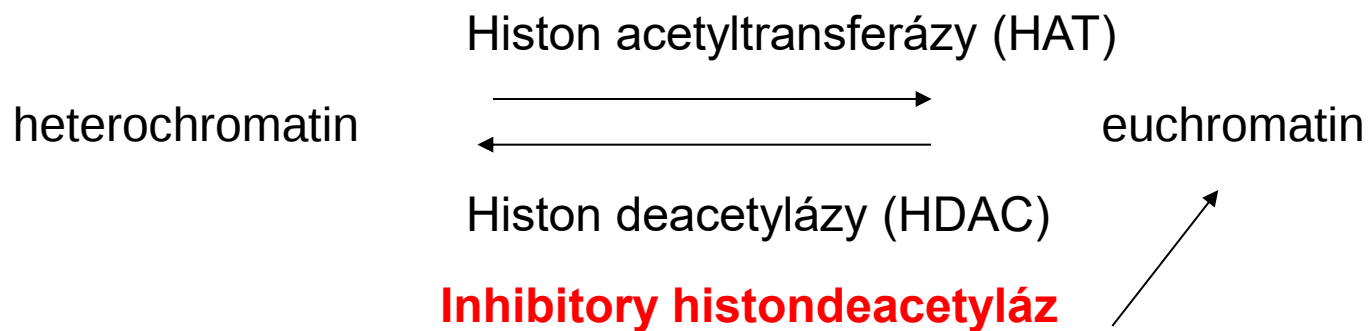
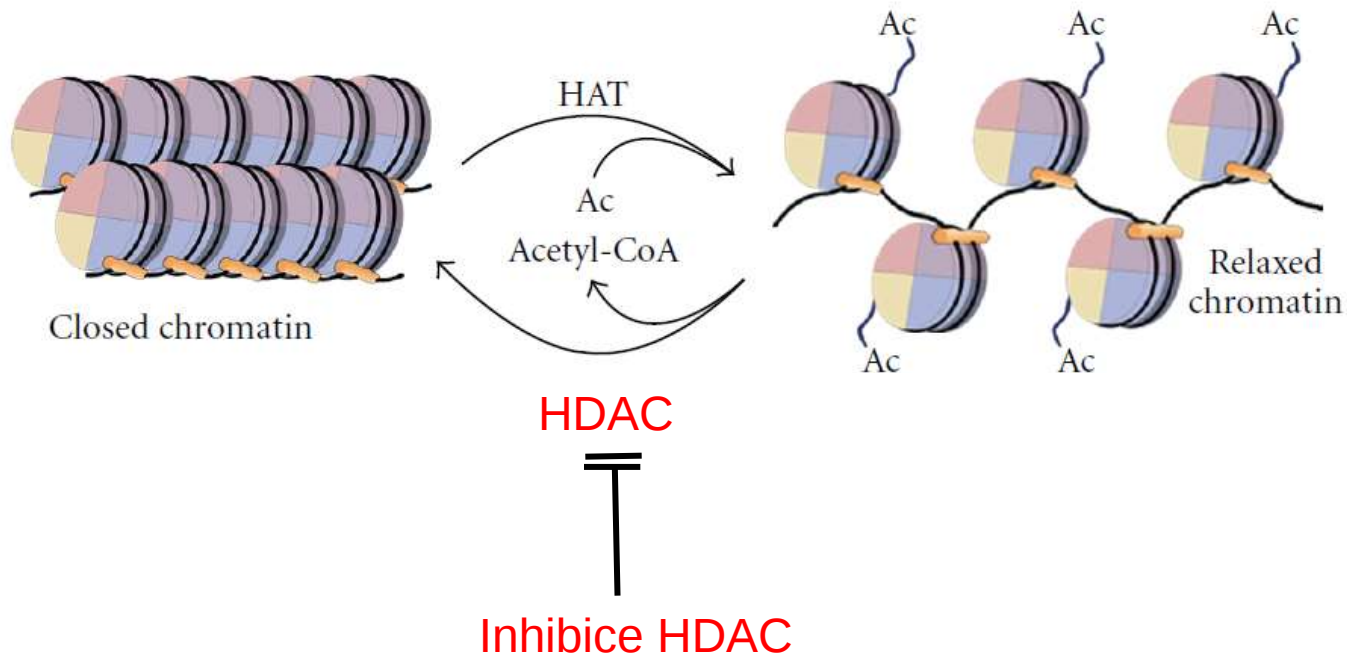
Inhibitory histondeacetyláz (HDACi)



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

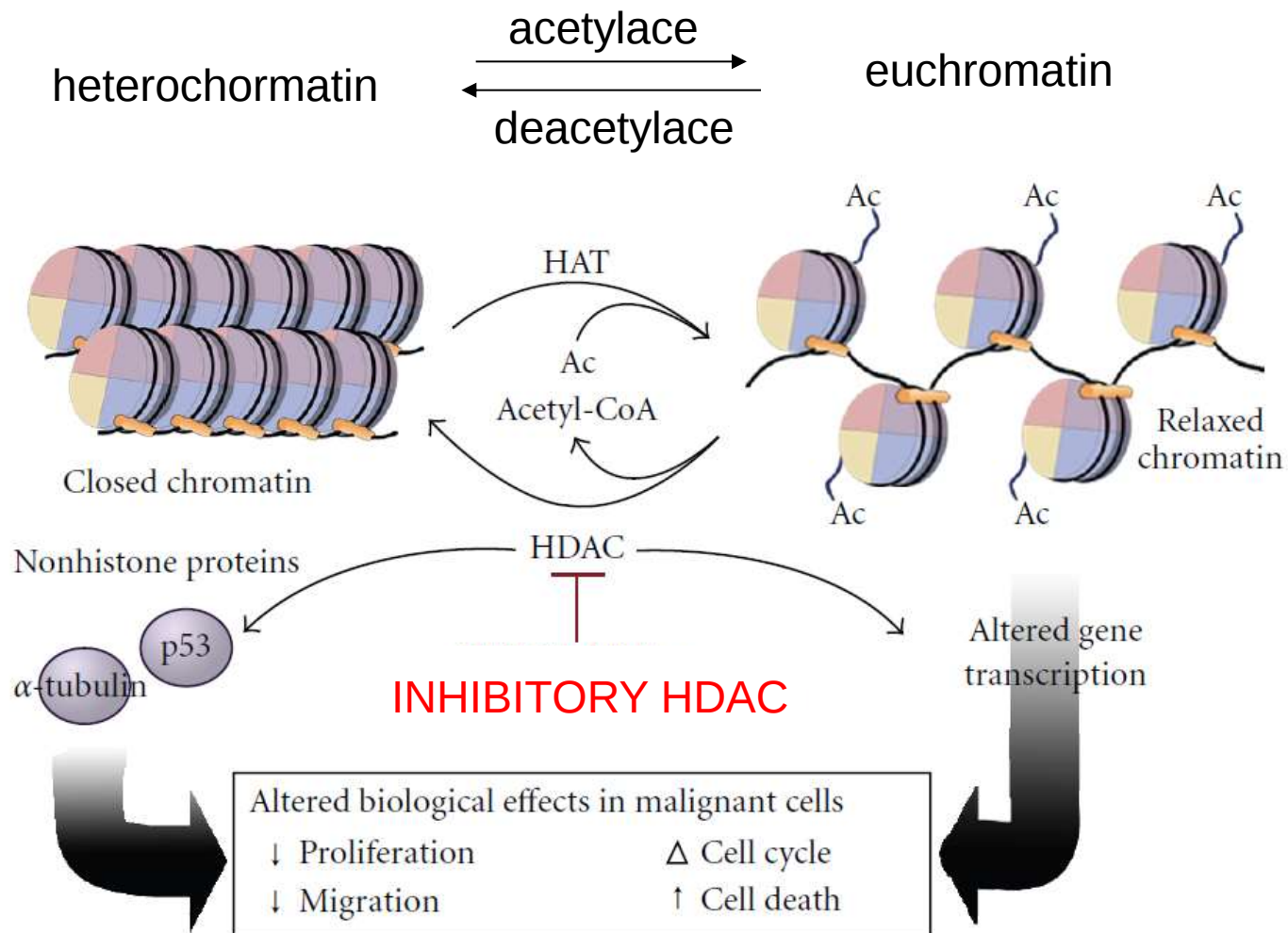
Deacetylase core histonů vede k **uzavření** struktury chromatinu → heterochromatin

