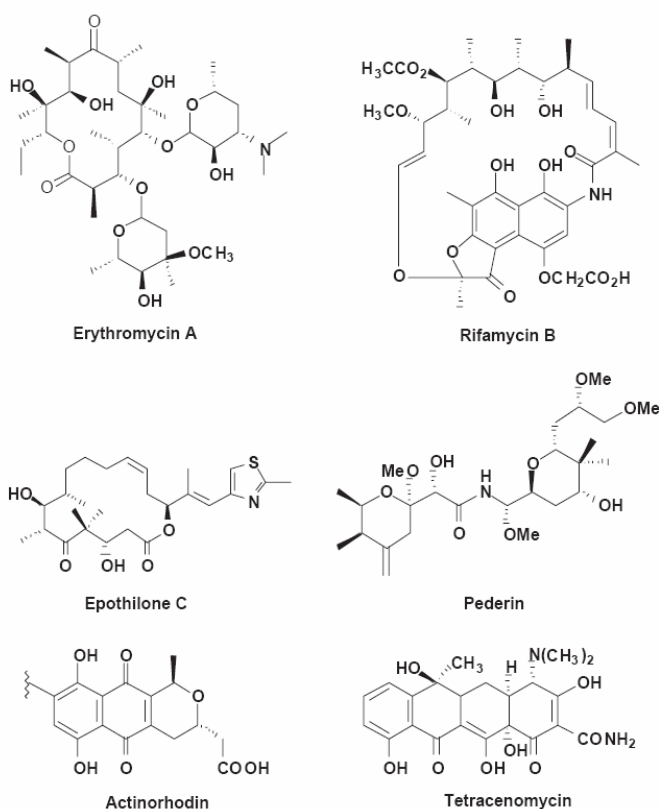


Epotilony – poliketydowe leki antynowotworowe

Wprowadzenie: poliketydy jako leki

Poliketydy są naturalnymi związkami odgrywającymi ważną rolę w leczenia różnego rodzaju zaburzeń fizjologicznych.

Związki poliketydowe wykazują silne właściwości antybakteryjne (erytromycyna, rifamycyna, tetracykliny), antygrzybicze (amfoterycyna B), immunosupresyjne (FK506, rapamycyna) oraz antynowotworowe (doksorubicyna, epotilon, geldanamycyna). Mogą także obniżać poziom cholesterolu we krwi (lowastatyna) (rys. 1) [1].



Rys.1. Przykłady poliketydów. Erytromycyna A oraz rifamycyna B są poliketydami typu I. Epotilon C i pederin to „mieszanka” poliketydów typu I i nie rybosomalnych peptydów. Actinorhodin i tetracenomycin są poliketydami typu II [1].

Poliketydy są również szeroko stosowane w weterynarii i rolnictwie. Aktualne technologie syntezy substancji chemicznych nie pozwalają na wytwarzanie handlowych ilości większości poliketydów. Skutkuje to potrzebą wykorzystania ich naturalnych źródeł oraz wykorzystaniem mikroorganizmów (zwykle bakterie i grzyby) w procesie biokatalizy. Niemniej jednak intensywny rozwój w dziedzinie klonowania i sekwencjonowania genów odpowiedzialnych za produkcję poliketydów oraz wzrost wiedzy o katalitycznych mechanizmach rządzących biosyntezą tych związków zaowocował możliwością heterologicznego ekspresjonowania genów odpowiedzialnych za syntezę poliketydów (Tabela nr 1) [1].

Tabela nr 1 [1].

