

INDIVIDUALIZACE FARMAKOTERAPIE INHIBITORY TYMIDYLÁT SYNTÁZY U NÁDORŮ GASTROINTESTINÁLNÍHO TRAKTU

Miroslav Svoboda¹, Ondřej Slabý²

¹Masarykův onkologický ústav, Brno

²Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity v Brně

Inhibitory tymidylát syntázy (TS) jsou často používány při léčbě nádorových onemocnění. Léčiva s inhibičním účinkem na tymidylát syntázu lze rozdělit na dvě hlavní skupiny: fluoropyrimidinové deriváty a analoga kyseliny listové. Tyto inhibitory jednak ovlivňují enzymatickou aktivitu TS, jednak dochází k metabolizaci těchto inhibitorů různými enzymy. Interindividuální rozdíly v expresi a aktivitě TS a metabolizujících enzymů by mohly být využity při předpovědi rezistence na jednotlivá cytostatika. Získané znalosti o expresi a aktivitě jednotlivých enzymů by pak mohly být využity při navrhování cílené individuální protinádorové terapie.

Bohužel rezistenci na cytostatika ovlivňují stovky genů. Pro přesnou předpověď rezistence pravděpodobně nebude stačit stanovení několika markerů. Pro takovou předpověď bude zřejmě nutné rutinní zavedení metod pro sledování exprese desítek nebo stovek genů a jejich proteinových produktů.

Klíčová slova: tymidylát syntáza, fluoropyrimidinové deriváty, antifoláty, komplexní profily genové exprese.

THE INDIVIDUALISED PHARMACOTHERAPY OF GASTROINTESTINAL CANCER BASED ON THYMIDYLATE SYNTHASE INHIBITORS

The inhibitors of thymidylate synthase (TS) are frequently used as anticancer drugs. These drugs can be divided into two principal groups: the fluoropyrimidine derivatives and folic acid analogs. All these inhibitors change enzymatic activity of TS, and at the same time they are also metabolized by different enzymes. The interindividual differences in the expression and activity of TS and of other enzymes can be exploited in the design of targeted individual anti-cancer therapy.

Unfortunately the drug resistance is influenced by hundreds of genes. If we would like to predict the drug resistance, the determination of as little as several markers would not be probably efficient. The routine establishment of methods of screening expression of tens or hundreds of genes and their protein products will be probably necessary for such prediction.

Key words: thymidylate synthase, fluoropyrimidine derivatives, antifolates, complex profiles of gene expression.

Úvod

Tymidylát syntáza (TS) představuje klíčový enzym při syntéze DNA (9). Proto jsou inhibitory tymidylát syntázy často používány při léčbě nádorových onemocnění (12). Léčiva s inhibičním účinkem na tymidylát syntázu lze rozdělit dle mechanismu účinku na dvě hlavní skupiny (31): fluoropyrimidinové deriváty a analoga kyseliny listové. Fluoropyrimidinové deriváty se metabolicky aktivují na 5-fluoro-deoxyuridin-monofosfát (FdUMP), který společně s kyselinou N5, N10 metylen-tetrahydrolistovou a tymidylát syntázou vytvářejí stabilní ternární komplex (8). V inhibičním komplexu navázaná tymidylát syntáza pak nemůže syntetizovat tymidin monofosfát. Tím je blokována syntéza a replikace DNA. Kyselina metylen-tetrahydrolistová je nezbytným kofaktorem pro enzymatickou aktivitu tymidylát syntázy (9). To vysvětluje, proč inhibují tento enzym antifoláty neboli analoga kys. listové.