V nádorové buňce je hypoacetylase tumorsupresorů



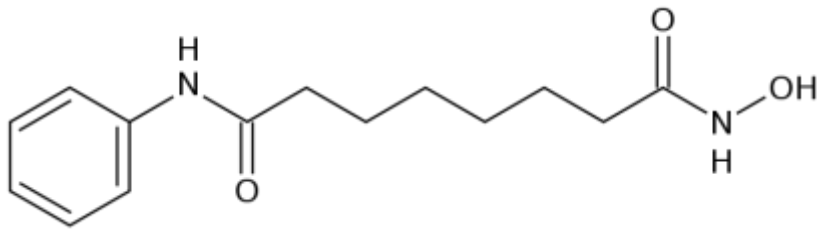
Cílem HDACi je spustit expresi vypnutých (tumorsupresorových) genů

Inhibitory histondeacetyláz

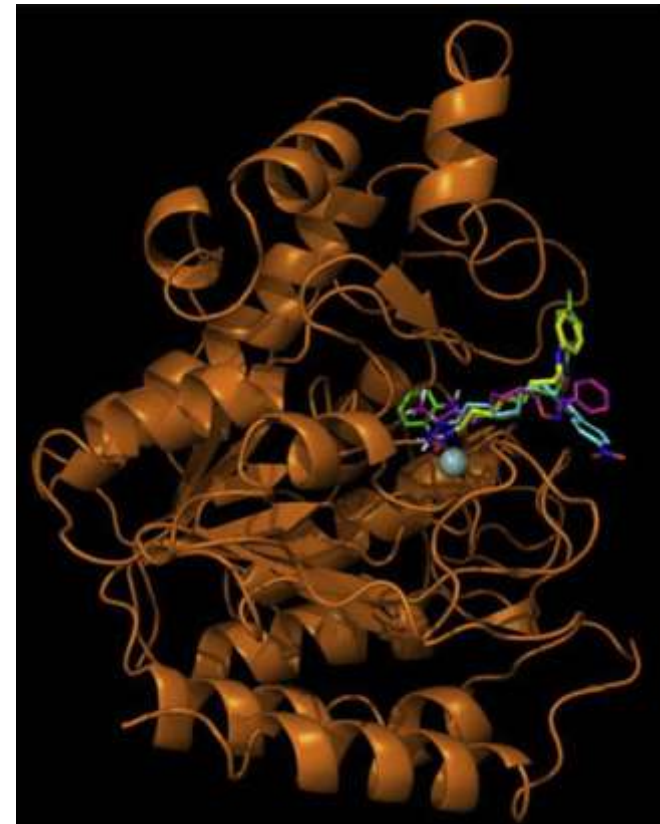


Inhibitory histondeacetyláz (HDACi)

Vorinostat (SAHA, kyselina suberanilohydroxamová)

