

# Inhibitory proteazomu v léčbě mnohočetného myelomu

## Proteasome Inhibitors in Treatment of Multiple Myeloma

Kubiczková L., Matějčková J., Sedlaříková L., Kryukov F., Hájek R., Ševčíková S.

Babákova myelomová skupina, Ústav patologické fyziologie, LF MU Brno

### Souhrn

Mnohočetný myelom, maligní onemocnění plazmatických buněk, zůstává stále velmi obtížně léčitelným hematologickým onemocněním, pro které je nutné hledat nové možnosti terapie ovlivňující jak plazmocyty samotné, tak i mikroprostředí kostní dřevě. Klonální plazmocyty se vyznačují zvýšenou regulací ubiquitin-proteazomové kaskády, což zvyšuje jejich citlivost k působení inhibitorů proteazomu. Léčebné přístupy využívající inhibitory proteazomu patří do éry nových léků a v posledních letech se ukázaly být velice důležitou součástí léčby pacientů s mnohočetným myelomem. Prvním inhibitorem proteazomu schváleným pro léčbu mnohočetného myelomu se stal bortezomib, který vykazoval silné antimyelomové účinky. Bohužel, navzdory jeho vysoké účinnosti se u velkého procenta pacientů s mnohočetným myelomem pacientů po čase objevuje rezistence k jeho působení. Ve snaze překonat rezistenci k bortezomibu a vyvinout inhibitor proteazomu s lepším toxickým profilem byly vyvinuty inhibitory proteazomu druhé generace – carfilzomib, marizomib a MLN9708, které by mohly nadějně změnit průběh mnohočetného myelomu v onemocnění chronické.

### Klíčová slova

mnohočetný myelom – inhibitory proteazomu – bortezomib – carfilzomib – marizomib – MLN9708

### Summary

Multiple myeloma, a plasma cell malignancy, still remains a hard-to-treat hematological disease that desperately needs new therapy targeting plasmocytes but also the bone marrow micro-environment. Clonal plasmocytes are characterized by increased regulation of ubiquitin-proteasome pathway which augments their sensitivity to proteasome inhibitors. Treatment strategies based on proteasome inhibitors belong to the era of new drugs, and they have become increasingly important for treatment of multiple myeloma in recent years. Bortezomib became the first proteasome inhibitor approved for the treatment of multiple myeloma and showed remarkable anti-myeloma activity. However, despite its high efficiency, a large proportion of patients have become bortezomib resistant. The second generation of proteasome inhibitors – carfilzomib, marizomib and MLN9708 – were developed in an effort to overcome bortezomib-resistance and find proteasome inhibitors with a better toxic profile. These drugs brought a chance that multiple myeloma would become a chronic disease.

### Key words

multiple myeloma – proteasome inhibitors – bortezomib – carfilzomib – marizomib – MLN9708

Práce byla podpořena výzkumnými projekty: Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy MSM0021622434, Grantové agentury ČR GAP304/10/1395 a Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví NT13190 a NT11154.

This study was supported by scientific program of the Czech Ministry of Education, Youth and Sports No. MSM0021622434, by grant of Czech Science Foundation No. GAP304/10/1395 and by grants of Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health No. NT13190 and NT11154.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



**RNDr. Sabina Ševčíková, Ph.D.**  
Babákova myelomová skupina  
Ústav patologické fyziologie  
LF MU  
Kamenice 5, A3  
625 00 Brno  
e-mail: sevcik@med.muni.cz

Obdrženo/Submitted: 2. 10. 2012  
Přijato/Accepted: 15. 10. 2012

## Úvod – inhibitory proteazomu

Proteazom jako nová buněčná struktura byl poprvé identifikován na počátku 70. let skupinou doktora Harrise [1]. Mnoho dalších objevů bylo učiněno později, koncem let 70. a počátkem let 80. v laboratoři prof. Avrama Hershka, a bylo zjištěno, že jeho funkce spočívá v ATP-dependentní degradaci intracelulárních proteinů a jeho specifita je dána interakcí pouze s takovými proteiny, které jsou označeny polyubikvitinovým řetězcem anebo obsahují specifickou sekvenci aminokyselin [2,3]. Za tento významný objev získali prof. Ciechanover, Hershko a Rose v roce 2004 Nobelovu cenu za chemii.

Proteazom je útvar cylindrického tvaru. Skládá se ze čtyř homologních prstenců tvořených sedmi podjednotkami  $\alpha$  nebo  $\beta$ , které jsou nad sebou uspořádány v pořadí  $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$  [4]. V této struktuře lze rozeznat tři různé typy proteolytických podjednotek –  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 a  $\beta$ 5. Každá z nich obsahuje aktivní místo na svém N-konci, kde se nachází zbytek aminokyseliny threoninu (Thr1) [5]. Ačkoli proteazom obsahuje více katalytických míst, k inhibici jeho funkce postačuje pouze zablokování podjednotky  $\beta$ 5, která vykazuje chymotrypsinovou aktivitu [6]. V hematopoietických buňkách je hlavním typem proteazomu jeho indukibilní izoforma – imunoproteazom, jehož výskyt koreluje s hladinou cytokinů. Je charakterizován nahrazením proteolyticky aktivních podjednotek  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 a  $\beta$ 5 jejich

ekvivalenty  $\beta$ 1i (LMP2),  $\beta$ 2i (MELC1) a  $\beta$ 5i (LMP7) [7].

Nejčastějšími proteiny určenými k degradaci jsou špatně sbalené proteiny a proteiny s krátkým biologickým poločasem, které mají většinou regulační funkci [8]. Produkty proteolytické reakce jsou pak oligopeptidové řetězce s průměrnou délkou 8–12 aminokyselin [9].

Použití inhibitorů proteazomu (IP) patří v současné době mezi jedny z neúspěšnějších strategií pro léčbu mnohočetného myelomu (MM), nádorového onemocnění způsobeného maligní transformací B lymfocytů s charakteristickou klonální proliferací a akumulací plazmatických buněk v kostní dřeni [10]. IP jsou zpravidla krátké peptidy, ke kterým je kovalentně připojen farmakofor – skupina atomů, která se váže do katalytických míst proteazomu, a tím zabraňuje jeho správné funkci. Konečným důsledkem inhibice proteazomu v myelomových buňkách je indukce apoptotických drah, překonání rezistence ke konvenční chemoterapii a senzitivace vůči dalším terapeutikům.

