

mTOR-komplexek - molekuláris pókok a molekuláris hálókbán

Kopper László¹, Tímár József²

Semmelweis Egyetem, ¹I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, ²II. sz. Patológiai Intézet, Budapest

Az egyik „legbefolyásosabb” jelátviteli út, amely a sejtek döntéshozatalában, funkcióiban meghatározó szerepet játszik, a PI3K-út. Ennek kiemelkedő tagja az mTOR (mammalian target of rapamycin). Az mTOR két komplexben működik, fokozott aktivitásuk igen sok human daganatban kimutatható. Az mTOR-gátlók egyre fontosabb helyet foglalnak el a célzott terápiában, kiemelkedően a veserákok kezelésében, de törzskönyvezésre kerültek a pancreas neuroendokrin daganataiban, bizonyos astrocytoma-típusokban, és jelentős mennyiségű klinikai vizsgálat folyik más daganattípusok esetében is. Az eddigi eredmények mellett számos probléma is felmerült, melyek tanulságai új terápiás stratégiák és új szerek megjelenéséhez vezettek, egyre jobban közelítve a személyre szabott kezeléshez. Magyar Onkológia 55:287-294, 2011

Kulcsszavak: célzott terápia, mTOR-gátlók, hatásmechanizmus, célzott terápia

PI3K route is one of the most outstanding signal transduction pathways, which has a key role in the decision-making processes and functions of a cell. In this network mTOR (mammalian target of rapamycin) is a well-known integrator. mTOR forms two complexes, and their increased activity is present in many human tumors. Therefore, mTOR inhibitors became more and more important in the targeted therapy, first of all in the treatment of renal cancer, neuroendocrine pancreatic cancer and certain astrocytomas, and many trials are going on in other tumor types. The therapeutic results are obvious, but problems also occur, which stimulate application of new strategies and development of new drugs in order to approach the more individual cancer therapy.

Kopper L, Tímár J. mTOR complexes - molecular spiders in molecular networks. Hungarian Oncology 55:287-294, 2011

Keywords: targeted therapy, mTOR inhibitors, mechanism of action, cancer

BEVEZETÉS

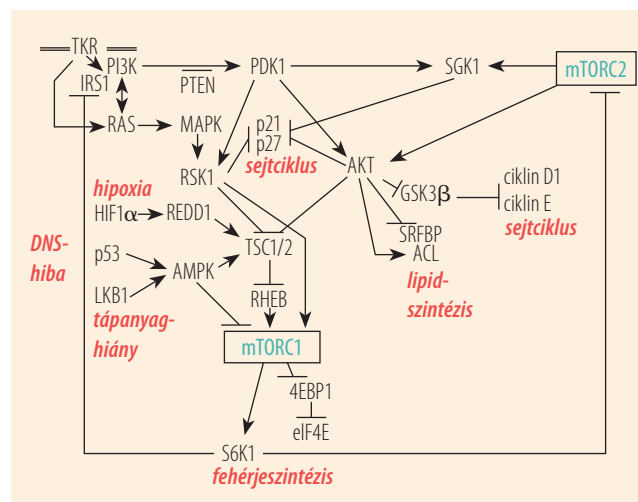
Az onkológiai célzott diagnosztika és -terápia egyik legnagyobb „sztárja” az a jelátviteli út, amelyet főbb tagjaival – PI3K, PTEN, AKT, mTOR – szoktak jellemezni (vagy egyszerűen a lipidkináz, esetleg PI3K-út). Ez az útvonal szinte minden jeleket átvevő és közvetítő receptorral, következtésképpen a legtöbb sejtfunkció szabályozásával kapcsolatban van, beleértve a sejt túlélésének vagy önpusztításának kérdését, előbbi esetében a proliferációt vagy a differenciációt, vagy éppen a funkcióhoz szükséges oxigén- és tápanyagellátást. Nem véletlen tehát, hogy e jelútban bekövetkező szabályozási zavarok olyan patológiai eseményeket indíthatnak el és befolyásolhatnak, mint a daganatok keletkezése, növekedése és terjedése. Az is érthető, hogy azok a molekuláris hibák, amelyek a szabályozási zavarokhoz vezetnek, terápiás célpontként szolgálhatnak. Ennek a jelútnak egyik főszereplője az mTOR (mammalian target of rapamycin). Mint látni fogjuk, nem egyszerűen egyirányú jelátvitel a feladata, hanem kapcsolatai más molekuláris szabályozókkal a sejt döntéshozatalában, funkcióiban meghatározók lehetnek. Napjainkban igen intenzív az a törekvés, hogy az említett jelutat, és ebben az mTOR-t szükség esetén minél hatékonyabban tudjuk gátolni – a daganatokban. Természetesen ezek a jelek nem csak az onkológiában játszhatnak fontos szerepet, hanem más betegségek kialakulásában, vagy éppen kezelésében is.

