

RETINOIDY V LÉČBĚ NEUROBLASTOMU

RETINOIDS IN THERAPY OF NEUROBLASTOMA

FRGALA T.¹, DUBSKÁ L.¹, REYNOLDS C.P.²¹ ODDĚLENÍ LABORATORNÍ MEDICÍNY, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO² USC-CHLA INSTITUTE FOR PEDIATRIC CLINICAL RESEARCH, CHILDRENS HOSPITAL LOS ANGELES, UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA, USA

Souhrn

Přibližně 60% pacientů s neuroblastomem je diagnostikováno s vysoce rizikovým onemocněním a přes intenzivní kombinovanou léčbu (chirurgické odstranění nádoru, radioterapie, vysokodávkovaná chemoterapie s ev. transplantací kostní dřeně) bývá téměř 60% těchto pacientů do dvou let postiženo recidivou onemocnění. Nadále jsou proto hledány nové terapeutické postupy včetně možností doléčení minimální reziduální choroby s důrazem na nízkou celkovou toxicitu. V *in vitro* podmínkách představují deriváty vitamínu A, retinoidy, jedny z neúčinnějších induktorů buněčné diferenciace u neuroblastomu. Slibné účinky kyseliny retinové *in vitro* podnítily již v první polovině 80. let zájem o její *in vivo* aplikaci. Přirozený metabolit retinolu kyselina **all-trans retinová (ATRA, Tretinoin, Vesanoid)** je s úspěchem a minimální toxicitou využívána k léčbě akutní promyelocytární leukemie (APL). Vysokodávkovaná pulzní aplikace kyseliny **13-cis retinové (13-cis-RA, Izotretinoin, Roaccutane)** v návaznosti na intenzivní kombinovanou léčbu byla s úspěchem použita ve studii fáze III CCG-3891 (Children's Cancer Group), kdy podání 13-cis-RA významně prodloužilo přežívání bez příznaků choroby (Event-Free Survival, EFS) oproti skupině bez další léčby ($P = 0.027$). K recidivě nádoru však nadále dochází u více než 50% pacientů s vysoce rizikovým neuroblastomem léčených intenzivní kombinovanou léčbou s následnou aplikací 13-cis-RA. Syntetický retinoid **N-(4-hydroxyfenyl)-retinamid (fenretinid, 4-HPR)** při studiích *in vitro* inhiboval růst i těch buněčných linií neuroblastomu, jež se vyznačují rezistencí na kyselinu retinovou. Narozdíl od 13-cis-RA či ATRA nevede fenretinid k diferenciaci, nýbrž k apoptóze a nekróze maligních buněk. Fenretinid pravděpodobně působí nezávisle na receptorech RARs a RXRs, ačkoliv mechanismy cytotoxicity fenretinidu dosud nejsou plně objasněny. Jedním z cytotoxických mechanismů fenretinidu v neuroblastomových tkáňových kulturách je zvýšení hladin ceramidu přímo úměrné dávce 4-HPR. Jsou proto připravovány klinické studie s aplikací fenretinidu v kombinaci s modulátory ceramidového metabolismu, které s fenretinidem *in vitro* prokazují synergický účinek.

Klíčová slova: retinoidy, neuroblastom, fenretinid.

Abstract

Approximately 60% of neuroblastoma patients are diagnosed with high-risk disease and despite of intensive combination therapy (surgical removal of the tumor mass, radiotherapy, high-dose chemotherapy with eventual bone-marrow transplantation) almost 60% of these patients suffer a tumor relapse within two years of treatment completion. Therefore, novel therapeutic approaches with low toxicity are developed including treatment of minimal residual disease. Vitamin A derivatives retinoids represent some of the most effective neuroblastoma cell differentiation inducers *in vitro*. Promising retinoic acid effects stimulated interest in its *in vivo* application since the early 1980s. Natural retinol metabolite **all-trans retinoic acid (ATRA, Tretinoin, Vesanoid)** has been successfully used in treatment of acute promyelocytic leukemia with minimal adverse effects. High-dose pulse **13-cis retinoic acid (13-cis-RA, Izotretinoin, Roaccutane)** treatment following intensive combination therapy significantly prolonged the event-free survival (EFS) in the phase III CCG-3891 (Children's Cancer Group) clinical trial ($P = 0.027$). Nevertheless, over 50% of high-risk neuroblastoma patients treated with intensive combination treatment and subsequent 13-cis retinoic acid application still experience tumor recurrence. Synthetic retinoid **N-(4-hydroxyphenyl)-retinamide (fenretinide, 4-HPR)** inhibited the growth of neuroblastoma *in vitro*, including cell lines resistant to 13-cis RA. Unlike the 13-cis-RA or ATRA, fenretinide does not cause cell differentiation, but apoptosis and necrosis of the malignant cells. The cytotoxic effect of fenretinide is reportedly independent of the RAR and RXR receptors, although its mechanisms remain to be fully explored. One of the cytotoxic mechanisms of fenretinide in neuroblastoma cell cultures is elevation of ceramide levels directly proportional to 4-HPR dose increase. Therefore, clinical studies are being prepared combining the application of fenretinide with ceramide metabolism modulators, a combination treatment which showed synergistic effect *in vitro*.