V tomto přehledovém článku se zaměříme na mechanismus účinku a roli IP v léčbě mnohočetného myelomu.

## První generace inhibitorů proteazomu

### Bortezomib

**Bortezomib**, známý také pod označením PS-341 a komerčním názvem Velcade (Millenium Pharmaceuticals), je prvním a jediným IP, který byl doposud oficiálně schválen pro klinickou praxi. Po chemické stránce se jedná o dipeptidylový derivát kyseliny borité se sumárním vzorcem  $C_{19}H_{25}BN_4O_4$  (obr. 1).

Poprvé byl bortezomib syntetizován v polovině 90. let minulého století společností Myogenics [11]. O jeho vysoké specifitě, účinnosti a oxidační stabilitě vypověděly výsledky studií in vitro u 60 rakovinných linií [12]. První klinická studie s Velcade pro léčbu hematologických malignit byla zahájena v listopadu 1999. Tým pod vedením dr. Orlowského ve studii s nízkými dávkami léku, sloužícími pouze k ověření jeho bezpečnosti, zaznamenal úplné vymizení příznaků (CR) MM u 47leté pacientky. U ostatních osmi pacientů z celkového počtu jede-

náct došlo alespoň k minimální léčebné odpovědi (MR) nebo stabilizaci onemocnění [13]. Výsledek to byl natolik převratný, že po ověření v dalších fázích klinických studií vedl k urychlenému schválení bortezomibu pro léčbu relabujícího a refrakterního myelomu v roce 2003 v USA a o rok později také v České republice [14,15].

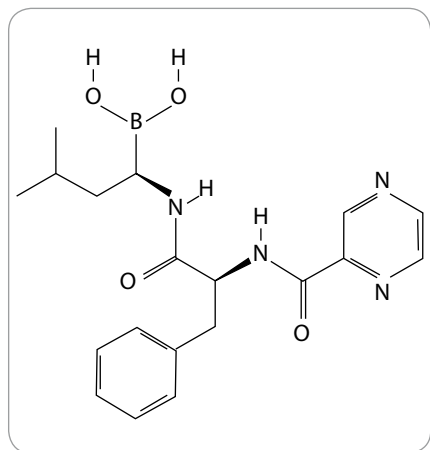
### Mechanismus účinku

Mechanismus inhibice proteazomu bortezomibem spočívá v jeho kovalentní vazbě na  $\beta$ 5 podjednotku, případně LMP7 podjednotku imunoproteazomu. S nižší afinitou se bortezomib váže také na podjednotky  $\beta$ 1 a  $\beta$ 2 [16]. Rozdílnost v afinitě je dána odlišnými interakcemi postranních řetězců inhibitoru s jednotlivými podjednotkami [17].

Vazebná konformace je zaujímana v podobě antiparalelního  $\beta$  skládaného listu, který je stabilizován vodíkovými můstky mezi atomy hlavního řetězce agens a konzervovanými zbytky katalytických míst (Gly47N, Thr21N, Thr21O a Ala49O). Samotná inhibice je zprostředkována farmakoforovou skupinou, v tomto případě zbytkem kyseliny borité. Atom boru zde kovalentně interaguje s nukleofilem, kterým je volný elektronový pár kyslíku Thr1O. Vzniklá elektronová mezera je stabilizována vazbou Gly47N na hydroxyl boru. Tetrahedrická struktura proteolyticky inaktivního produktu je dále zpevněna vazbou druhého hydroxylu na aminoskupinu v katalytickém místě [17]. Vzniklý adukt je charakterizován nízkým stupněm disociace, a proto, i když se jedná o reverzibilní reakci, zůstává po několik hodin prakticky vysoce stabilní.

Jelikož je proteazom zapojen do obrotu intracelulárních proteinů, patří mezi primární důsledky jeho inhibice hromadění nefunkčních proteinů a chyby v signálních drahách, které vyúsťují v narušení adheze myelomových buněk, potlačení novotvorby cév, zastavení buněčného cyklu, omezení odpovědi na poškození DNA a indukci apoptózy [18].

Původní hypotézou hlavního biologického účinku bortezomibu na myelomové buňky byla inhibice transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B, a tím zabránění tran-



Obr. 1. Struktura bortezomibu (The PubChem Project).

skripcie genů, které blokují apoptózu. Hlavní zástupce NF- $\kappa$ B se nachází v cytoplazmě v podobě inaktivního komplexu s vlastním inhibítorem I- $\kappa$ B, jehož degradace proteazomem je klíčem k aktivaci samotného transkripčního faktoru. Model proteazomové inhibice počítal se zastavením degradace I- $\kappa$ B, a tedy konstitutivní inhibicí NF- $\kappa$ B [19]. Ačkoli se tento předpoklad nepotvrdil, existuje ještě alternativní nekanonická dráha aktivace NF- $\kappa$ B, která by eventuálně mohla být bortezomibem blokována [20].

Klíčovou událostí v navození apoptózy myelomových buněk bortezomibem zůstává aktivace iniciačních kaspáz 8 a 9, které předávají apoptotický signál efektorovým kaspázám štěpícím obsah buňky zevnitř. Iniciační kaspázy mohou být aktivovány nejrůznějšími způsoby. U bortezomibem navozené inhibice proteazomu byla pozorována zvýšená aktivita c-Jun N-terminální kinázy (JNK), která souvisí s apoptózou odehrávající se přes Fas receptor. Fas patří do rodiny TNF receptorů, které po navázání ligandu spouštějí proapoptotický signál, který, pokud

není interferován, vyústí v buněčnou smrt. Zablokováním přirozeného obratu intracelulárních proteinů dochází také k disproporcioni apoptotických proteinů rodiny Bcl-2 ve prospěch jejich proapoptotických členů, což vyústí v permeabilizaci vnější mitochondriální membrány a taktéž v aktivaci efektorových kaspáz. Další cestou je aktivace proteinu p53 s výraznými proapoptotickými účinky a jeho následná stabilizace štěpením příslušného ubikvitin-ligačního enzymu MDM2 [21,22].

Dále bortezomib zabraňuje opravám poškozené DNA, indukuje stres endoplazmatického retikula (ER) v buňkách MM, snižuje adhezi nádorových buněk k buňkám kostní dřeně inhibicí signální dráhy MAPK, zabraňuje nádorové angiogenezi a podílí se na apoptóze osteoklastů a diferenciaci osteoblastů [23,24] (obr. 2).