Examples of polyketide produced in heterologous hosts

Compound	Heterologous host	Reference
Actinorhodin	<i>Streptomyces coelicolor</i>	McDaniel et al. (1993)
Tetracenomycin	<i>S. coelicolor</i>	McDaniel et al. (1993)
Frenolicin	<i>S. coelicolor</i>	McDaniel et al. (1993)
Oxytetracycline	<i>S. coelicolor</i>	Fu et al. (1994)
Erythromycin	<i>S. coelicolor</i>	Kao et al. (1994)
6-Methylsalicylic acid	<i>Escherichia coli</i>	Pfeifer et al. (2001)
	<i>S. coelicolor</i>	Bedford et al. (1995)
	<i>Escherichia coli</i>	Kealey et al. (1998)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Kealey et al. (1998)
Picromycin/methymycin	<i>Streptomyces lividans</i>	Tang et al. (1999)
R1128	<i>S. coelicolor</i>	Marti et al. (2000)
Oleandomycin	<i>S. lividans</i>	Shah et al. (2000)
Megalomicin	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Volchegursky et al. (2000)
Epothilone	<i>S. coelicolor</i>	Tang et al. (1999)
	<i>Myxococcus xanthus</i>	Arslanian et al. (2002)
	<i>E. coli</i>	Boddy et al. (2004)
Macrotetrolide	<i>S. lividans</i>	Kwon et al. (2001)
Yersiniabactin	<i>E. coli</i>	Pfeifer et al. (2003)
P8/1-OG	<i>E. coli</i>	Watanabe et al. (2003)
Medermycin	<i>S. coelicolor</i>	Ichinose et al. (2003)
Landomycin	<i>Streptomyces fradiae</i>	Von Mulert et al. (2004)
Wailupemycin	<i>S. lividans</i>	Hertweck et al. (2004)

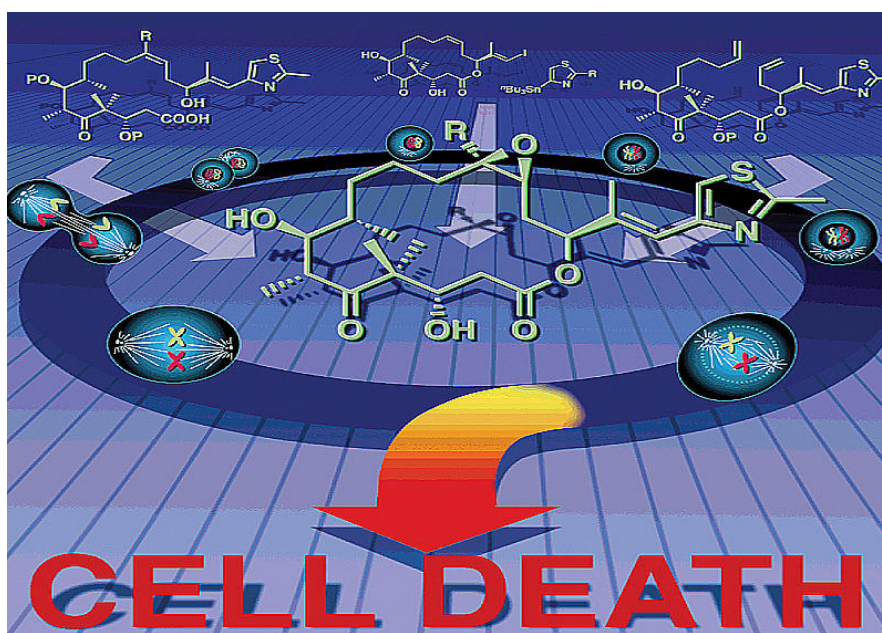
Epothilony (*ang. epothilones*)

Inhibitory mikrotubul reprezentują ważną klasę leków antynowotworowych. Odkrycie ich oraz wprowadzanie do klinicznej praktyki np. Taksol (paklitaksel) było przypuszczalnie jednym z najważniejszych wydarzeń w ciągu ostatnich kilku dekad, jakie się dokonało w chemioterapii nowotworów.

Od odkrycia w 1980 roku, że paklitaksel zabuża proces depolimeryzacji mikrotubul, przez ponad dekadę był to jedyny znany inhibitor depolimeryzacji [2]. Dopiero na początku lat 90-tych ubiegłego wieku zespół Reichenbach'a z Niemiec odkrył drugą klasę cytotoxyków pochodzenia naturalnego. W 1995 roku grupa Merck Research Laboratories przedstawiła związki posiadające