SZERKEZET ÉS FUNKCIÓ

Az mTOR (mammalian target of rapamycin) annak a proteinkináz-családnak (PIKK: PI3K-related kinase) a tagja, melyben szerepel pl. a PI3K, az ATM (ataxia teleangiectasia mutated), a RAD3 és a DNS proteinkinázok. A tagokban azonos doménszekvencia található, ebben pedig a FAT (FRAP, ATM, TRAP), a FATC (FAT c-terminális) és a HEAT (Huntington, EF3, PP2A alfa-alegysége, TOR1). Ez a szerkezet biztosítja az mTOR számára a kölcsönhatást más fehérjékkel. Az mTOR – egy 289 kDa tömegű szerin-treonin proteázként – számos jelet integrálva befolyásolja a sejt túlélését, növekedését (proliferációját), tápanyagellátását és energiahelyzetét, valamint a stresszre (metabolikus stresszre: hipoxia, tápanyaghiány) adott választát, ezzel összefüggésben pl. az autofágiát vagy a DNS-hibajavítást is.

Az mTOR két komplexben található: mTORC1 és mTORC2. Az előbbi modulálja a cap-függő fehérjeszintézist tápanyagok, hormonok és növekedési faktorok hatására (1. ábra). Felépítésében részt vesz az mTOR, a Raptor (regulatory associated protein of TOR), mLST8 (vagy GβL: GTPáz β-alegysége-szerű fehérje), PRAS40 (proline-rich Akr substrate 40) és a Deptor (DEP domain containing mTOR-interacting protein). Az mTORC2-ben is megta-

1. ábra. Az mTOR kapcsolatai (rendkívül leegyszerűsítve), elsősorban a PI3K-AKT-mTOR tengely szempontjából. Az mTOR-komplexek a ciklineken (D1 és E), valamint a CDK-gátlókon (p21, p27) keresztül befolyásolják a sejtciklust; a SREBP-k és az ACL a lipidok szintézisét szabályozza. Az mTORC1 foszforilálja a 4EBP1-et és az S6K1-et, aktiválva ezzel a fehérjeszintézist. A PI3K-t és az mTORC2-t gátolhatja az mTORC1, amellyel a jelúton belül visszacsatolás - és az egyensúly megteremtésének lehetősége - érvényesül: az S6K1 foszforilálja az IRS1-et, elősegítve a proteolízisét (így elmarad a PI3K aktiválása), valamint a Rictort (ezzel akadályozva, hogy az mTORC2 aktiválja az AKT-ot). A TSC1/2 komplex a mikrokörnyezeti információkat „értékeli”. Az onkogén PI3K/PDK1 és a RAS/MAPK egymást segítve csökkenti a TSC1/2 aktivitását. A hipoxia (HIF-1α-n keresztül), a DNS-károsodás javítása (p53-on keresztül), a tápanyaghiány (LKB1-en keresztül) aktiválja a TSC1/2-t, hogy az mTORC1 ne támogassa a bioszintetikus folyamatokat (normális szövetekben - daganatokban ezek az utak gyakran inaktívvá válnak).



lálható az mTOR, az mLST8 és a Deptor, eltérő a Rictor (rapamycin insensitive companion of TOR), mSIN1 (stress activated MAPK-interacting protein 1) és a PRR5. A Deptor mindkét komplexet gátolja. (A Deptor expressziójának elősegítése célzottan az mTOR gátlásához vezethet.) Az mTORC2-t is feltehetően növekedési faktorok aktiválják.