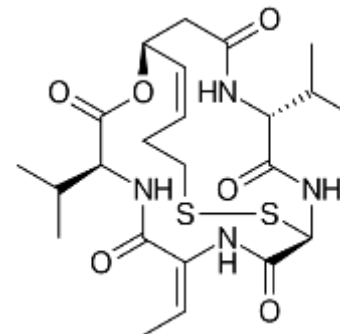


+ Belinostat, Panobinostat



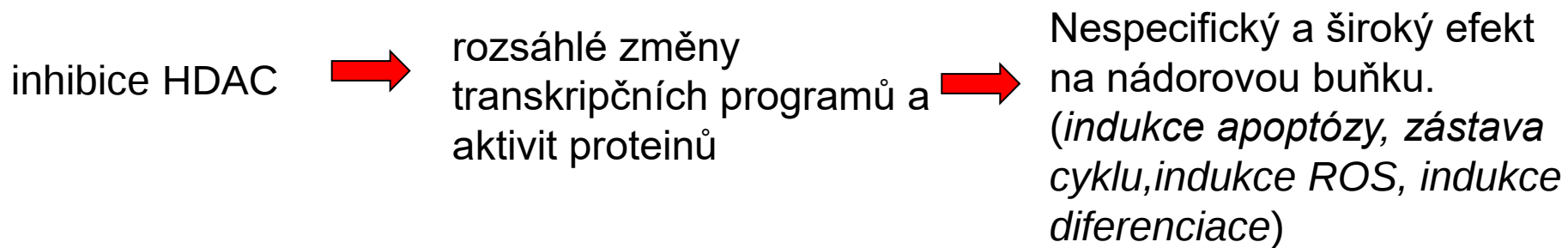
Romidepsin

produkt *Chromabacterium violaceum*



Vedlejší (off target) HDACi

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



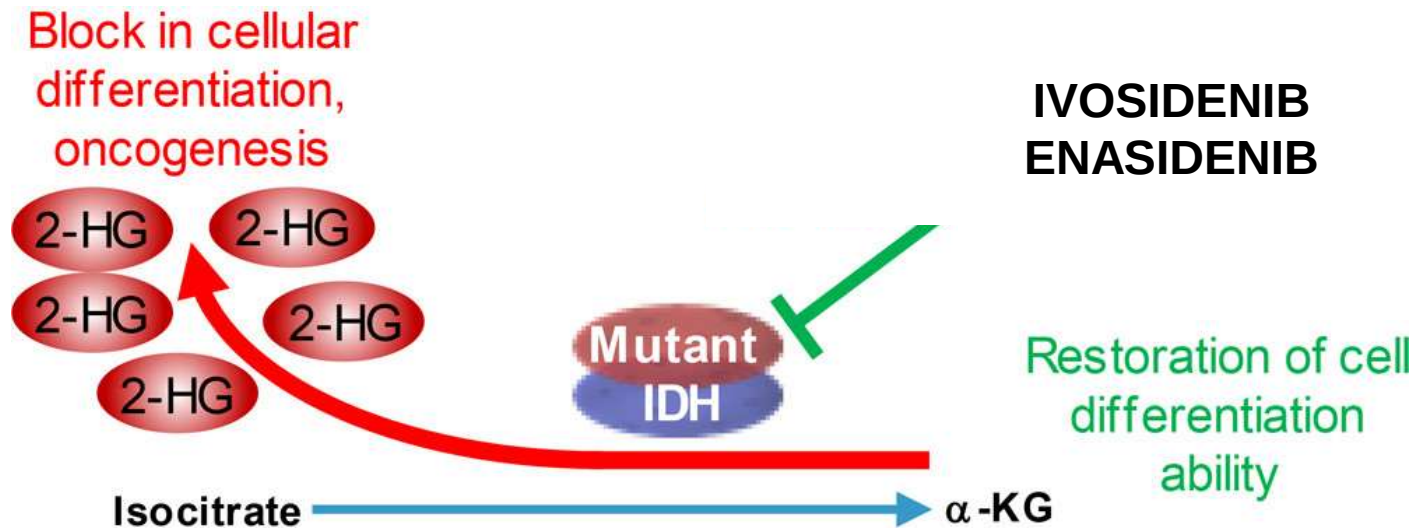
Inhibitory isocitrát dehydrogenázy 1 a 2

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

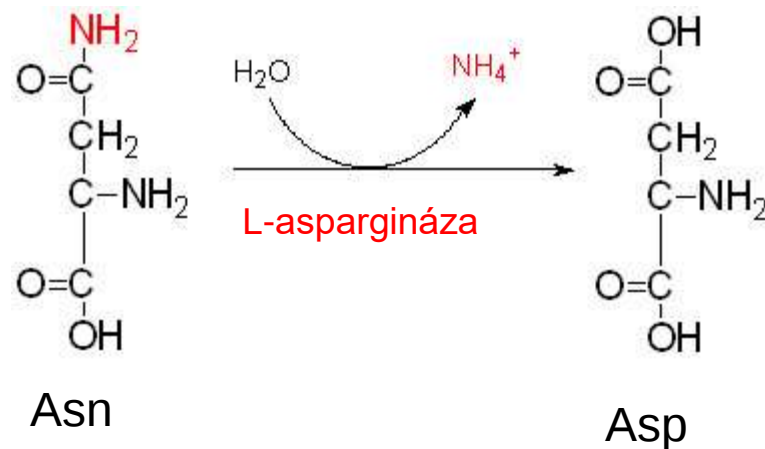
L-asparagináza

Inhibitory translace

Inhibitory proteazómu

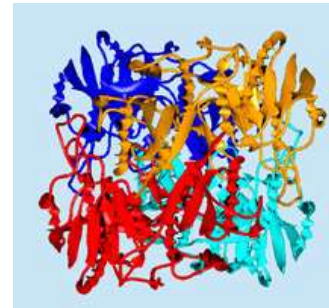
Některé nádorové buňky (ALL)
nedovedou syntetizovat neesenciální amk **asparagin...**