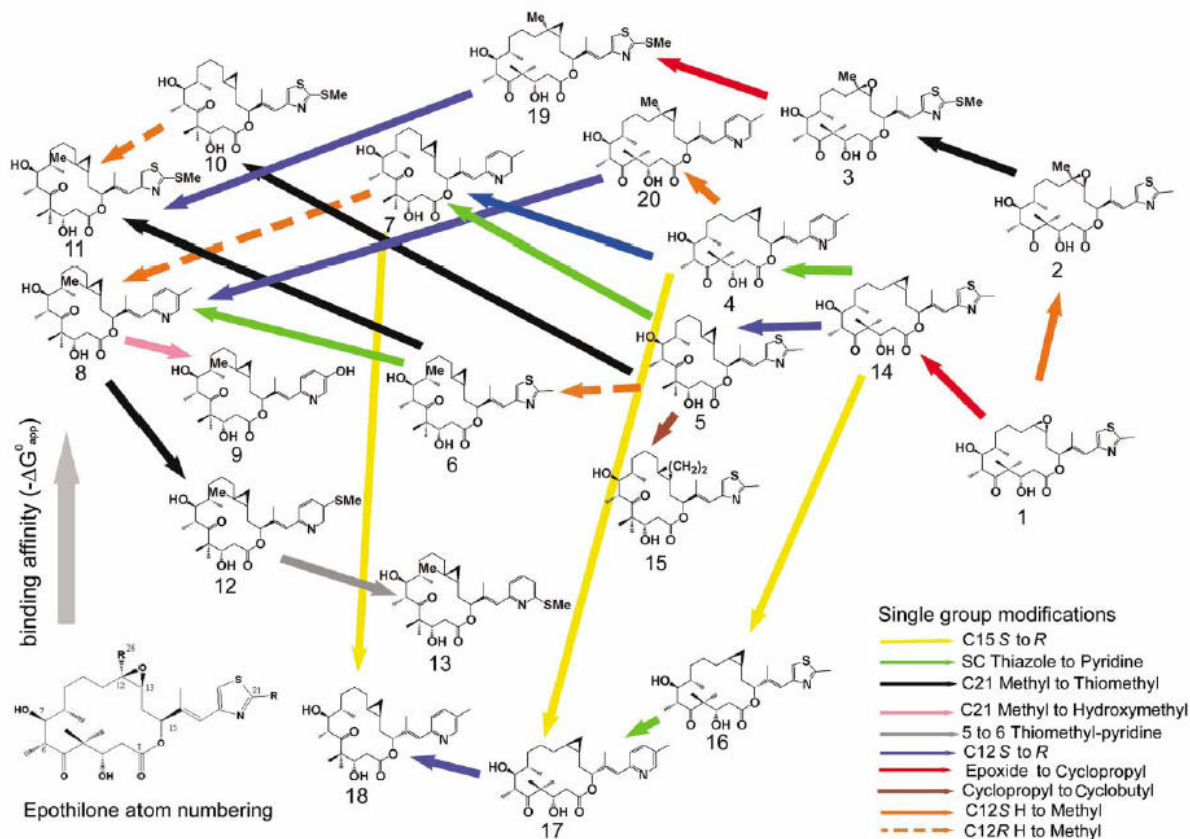
mechanizm działania podobny do paklitakselu. Przedstawione komponenty zostały określone przez Reichenbach'a wspólnym terminem „epotilony”.

Epotilony, to wtórne metabolity syntetyzowane przez miksobakterie. Zostały odkryte po raz pierwszy, podczas badań przesiewowych wtórnych metabolitów na wybiórczą aktywność przeciwgrzybiczą skierowaną na *Mucor hiemalis*. Dwa metabolity wtórne, epotilon A oraz epotilon B zostały odkryte przez zespół Reichenbacha u miksobakterii *Sorangium cellulosum* (Rys. 2) [3, 4].



Rys. 2. Ogólny schemat budowy i działania epotilonów. Epotilon A (R=H) i epotilon B (R=CH₃) [5].

Badania biologiczne wykazały, że epotilony stabilizują mikrotubule na tej samej drodze, co paklitaksel, ale z nieco niższą wydajnością. Epotilony wiążą się również z tym samym miejscem na polimerze tubuliny, co paklitaksel [6]. Cząsteczka epotilonu B charakteryzuje się mniejszą wrażliwością na działanie glikoproteiny-P (P-gp, ABCB1, P-170) w porównaniu z paklitakselem. Glikoproteina-P jest jednym z głównych białek zaangażowanych w mechanizmy oporności wielolekowej (MDR, *multidrug-resistance*) [7]. Obecnie badane są, oprócz epotilonu A i B, również ich liczne modyfikacje chemiczne, szczególnie pod kątem siły wiązania z polimerem tubuliny (Rys.3) [8].