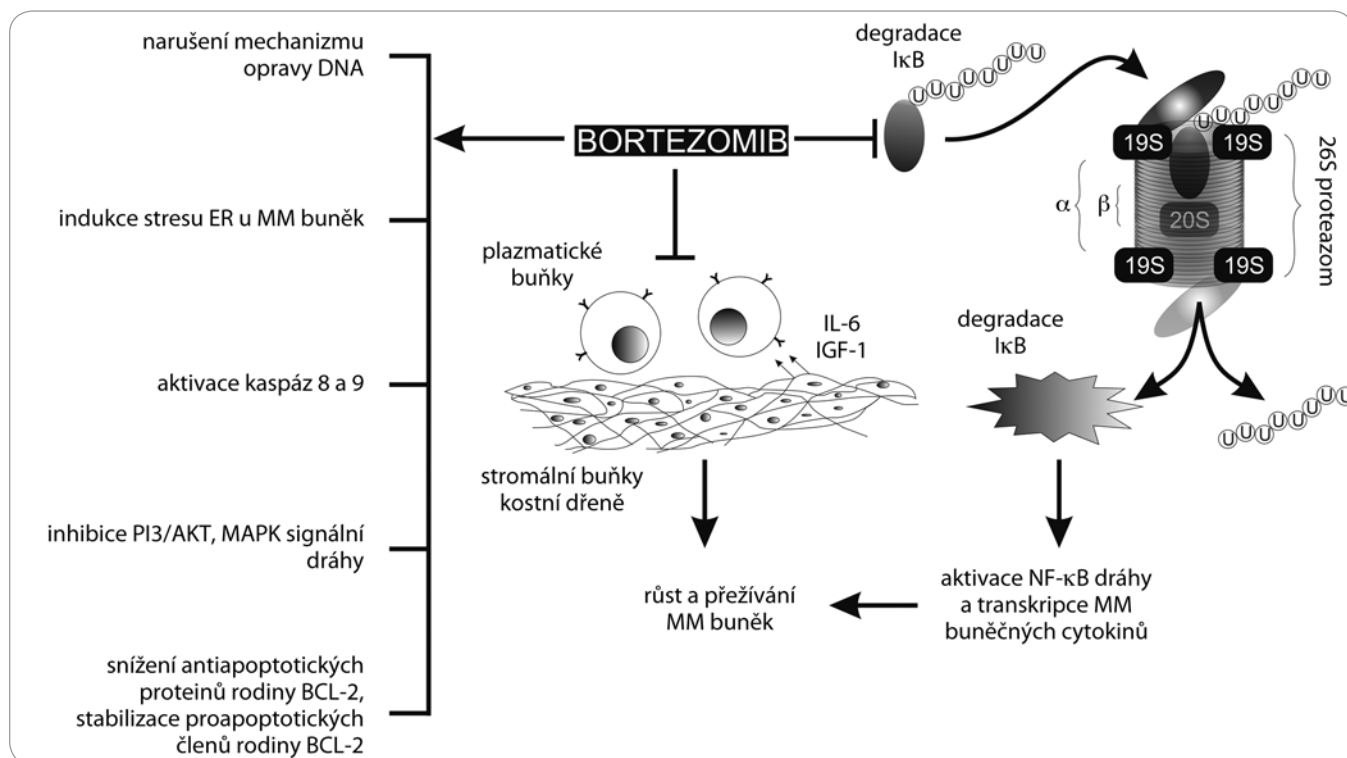
#### Klinické studie

Klinické studie fáze II, SUMMIT a CREST, potvrdily antimyelomový účinek bortezomibu, který byl pozorován ve studiích preklinických fází a v první fázi klinického výzkumu [25,26]. Do studie

SUMMIT bylo zařazeno 202 pacientů, z nichž 193 bylo následně hodnoceno. Léčebně odpovědi dosáhlo 35 % z nich, přičemž kompletní remise byla pozorována v sedmi případech, a to ve velmi krátké době (medián odpovědi 1,3 měsíce). U dalších 24 % pacientů byla pozorována stabilizace nemoci. Navíc, 74 pacientů s nedostatečnou odpovědí na monoterapii bortezomibem dostalo v kombinaci dexametazonu a v 13 případech bylo dosaženo následného zlepšení léčebné odpovědi [25].

Mezinárodní randomizovaná klinická studie fáze III APEX srovnávala účinnost bortezomibu v porovnání s dexametazonem. Do studie bylo zapojeno 669 pacientů s relabujícím MM, z nichž bylo nakonec vyhodnoceno 627. Již při prvních výsledcích bylo zřejmé, že bortezomib je signifikantně mnohem účinnější než dexametazon v léčebné odpovědi (38 % vs 18 %), kompletní remisi (6 % vs < 1 %) i v jednoročním přežití (80 % vs 66 %) [18].

Klinická studie fáze III VISTA byla podkladem pro schválení bortezomibu pro



**Obr. 2. Mechanismus působení bortezomibu.** Bortezomib blokuje proces degradace I $\kappa$ B, která je klíčem k aktivaci NF $\kappa$ B. Dále bortezomib snižuje adhezi plazmatických buněk ke stromálním buňkám kostní dřeně a navozuje apoptózu aktivací kaspáz 8 a 9. Bortezomib v buňce narušuje mechanismus opravy DNA, indukuje apoptózu narušením membrány endoplazmatického retikula, inhibuje MAPK signální dráhy, snižuje hladiny antiapoptotických proteinů a stabilizuje hladiny proapoptotických proteinů.

primoléčbu. Cílem její pozdější analýzy bylo potvrdit, že kombinace bortezomibu s melfalanem a prednisonem zvyšuje celkové přežití nemocných [27].

Minulý rok vyšla studie francouzské skupiny, která porovnávala použití bortezomibu subkutánně (s.c.) proti intravenóznímu podávání (i.v.) s překvapivými výsledky. Ve studii bylo hodnoceno celkem 222 nemocných randomizovaných v poměru 2 : 1 (s.c. : i.v.). Z výsledků studie vyplývá, že všechny sledované parametry související s léčebnou účinností léků byly velmi podobné a nezávislé na použití aplikační cesty. Ale četnost nežádoucích účinků při podkožním podání byla pro určité typy toxicit nejméně o 10 % nižší (gastrointestinální, dýchací potíže a potíže související s mediastinem a hrudníkem, průjem), především však byla nižší četnost výskytu periferní polyneuropatie, která při intravenózním podání bortezomibu znamená závažný problém. Periferní neuropatie stupně 2 a výše byla pozorována u 38 % při podkožním podání oproti 53 % u nemocných s intravenózním podáním. Pro polyneuropatie stupně 3–4 byly poměry rovněž ve prospěch podkožního podání (6 % vs 16 %). Při podkožním podání nelze konstatovat, že by poškození nervů přestalo být problémem, ale jde o významnou redukci četnosti nežádoucího účinku výhradně změnou cesty podání [28]. V EU se přechází na podání bortezomibu jednou týdně, lze tedy očekávat – v kombinaci s podkožním podáním – další redukci četnosti polyneuropatie. Evropská komise EMA již odsouhlasila na základě těchto výsledků možnost podkožního podání bortezomibu v běžné praxi.