1. Přehled nejdůležitějších fluoropyrimidinových inhibitorů tymidylát syntázy

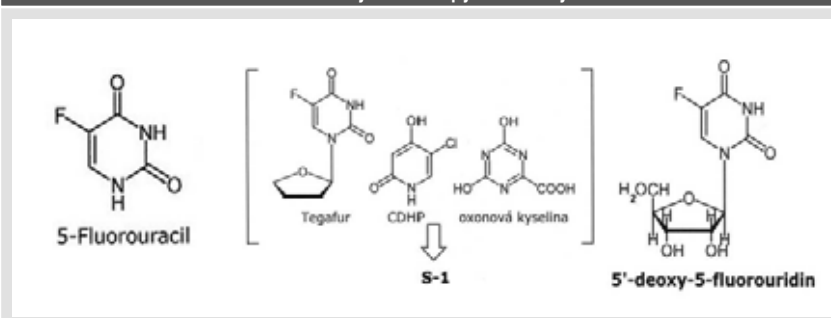
Nejčastěji používaným cytostatikem této řady je 5-fluorouracil (1) (obrázek 1). Do buněk vstupuje snadno mechanismem usnadněného transportu uracilu (2). Ostatní uvedená cytostatika, jako tegafur nebo kapecitabin (obrázky 1, 3) vstupují do buňky nukleosidovými transportními systémy (3).

1.1 Metabolická aktivace

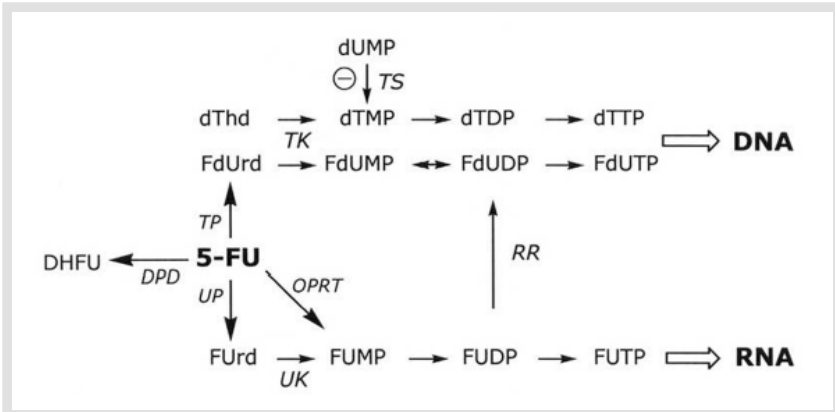
Všechny fluoropyrimidinové deriváty podstupují intracelulární aktivaci na FdUMP, který vytváří ternární inhibiční komplex s tymidylát syntázou. Část fluorovaných metabolitů se dále mění na fluorouridin trifosfát (FUTP) a fluorodeoxyuridin trifosfát FdUTP, které se začleňují do RNA nebo DNA dle schématu na obrázku 2 (4).

Perorální cytostatikum kapecitabin (Xeloda), které je před aktivací poměrně málo

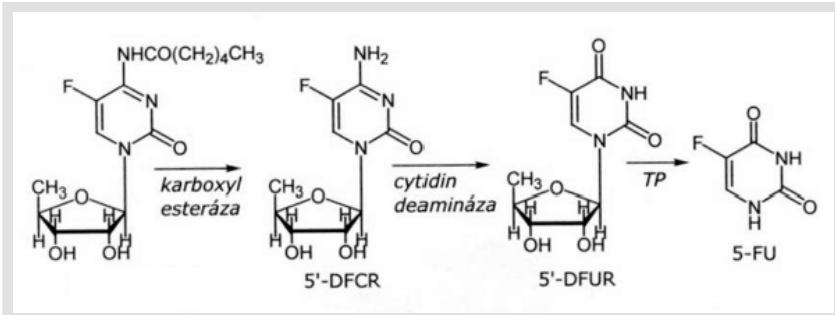
Obrázek 1. Chemická struktura některých fluoropyrimidinových léčiv