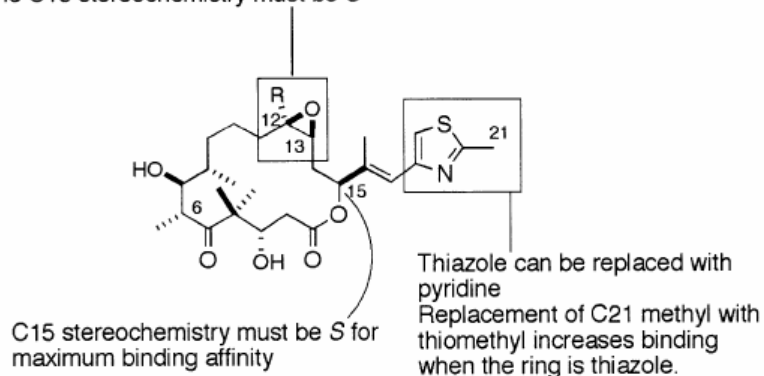
Rys. 3. Schemat przedstawia struktury chemiczne analogów epotilonu badanych pod kątem wpływu modyfikacji chemicznych na ich energię swobodną wiązania z mikrotubulami (w temp. 35°C) [8].

Badania te potwierdzają wcześniejsze obserwacje dotyczące zmiennego powinowactwa różnorodnych stereoizomerów epotilonów do mikrotubul. Na przykład, stereochemia S przy atomie C13 i C15 jest ważna dla zwiększenia powinowactwa wiązania epotilonów do polimeru tubuliny, podczas gdy stereochemia przy atomie C12 może pozostawać R lub S.

Dodatkowo zastąpienie epoksydu pierścieniem cyklopropanonu wzmacnia również powinowactwo wiązania ligandu do polimeru. Podobnie jest w przypadku zamiany grupy metylowej przy atomie C21 na grupę tiometylową (Rys. 4).

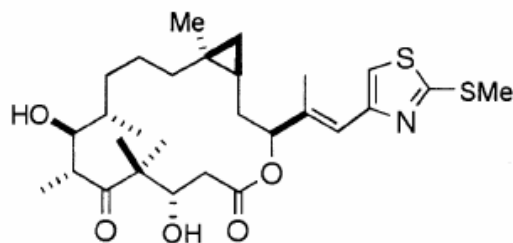
Analogiem o największym powinowactwie do wiązania się z polimerem tubuliny okazała się cząsteczka oznaczona jako „19” (cis-CP-tmt-EpoB) (Rys. 3 i 5). Posiada ona pierścień cyklopropanu oraz grupę tiometylową przy węglu C21. Analog ten wykazuje dwudziestopięciokrotnie większe powinowactwo wiązania się z mikrotubulami niż epotilon B [6].

Replacement of epoxide with a cyclopropyl group increases binding affinity
 Replacement of epoxide with a cyclobutyl group greatly decreases binding affinity
 The C12 stereochemistry can be *R* or *S*
 A methyl group at C12 enhances activity
 The C13 stereochemistry must be *S*



Rys. 4. Wzór analogu epotilonu [6].

Wyżej przedstawione analogi zostały przetestowane pod kątem największej cytotoksyczności w stosunku do komórek linii ludzkiego raka jajnika 1A9. Okazało się, że najskuteczniejszym z całej grupy analogów cytotoksykiem był komponent „19”. Jednak wykazywał on tylko trzykrotnie większą cytotoksyczność w stosunku do badanych komórek raka w porównaniu do epotilonu B (Tabela 2) [6].



Compound 19

Rys. 5. Struktura analogu „19” (cis-CP-tmt-EpoB) [6]

Tabela 2. Porównanie powinowactwa do wiązania ligantu w 37°C. Krytyczna wartość stężenie ligandu wywołującego „składanie” mikrotubul oraz cytotoksyczność epotilonów i paklitakselu w stosunku do linii komórek ludzkiego nowotworu jajnika 1A9 [8].