AZ mTOR-IG VEZETŐ JELÚT

Az mTOR aktivitása szorosan kötődik a PI3K-jelúthoz (1. ábra). A PI3K-t a receptorokról (TKR: tirozinkináz receptor) érkező jelek aktiválják, a PI3K pedig a PDK1-et (phosphoinositide dependent protein kinase-1) aktiválja. További lépésként a PDK1 foszforilálja az AGC-család kinázait (homologs of protein kinase A, G and C), beleértve az AKT-ot, SGK1-et (serum/glucocorticoid-regulated kinase 1), RSK1-et (ribosomal S6 kinase), amelyek azonban

az aktiválódásukhoz második foszforilációt is igényelnek. Ezt az igényt az AKT-nál az mTORC2, az SGK1-nél a két mTOR-komplex, az RSK1-nél a MAPK1 és MAPK3 elégíti ki. Ezek az egymást követő, de egymásra is utalt lépések jutnak el az mTORC1-ig, ha az utat nem állja el a TSC1/2. Ez a komplex gátolhatja az mTORC1-et vagy közvetlenül, gátolva a Raptort, vagy a kis G-fehérje, a RHEB (RAS homolog enriched in brain) funkciójának felfüggesztésével. A RHEB a gátlás alól felszabadulva aktiválja az mTORC1-et.

A TSC1/2 komplex (TSC: tuberous sclerosis, TSC1: tuberin, TSC2: hamartin, GTPáz-aktiváló fehérje) tulajdonképpen integrátorként működik, fogadja és értékeli a növekedési faktorokat és energiaszintet értékelő jelutakat az mTORC1 szabályozásához. A mitogének inaktíválják a TSC1/2-t, amiben közreműködik az ERK, AKT és RSK1, ezzel a gátlással segítik az mTORC1-függő fehérje- és lipidszintézist. (Az RSK1 a Raptort is aktiválja.) Normális szövetekben a TSC1/2-t főleg olyan „előnytelen” események aktiválják, mint pl. a DNS-károsodás, a hipoxia, vagy az elégtelen tápanyagellátás, amellyel a sejt azt biztosítja, hogy ilyen rossz feltételek között az mTORC1 ne végezze feladatát, ne stimulálja a bioszintetikus folyamatokat, hanem a sejt állítsa helyre először az egyensúlyi állapotot (pl. javítsa ki a DNS-hibákat) vagy „keressen” új egyensúlyi állapotot. A hipoxia a HIF-1 α -n keresztül aktiválja a REDD1-et, ez antagonizálja az AKT-nak a TSC1/2-re kifejtett gátló hatását. A tápanyaghiány az LKB1-et aktiválja, amely az AMPK (AMP-activated protein kinase) segítségével aktiválja a TSC2-t. A DNS-károsodás esetén a p53 is aktiválja az AMPK-t. Az AMPK a Raptort is foszforilálhatja, ezzel teheti lehetővé annak lebontását, amelyet a 14-3-3 végez. Végül soron a DNS-károsodás és az energiahiány okozta stressz az AMPK-n keresztül aktiválja a TSC1/2-t, és így több úton is gátolja az mTORC1-et.

Az AKT és az mTOR-komplexek között többszörös a kapcsolat. Az AKT támogatja az mTORC1 működését (gátolhatja a TSC2-t, de közvetlenül az mTORC1 komplexbe „beépített” gátlót, a PRAS40-et is). Az AKT egyik fontos aktiválója az mTORC2, amelyet viszont a „rokona”, az mTORC1 képes gátolni az S6K1-en keresztül. Hasonló visszacsatolás érvényesül az mTORC1 és a PI3K felé az IRS1 közvetítésével. Ezek a kapcsolatok igen fontosak a PI3K jelút igényeknek megfelelő szabályozásában. (Erre még a terápia tárgyalásánál visszatérünk.)