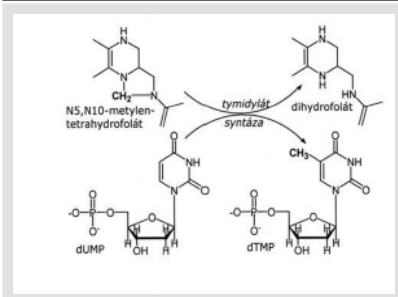
Obrázek 2. Metabolická aktivace a místa účinku 5-fluorouracilu (TS 150 tymidylát syntáza, TK – tymidin kináza, TP – tymidin fosforyláza, UP – uridin fosforyláza, UK – uridin kináza, OPRT – orotát fosforibozyltransferáza, RR – ribonukleotid reduktáza). Naznačena je i hlavní degradační dráha přes dihydropyrimidin dehydrogenázu (DPD) na inaktivní dihydrofluorouracil (DHFU)



Obrázek 3. Kapecitabin



Obrázek 4. Normální funkce tymidylát syntázy

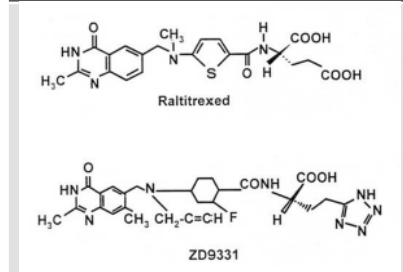


toxické pro nenádorové buňky, před vstupem do nádorové tkáně podstupuje aktivaci v játrech dle schématu na obrázku 3. První krok uvedeného schématu probíhá výlučně v játrech (5), aktivace cytidin deaminázou probíhá v játrech i v nádorové tkáni. Dalším krokem je přeměna na vlastní 5-fluorouracil, který je dále metabolizován dle již uvedeného schématu na obrázku 2. Protože hladiny cytidin deaminázy a tymidin fosforylázy jsou velmi často zvýšeny v nádorech oproti okolní tkáni, dochází k selektivní aktivaci na cytotoxické metabolity právě v nádorové tkáni. Toto selektivní působení Xelody (kapecitabinu) se odráží ve vyšší účinnosti některých léčebných režimů s Xelodou (6).

1.2. Mechanismus účinku

Účinky fluoropyrimidinových cytostatik rozdělujeme na RNA toxické a DNA toxické. DNA

Obrázek 5. Chemická struktura dvou často používaných antifolátů



toxické účinky zahrnují i nejlépe prozkoumaný mechanismus inhibice tymidylát syntázy. Kromě toho fluoropyrimidiny během svých metabolických přeměn indukují glykosylaci buněčných proteinů (7) a tím mohou narušit rovnováhu některých biochemických reakcí, včetně reakcí souvisejících s modulací chemorezistence.

1.2.1. Tymidylát syntáza

Tymidylát syntáza (TS) je klíčový enzym v biosyntéze pyrimidinových nukleotidů, katalyzující konverzi dUMP na dTMP, tzn. zavedení metylové skupiny do molekuly dUMP (8) (obrázek 4).

Nejvýznamnější DNA toxický účinek, který lze kvantifikovat nejpřesněji, je právě inaktivace tymidylát syntázy fluorodeoxyuridylationem (9). FdUMP je tvořen jednak prostřednictvím tymidin kinázy z FdUrd, ale především redukcí

FUDP ribonukleotid reduktázou a následnou defosforylací (obrázek 2). Inhibice tymidin syntázy je způsobena tvorbou velice stabilního ternárního komplexu TS-FdUMP-N5,N10-metylentetrahydrofolát (9). Důsledkem tvorby tohoto komplexu je inhibice TS při konverzi nukleotidu, což vyvolá nedostatek dTTP nutného pro biosyntézu DNA a nadměrnou akumulaci dUMP.

Inkorporace dUTP a FdUTP do DNA může vyústit v tvorbu DNA zlomů při chybné excizní reparaci uracil-N-glykosylázou s následným spuštěním apoptotické kaskády (10).