#### **Toxicita, rezistence a limity**

Původní hypotéza, že biologické účinky inhibice proteazomu bortezomibem jsou nezávislé na typu buňky s fatálním dopadem pro lidský organizmus, byla vyvrácena. Faktem však zůstává, že působení bortezomibu na ostatní buňky organismu se odráží v podobě relativně vysoké míry nežádoucích účinků. Mezi ty hematologické patří trombocytopenie, kdy s každým podáním bortezomibu dochází k poklesu počtu trombocytů. Dále anémie, dyspeptické poruchy

a zejména periferní neuropatie, které bývají hlavním důvodem pro ukončení léčby [13,15,29]. Periferní neuropatie se vyskytuje s incidencí 35–55 % po podání bortezomibu a je pravděpodobně způsobena účinkem bortezomibu na proteázu HtrA2/Omi – stresem indukovanou proteázu důležitou pro přežití nervových buněk a formaci neuritů [30].

Navzdory vysoké účinnosti bortezomibu disponuje až 60 % pacientů primární rezistencí nebo se u nich v průběhu léčby vyvine rezistence sekundární [25]. Doposud bylo identifikováno několik málo molekulárních mechanismů, pomocí kterých tyto rezistence mohou vznikat. Jedním z nich jsou mutace v propeptidovém lokusu pro  $\beta 5$  podjednotku proteazomu a její nadměrná syntéza [31]. Se zvýšenou rezistencí nádorových buněk také koreluje zvýšená hladina antiapoptotických proteinů rodiny Bcl-2 a proteinů tepelného šoku Hsp 27, 70 a 90 [32,33].

Studie Zhang et al (2011) odhalila, že u buněčných linií rezistentních k bortezomibu zůstala enzymatická aktivita proteazomu inhibovaná i po další léčbě bortezomibem stejně jako u buněčné linie citlivé k tomuto léku. Tyto výsledky naznačují, že mechanismus rezistence se objevuje až později v signalizační kaskádě [34].

V poslední době se navíc ukázalo, že přírodní produkty obsahující vicinální dioly jsou schopné inhibovat účinek bortezomibu vazbou na zbytek kyseliny borité. Mezi tyto produkty patří zelený čaj obsahující epigalokatechin-3-galát a vitamin C [35,36].

#### **Druhá generace inhibitorů proteazomu**

Úspěch bortezomibu vzbudil zájem vědecké obce o proteazomové inhibitory. Optimalizace dávek a kombinace bortezomibu s jinými protinádorovými terapeuty sice omezily jeho vedlejší účinky a částečně potlačily rezistenci, bylo však jasné, že druhá generace inhibitorů proteazomu může přinést daleko lepší výsledky. Carfilzomib, Marizomib a MLN9708 reprezentují druhou generaci IP a nabízejí řadu výhod v podobě zvýšené účinnosti, bezpečnosti lékového

profilu a překonání rezistence k bortezomibu díky své odlišné chemické struktuře, biologickým vlastnostem, mechanismu účinku, i/reverzibilitě inhibice proteazomu a způsobu užívání [37].

#### **Carfilzomib**

**Carfilzomib** (známý též jako PR-171, Kyprolis, Onyx Pharmaceuticals) je tetrapeptidový epoxyketon se sumárním vzorcem C<sub>40</sub>H<sub>57</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> (obr. 3). V preklinických výzkumech byl identifikován jako vysoce potentní IP. Bylo prokázáno, že dokáže navodit apoptózu u bortezomib-naivních i u bortezomibem předléčených myelomových buněk bez zvýšené toxicity a je schopen překonat primární i sekundární rezistenci [38,39]. Ačkoli mechanismus překonání rezistence nebyl doposud zcela objasněn, jedním z možných vysvětlení může být odlišný způsob a typ vazby, který dovoluje obejít důsledky mutací v genech pro proteazomové podjednotky. Jiným vysvětlením může být jeho vyšší selektivita vůči katalytickým podjednotkám imunoproteazomu, jehož význam doposud nebyl dostatečně reflektován [39–41].

V červenci 2012 schválila FDA carfilzomib pro léčbu pacientů s MM, kteří už mají za sebou více než dvě linie léčby včetně bortezomibu a nějakého imunomodulačního léku a u kterých došlo k progresi onemocnění do 60 dnů od ukončení předchozí léčby (www.onyx.com). Předpokládá se, že nejpozději do dvou let od schválení v USA bude lék schválen i pro Českou republiku.

#### **Mechanismus působení**

Inhibice chymotrypsinové podjednotky proteazomu carfilzomibem je z mechanického hlediska ireverzibilní reakcí snižující aktivitu proteazomu na méně než 20 %. Znovunastolení proteazomové aktivity v buňce je možné pouze nasyntetizováním jednotlivých podjednotek a jejich sestavením do nových proteazomů [38].

Carfilzomib se primárně navazuje na  $\beta 5$  katalytickou podjednotku proteazomu a LMP7 podjednotku imunoproteazomu s vyšší selektivitou než bortezomib [7]. Navázáním epoxybutanového farmakoforu, který vykazuje vysokou specifitu vůči hydroxylové a především

aminové skupině N-terminálního Thr1, vzniká šestičlenný morfolinový kruh. Tato intermolekulární cyklizace probíhá dvoustupňovým mechanismem, kdy tedy kyslík hydroxylové skupiny Thr1 nukleofilně atakuje uhlík epoxyketonu za vzniku hemiacetalu. Druhým krokem je nukleofilní atak  $\alpha$ -amino dusíku Thr1 na C2 uhlík epoxidového kruhu, což má za následek vytvoření morfolinového aduktu [42,43].