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-asparagináza

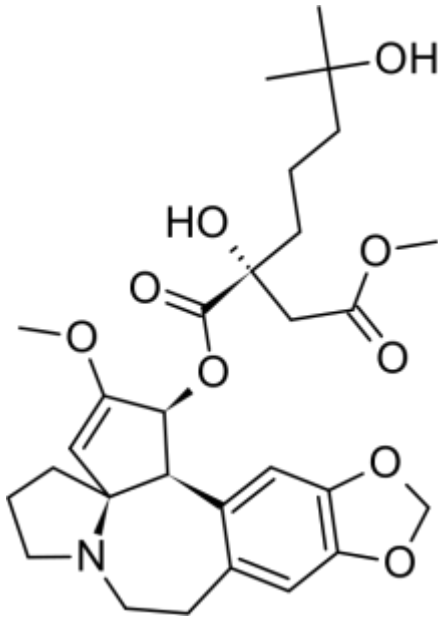
Inhibitory translace

Inhibitory proteazómu

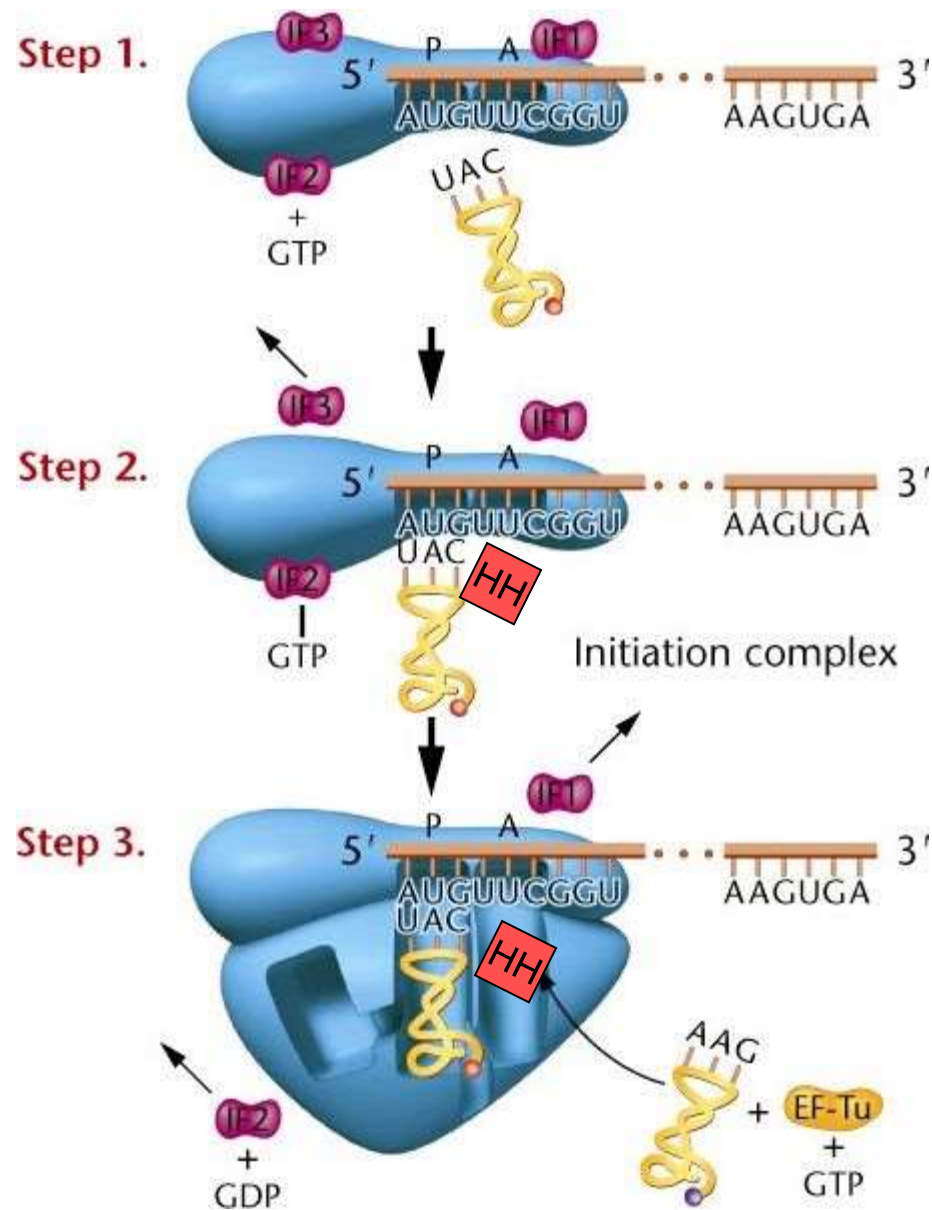
Inhibice translace

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 aminokysleliny z přicházející aminoacyl-tRNA. **Funguje v první elongaci při translaci, nebrání však translaci, která již začala.**