Keywords: retinoids, neuroblastoma, fenretinide.

Neuroblastom je maligní nádor raného dětského věku vycházející z periferního nervového systému, jehož spektrum klinického chování sahá od spontánních regresí až po rychle progredující onemocnění nereagující na chemoradioterapii. Přibližně 60% pacientů je diagnostikováno s vysoce riziko-

vým onemocněním (stadium 4 diagnostikované ve věku 1 rok a vyšším, případně nádory všech stádií s amplifikací proto-onkogenu *n-myc* a/nebo nepříznivým histopatologickým nálezem) [1]. Děti s vysoce rizikovým onemocněním bývají i přes intenzivní kombinovanou léčbu (chirurgické odstranění nádoru

ru, radioterapie, vysokodávkovaná chemoterapie s ev. transplantací kostní dřeně) téměř v 60% případů do dvou let postiženy recidivou onemocnění. Nadále jsou proto hledány nové terapeutické postupy včetně možnosti doléčení minimální reziduální choroby v návaznosti na intenzivní kombinovanou terapii, u nichž je kladen důraz na minimální celkovou toxicitu. V *in vitro* podmínkách představují u neuroblastomu deriváty vitamínu A, retinoidy, jedny z neúčinnějších induktorů buněčné diferenciace [2,3,4]. Působením kyseliny retinové na tkáňové kultury neuroblastomu dochází k výraznému snížení exprese RNA onkogenu *n-myc* a k zástavě buněčné proliferace, a to bez ohledu na stupeň původní amplifikace onkogenu *n-myc* [5,6]. Po přerušení aplikace nádorové buňky znovu rostou; u některých tkáňových kultur však opětovnou zástavou proliferace reagují i na další, s odstupem aplikovaný cyklus kyseliny retinové. Podobná pulzní terapie kyselinou retinovou by tak mohla u správně zvolené podskupiny pacientů s neuroblastomem dosáhnout dlouhodobé zástavy buněčné proliferace [6].

Diferenciace a zástava buněčného růstu jsou v případě většiny retinoidů zprostředkovány jednou či více skupinami jaderných receptorů: receptory kyseliny retinové RARs a retinoidovými X receptory RXRs (skupiny jsou dále děleny na subtypy alfa, beta a gama) [7]. Obě skupiny těchto receptorů jsou přítomny v buňkách většiny neuroblastomových tkáňových kultur i primárních tumorů. Nicméně mezi rezistencí buněčných linií na kyselinu retinovou a úrovní exprese RAR či RXR nebyl pozorován vzájemný vztah. Zvýšená exprese RAR beta však bývá spojena s dobrou prognózou neuroblastomu a overexprese tohoto receptoru v důsledku transfekce zvyšuje léčebnou odpověď některých buněčných linií neuroblastomu na kyselinu retinovou [8].

Slibné účinky kyseliny retinové *in vitro* podnítily již v první polovině 80. let zájem o její *in vivo* aplikaci. Přirozený metabolit retinolu kyselina **all-trans retinová (ATRA, Tretinoin, Vesanoid)** je s úspěchem a minimální toxicitou využívána k léčbě akutní promyelocytární leukemie (APL) [9,10]. Izomerem kyseliny all-trans retinové je **kyselina 13-cis retinová (13-cis-RA, Izotretinoin, Roaccutane)**, která indukovala v klinických studiích diferenciaci u APL spojenou s léčebnou odpovědí u některých pacientů. Regrese onemocnění byly pozorovány i u pacientů s APL, myelodysplastickým syndromem, mycosis fungoides a pokročilým skvamózním karcinomem kůže [11]. Podání 13-cis-RA pacientům s progredujícím neuroblastomem sice ojediněle vyvolala léčebné odpovědi včetně jedné kompletní remise [6], celkově však byla nevýrazná aktivita 13-cis-RA v dávce 100 mg/m²/den zklamáním [12]. Rovněž studie European Neuroblastoma Study Group (ENSG) při denní dávce 22.5 mg/m²/den prokázala minimální celkovou toxicitu, ale rovněž nulový efekt kontinuální nízkodávkované 13-cis-RA na přežívání bez příznaků choroby (Event-Free Survival, EFS) u pacientů s neuroblastomem [13]. Mezi hlavní nežádoucí účinky byly v těchto studiích řazeny suchost kůže a sliznic, zánět spojivek a hypertriglyceridemie.

