

Epigenetická cytostatika a jejich role v protinádorové léčbě

P. Klener

I. interní klinika 1. lékařské fakulty UK a VFN v Praze, přednosta prof. MUDr. Marek Trněný, CSc., a Ústav hematologie a krevní transfuze Praha, ředitel prof. MUDr. Marek Trněný, CSc.

Souhrn: Epigenetické změny jsou úzce spjaty s rozvojem a progresí nádorového onemocnění a lze je korigovat aplikací epigenetických cytostatik. Cílem tohoto sdělení je podat přehled o molekulárních mechanismech epigenetických cytostatik a o jejich možném klinickém použití. Většina těchto chemoterapeutik je předmětem klinických studií. Jen 2 demethylující látky, t.j. inhibitory DNA metyltransferáz (5-azacytidin a decitabin) jsou schváleny k léčbě myelodysplastického syndromu a několik cytostatik ze skupiny inhibitorů histondeacetyláz (vorinostat, romidepsin a panobinostat) lze použít v léčbě hematologických malignit, zejména k léčbě refrakterních a relabujících kožních T lymfomů.

Klíčová slova: epigenetická cytostatika – inhibitory DNA metyltransferáz – inhibitory histondeacetyláz

Epigenetic cancer drugs and their role in anticancer therapy

Summary: Epigenetic modification have been causally linked to cancer development and progression, and are potentially reversible by treatments with epigenetic cancer drugs. The aim of this review is to give an overview of the basic current knowledge on molecular mechanisms of epigenetic cancer drugs and their possible clinical use. Many of them are in inclinal trials. However only two demethylating agents ie. inhibitors of DNA methyltransferase (5-azacytidin and decitabin) are approved in the treatment of myelodysplastic syndrome and a few inhibitors of histonacetylase (vorinostat, romidepsin and panobinostat) are approved in the treatment of hematological malignancies, particularly in refractory or relapsed cutaneous T-cell lymphoma.

Key words: epigenetic cancer drugs – inhibitors of DNA methyltransferase – inhibitors of histondeacetylase

Úvod

Trvale narůstající incidence nádorových onemocnění poněkud kontrastuje s relativně stabilní či dokonce klesající mortalitou některých malignit. To nepochybně znamená, že se výrazně zdokonalily naše léčebné možnosti a že některá nádorová onemocnění lze dnes úspěšně léčit či vyléčit. Jednou z novějších léčebných metod je i použití epigenetických cytostatik [1].

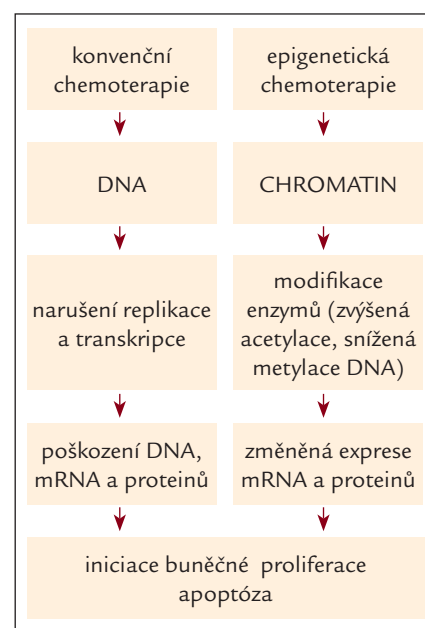
Nádorová onemocnění jsou charakterizována nejen alterací genetické, ale i epigenetické struktury genomu [2]. Zatímco konvenční chemoterapie je cílena především na genetické změny, epigenetická cytostatika nevyvolávají cytostatický účinek inkorporací do DNA či indukci zlomů v DNA molekule, ale působí změnu struktury chromatinu [3]. Rozdíl v účinku konvenčních a epigenetických cytostatik je na obr. 1.