LÁTKY OVLIVŇUJÍCÍ SYNTÉZU A DEGRADACI PROTEINŮ

L-asparagináza

Inhibitory translace

Inhibitory proteazómu

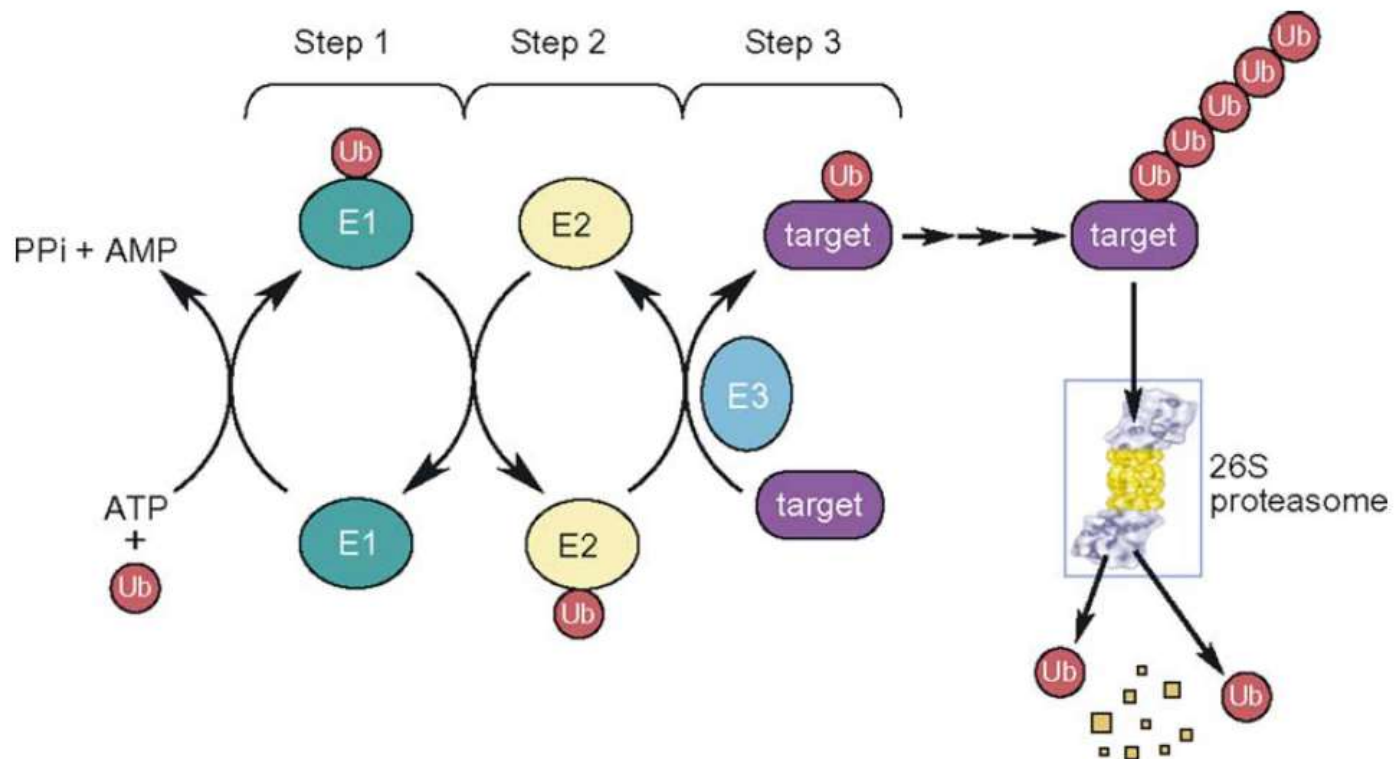
Inhibice degradace proteinů

Polyubiquitinylace proteinů



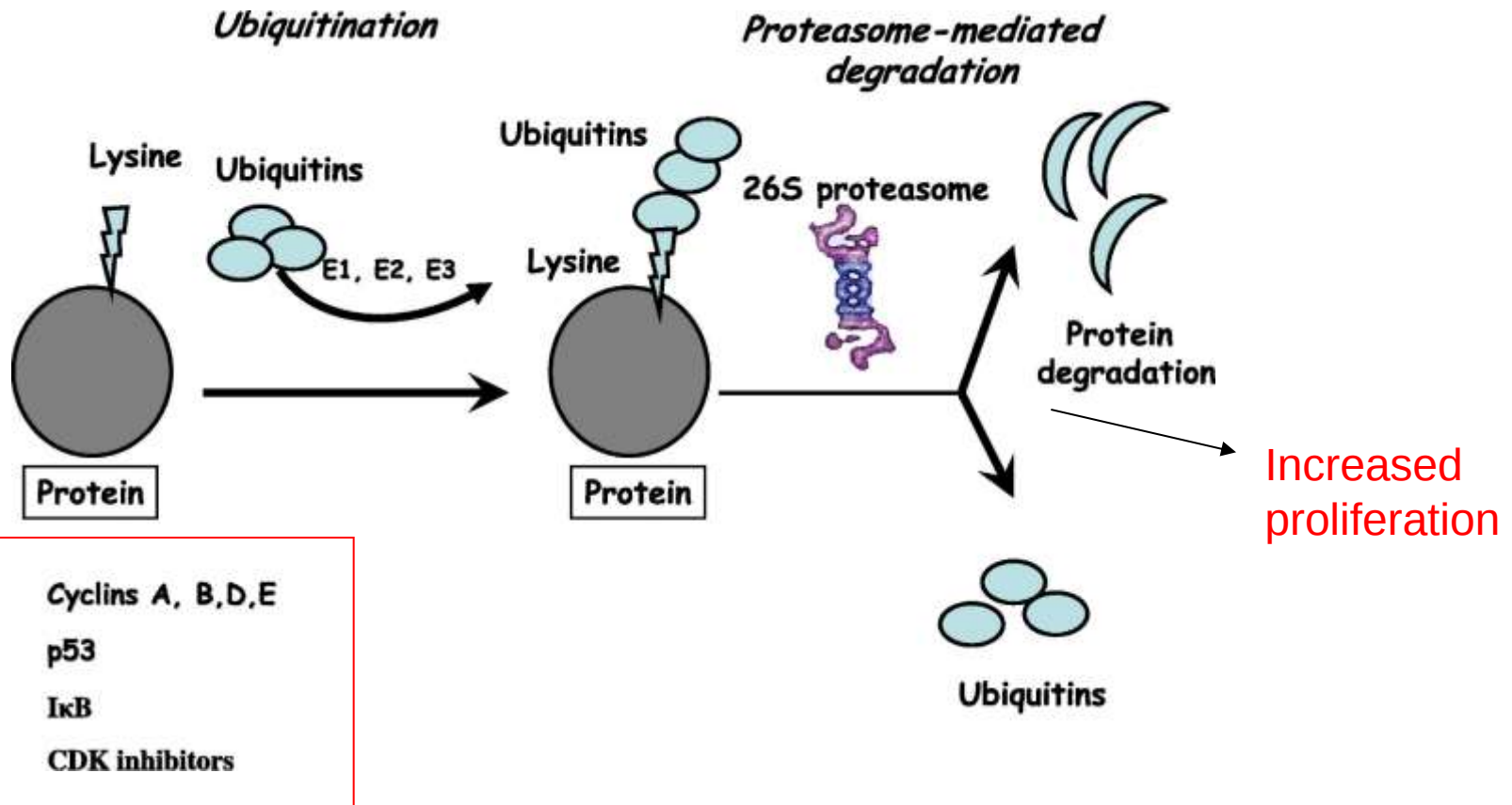
Degradace v proteazomu

Ubiquitin ligázy X deubiquitinylační enzymy

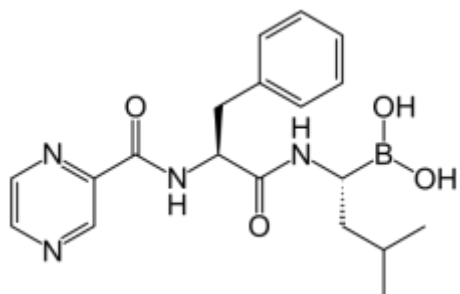


Degradace tumorsupresorů v proteazomu je zvýšená u nádorových buněk

(IκB, cykliny, p53, BAX, NOXA, p21, p27..)



Bortezomib (Velcade, dipeptidový derivát kyseliny boronové)

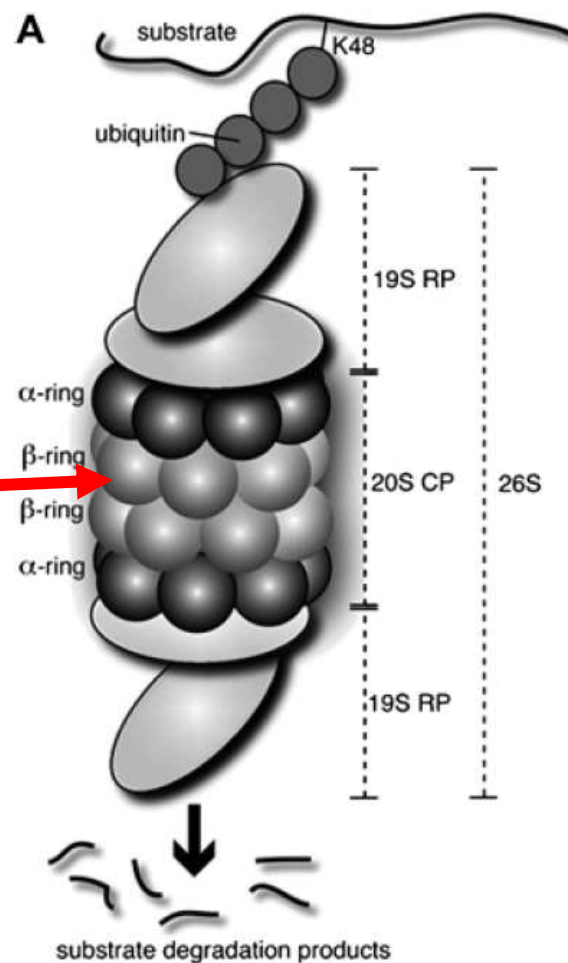


Bortezomib

vazba na podjednotku $\beta 5$

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

+ Carfilzomib + Ixazomib

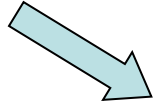




Cílené (více či méně) **terapie**

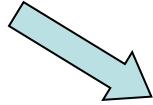
- Látky zasahují do epigenetické informace
- Látky ovlivňující syntézu a degradaci bílkovin
- **Diferenciační terapie**
- Fotodynamická terapie
- Inhibitory kináz
- Inhibitory mTOR, PARP, CDK4/6, Bcl-2, IDH2
- Terapeutické protilátky
- CAR-T buňky