Compound	Cr μ M	Kel ₂ *1e5 (M ⁻¹)	1/K _{un1} (nM)	IC50 (nM) ^a
Paclitaxel	4.24 ± 0.49	2.35 ± 0.24	93 ± 9 ^b	1.30 ± 0.22
Docetaxel	1.52 ± 0.25	6.58 ± 0.93	32 ± 3	0.45 ± 0.25
Epothilone A [1]	5.11 ± 0.15	2.93 ± 0.44	34 ± 4	3.10 ± 0.72
Epothilone B [2]	1.17 ± 0.12	8.55 ± 0.80	1.6 ± 0.1	0.30 ± 0.05
tmt-EpoB [3]	0.72 ± 0.089	13.89 ± 1.53	0.51 ± 0.07 ^b	0.17 ± 0.08
cis-CP-py-EpoA [4]	1.53 ± 0.10	6.53 ± 0.40	5.2 ± 0.8	1.40 ± 0.45
trans-CP-EpoA [5]	1.27 ± 0.21	7.87 ± 1.11	6.5 ± 0.1	2.70 ± 0.10
trans-CP-EpoB [6]	2.19 ± 0.30	4.57 ± 0.55	8.8 ± 0.4 ^b	15.00 ± 0.00
trans-CP-py-EpoA(7)	1.53 ± 0.10	6.53 ± 0.40	2.1 ± 0.4	0.62 ± 0.17
trans-CP-py-EpoB(8)	1.19 ± 0.21	8.40 ± 1.26	3.5 ± 0.3 ^b	1.70 ± 0.76
trans-CP-pyOH-EpoB(9)	1.70 ± 0.18	5.88 ± 1.26	6.0 ± 0.6	1.70 ± 1.12
trans-CP-tmt-EpoA(10)	1.44 ± 0.12	6.94 ± 0.53	0.71 ± 0.14 ^b	1.20 ± 0.67
trans-CP-tmt-EpoB(11)	1.36 ± 0.21	7.35 ± 0.98	1.8 ± 0.2	3.50 ± 1.64
trans-CP-5tmpy-EpoB(12)	2.54 ± 0.10	3.94 ± 0.15	9.6 ± 1.3 ^b	14.20 ± 5.73
trans-CP-6tmpy-EpoB(13)	9.65 ± 2.46	1.04 ± 0.21	42 ± 7 ^b	114.00 ± 0.00
cis-CP-EpoA(14)	0.93 ± 0.17	10.75 ± 1.66	5.7 ± 0.4	1.60 ± 0.12
trans-CB-EpoA(15)	2.97 ± 0.12	3.36 ± 0.13	32 ± 3	25.5 ± 1.5
cis-(15R)-CP-EpoA(16)	>50	<0.2	~5300	225
cis-(15R)-CP-py-EpoA(17)	>50	<0.2	~170,000	>300 (inactive)
trans-(15R)-CP-py-EpoA [18]	>50	<0.2	~83,000	>300 (inactive)
cis-CP-tmt-EpoB [19]	0.38 ± 0.07	26.3 ± 4.1	0.063 ± 0.006	0.1 ± 0.0
cis-CP-py-EpoB [20]	0.71 ± 0.03	14.1 ± 0.6	1.9 ± 0.1	0.3 ± 0.1

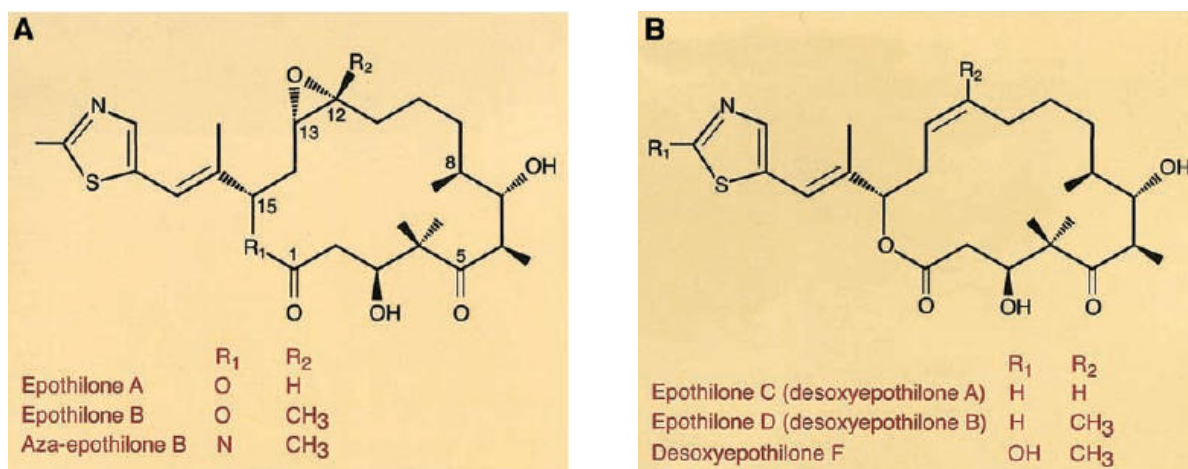
^aData taken from [29–31].