Az mTOR az anyagcsere integrációs pontjaként működik, összekapcsolja a növekedési jeleket a rendelkezésre álló tápanyagkészlettel. Az aktivált mTOR stimulálja a fehérje- és lipid-bioszintézist, hogy megfelelő mennyiségű energia álljon a növekedés rendelkezésére. Molekuláris szinten elősegíti a mRNS transzlációját és a riboszóma-biogenezt,

és indirekten okozza az anyagcsere-változásokat a transzkripció faktorok aktiválásával (pl. HIF-1) még normoxiás állapotban is. A HIF-1-függő metabolikus változások határozzák meg a glikolitikus fenotípust, a sejtek metabolikus stresszre (oxigén-, tápanyaghiány) adott választát.

A HIF-1 és HIF-2 komplexek azok a transzkripció faktorok, amelyek elsősorban felelősek az alacsony oxigénfelvételek miatt bekövetkező génexpressziós változásokért. Ezek a komplexek heterodimerek, az egyik tagjuk a konstitutívan termelődő HIF-1 β (ARNT) alegység, amely vagy HIF-1 α -val, vagy HIF-2 α -val (EPAS1) társul. Hipoxiás körülmények között a komplexek gyorsan stabilizálódnak. Az aktivált HIF fokozza a glükózztranszporterek és a legtöbb glikolitikus enzim expresszióját, elsősegítve a sejtben a glikolízist. Továbbá, a HIF-1 aktiválja a PDK-kat (piruvát-dehidrogenáz-kináz), amelyek inaktíválják a mitokondriális piruvát-dehidrogenáz komplexet, csökkentve ezzel a glükózból származó piruvát eljutását a trikarboxilsav (TCA) ciklusba. Utóbbi csökkenti az oxidatív foszforilációt és az oxigénfelhasználást, megerősítve a glikolitikus fenotípust és az oxigénigény szintjét hipoxiás körülmények között. Daganatos sejtekben a glikolitikus fenotípust HIF- és PDK-gátlókkal igyekeznek megszüntetni, és ezzel terápiás hatást elérni.

Nem teljesen ismert, hogy az mTORC1 hogyan „érzékel” a sejt energiaszintjét. Valószínű, hogy – legalábbis részben – az ATP-fogyás és az AMP-szint emelkedésére az AMPK az mTORC1 gátlásával reagál, foszforilálva a TSC2-t aktiváló és a Raptort gátló helyeket.

AZ mTOR CÉLPONTJAI

A TSC1/2 „csavaros” szabályozása is alátámasztja az mTORC1 fontosságát a sejt homeosztázisának biztosításában. A két komplex eltérő szubsztrátokat foszforilál. Az mTORC1 stimulálja a proliferációt, fokozva a cap-függő transzláció elindulását két fő célpontján keresztül: 4EBP (eukaryotic initiation factor 4E-binding protein) és az S6 kinázok (S6K1 és 2: ribosomal protein S6 kinase). Az S6 kinázok foszforilálják a 40S riboszomális fehérjét (rpS6), ami az mRNS-ek transzlációját segíti elő. A 4EBP-család gátolja a transzlációt, versengve az eIF4G-vel az eIF4E-hez való kötődésért, meggátolva ezzel az eIF4F iniciációs komplex kialakulását. Az eIF4E-t (eukaryotic initiation factor) – az mTOR felől érkező aktiválása után – a gyengébben átiródó mRNS-ekről is hatékonyra teszi a transzlációt. Ez azért érdekes, mert igen sok onkogén fehérje (pl. MYC, MCL, ciklin D, VEGF, survivin) gyenge mRNS-sel rendelkezik. Ez tehát, transzlációs szinten, hozzájárulhat a malignus fenotípus kialakulásához, következésképpen aláhúzza az mTOR gátlásának fontosságát (22).