Maligní fenotyp je často asociován s defektem diferenciací



Diferenciační terapie

Maligní fenotyp je často asociován s defektem diferenciací

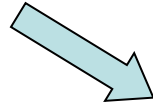


Diferenciační terapie

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 vazbou na RAREs (retinoic acid responsive elements)

Maligní fenotyp je často asociován s defektem diferenciací



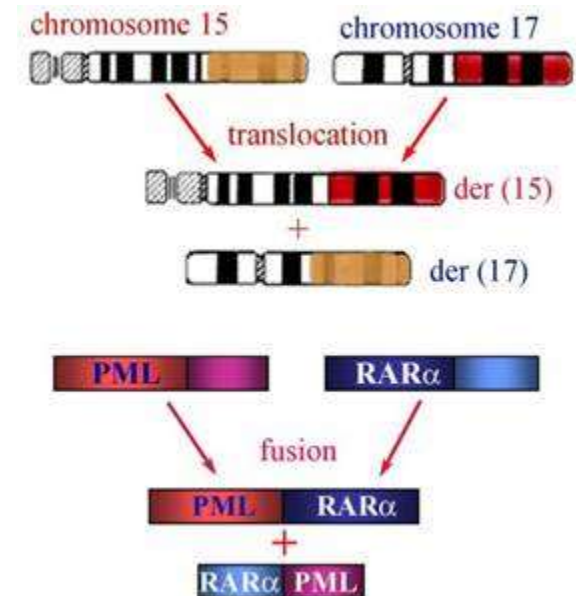
Diferenciační terapie

Receptor kyseliny retinové

Za normálních okolností nukleární receptor **retinoic acid receptor alfa** ($\text{RAR}\alpha$) reguluje expresi proteinů diferenciačního programu (například granulocytů) $\text{RAR}\alpha$ 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 neutrofily) vznikem fuzního proteinu **PML- $\text{RAR}\alpha$** který **blokuje transkripci** směřující k diferenciaci (váže represory a histondeacetylázy)

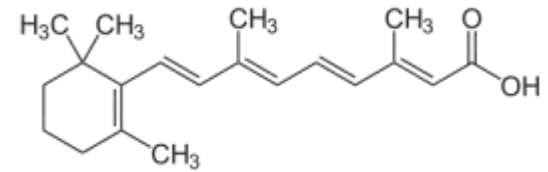


Komplex PML-RAR α je po navázání jedné ze strukturních variant kyseliny retinové

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

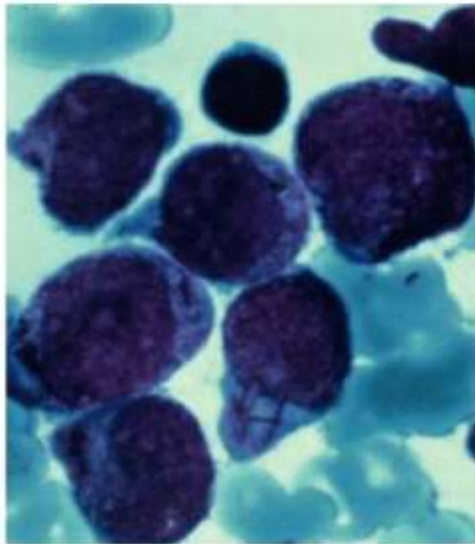


Exprese diferenciačního programu je obnovena.

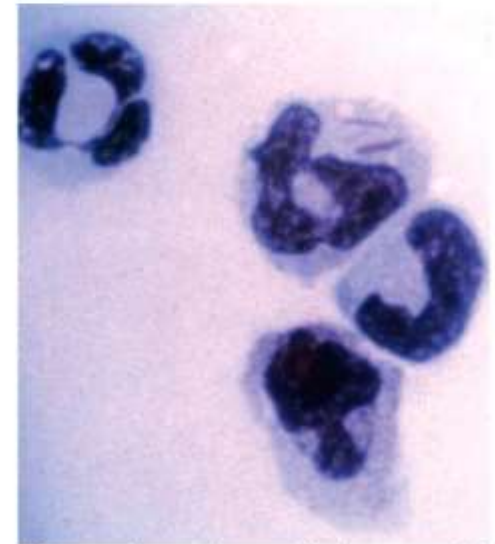
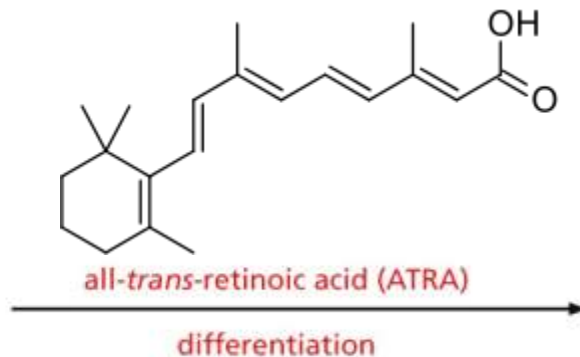


Retinoic acid
(směs izomerů)

(B)



promyelocytes



polymorphonuclear cells (neutrophils)

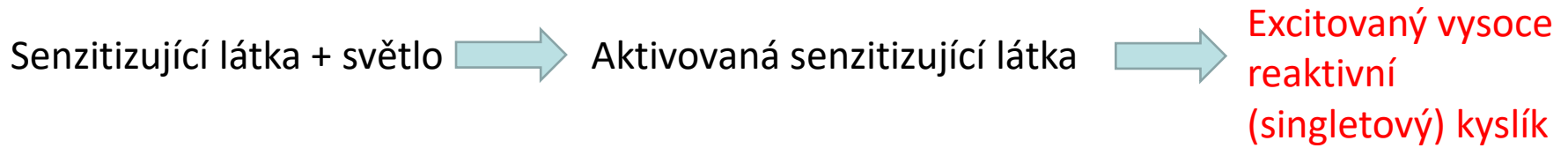


Cílené (více či méně) terapie

- 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



PHOTODYNAMIC THERAPY



Person with cancer receives a drug called a photosensitizer.



In 24 to 72 hours, cancer cells absorb the photosensitizer.