2. Přehled nejdůležitějších folátových inhibitorů tymidylát syntázy

Tyto inhibitory, jak už bylo napsáno v úvodu a jak plyne z obrázku 4, inhibují aktivitu tymidylát syntázy tím, že omezují dostupnost důležitého kofaktoru – 5,10metylentetrahydrofolátu. Dle toho, jak jsou antifoláty metabolizovány v buňce, se ještě dělí na antifoláty, které jsou výrazně aktivovány polyglutamací a na antifoláty bez aktivace polyglutamací. Reprezentantem první skupiny je raltitrexed (Tomudex), reprezentantem druhé skupiny je např. ZD9331 (11) (obrázek 5).

Raltitrexed i ZD9331 se zkoušejí při léčbě kolorektálního karcinomu, karcinomu žaludku a prsu (12). ZD9331 se též zkouší u karcinomu ovaria (11). Pozitivní účinek polyglutamace spočívá v tom, že polyglutamané antifoláty zůstávají v buňce dlouho zadržovány (u raltitrexedu až 24 hodin (13)) a zvyšuje se tak pravděpodobnost, že v buňce proběhne buněčný cyklus a inhibiční účinek antifolátu na syntézu DNA se tak bude moci projevit (11, 12).

Antifoláty představují poměrně rozsáhlou skupinu cytostatik. Patří sem také např. metotrexat používaný při léčbě akutních leukemií, lymfomů a sarkomů (29), nebo pemetrexed – MTA (MTA = multi-target antifolate) používaný při léčbě kolorektálního karcinomu a karcinomu pankreatu (14). Pemetrexed-MTA má kromě inhibice TS také inhibiční účinky na dihydrofolát reduktázu a ribonukleotid formyl transferázu (14).

Diskuze – racionální podklady pro individualizaci farmakoterapie

Lidský organismus exprimuje přibližně 20 000 genů a jejich alternativních transkriptů (15). Mnohé geny nesou polymorfismy, které mají vliv na hladinu exprese, regulační mechanismy nebo vlastnosti jimi kódovaných proteinů resp. enzymů (16). To se projevuje individuálními rozdíly v expresi jednotlivých genů, individuálními rozdíly v reaktivitě na vnější podněty (např. UV záření) nebo indi-

viduálními rozdíly v aktivitě určitých enzymů (30). Mimo to existují rozdíly úrovně exprese nebo enzymové aktivity mezi nádorem a zdravou tkání (17). Uvedených poznatků můžeme využít k racionálnímu návrhu chemoterapie.

Je známo, že folylpolyglutamát syntáza (FPGS) má vyšší aktivitu v nádorových buňkách než ve zdravé tkáni. Tento enzym provádí polyglutaminaci některých antifolátů a tím je aktivuje nebo zvyšuje jejich účinek. Proto lze předpokládat, že na léčbu budou dobře reagovat ty nádory, kde je FPGS vysoká. Bohužel aktivita FPGS je kromě nádorů vysoká též v játrech a v kmenových buňkách kostní dřene. Důsledkem je vyšší toxicita uvedených folátů na tyto tkáně. Antifoláty s polyglutamátovou aktivací se běžně používají při léčbě nádorových onemocnění krvetvorby a při léčbě jaterních metastáz (29).

Nebude mít smysl podávat tyto antifoláty u nádorů, kde již proběhla mutace FPGS a uvedené antifoláty nebudou v důsledku této mutace aktivovány (11). V případě nízkých hladin FPGS nebo mutací je třeba vybrat cytostatikum, které nepotřebuje aktivaci polyglutaminací. V současné době probíhají zkoušky antifolátového cytostatika ZD9331, které tento požadavek splňuje a je zároveň silným inhibitorem TS (11).

Racionální výběr fluoropyrimidinových cytostatik, případně jejich náhrada např. irinotecanem – inhibitorem topoisomerázy I, nebo oxaliplatinou – závisí na stanovení aktivity dihydropyrimidin dehydrogenázy v krvi nebo játrech (18). DPD je katabolizující enzym (obrázek 2), jehož deficit může vyvolávat hromadění 5-FU v organizmu a vést k toxickým stavům ohrožujícím život (18). Asi 3% populace jsou postiženy částečným nebo úplným deficitem tohoto enzymu (19). Bohužel ke stanovení aktivity DPD je standardně používáno radioaktivního značení. Proto není toto vyšetření u nás běžně dostupné.