Mechanismus účinku epigenetických cytostatik

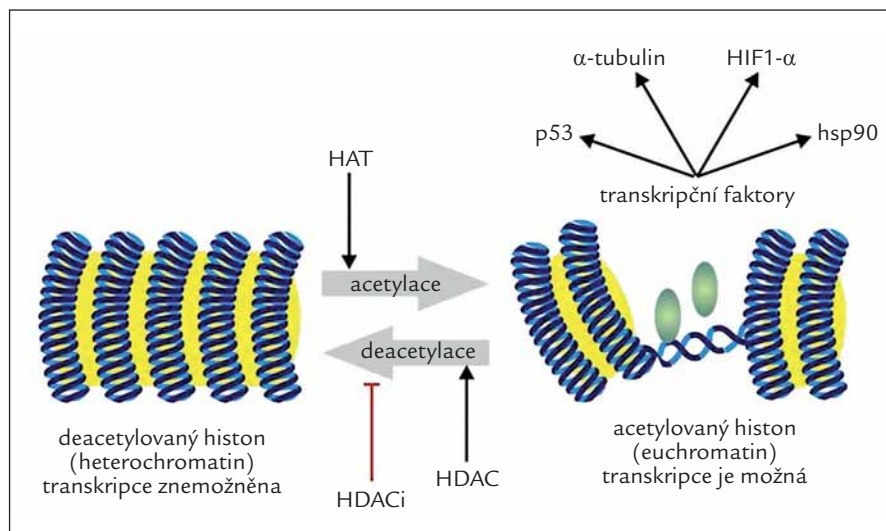
Epigenetické úpravy zahrnují metylaci DNA, modifikaci histonů a remodelaci chromatinu [4,5]. Mezi látky s epigenetickým mechanismem účinku patří inhibitory hlavních fyziologických epigenetických regulátorů, t.j. inhibitory DNA metyltransferáz (DNMTi) a inhibitory histondeacetyláz (HDACi).

Metylace DNA znamená navázání metylové skupiny na C5 cytosinů nacházejících se v sousedství guaninů. Tyto úseky dinukleotidů se nazývají CpG ostrůvky, kde „p“ znamená fosfodiesterový můstek mezi cytosinem a guaninem. CpG ostrůvky se hojně nacházejí v oblastech promotorů genů, tedy v regulačních úsecích DNA. Zvýšená metylace promotorů DNA blokuje vazbu transkripčního faktoru k promotoru [6]. Metylace/demetylace DNA hraje tudíž významnou úlohu v kontrole aktivity

genové exprese. U řady nádorů byla popsána specifická hypermetylace promotorů tumor supresorových genů



Obr. 1. Rozdíl v účinku konvenčních a epigenetických cytostatik.



Obr. 2. Změny genové exprese účinkem acetylce histonů. Acetylce histon-acetyltransferázami (HAT) působí změnu uzavřeného chromatinu v otevřený euchromatin, který umožní kontakt transkripčních faktorů s DNA. Opětnému uzavření chromatinu zabrání inhibitory histondeacetyláz (HDACi).

(zejména retinoblastomového genu RB1, genu von Hippel Lindau VHL a DNA reparačních genů – MLH1 a BRCA1). Hypermetylace těchto genů vede k umlčení jejich transkripce (silencing), což znemožní opravy genetických chyb, působí deregulaci průchodu buňky buněčným cyklem a otvírá cestu k neoplastické transformaci [7].

Dalším epigenetickým mechanismem je **modifikace histonů** a remodelace chromatinu [8]. Základní stavební jednotkou chromatinu je nukleosom. Nukleosomy jsou tvořeny molekulami bazických histonů, tvořících jádro, kolem kterého se jako kolem cívky obtačí dvojlátko DNA (obr. 2). Zdárný průběh genové exprese vyžaduje změnu prostorového uspořádání chromatinu (z heterochromatinu na euchromatin), která umožní fyzický průchod transkripčního komplexu rozevřenou vidlicí DNA [9]. Deacetylase histonů způsobí prostorové uzamčení přilehlých genů do heterochromatinové struktury. V normální buňce jsou oba pochody v rovnováze, v nádorové buňce převažuje deacetylase. Ta může být jednak výsledkem zvýšené aktivity histondeacetyláz, jednak snížením aktivity histonacetyltransferáz (HAT). Následkem vystupňované deacetylase dochází ke snížené expresi celé řady tumor supreso-

rových a proapoptických genů, např. p53, p21^{CIP1}, BAX, DR5/TRAILR2, FAS/CD95. Kromě histonů jsou substrátem HDAC i nehistonové proteiny a další regulační proteiny, které mají důležitou roli v onkogenezi, např. p53, α-tubulin, HIF1-α, hsp90 aj. **Deacetylase tumor supresorového transkripčního faktoru p53** na specifických lyzinových zbytcích vede k jeho nestabilitě, zrychlené degradaci a ke snížení jeho transkripční a proapoptické aktivity. Hyperacetylase vyvolaná HDACi způsobí stabilizaci a funkční obnovení proapoptické funkce p53. **Deacetylase α-tubulinu** naruší funkci mikrotubulů, základních elementů cytoskeletu. Destabilizace tubulinu u nádorových onemocnění je provázena zvýšenou buněčnou motilitou a s tím spojenou invazivitou a sklonem k metastazování. HDACi tyto porušené funkce obnoví. **Deacetylase HIF1α** působí jeho stabilizaci, a má tudíž význam pro stimulaci angiogeneze, prostřednictvím zvýšeného výdeje VEGF. Inhibice deacetylase vede k destabilizaci HIF1α, a tím k omezení angiogeneze. Antiangiogenní účinky HDACi se testují u karcinomu ledviny nebo maligního melanomu. **Deacetylase hsp90** je důležitá pro aktivitu tohoto proteinu. Inhibice deacetylase vede k destabi-