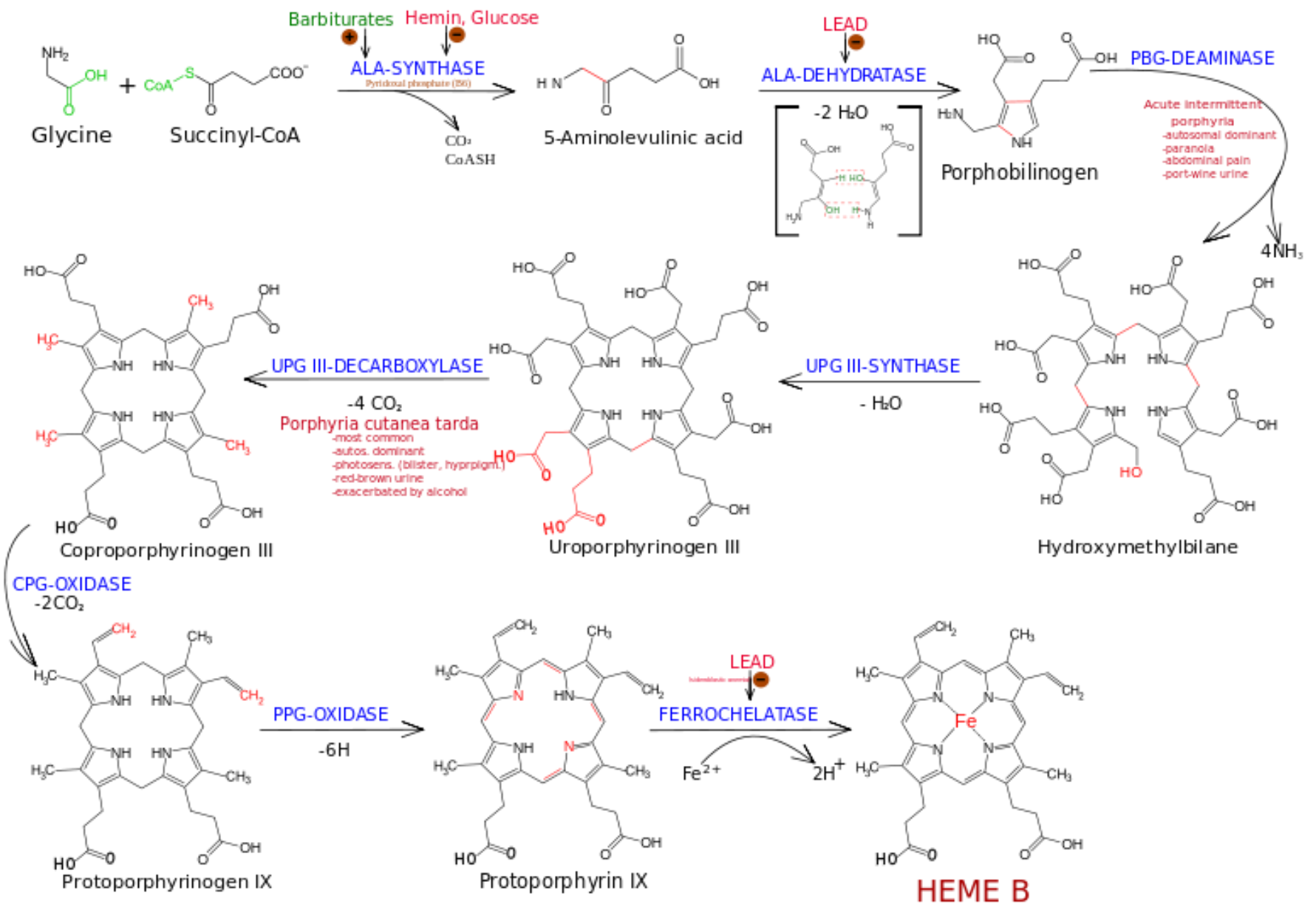


Cancer cells that absorbed the photosensitizer are exposed to light.

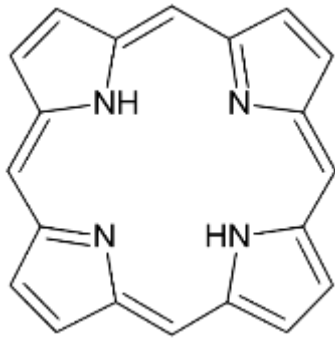


Light causes photosensitizer to make a form of oxygen that kills cancer cells.





Nádorové buňky obsahují/kumulují vyšší množství porfyrinů než zdravé

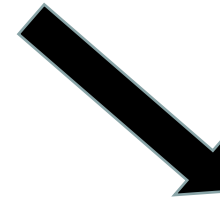


porfyrin

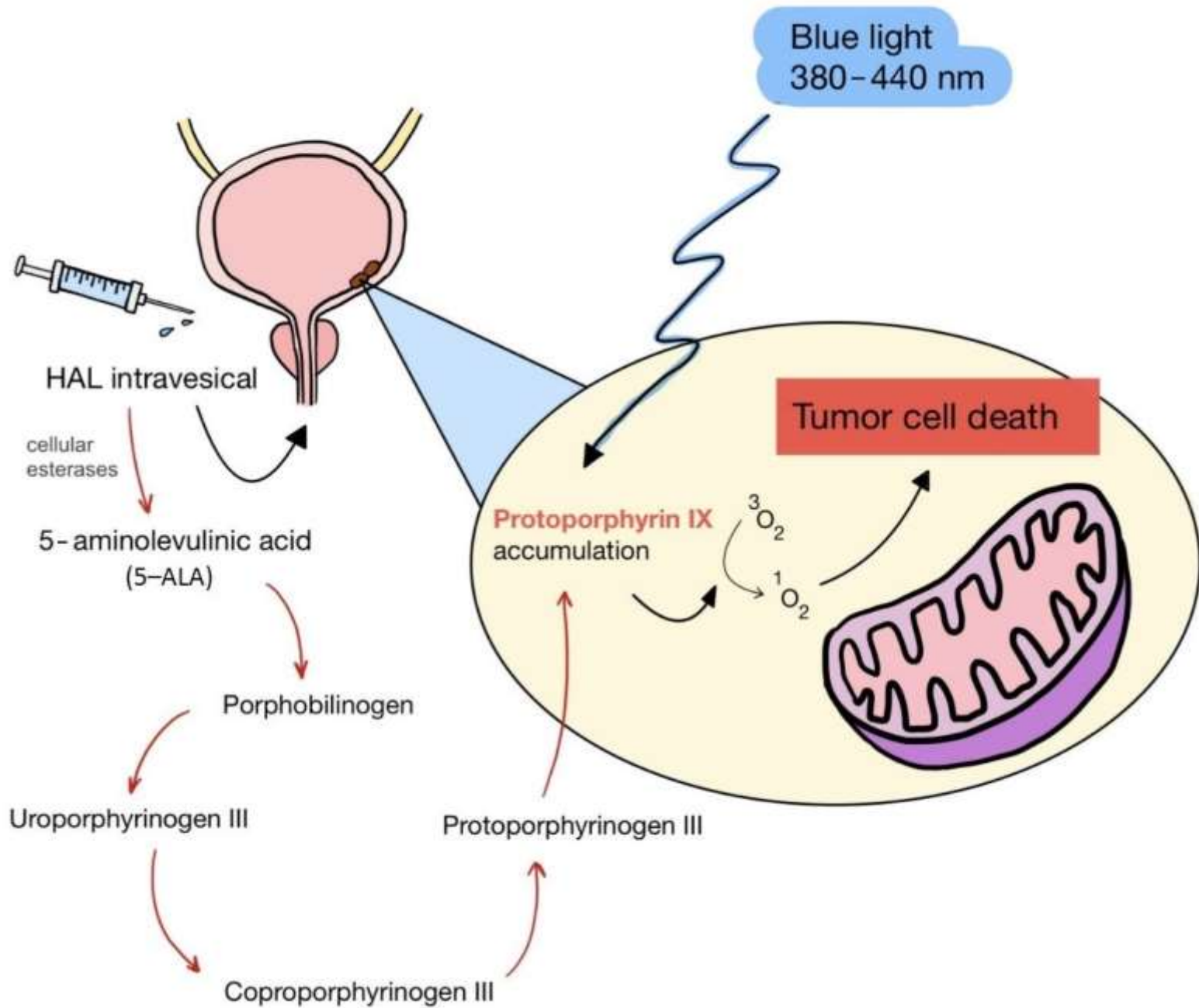
Deriváty porfyrinu
nebo jeho
prekurzory
(Photofrin,
kyselina
aminolevulová)