Dalším kritériem výběru by mohla být hladina tymidin fosforylázy. Je známo, že nádory často obsahují vyšší hladiny tohoto enzymu než okolní tkáně. V případě vysokých hladin TP je vhodné použít kapecitabin (Xelodu), který je poměrně specificky aktivován právě v nádoru zvýšenými hladinami tymidin fosforylázy (obrázky 2, 3) (5).

Význam hladin TS pro predikci odpovědi na fluoropyrimidiny je sporný, existují výsledky potvrzující přítomnost vysokých hladin TS u nádorů rezistentních na fluoropyrimidiny (20, 21) a jiní autoři nenalezli shodu mezi vysokými hladinami a rezistencí na 5-FU (22). Někteří autoři naopak našli shodu mezi dobrou prognózou a vysokými hladinami TS (23). Dle našich zkušeností jsou rozdíly hladin TS

mezi nádory odpovídajícími na léčbu a nádory neodpovídajícími statisticky nevýznamné v kaskádě populací (24). Neshody v hodnocení významu TS jsou způsobeny mimo jiné rozdíly v metodikách, etnickou variabilitou a v rozdílné expresi TS v nádorové a okolní tkáni. Další skutečností, která má „na svědomí“ rozporuplné výsledky, je komplexnost buněčných dějů – každý zásah do buňky má za následek změny v expresi mnoha genů. Tyto změny mohou mít individuální rozdíly dané sekvenčními rozdíly individuálních genomů. Odrázem této komplexnosti je skutečnost, že dle studií profilů genové exprese s využitím cDNA microarrays, přidavek určitého cytostatika vyvolá výrazné změny v expresi řádově stovek genů (25, 26). Lze proto předpokládat, že rezistenci na určité cytostatikum nebude možné spolehlivě předpovědět pomocí několika málo markerů.

Závěr

Dle některých autorů jsou vysoké hladiny TS asociovány s rezistencí na inhibitory TS. Dle zjednodušených představ by rezistence měla být důsledkem toho, že při vysokých hladinách TS inhibitory nejsou schopny účinně inhibovat veškerou aktivitu TS a nemohou tedy účinně zablokovat syntézu DNA a replikaci. Dle těchto představ by vysoká hladina TS měla

být prediktorem rezistence na fluoropyrimidiny a antifoláty a být důvodem pro podání jiného cytostatika pracujícího na jiném principu než je inhibice TS. Podobně další enzymy spojené s metabolismem inhibitorů TS, jako jsou dihydropyrimidin dehydrogenáza a tymidin fosforyláza by mohly mít prediktivní význam pro předpověď rezistence na fluoropyrimidiny a napomoci výběru nejvhodnějšího cytostatika individuálně pro každého pacienta (28).

Hlavním kritériem pro rozhodování by měla být známá přecitlivělost na fluoropyrimidiny způsobená částečným nebo úplným deficitem DPD. Hladiny TS a TP by měly být jen pomocnými kritérii. V případě deficitu DPD by bylo možné použít antifoláty, rozhodování mezi polyglutamovatelnými a ostatními foláty je závislé na hladině exprese a funkčnosti FPGS genu v nádoru.

Bohužel rezistence na cytostatika, včetně rezistence na inhibitory TS je ovlivňována mnoha faktory a je výsledkem celkové individuální genové výbavy každého jedince. V současné době neexistuje absolutně spolehlivý systém pro predikci rezistence na inhibitory TS.

Poděkování: Děkuji prof. Janu Kovaříkovi za pomoc při přesnější formulaci některých anglických termínů.