Koncentrací 5 μ M - 10 μ M účinných v podmínkách *in vitro* nebylo v séru při dávkování 100 mg/m²/den dosaženo, což může být vysvětlením nesignifikantního efektu 13-cis-RA ve zmíněných klinických studiích [14,15]. V dalších *in vitro* studiích a studiích fáze I byla proto vyvinuta vysokodávkovaná pulzní aplikace 13-cis-RA s maximální tolerovanou dávkou (MTD) 160 mg/m²/den denně po dobu 2 týdnů, s následnou 2-týden-

ní přestávkou pro mukokutánní regeneraci. Sérové hladiny 13-cis-RA při tomto pulzním dávkování dosahovaly 4 μ M až 7 μ M [16]. Tato vysokodávkovaná pulzní aplikace 13-cis-RA byla použita i ve studii fáze III CCG-3891 (Children's Cancer Group) s podáním 13-cis-RA po ukončení intenzivní kombinované léčby [17]. Po 1. randomizaci byli pacienti této studie léčeni buďto myeloablativní terapií (melphalan, karboplatina, etoposid a celotělové ozáření) s následnou autologní transplantací kostní dřeně nebo třemi cykly konsolidační chemoterapie (cisplatina, etoposid, doxorubicin, ifosfamid/mesna) bez transplantace kostní dřeně. Při 2. randomizaci pak byli pacienti z obou skupin rozděleni do podskupiny s pulzní aplikací 13-cis-RA 160 mg/m²/den (dva týdny každý měsíc po dobu 6 měsíců) a podskupiny bez další léčby. První randomizace ukázala statisticky významné prodloužení EFS ve skupině s myeloablativní terapií a transplantací kostní dřeně ($P = 0.034$). Podání 13-cis-RA pak při druhé randomizaci významně prodloužilo EFS oproti skupině bez další léčby ($P = 0.027$). Nejvýraznějšího efektu bylo dosaženo při aplikaci 13-cis-RA po ukončení intenzivní léčby u pacientů bez detekovatelného nádoru, tedy ve fázi minimální reziduální choroby [17].

I přes absenci přímého srovnání obou izomerů byla ATRA dlouho považována za účinnější formu kyseliny retinové než 13-cis-RA. Při *in vitro* testování shodnými dávkami 0.1 μ M - 1.0 μ M prokazuje ATRA skutečně výraznější účinek než 13-cis-RA [18]. Tyto dávky byly původně zvoleny na základě sérových hladin dosažených klinicky při kontinuální aplikaci ATRA v dávce 45 mg/m²/den [19]. Nicméně vysokodávkovaná pulzní aplikace 13-cis-RA dosahuje *in vivo* výrazně vyšších sérových hladin 4 μ M - 7 μ M [16]. 13-cis-RA navíc v průběhu léčby zachovává delší biologický poločas a stabilní hladiny, zatímco poločas ATRA se v průběhu léčby v důsledku zvýšené metabolizace zkracuje a jeho sérové hladiny klesají [20]. Indukce diferenciace a zástava buněčného růstu retinoidy jsou přímo úměrné dávce a trvalý léčebný efekt vyžaduje vystavení nádorových buněk optimálním hladinám retinoidů alespoň po dobu několika dnů. Z toho pohledu může být 13-cis-RA považována v léčbě neuroblastomu za vhodnější formu kyseliny retinové než ATRA [14].