V buňkách MM vystavených působení carfilzomibu byla pozorována indukce vnější i vnitřní apoptotické kaskády s výrazným zvýšením hladiny kaspázy 3, 7, 8 a 9. Programovaná buněčná smrt byla asociována s aktivací JNK, depolarizací mitochondriální membrány, vylištěním cytochromu c, počátečním poklesem fosforylovaného eIF2 v souvislosti se stresem endoplazmatického retikula navozeným akumulací nefunkčních proteinů a zvýšením hladiny proapoptického proteinu Noxa, který je členem rodiny proteinů Bcl-2 [7,38].

#### Klinické studie

První klinická studie s carfilzomibem pro léčbu hematologických malignit byla zahájena v září 2005. Studie 29 pacientů prokázala snášenlivost a klinickou aktivitu terapeutika. Objektívni léčebné odpovědi bylo dosaženo u dvou z deseti pacientů s MM [44]. Pokračováním fáze I bylo vyhodnocení bezpečnosti a účinnosti carfilzomibu v kombinaci s lenalidomidem a dexametazonem, standardními léky pro pacienty s relabujícím myelomem. Ačkoli se jedná teprve o první zhodnocení studie, Niesvizky et al (2009) zaznamenali klinický přínos v 78 % případů [45]. U šesti pacientů došlo ke kompletní remisi a nebyly pozorovány závažné vedlejší účinky. Výsledky by měly být potvrzeny v rámci fáze III začínající klinické studie ASPIRE. Nedávno byly publikovány výsledky otevřené multicentrické studie fáze II s carfilzomibem v monoterapii pro relabující/refraktérní myelom. Do studie bylo zařazeno 129 pacientů, z nichž 47,6 % dosáhlo léčebné odpovědi. Ve třech případech došlo ke kompletní remisi [46].

V klinické studii fáze I/II u nově diagnostikovaných pacientů s MM léčených kombinací carfilzomibu, lenalidomidu

a nízko dávkovaného dexametazonu dosáhlo 62 % pacientů téměř kompletní remise [47]. Odpověď na léčbu se zlepšovala v průběhu času a tento léčebný režim byl vyhodnocen jako vysoce účinný a dobře tolerovatelný.

Toxický profil carfilzomibu není zdaleka tak bohatý jako u bortezomibu. Periferní neuropatie byly pozorovány u relativně nízkého procenta pacientů a nejčastějšími vedlejšími účinky byly únava, anémie, trombocytopenie a nauzea [46].

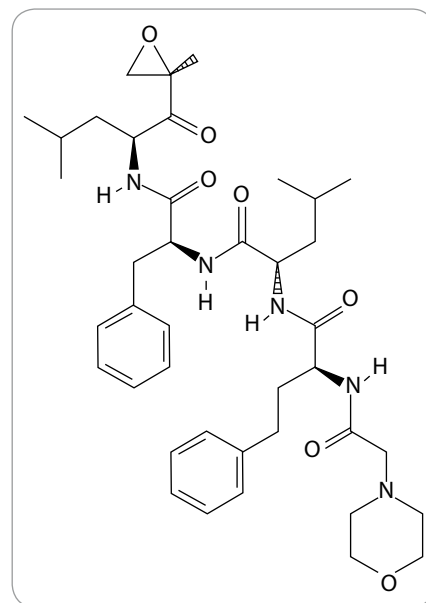
#### Marizomib

**Marizomib**, známý také jako NPI-0052 nebo Salinosporamid A, je prvním přírodním proteazomovým inhibítorem, který byl zařazen do klinického výzkumu MM. Jedná se o produkt obligátní mořské bakterie, aktinomycety *Salinispora tropica* [48]. Po chemické stránce je marizomib bicyklo  $\gamma$ -laktam- $\beta$ -lakton se sumárním vzorcem  $C_{15}H_{20}ClNO_4$  (obr. 4). Na rozdíl od předešlých IP ve své struktuře neobsahuje peptidový řetězec. V preklinických výzkumech s buněčnými liniemi MM bylo prokázáno překonání rezistence na konvenční terapie a léčbu bortezomibem spolu s vyšší účinností. Kombinace bortezomibu s marizomibem by mohla umožnit používat takovou koncentraci jednotlivých léků, která nepůsobí na pacienty toxicky a zlepšuje společný antimyelomový účinek jednotlivých léků [49].

#### Mechanismus působení

Marizomib se přednostně navazuje do  $\beta 5$  a  $\beta 1$  katalytického místa proteazomu a s nižší afinitou také na  $\beta 2$  podjednotku. Za ireverzibilnost vazby zodpovídá chloretylová skupina substituující  $\beta$ -lakton. Skupina se navazuje do S2 vazebné kapsy aktivního místa a chlor se chová jako odstupující atom, čímž umožní vytvořit stabilní komplex konečného produktu po acylaci Thr10  $\beta$ -laktanem inhibítorem [49].

Na rozdíl od bortezomibu, který aktivuje kaspázu 8 i 9, je apoptotický účinek marizomibu zprostředkován především kaspázou 8, v menší míře pak kaspázou 9, ale s odlišným mechanismem aktivace než u bortezomibu, čímž překonává rezistenci myelomových buněk s mu-

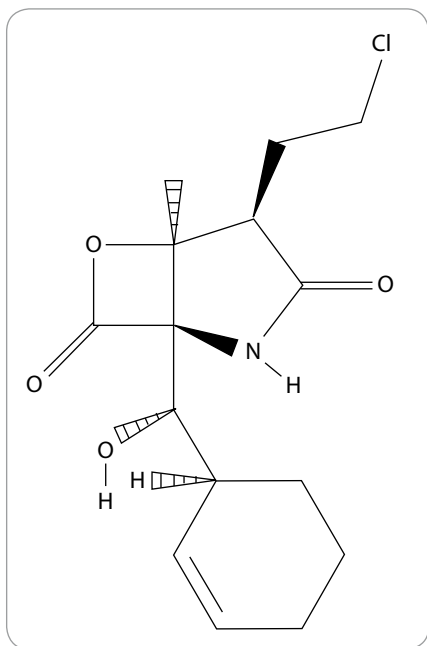


Obr. 3. Struktura carfilzomibu (The PubChem Project).

tacemi v genech pro proteiny rodiny Bcl-2. Dochází tedy k uvolnění cytochromu c a proteinu Smac z mitochondrií do cytosolu, generaci kyslíkových radikálů a aktivaci výše zmíněných kaspáz. Studie Chauhana et al (2005) prokázala, že marizomib je schopen indukovat apoptózu u myelomových buněk dokonce i v přítomnosti myelomových růstových faktorů, IL-6 a IGF-1 [32]. Navíc se podílí na zablokování sekrece IL-6 stromálními buňkami kostní dřeně, aniž by došlo k ovlivnění jejich životaschopnosti. Marizomib významně blokuje migraci buněk MM indukovanou VEGF, a potvrzuje tak i své antiangiogenní účinky. U marizomibu byla pozorována jako u jednoho z mála IP i inhibice kanonické NF- $\kappa$ B dráhy a následné sekrece cytokinů [33].