Literatura

1. Pinedo HM, Peters GF. Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J Clin Oncol*. 1988 Oct; 6(10): 1653–1664. Review.
2. Wohlhueter RM, McIvor RS, Plagemann PG. Facilitated transport of uracil and 5-fluorouracil, and permeation of orotic acid into cultured mammalian cells. *J Cell Physiol*. 1980 Sep; 104(3): 309–319.
3. Damaraju VL, Damaraju S, Young JD, Baldwin SA, Mackey J, Sawyer MB, Cass CE. Nucleoside anticancer drugs: the role of nucleoside transporters in resistance to cancer chemotherapy. *Oncogene*. 2003 Oct 20; 22(47): 7524–7536. Review.
4. Allegra CJ, Grem JL. Antimetabolites. In: *Cancer, Principles and Practice of Oncology* 5th ed. DeVita VT, et al. (eds.), Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997; pp 432–452.
5. Miwa M, Ura M, Nishida M, Sawada N, Ishikawa T, Mori K, Shimma N, Umeda I, Ishitsuka H. Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. *Eur J Cancer*. 1998 Jul; 34(8): 1274–1281.
6. Kocakova, Spelda S, Svoboda M, Vyzula R, Kocak I, Brancikova, Slampa P, Vetcha H, Kovarova M, Penka I. Combined therapy of locally advanced rectal adenocarcinoma with capecitabine and concurrent radiotherapy. 2003 ASCO Annual Meeting Abstract No: 1295. *Proc Am Soc Clin Oncol* 22: page 322, 2003
7. Pels Rijcken WR, Telleman F, Peters GJ, Ferwerda W. Incorporation of 5-fluorouracil into nucleotide sugars and the effect on glycoconjugates in rat hepatoma cells and hepatocytes. *Adv Exp Med Biol*. 1989; 253B: 313–320.
8. Fernandes DJ, Bertino JR. 5-fluorouracil-methotrexate synergy: enhancement of 5-fluorodeoxyuridylate binding to thymidylate synthase by dihydroteroyl polyglutamates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Oct; 77(10): 5663–5667.
9. Santi DV, Pena VA, Lam SS. On the structure of the cofactor in the complex formed with thymidylate synthetase, 5,10-methylenetetrahydrofolate and 5-fluoro-2'-deoxyuridylate. *Biochim Biophys Acta*. 1976 Jun 7; 438(1): 324–331.
10. Dusseau C, Murray GI, Keenan RA, O'Kelly T, Krokan HE, McLeod HL. Analysis of uracil DNA glycosylase in human colorectal cancer. *Int J Oncol*. 2001 Feb; 18(2): 393–399.
11. Plummer R, Rees C, Hughes A, Beale P, Highley M, Trigo J, Gokul S, Judson I, Calvert H, Jackman A, Mitchell F, Smith R, Douglass E. A phase I trial of ZD9331, a water-soluble, nonpolyglutamatable, thymidylate synthase inhibitor. *Clin Cancer Res*. 2003 Apr; 9(4): 1313–1322.
12. Rose MG, Farrell MP, Schmitz JC. Thymidylate synthase: a critical target for cancer chemotherapy. *Clin Colorectal Cancer*. 2002 Feb; 1(4): 220–229. Review.
13. Widemann BC, Balis FM, Godwin KS, McCully C, Adamson PC. The plasma pharmacokinetics and cerebrospinal fluid penetration of the thymidylate synthase inhibitor raltitrexed (Tomudex) in a nonhuman primate model. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1999; 44(6): 439–443.
14. Curtin NJ, Hughes AN. Pemetrexed disodium, a novel antifolate with multiple targets. *Lancet Oncol*. 2001 May; 2(5): 298–306. Review.
15. Iseli C, Stevenson BJ, de Souza SJ, Samaia HB, Camargo AA, Buetow KH, Strausberg RL, Simpson AJ, Bucher P, Jongeneel CV. Long-range heterogeneity at the 3' ends of human mRNAs. *Genome Res*. 2002 Jul; 12(7): 1068–1074.
16. Wojnowski L, Brockmoller J. Single nucleotide polymorphism characterization by mRNA expression imbalance assessment. *Pharmacogenetics*. 2004 Apr; 14(4): 267–269.