lizaci asociací mezi hsp90 a mnoha onkoproteiny, což přispívá k omezení proliferace a k indukcí apoptózy. Příznivý účinek HDACi by se tak mohl uplatnit zejména u CML, u karcinomu prsu, prostaty, popř. u mnohočetného myelomu, kde se předpokládá synergní účinek s inhibitory proteasomu. Inhibice deacetylase působí dále též indukcí proapoptických proteinů Bim, Bax a potlačuje produkci antiapoptických proteinů rodiny Bcl-2. Je evidentní, že účinek HDACi je značně komplexní [10].

Širokým spektrem cílových proteinů pro HDACi lze vysvětlit široké spektrum účinků těchto látek. Patří mezi ně indukce apoptózy, indukce autofagie, zástava buněčného cyklu, indukce diferenciace, indukce ROS (Reactive Oxygen Species), změněná exprese mikroRNA (miRNA), resensitizace rezistentních nádorových buněk vůči konvenčním chemoterapeutikům či synergický cytotoxický a antiproliferační účinek s jinými antineoplastickými molekulami.

Přípravky s epigenetickým mechanismem účinku

Inhibitory DNA metyltransferáz. Mezi DNMTi patří analoga cytidinu 5-azacytidin a 2'-deoxy-5-azacytidin. **5-azacytidin** (Vidaza) je ribonukleotidový analog, který je aktivován cytidin/uridinkinázou a značná část aza-CTP je inkorporována do RNA. Ribonukleotid-reduktáza (RR) však katabolizuje přeměnu azacytidinu na deoxyazacytidin a vzniklý azacytidin-trifosfát je inkorporován do DNA, kde nevede k zástavě replikace, ale k inhibici metylace DNA blokadou DNA-metyltransferázy (DNMT) [11]. Methylace deoxycytidinu představuje klíčovou modifikaci DNA regulující genovou expresi. Podobně působí jeho derivát 5-aza-2'-deoxycytidin, **decitabin** (Dacogen), používá se v léčbě MDS a některých AML. Oba přípravky našly uplatnění v léčbě myelodysplastického syndromu [12,13]. V preklinickém testování je nový inhibitor DNMT **zebularin**, nukleotidový

analog s výraznou demetylační aktivitou [14].

Inhibitory histon deacetyláz. Acetylase histonů, k níž vede inhibice histon-deacetyláz, působí otevření chromatinové struktury a umožní průchod transkripčního komplexu rozvolněnou DNA vidlicí. Podle chemické struktury se HDACi dělí do 4 skupin, jak je uvedeno v tab. 1.

Mnohé HDACi jsou v současnosti testovány u různých typů malignit, obvykle v kombinaci s monoklonálními protilátkami či konvenčními cytostatiky [15]. Dva již dříve schválené HDACi pro klinické použití jsou **vorinostat** (Zolinza) a **romidepsin** (Istodax), oba pro terapii relabujících kožních T lymfomů. Vorinostat se kromě toho zkouší u mnohočetného myelomu a AML a v kombinaci s klasickými cytostatiky u solidních tumorů (např. u nemalobuněčného karcinomu plic v kombinaci s karboplatinou a paclitaxelem) [16]. Romidepsin se testuje v terapii ne Hodgkinských lymfomů, mnohočetného myelomu, AML a solidních tumorů. **Panobinostat** (Faridak-LBH 589) byl schválen v roce 2010 Evropskou komisí jako „orphan drug“ pro terapii Hodgkinova lymfomu a zkouší se u dalších hematologických malignit. **Belinostat** se testuje u pacientů s refrakterním Hodgkinovým lymfomem a CML. **Mocetinostat** jeví nadějně výsledky u pacientů s refrakterními B-NHL [17]. Zkouší se i v léčbě Hodgkinova lymfomu. **Valproát** (Depakin) se běžně používá v neurologii pro léčbu epilepsie, v onkologii se testuje v kombinaci s hypometylačními látkami (s 5-azacytidinem) v terapii MDS a AML [18].