Ačkoliv aplikace 13-cis-RA v návaznosti na intenzivní kombinovanou léčbu prodloužila EFS u dětí s vysoce rizikovým neuroblastomem, k recidivě nádoru přesto dochází u více než 50% takto léčených pacientů. Jsou proto nadále hledány léky či kombinace léků, které by s minimální celkovou toxicitou působily zejména na nádory rezistentní na kyselinu retinovou. Z tohoto pohledu je zajímavý syntetický retinoid **N-(4-hydroxyfenyl)-retinamid (fenretinid, 4-HPR)**, který při studiích *in vitro* inhiboval růst i těch buněčných linií neuroblastomu, jež se vyznačují rezistencí na kyselinu retinovou [21]. Narodil od 13-cis-RA či ATRA nevede fenretinid k diferenciaci, nýbrž k apoptóze a nekróze maligních buněk [22]. Fenretinid pravděpodobně působí nezávisle na receptorech RARs a RXRs [23,24], ačkoliv mechanismy cytotoxicity fenretinidu dosud nejsou plně objasněny. Současné studie ukazují, že jedním z cytotoxických mechanismů fenretinidu v neuroblastomových tkáňových kulturách je zvýšení hladin ceramidu přímo úměrné dávce 4-HPR [22]. Jsou proto připravovány klinické studie s aplikací fenretinidu v kombinaci s modulátory ceramidového metabolismu, které s fenretinidem *in vitro* prokazují synergický účinek [25]. V posledních letech byly dokončeny klinické studie s perorální aplikací fenretinidu u dětí se solidními nádory [26] i u dospělých s karcinomy [27,28]. V pediatrické studii fáze

I byla při opakovaných sedmidenních aplikacích fenretinidu s třítydenními přestávkami dosažena maximální tolerovaná dávka 2457 mg/m²/den, přičemž byly s minimálními vedlejšími účinky zaznamenány sérové hladiny fenretinidu 6 µM - 10 µM [26], odpovídající koncentracím účinným *in vitro* i u buněčných linií rezistentních na 13-cis-RA [21]. Z výsledků dosavadních studií je zřejmé, že retinoidy již mají v léčebných postupech u neuroblastomu své místo. Zdá se však, že efekt stávajících forem je limitován na pro-

dloužení EFS po intenzivní kombinované léčbě bez výrazného snížení počtu recidiv. Od vývoje účinnějších forem, umožňujících dosažení vyšších sérových a především tkáňových hladin léku při zachování minimální celkové toxicity, se očekává výraznější terapeutický efekt retinoidů a jejich významnější úloha v léčbě neuroblastomu.

Práce byla podpořena grantem Ministerstva zdravotnictví (MZO00209805).