^bThese data differ from those previously published [30] since they have been measured again with higher precision.

Przedkliniczna aktywność antynowotworowa epotilonów

Opublikowane badania trzech epotilonów (epotilon B, azo-epotilon B i dezoksyepotilon B) dowodzą, że związki te wykazują szerokie spektrum działania antynowotworowego na modelach zwierzęcych i hodowlach komórkowych. Ponadto epotilony są generalnie bardziej cytotoksyczne niż paklitaksel. Podczas badań na hodowlach komórkowych, wartość ich IC₅₀ dla różnych linii komórek nowotworowych utrzymuje na poziomie niskich stężeń nanomolowych. Porównanie cytotoksyczności epotilonów na większości modeli komórkowych sugeruje, że epotilon B jest nieznacznie bardziej aktywny od azo-epotilonu B lub dezoksyepotilonu B (Rys. 6). Przedkliniczną charakterystykę epotilonów przedstawiono w tabeli nr 3.

Badania przedkliniczne wskazują na ważną różnicę w zjawisku oporności wielolekowej pomiędzy epotilonami a taksanami. Szczególnie nadekspresja P-gp minimalizuje efekt cytotoksyczności na hodowle komórkowe traktowane epotilonem B, azo-epotilonem B i dezoksyepotilonem (Tabela 3). Porównanie efektu cytotoksyczności epotilonu B, azo-epotilonu B i dezoksyepotilonu w przypadku linii komórkowych z nadekspresją P-gp sugeruje, że azo-epotilon B w największym stopniu indukuje nadekspresję P-gp, a dezoksyepotilon najmniej [9].



Rys. 6. Struktura etopozylonu (A) oraz analogu dezoksyetopozylonu (B) [9].

Znaczenie ekspresji P-gp w klinicznej oporności na taksany pozostaje do końca niewyjaśnione. Niemniej jednak sugeruje się, że etopozylony mogą być bardziej aktywne niż taksany u pacjentów z zaawansowaną chorobą nowotworową, z opisaną wysoką ekspresją P-gp [9].

Tabela nr 3. Streszczenie charakterystyki przedklinicznej wybranych etopozylonów podczas prób klinicznych [9].

Compound and Trial	Unique Structural Characteristic	Activity in Cell Lines*	Curative Activity in Human Xenografts†	Relative Resistance in P-glycoprotein Expressing Cell Lines‡
Aza-etoposide B (BMS-247550)	Lactam rather than lactone	Ovarian, breast, lung, colon, prostate, squamous cell, fibroblasts, and leukemia	Pat-7 ovarian (paclitaxel-resistant) ²⁰	45 KB-31 squamous cell, ²⁶ 1.9 A2789 ovarian, and 9.4 HCT116 colon ²⁰
Etoposide B (EPO906)	Natural product	Ovarian, breast, lung, colon, prostate, and squamous cell	KB-8511 epidermoid (Pgp-overexpressing) ³³	1.0 KB-31 squamous cell, 3.0 SW620 colon, 6.0 CCRF-CEM leukemia, and 16 MCF-7 breast ²⁶
Desoxyetoposide B (etoposide D, KOS-862)	Lacks C12-C13 epoxide	Ovarian, breast, lung, colon, prostate, and leukemia	MX-1 breast, CCRF-CEM leukemia and paclitaxel-resistant subline, ²⁸ HCT-116 colon, K-562 leukemia ³¹	0.5 KB-31 squamous cell, ²⁶ 1.7 CCRF-CEM leukemia, and 2.4 MCF-7 breast ²⁸

*Cell line histologies for which the compound exhibits low nanomolar IC₅₀s.

†All of the compounds show significant growth inhibitory effects or induce regressions in a variety of xenograft models, but only those xenografts where apparent cures were observed are listed.