Závěr

Epigenetická chemoterapeutika se dají kombinovat jak mezi sebou navzájem (tzv. kombinovaná epigenetická terapie), tak spolu s konvenčními cytostatiky, inhibitory proteasomu, monoklonálními protilátkami, hormo-

Tab. 1. Přehled inhibitorů histondeacetyláz.

Chemická skladba	Generický název	Obchodní přípravek
mastné kyseliny	valproát (sodný)	Depakine
deriváty kys. hydroxamové	vorinostat (SAHA)	Zolinza
	panobinostat (LBH589)	Faridak
	belinostat (PXD101)	
benzamid	entinostat (MS-275)	
	mocetinostat (MGCD0103)	
cyklické tetrapeptidy	romidepsin (depsipeptid, FK228)	Istodax

SAHA – suberoylanilide hydroxamic acid (tučně jsou tištěny přípravky schválené ke klinickému použití)

nální terapií či radioterapií. Inhibitory DNA metyltransferáz našly své uplatnění v léčbě MDS, kdežto u HDACi navzdory nadějným výsledkům mnoha časných fází klinických studií zůstává jejich využití v onkologické praxi omezené prakticky jen na kožní T lymfomy. Hlavním limitujícím faktorem širšího klinického využití HDACi (včetně kombinací s jinými protinádorovými látkami) zůstává jejich značná hematologická a gastrointestinální toxicita. Syntéza nových HDACi další generace by mohla vést ke zlepšení toxického profilu a zvýšení protinádorové aktivity.

Literatura

1. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008; 358: 1148–1159.
2. Grønbaek K, Hother C, Jones PA. Epigenetic changes in cancer. *APMIS* 2007; 115: 1039–1059.
3. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* 2012; 150: 12–27.
4. Gilbert J, Gore SD, Herman JG et al. The clinical application of targeting cancer through histone acetylation and hypomethylation. *Clin Cancer Res* 2004; 15: 4589–4596.
5. van Vierken LE, Hurt EM, Hollingsworth RE. The role of epigenetic regulation in stem cell and cancer. *J Mol Med (Berl)* 2012; 90: 791–801.
6. Brueckner B, Kuck D, Lyko F. DNA methyltransferase inhibitors for cancer therapy. *Cancer J* 2007; 13: 17–22.
7. Mani S, Herceg Z. DNA demethylating agents and epigenetic therapy of cancer. *Adv Genet* 2010; 70: 327–340.
8. Billam M, Sobolewski D, Davidson N. Effect of a novel DNA methyltransferase inhibitor ze-

bularine on human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 120: 581–592.

9. Lee MJ, Kim SY, Kummar S et al. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *Curr Opin Oncol* 2008; 20: 639–649.

10. Martinez-Iglesias O, Ruiz-Liorentes L, Sánchez-Martínez R et al. Histone deacetylase inhibitors: mechanism of action and therapeutic use in cancer. *Clin Transl Oncol* 2008; 10: 395–398.

11. Min-Jung L, Yeong Sang K, Ku Shivani K et al. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *Curr Opin Oncol* 2008; 20: 639–649.

12. Garcia-Manero G. Demethylating agents in myeloid malignancies. *Curr Opin Oncol* 2008; 20: 705–710.

13. Garcia-Manero G, Fenaux P. Hypomethylating agents and other novel strategies in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2011; 29: 516–523.

14. Quintás-Cardama A, Ravandi F, Liu-Dumlao T et al. Epigenetic therapy is associated with similar survival compared with intensive chemotherapy in older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Blood* 2012; 120: 4840–4845.

15. Khan O, LaThangue NB. Drug insight: histone deacetylase inhibitor-based therapies for cutaneous T-cell lymphomas. *Nat Clin Pract Oncol* 2008; 5: 714–726.

16. Szyf M. Epigenetics, DNA methylation, and chromatin modifying drugs. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2009; 49: 243–263.

17. Younes A, Oki Y, Bociek RG et al. Mocetinostat for relapsed classical Hodgkin's lymphoma: an open-label, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2011; 13: 1222–1228.

18. Hřebáčková J, Hraběta J, Eckschlager T. Valproic acid in the complex therapy of malignant tumors. *Curr Drug Targets* 2010; 11: 361–379.

prof. MUDr. Pavel Klener, DrSc.

www.vfn.cz

www.Klener.cz

e-mail: pavel.klener@ruk.cuni.cz

Doručeno do redakce: 26. 3. 2013