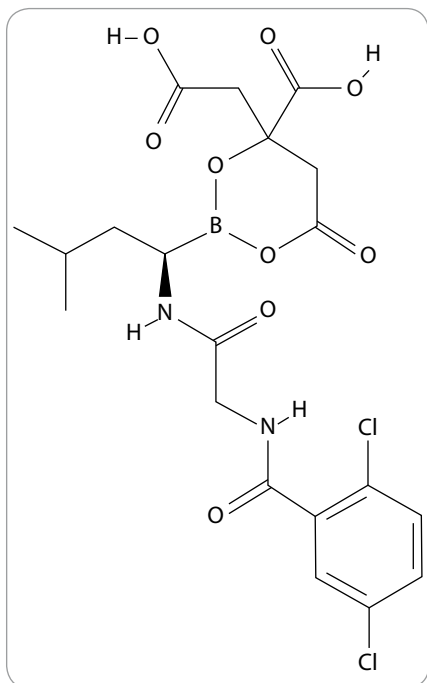
#### Klinické studie

V současné době se marizomib nachází v doposud nevyhodnocené I. fázi klinické studie [50]. Další klinické studie I právě nabírají pacienti. Jedná se o studii pacientů s relabujícím nebo refraktérním myelomem léčených marizomibem (NPI-0052-101) a studii pacientů trpících některou z pokročilých malignit (NPI-0052-102). Mezi zatím nejčastěji pozorované nepříznivé účinky tohoto léku patří únava, nespavost, ne-



Obr. 4. Struktura marizomibu (The PubChem Project).

volnost, průjem, zácpa, bolesti hlavy, halucinace, změny v kognitivních funkcích, ztráta rovnováhy nebo horečky. Významný výskyt periferní neuropatie však nebyl pozorován. Tato data naznačují, že marizomib by mohl být bezpečným lékem bez zkřížené rezistence s ostat-



Obr. 5. Struktura MLN9708/MLN2238 (The PubChem Project).

ními IP a aktivním u pacientů refrakterních k bortezomibu [51,52].

#### MLN9708

MLN9708 je analog kyseliny borité a první orálně podávaný IP druhé generace, který v preklinických studiích prokázal větší potenciál účinku proti buňkám MM *in vivo* než bortezomib [53]. Jde o reverzibilní typ IP, který ve vodných roztocích či plazmě okamžitě hydrolyzuje na MLN2238, jeho biologicky aktivní formu (obr. 5) [54]. Je tedy schopen rozsáhlejší distribuce do krve ve stabilní formě a má vyšší farmakodynamický účinek v tkáních [51].

#### Mechanismus působení

MLN9708 (MLN2238), stejně jako bortezomib, inhibuje především chymotrypsinovou proteolytickou ( $\beta 5$ ) podjednotku 20S proteazomu. Navíc je schopen ve vyšších koncentracích inhibovat kaspázovou ( $\beta 1$ ) a trypsinovou ( $\beta 2$ ) proteolytickou podjednotku a indukovat akumulaci ubikvitinovaných proteinů [53,55]. K rozpadu 20S podjednotky proteazomu po léčbě MLN9708 dochází šestkrát rychleji než po léčbě bortezomibem.

MLN9708 je zodpovědný za kaspázově dependentní indukci apoptózy myelomových buněk. Po podání dochází k aktivaci kaspáz 8, 9 a 3; dále k navýšení hladiny proteinů p53, p21, NOXA, PUMA, E2F a naopak ke snížení hladiny cyklinu D1 a CDK6. Léčba pomocí MLN9708 vedla také k indukci exprese Bip a CHOP, proteinů stresové odpovědi ER a k účinné inhibici kanonické i nekanonické dráhy NF- $\kappa$ B ovlivňující tak sekreci cytokinů důležitých pro růst a přežívání myelomových buněk stromálními buňkami kostní dřeně. Takto jsou narušeny cytoprotektivní účinky mikroprostředí kostní dřeně. Chauhan et al (2011) dále pozorovali snížení počtu buněk nesoucích VEGFR2 a PECAM, což naznačuje inhibici nádorem indukované angiogeneze [53].

Lee et al (2011) ve své studii na myších modelech prokázali, že na rozdíl od bortezomibu, MLN9708 pravděpodobně také zmírňuje osteolýzu kostí, nejčastější příznak MM [54]. Profilování miRNA v buňkách MM léčených MLN9708 prokázalo zvýšenou expresi miR-33b. Zvý-

šená exprese této miRNA je asociovaná se sníženou schopností migrace a životaschopností buněk MM stejně jako se zvýšenou apoptózou a citlivostí myelomových buněk k léčbě MLN9708. Navíc zvýšená exprese miR-33b vede k negativní regulaci onkogenu PIM-1. Ve studii Tiana et al (2012) bylo tedy naznačeno, že miR-33b funguje jako nádorový supresor, který se podílí na apoptóze myelomových buněk vyvolané léčbou MLN9708, což vede k inhibici růstu nádoru a prodloužení přežití lidských myelomových xenoimplantátových modelů [56].

#### Klinické studie

V současné době hodnotí několik klinických studií fáze I bezpečnost MLN9708 u různých populací pacientů léčených různými dávkami tohoto léku. Dvě probíhající studie (C16004 a C16003) hodnotí účinek MLN9708 v monoterapii u pacientů s relabujícím či refrakterním myelomem, kteří byli dříve léčeni některým z IP. Mezi nejčastější nepříznivé účinky léčby MLN9708 patří únava, trombocytopenie, nevolnost, průjemy, zvracení a méně často neutropenie. Je však důležité, že po léčbě MLN9708 trpí pouze 10 % pacientů periferní neuropatií.