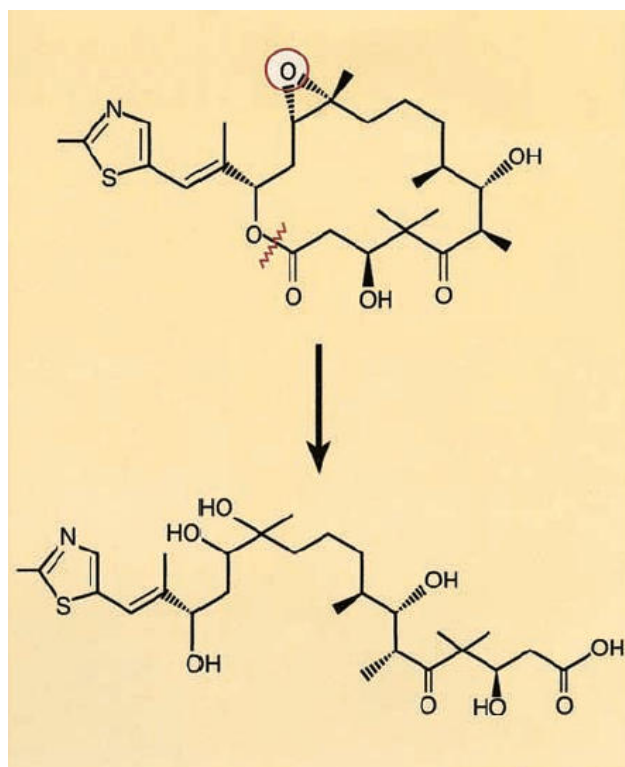
‡Ratio of IC₅₀ for resistant versus sensitive cell lines.

Badania *in vivo* dowodzą, że etopozylony są aktywne zarówno w modelach wrażliwych na paklitaksel jak i opornych na ten związek. W przypadku dożylnego podawania myszom etopozylonów, w formie emulsji (w odstępach 24 h lub tygodniowych), stwierdzono, że azo-etopozylon B jest wysoce aktywny na ksenogeniczne komórki nowotworu jajnika, jelita grubego i piersi oraz na nowotwór piersi (Pat-7) oporny na paklitaksel. Szczególnie podawany doustnie azo-etopozylon B w badaniach na przedklinicznych modelach jest skuteczny na komórki odporne na

paklitaksel. Zjawisko to najprawdopodobniej związane jest z konstytutywną ekspresją P-gp w błonie śluzowej jelita, co skutkuje tym, że paklitaksel ulega słabej absorpcji w jelitach natomiast epotilony ulegają wchłonięciu tą drogą [9].

Farmakologia przedkliniczna

Początkowe badania farmakokinetyki epotilonów wykazały, że lakton w pozycji 16 jest stosunkowo szybko metabolizowany w mysim osoczu (połowiczny czas życia leku ok. 20 min). Następnie po czwartej iniekcji epotilonu B, w wątrobie myszy dominowała hydroliza zarówno laktonu jak i regionu epoksydowego w cząsteczce (Rys. 7) [9].



Rys. 7. Metabolizm epotilonu B u myszy. Rejony hydrolizowane w cząsteczce epotilonu B są zaznaczone linią „zabkowaną” i okręgiem.

W ludzkim osoczu połowiczny czas życia dezoksyepotilonu B wynosi trzy godziny natomiast u psa ten czas jest o dwie godziny dłuższy. Połowiczny czas życia epotilonu B u ludzi wynosi około pięciu dni. W ten sposób widać, że stabilność laktonów w cząsteczkach epotilonów zmienia się pomiędzy gatunkami. Wynika to najprawdopodobniej z różnic w aktywności esterazy tkankowej i osocza [9].

Badania kliniczne epotilonów

W obecnym czasie cztery leki oparte na epotilonach przechodzą badania kliniczne.

Są to:

- BMS-247550 (azo-epotilon B)
- BMS-310705 (rozpuszczalny w wodzie półsyntetyczny analog epotilonu B)
- EPO906 (epotilon B)
- KOS-862 (epotilon D)

Wyniki wczesnych prób klinicznych zostały zestawione i porównane w tabeli nr 4 [9].