17. Zou TT, Selaru FM, Xu Y, Shustova V, Yin J, Mori Y, Shibata D, Sato F, Wang S, Olaru A, Deacu E, Liu TC, Abraham JM, Meltzer SJ. Application of cDNA microarrays to generate a molecular taxonomy capable of distinguishing between colon cancer and normal colon. *Oncogene*. 2002 Jul 18; 21(31): 4855–4862.
18. Milano G, Etienne MC. Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) and clinical pharmacology of 5-fluorouracil (review). *Anticancer Res*. 1994 Nov-Dec; 14(6A): 2295–2297. Review.
19. Lu Z, Zhang R, Diasio RB. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity in human peripheral blood mononuclear cells and liver: population characteristics, newly identified deficient patients, and clinical implication in 5-fluorouracil chemotherapy. *Cancer Res*. 1993 Nov 15; 53(22): 5433–5438.
20. Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, Metzger R, Groshen S, Tsao-Wei DD, Lenz HJ, Leichman CG, Leichman L, Diasio RB, Danenberg PV. Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clin Cancer Res*. 2000 Apr; 6(4): 1322–1327.
21. Horikoshi T, Danenberg KD, Stadlbauer TH, Volkenandt M, Shea LC, Aigner K, Gustavsson B, Leichman L, Frosing R, Ray M, et al. Quantitation of thymidylate synthase, dihydrofolate reductase, and DT-diaphorase gene expression in human tumors using the polymerase chain reaction. *Cancer Res*. 1992 Jan 1; 52(1): 108–116.
22. Allegra CJ, Paik S, Colangelo LH, Parr AL, Kirsch I, Kim G, Klein P, Johnston PG, Wolmark N, Wieand HS. Prognostic value of thymidylate synthase, Ki-67, and p53 in patients with Dukes' B and C colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project collaborative study. *J Clin Oncol*. 2003 Jan 15; 21(2): 241–250.
23. Kornmann M, Schwabe W, Sander S, Kron M, Strater J, Polat S, Kettner E, Weiser HF, Baumann W, Schramm H, Hausler P, Ott K, Behnke D, Staib L, Beger HG, Link KH. Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA expression levels: predictors for survival in colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res*. 2003 Sep 15; 9(11): 4116–4124.
24. Svoboda M, et al., in preparation.
25. Shimizu D, Ishikawa T, Ichikawa Y, Togo S, Hayasizaki Y, Okazaki Y, Shimada H. Current progress in the prediction of chemosensitivity for breast cancer. *Breast Cancer*. 2004; 11(1): 42–48. Review.
26. Zembutsu H, Ohnishi Y, Tsunoda T, Furukawa Y, Katagiri T, Ueyama Y, Tamaoki N, Nomura T, Kitahara O, Yanagawa R, Hirata K, Nakamura Y. Genome-wide cDNA microarray screening to correlate gene expression profiles with sensitivity of 85 human cancer xenografts to anticancer drugs. *Cancer Res*. 2002 Jan 15; 62(2): 518–527.
27. Stoehlmacher J, Goekkurt E, Lenz HJ. Pharmacogenetic aspects in treatment of colorectal cancer—an update. *Pharmacogenomics*. 2003 Nov; 4(6): 767–77. Review.
28. Iqbal S, Lenz HJ. Determinants of prognosis and response to therapy in colorectal cancer. *Curr Oncol Rep*. 2001 Mar; 3(2): 102–108. Review.
29. McGuire JJ. Anticancer antifolates: current status and future directions. *Curr Pharm Des*. 2003; 9(31): 2593–2613. Review.
30. Fitch ME, Nakajima S, Yasui A, Ford JM. In vivo recruitment of XPC to UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers by the DDB2 gene product. *J Biol Chem*. 2003 Nov 21; 278(47): 46906–46910. Epub 2003 Aug 27.
31. Schmoll HJ. Development of treatment for advanced colorectal cancer: infusional 5-FU and the role of new agents. *Eur J Cancer*. 1996; 32A Suppl 5: S18–22. Review.