Dále probíhají studie účinnosti tohoto léku v různých kombinacích u nově diagnostikovaných pacientů. Jde např. o studii účinku MLN9708 v kombinaci s melfalanem a prednisonem (C16006) a v kombinaci s lenalidomidem a nízkými dávkami dexametazonu (C16005 a C16008) [46]. Bylo rovněž zjištěno, že MLN9708 v kombinaci s lenalidomidem vykazuje synergistickou antimyelomovou aktivitu a tato kombinace léků má potenciál pro klinické studie, neboť jde o vysoce účinný perorální léčebný režim bez známek periferní neuropatie [53].

#### Budoucnost inhibitorů proteazomu

Doposud byly identifikovány čtyři významné mediátory přímé antimyelomové aktivity IP, a to transkripční faktor NF- $\kappa$ B, pro- a antiapoptické faktory, protein p53 a proteiny stresové odpovědi ER. Účinek IP by však měl být chápán jako komplexní děj zahrnující na mnoha místech všechny tyto hlavní mechanismy,

neboť ani samotná inhibice NF- $\kappa$ B ani samotná mutace zajišťující inaktivitu proteinu p53 nezastaví apoptózu myelomových buněk indukovanou IP. Identifikace podrobných mechanizmů působení IP má velký potenciál pro odhalení možných molekulárních cílů pro budoucí léčiva. Příkladem mohou být dnes známé specifické deubikvitinační enzymy, které mohou zastavit degradaci určitých molekul bez nutné inhibice proteazomu.

Na otázku, jak zajistit vyšší selektivitu, účinnost a výrazně omezit vedlejší účinky dnešních IP, mohou nabídnout odpovědi specifické inhibitory imunoproteazomu.

S ohledem na heterogenní podstatu MM lze do budoucna počítat se zavedením genetického screeningu jednotlivých genových sad kódujících klíčové molekuly, na jehož základě by byla zahájena optimální léčba s predikcí stupně účinnosti IP u jednotlivých nemocných.

## Závěr

Důležitou a vysoce efektivní strategií při hledání léčebných přístupů k MM je poznání důležité role, kterou v léčbě tohoto heterogenního onemocnění hraje inhibice proteazomu bortezomibem. Toto poznání vedlo k vývoji IP druhé generace, které se liší ve svých chemických strukturách (boronáty, epoxyketony, salinosporamidy), účinnosti a toxických profilech, a poskytují tak nové možnosti pacientům, kteří se stali rezistentními k bortezomibu. Hlavní cesta dalšího výzkumu ve vývoji nových léčiv by se tedy měla ubírat směrem lepšího porozumění mechanismům účinku IP a především mechanismu, kterým buňky získávají rezistenci k těmto lékům.