Literatura

1. Reynolds CP, Seeger RC: Neuroblastoma. In: *Cancer Treatment*, Fifth Edition, Haskell CM (ed.), Philadelphia - W.B. Saunders: 1214-1236, 2000
2. Sidell N: Retinoic acid-induced growth inhibition and morphologic differentiation of human neuroblastoma cells in vitro. *J Natl Cancer Inst* 68: 589-596, 1982
3. Sidell N, Altman A, Haussler MR, Seeger RC: Effects of retinoic acid (RA) on the growth and phenotypic expression of several human neuroblastoma cell lines. *Exp Cell Res* 148: 21-30, 1983.
4. Pahlman S, Ruusala AI, Abrahamsson L, Mattsson ME, Esscher T: Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differ* 14: 135-144, 1984.
5. Thiele CJ, Reynolds CP, Israel MA: Decreased expression of N-myc precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma. *Nature* 313: 404-406, 1985.
6. Reynolds CP, Kane DJ, Einhorn PA, Matthay KK, Crouse VL, Wilbur JR, Shurin SB, Seeger RC: Response of neuroblastoma to retinoic acid in vitro and in vivo. *Prog Clin Biol Res* 366: 203-211, 1991
7. Doubek M, Šmardová J, Adam Z, Vorlíček J: Induktory diferenciace - retinoidy a další látky. In: *Obecná onkologie a podpůrná léčba*, 1. vydání, Adam Z, Vorlíček J, Koptíková J (Ed.), Grada Publishing: 371-373, 2003
8. Cheun B, Hocker JE, Smith SA, Norris MD, Haber M, Marshall GM: Favorable prognostic significance of high-level retinoic acid receptor beta expression in neuroblastoma mediated by effects on cell cycle regulation. *Oncogene* 17: 751-759, 1998
9. Huang ME, Ye YC, Chen SR, Chai JR, Lu JX, Zhou L et al: Use of all trans retinoic acid as a differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia. *Blood* 72: 567-572, 1988
10. Warrell RPJ, Frankel SR, Miller WHJ, Sheinberg DA, Itri LM, Hittelman WN et al: Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-trans-retinoic acid). *N Engl J Med* 324: 1385-1393, 1991
11. Reynolds CP, Lemmons RS: Retinoid therapy of childhood cancer. *Hematol Oncol Clin N Amer* 15: 867-910, 2001
12. Finklestein JZ, Krailo MD, Lenarsky C, Ladisch S, Blair GK, Reynolds CP, Sitarz AL, Hammond GD: 13-cis-retinoic acid (NSC 122758) in the treatment of children with metastatic neuroblastoma unresponsive to conventional chemotherapy: report from the Children's Cancer Study Group. *Med Pediatr Oncol* 20: 307-311, 1992
13. Kohler JA, Imeson J, Ellershaw C, Lie SO: A randomized trial of 13-cis retinoic acid in children with advanced neuroblastoma after high-dose therapy. *Br J Cancer* 83: 1124-1127, 2000
14. Reynolds CP, Schindler PF, Jones DM, Gentile JL, Proffitt RT, Einhorn PA: Comparison of 13-cis-retinoic acid to trans-retinoic acid using human neuroblastoma cell lines. *Prog Clin Biol Res* 385: 237-244, 1994
15. Khan AA, Villablanca JG, Reynolds CP, Avramis VI: Pharmacokinetic studies of 13-cis-retinoic acid in pediatric patients with neuroblastoma following bone marrow transplantation. *Cancer Chemother Pharmacol* 39: 34-41, 1996
16. Villablanca JG, Khan AA, Avramis VI, Seeger RC, Matthay KK, Ramsay NK, Reynolds CP: Phase I trial of 13-cis-retinoic acid in children with neuroblastoma following bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 13: 894-901, 1995
17. Matthay K, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris R, Ramsay NK, Swift P, Shimada H, Black CT, Brodeur GM, Gerbing R, Reynolds CP: Treatment of high risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. *N Engl J Med* 341: 1165-73, 1999
18. Chomienne C, Ballerini P, Balitrand N, Daniel MT, Fenaux P, Castaigne S, Degos L: All-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemias: II, in vitro studies: structure - function relationship. *Blood* 76: 1710-1717, 1990
19. Muindi JR, Young CW, Warrell RP: Clinical pharmacology of all-trans retinoid acid (Review). *Leukemia* 8: 1807-1812, 1994
20. Smith MA, Parkinson DR, Cheson BD, Friedman MA: Retinoids in cancer therapy. *J Clin Oncol* 10: 839-864, 1992
21. Reynolds CP, Wang Y, Melton LJ, Einhorn PA, Slamon DJ, Maurer BJ: Retinoic-acid-resistant neuroblastoma cell lines show altered MYC regulation and high sensitivity to fenretinide. *Medical & Pediatric Oncology* 35: 597-602, 2000
22. Maurer BJ, Metelitsa LS, Seeger RC, Cabot MC, Reynolds CP: N-(4-hydroxyphenyl)retinamide increases ceramide and reactive oxygen species and induces mixed apoptosis/necrosis in neuroblastoma cell lines. *J Natl Cancer Inst* 91: 1138-1146, 1999
23. Sani BP, Shealy YF, Hill DL: N-(4-hydroxyphenyl)retinamide: interactions with retinoid-binding proteins/receptors. *Carcinogenesis* 16: 2531-2534, 1995
24. Sheikh MS, Shao ZM, Li XS, Ordonez JV, Conley BA, Wu S, Dawson MI, Han QX, Chao WR, Quick T: N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (4-HPR)-mediated biological actions involve retinoid receptor-independent pathways in human breast carcinoma. *Carcinogenesis* 16: 2477-2486, 1995
25. Maurer BJ, Melton L, Billups C, Cabot MC, Reynolds CP: Synergistic cytotoxicity in solid tumor cell lines between N-(4-hydroxyphenyl)retinamide and modulators of ceramide metabolism. *J. Natl. Cancer Inst.* 92: 1897-1909, 2000
26. Villablanca JG, Ames MM, Reid JM, Bagniewski PG, Krailo M, Reynolds CP: Phase I trial of oral N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (4-HPR) in children with resistant/recurrent solid tumors: A Children's Cancer Group Study (CCG 09709). *Proc Am Soc Clin Oncol* 21: 198a, 2002
27. Decensi A, Serrano D, Bonanni B, Cazzaniga M, Guerrieri-Gonzaga A: Breast cancer prevention trials using retinoids (Review). *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8(1): 19-30, 2003
28. Formelli F, Camerini T, Cavadini E, Appierto V, Villani MG, Costa A, De Palo G, Di Mauro MG, Veronesi U: Fenretinide breast cancer prevention trial: drug and retinol plasma levels in relation to age and disease outcome. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 12(1):34-41, 2003

Korespondenční adresa:

MUDr. Frgala Tomáš
Gynekologické odd.MOU, Žlutý kopec č.7, 65653 BRNO
e-mail: (frgala@mou.cz).

Došlo: 5. 4. 2007
Přijato: 15. 4. 2007