Tabela nr 4. Porównanie dawkowania oraz toksyczności taksanów i epotilonów [9].

	Paclitaxel		Docetaxel		BMS-247550			
	Weekly	Every 21 Days	Weekly	Every 21 Days	Daily × 5 Every 21 Days Over 1 Hour	Daily × 3 Every 21 Days Over 1 Hour	Weekly Over 30 Minutes*	Every 21 Days Over 1 Hour
Dose, mg/m ² /d								
Range	70-120	135-250	30-40	60-120	1.5-8	8-10	1-30	32-65
MTD	100	175	36	100	6	8	25	50
Significant toxicities (grade 3, except alopecia)	HSR, neutropenia, sensory neuropathy, arthralgia/ myalgia, fatigue, diarrhea		HSR, neutropenia, sensory neuropathy, fatigue, diarrhea, cutaneous reactions, fluid retention		HSR, neutropenia, thrombocytopenia, sensory neuropathy, arthralgia/myalgia, fatigue, diarrhea, stomatitis			
Dose-limiting toxicities	Neutropenia, neuropathy		Neutropenia, edema, asthenia		Neutropenia, neuropathy			
	EPO906		KOS-862			BMS-310705		
	Weekly × 6 Every 63 Days Over 5 to 10 Minutes	Every 21 Days Over 5 to 10 Minutes	Weekly × 3 Every 28 Days Over 90 Minutes	Daily × 3 Every 21 Days	Every 21 Days at a Fixed Rate (150 mL/hr)	Weekly × 3 Every 28 Days Over 15 Minutes	Every 21 Days Over 15 Minutes	
Dose, mg/m ² /d								
Range	0.3-3.6	0.3-8	16-100	20-50	9-185	5-30	0.6-70	
MTD	2.5	6	Unknown	40	120	15	40	
Significant toxicities (grade 3, except alopecia)	Diarrhea, fatigue, nausea, vomiting		Fatigue, nausea/vomiting, sensory neuropathy			HSR, pancytopenia, sensory neuropathy, arthralgia/myalgia, asthenia, diarrhea, ataxia		
Dose-limiting toxicities	Diarrhea		Impaired gait, cognitive/perceptual abnormalities, chest pain			Neutropenia, hyponatremia, vomiting, diarrhea		

Abbreviations: MTD, maximum-tolerated dose; HSR, hypersensitivity reaction.

*Administration amended to 1 hour to reduce neuropathy.

†Phase II trials amended to 40 mg/m² over 3 hours to reduce neurotoxicity, mucositis, and abdominal pain.

Literatura:

- [3] B.W. Barry, *Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery*, European Journal of Pharmaceutical Sciences **14** (2001) 101-114.
- [1] M.A. Rude, C. Khosla, *Engineered biosynthesis of polyketides in heterologous hosts*, Chemical Engineering Science **59** (2004) 4693-4701.
- [2] K.-H. Altmann et al., *Epothilones and related structures - a new class of microtubule inhibitors with potent in vivo antitumor activity*, Biochimica et Biophysica Acta **1470** (2000) M79-M91.
- [3] D.M. Bollag et al., *Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a Taxol-like mechanism of action*, Cancer Res. **55** (1995) 2325-2333.
- [4] H. Reichenbach et al., *Epothilons A and B - Antifungal and cytotoxic compounds from Sorangium cellulosum (Myxobacteria)-production, physico-chemical and biological properties*, J. Antibiot. **49** (1996) 560-564.
- [5] <http://www.ethlife.ethz.ch/images/epothilon-1.jpg>
- [6] D.G.I. Kingston, *What Makes Epothilones Stick?*, Chemistry & Biology **11** (2004) 153-154
- [7] K. -H. Altmann, *Microtubule-stabilizing agents: a growing class of important anticancer drugs*, Current Opinion in Chemical Biology **5** (2001) 424-431.
- [8] R.M. Buey et al., *Interaction of Epothilone Analogs with the Paclitaxel Binding Site: Relationship between Binding Affinity, Microtubule Stabilization, and Cytotoxicity*, Chemistry & Biology, **11** (2004) 225-236.
- [9] S. Goodin, M.P. Kane, E. Rubin, *Epothilones: Mechanism of Action and Biologic Activity*, Journal of Clinical Oncology **22** (2004) 2015-2025.