## Literatura

- Harris JR. The proteins released from intact erythrocyte ghosts' at low ionic strength. *Biochem J* 1971; 122(5): 38P–40P.
- Ciechanover A, Hod Y, Hershko A. A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1978; 81(4): 1100–1105.
- Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J* 1998; 17(24): 7151–7160.
- Unno M, Mizushima T, Morimoto Y et al. The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. *Structure* 2002; 10(5): 609–618.
- Jäger S, Groll M, Huber R et al. Proteasome beta-type subunits: unequal roles of propeptides in core particle maturation and a hierarchy of active site function. *J Mol Biol* 1999; 291(4): 997–1013.
- Arendt CS, Hochstrasser M. Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(14): 7156–7161.
- Parlati F, Lee S, Aujay M et al. Carfilzomib can induce tumor cell death through selective inhibition of the chymotrypsin-like activity of the proteasome. *Blood* 2009; 114(16): 3439–3447.
- Carvalho P, Goder V, Rapoport TA. Distinct Ubiquitin-Ligase Complexes Define Convergent Pathways for the Degradation of ER Proteins. *Cell* 2006; 126(2): 361–373.
- Luciani F, Keşmir C, Mishto M et al. A mathematical model of protein degradation by the proteasome. *Biophys J* 2005; 88(4): 2422–2432.
- Adam Z, Ščudla V, Neubauer J. Mnohočetný myelom. In: Adam Z, Vorlíček J, Adamová Z et al. *Hematologie II: Přehled maligních hematologických nemocí*. Praha: Grada 2001: 461–498.
- Goldberg AL. Introduction to the proteasome and its inhibitors. In: Adams J. *Proteasome inhibitors in cancer therapy*. New Jersey: Humana Press 2004: 17–39.
- Adams J, Palombella VJ, Sausville EA et al. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res* 1999; 59(11): 2615–2622.
- Orlowski RZ, Stinchcombe TE, Mitchell BS et al. Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 2002; 20(22): 4420–4427.
- Kane RC, Bross PF, Farrell AT et al. Velcade: U.S. FDA approval for the treatment of multiple myeloma progressing on prior therapy. *Oncologist* 2003; 8(6): 508–513.
- Špička I, Kleibl Z, Hájek R. Bortezomibum. *Remedia* 2005; 15(3): 193–203.
- Berkers CR, Verdoes M, Lichtman E et al. Activity probe for in vivo profiling of the specificity of proteasome inhibitor bortezomib. *Nat Methods* 2005; 2(5): 357–362.
- Groll M, Berkers CR, Ploegh HL et al. Crystal structure of the boronic acid-based proteasome inhibitor bortezomib in complex with the yeast 20S proteasome. *Structure* 2006; 14(3): 451–456.
- Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW et al. Assessment of Proteasome Inhibition for Extending Remissions (APEX) Investigators. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med* 2005; 352(24): 2487–2498.
- Hideshima T, Chauhan D, Richardson P et al. NF- $\kappa$ B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J Biol Chem* 2002; 277(19): 16639–16647.
- Hideshima T, Ikeda H, Chauhan D et al. Bortezomib induces canonical nuclear factor- $\kappa$ B activation in multiple myeloma cells. *Blood* 2009; 114(5): 1046–1052.
- Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V et al. Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(22): 14374–14379.
- Hideshima T, Mitsiades C, Akiyama M et al. Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341. *Blood* 2003; 101(4): 1530–1534.
- Hideshima T, Richardson P, Chauhan D et al. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res* 2001; 61(7): 3071–3076.
- Mukherjee S, Raju N, Schoonmaker JA et al. Pharmacologic targeting of a stem/progenitor population in vivo is associated with enhanced bone regeneration in mice. *J Clin Invest* 2008; 118(2): 491–504.
- Richardson PG, Barlogie B, Berenson J et al. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med* 2003; 348(26): 2609–2617.
- Jagannath S, Barlogie B, Berenson J et al. A phase 2 study of two doses of bortezomib in relapsed or refractory myeloma. *Br J Haematol* 2004; 127(2): 165–172.
- Mateos MV, Richardson PG, Schlag R et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone compared with melphalan and prednisone in previously untreated multiple myeloma: updated follow-up and impact of subsequent therapy in the phase III VISTA trial. *J Clin Oncol* 2010; 28(13): 2259–2266.
- Moreau P, Pylypenko H, Grosicki S et al. Subcutaneous versus intravenous administration of bortezomib in patients with relapsed multiple myeloma: a randomised, phase 3, non-inferiority study. *Lancet Oncol* 2011; 12(5): 431–440.
- Hájek R, Adam Z, Maisnar V et al. Diagnostika a léčba mnohočetného myelomu. *Transfuzie Hematol dnes* 2012; 18 (Suppl 1): 1–80.
- Arastu-Kapur S, Anderl JL, Kraus M et al. Nonproteasomal targets of the proteasome inhibitors bortezomib and carfilzomib: a link to clinical adverse events. *Clin Cancer Res* 2011; 17(9): 2734–2743.
- Oerlemans R, Franke NE, Assaraf YG et al. Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit beta5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood* 2008; 112(6): 2489–2499.
- Smith AJ, Dai H, Correia C et al. Noxa/Bcl-2 protein interactions contribute to bortezomib resistance in human lymphoid cells. *J Biol Chem* 2011; 286(20): 17682–17692.
- Chauhan D, Catley L, Li G et al. A novel orally active proteasome inhibitor induces apoptosis in multiple myeloma cells with mechanisms distinct from Bortezomib. *Cancer Cell* 2005; 8(5): 407–419.
- Zhang L, Littlejohn JE, Cui Y et al. Characterization of bortezomib-adapted I-45 mesothelioma cells. *Mol Cancer* 2010; 9: 110.
- Zou W, Yue P, Lin N et al. Vitamin C inactivates the proteasome inhibitor PS-341 in human cancer cells. *Clin Cancer Res* 2006; 12(1): 273–280.
- Golden EB, Lam PY, Kardosh A et al. Green tea polyphenols block the anticancer effects of bortezomib and other boronic acid-based proteasome inhibitors. *Blood* 2009; 113(23): 5927–5937.
- Lonial S, Boise LH. Current Advances in Novel Proteasome Inhibitor-Based Approaches to the Treatment of Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. *Oncology* 2011; 25(2).
- Kuhn DJ, Chen Q, Voorhees PM et al. Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. *Blood* 2007; 110(9): 3281–3290.
- Demo SD, Kirk CJ, Aujay MA et al. Antitumor activity of PR-171, a novel irreversible inhibitor of the proteasome. *Cancer Res* 2007; 67(13): 6383–6391.
- Suzuki E, Demo S, Arastu-Kapur S et al. Bortezomib resistant cell lines have increased proteasome levels but remain sensitive to carfilzomib. *Blood* 2009; 114: Abstr 2852.
- Wang L, Kumar S, Fridley B et al. Proteasome beta subunit pharmacogenomics: gene resequencing and functional genomics. *Clin Cancer Res* 2008; 14(11): 3503–3513.
- Kisselev AF, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol* 2001; 8(8): 739–758.
- Ruschak AM, Slassi M, Kay LE et al. Novel proteasome inhibitors to overcome bortezomib resistance. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103(13): 1007–1017.
- O'Connor OA, Stewart AK, Vallone M et al. A phase 1 dose escalation study of the safety and pharmacokinetics of the novel proteasome inhibitor carfilzomib (PR-171) in patients with hematologic malignancies. *Clin Cancer Res* 2009; 15(22): 7085–7091.
- Niesvizky R, Bensinger W, Vallone M et al. PX-171-006: Phase Ib multicenter dose escalation study of carfilzomib (CFZ) plus lenalidomide (LEN) and low-dose dexamethasone (loDex) in relapsed and refractory multiple myeloma (MM): Preliminary results (Abstract). *J Clin Oncol* 2009; 27 (15 Suppl); Abstr 8541.

46. Vij R, Wang M, Kaufman JL et al. An open-label, single-arm, phase 2 (PX-171-004) study of single-agent carfilzomib in bortezomib-naive patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma. *Blood* 2012; 119(24): 5661–5670.
47. Jakubowiak AJ, Dytfeld D, Griffith KA et al. A phase 1/2 study of carfilzomib in combination with lenalidomide and low-dose dexamethasone as a frontline treatment for multiple myeloma. *Blood* 2012; 120(9): 1801–1089.
48. Fenical W, Jensen PR. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nat Chem Biol* 2006; 2(12): 666–673.
49. Miller CP, Manton CA, Hale R et al. Specific and prolonged proteasome inhibition dictates apoptosis induction by marizomib and its analogs. *Chem Biol Int* 2011; 194(1): 58–68.
50. Hofmeister CC, Richardson P, Zimmerman T et al. Clinical trial of the novel structure proteasome inhibitor NPI-0052 in patients with relapsed and relapsed/refractory multiple myeloma (r/r MM). *J Clin Oncol* 2009; 27 (15 Suppl): Abstr 8505.
51. Ocio EM, Mateos MV, San-Miguel JF. Novel agents derived from the currently approved treatments for MM: novel proteasome inhibitors and novel IMiDs. *Expert Opin Investig Drugs* 2012; 21(8): 1075–1087.
52. Moreau P. The future of therapy for relapsed/refractory multiple myeloma: emerging agents and novel treatment strategies. *Semin Hematol* 2012; 49 (Suppl 1): S33–S46.
53. Chauhan D, Tian Z, Zhou B et al. In vitro and in vivo selective antitumor activity of a novel orally bioavailable proteasome inhibitor MLN9708 against multiple myeloma cells. *Clin Cancer Res* 2011; 17(16): 5311–5321.
54. Lee EC, Fitzgerald M, Bannerman B et al. Antitumor activity of the investigational proteasome inhibitor MLN9708 in mouse models of B-cell and plasma cell malignancies. *Clin Cancer Res* 2011; 17(23): 7313–7323.
55. Kupperman E, Lee EC, Cao Y et al. Evaluation of the proteasome inhibitor MLN9708 in preclinical models of human cancer. *Cancer Res* 2010; 70(5): 1970–1980.
56. Tian Z, Zhao JJ, Tai YT et al. Investigational agent MLN9708/2238 targets tumor suppressor microRNA-33b in MM cells. *Blood* 2012; 120(19): 3958–3967.