630 nm

$^1\text{O}_2$ singletový kysík

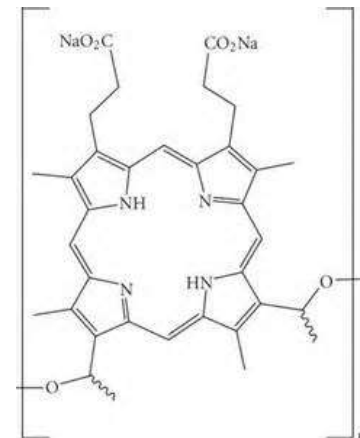


Oxidativní poškození
buněčných struktur (MK, proteiny, NA...)
APOPTÓZA



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

Photofrin

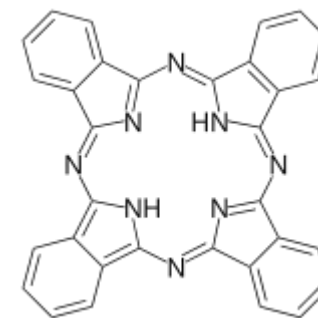


Využití „kam lze posvítit“ – karcinomy kůže a kožní T-buněčné lymfomy

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

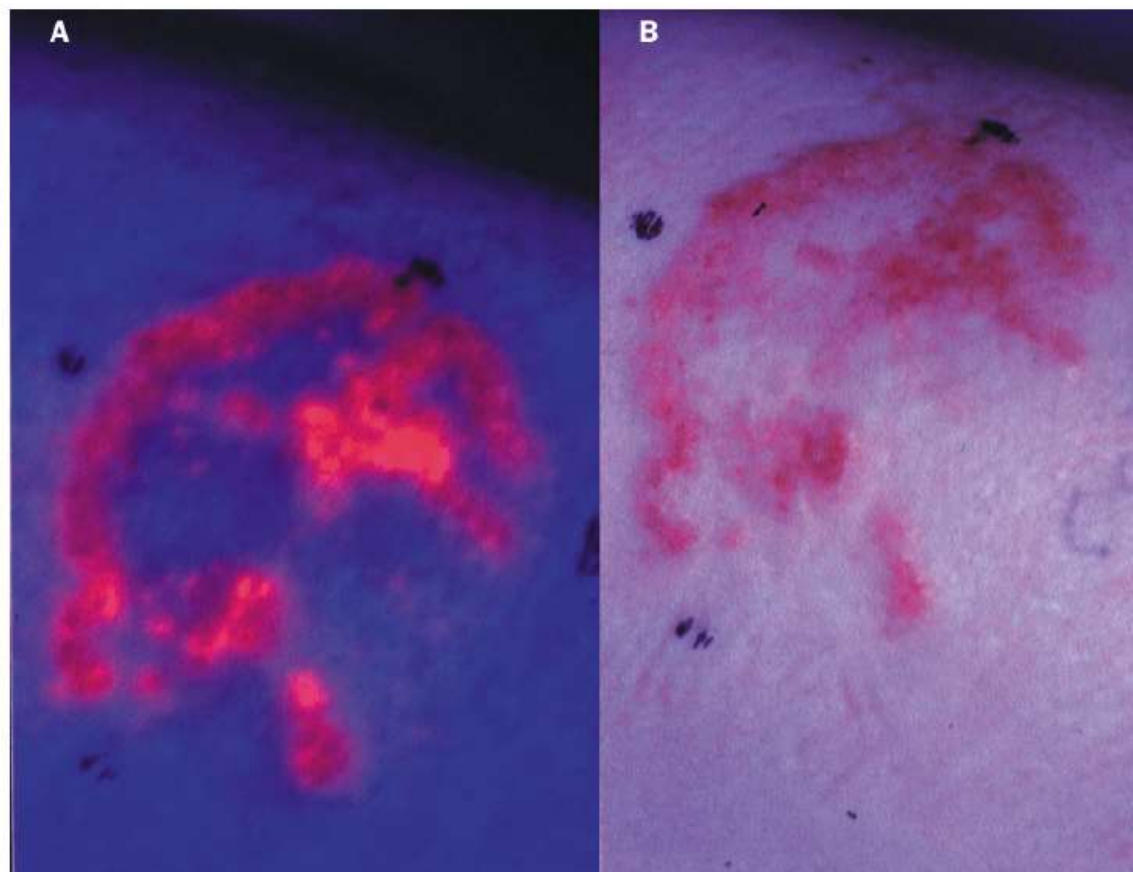


Figure 4. Tumour selectivity of methyl aminolevulinate. The pattern of fluorescence induced by methyl aminolevulinate is clearly limited to abnormal tissue (A), when compared with the outline of the tumour as seen under white light (B).