Az mTORC a lipid-biogenezist is stimulálja, ami szükséges a membránok szintéziséhez és a mitogén jelátvitel módosításaihoz. Mindkét mTOR-komplex részt vesz a sejtciklus progressziójának támogatásában az AGC kinázokon keresztül. Az mTORC2 az AKT útján fokozza a ciklin D1 expresszióját, egyben megakadályozza, hogy a GSK3 β lebontassa a ciklin D1-et és a ciklin E-t. Az AKT, részben az AFX (forkhead transzkripció faktor) segítségével, gátolja a p21-et, p27-et (ciklin-függő kinázok gátlói).

Az mTORC2 foszforilálja az AKT-ot, a szerinen (S473), mint foszfoinozítid-függő kináz 2 (PDK2), valamint az SGK1-et, PKC-t, amelyek a sejt túlélését és a citoszkeletont szabályozzák. A foszforilált AKT inaktíválhat transzkripció faktorokat, apoptózist indukáló FOXO fehérjét. A komplex aktivitása az mSIN1 jelenlététől függ, ez stabilizálja a komplexet (terápiás célpont lehet). A komplexek felelősek lehetnek két HIF (HIF-1 α és HIF-2 α) átíródásáért. Míg a HIF-1 α -t mind a két mTOR-komplex szabályozza, addig a HIF-2 α -t csak az mTORC2.

AZ mTOR AKTIVITÁSA A DAGANATOKBAN

A PI3K és az mTOR-komplexek együttműködése normálisan igen elegáns egyensúlyt biztosít a sejt növekedése/proliferációja számára. Ennek a kapcsolatnak a zavara igen sok humán tumorban megfigyelhető, ezért aztán ezek a molekuláris hibák terápiás célpontokká váltak.

Az mTOR aberráns aktivitása a 10 leggyakoribb daganattípusban 40–90%-ban kimutatható (18). Az mTOR aktivitása valószínűleg a jelút mTOR-t megelőző lépéseitől függ, mivel aktiváló molekuláris hibáját eddig még nem írták le. A jelutak előző lépcsőiben (PI3K- és RAS-úton, vagy az ezek előtti ligand-receptor szinten) bekövetkező aktiváló változásoknak köszönhetően az mTOR a növekedési faktoroktól függetlenné válik.

Az mTOR aktiválásához vezető genetikai hibák különböző következményekkel járnak. A PI3K jelút mTOR előtti lépései gyakran mutatnak amplifikációt vagy aktiváló mutációt. A PI3K katalitikus doménjét (p110 α) kódoló gén talán a leggyakoribb mutáns kináz-gén a humán tumorokban. Ugyancsak nagyon gyakori a PTEN génjének hiánya vagy inaktíválása. A PTEN vesztese lényegében függetleníti az mTORC1 aktiválódását a PI3K/MAPK jelutaktól, de az energiaszint érzékelése az LKB1-en és AMPK-n keresztül ép marad, viszont az LKB1 mutációi az elégtelen tápanyagellátás ellenére a rosszul vaszkularizált szövetekben „engedik” az mTORC1 működését. A jelutak hibái az RSK1-et is aktiválják. A p53 mutációja a DNS-károsodást „elválasztja” a bioenergetikai folyamatoktól és a sejtciklus

gátlásától (azaz utóbbiak nem állnak le időt engedve a hibák kijavítására). A TSC1/2 mutációi ritkák, a komplexet befolyásoló tényezőké (pl. p53, LKB1, HIF-1 α , REDD1) viszont gyakoribbak. A TSC1/2-szintet csökkentheti az NF1 kiesése (az NF1 a RAS aktivitását gátolhatja), ami aktiválja a RAS/MEK- és RSK1-utat, ezzel gátolja a TSC1/2 komplexet. Ugyanezt érheti el a BRAF mutációja is (pl. melanomákban). A TSC1/2 gátló hatásának kiesésével az mTORC1 hiperaktívvá válik.

Az AKT1 gén aktiváló mutációja kisebb százalékban előfordul emlő-, vastagbél- és ováriumrákokban. Ugyanakkor ez a génhiba kizárja a jelpálya más elemeinek genetikai hibáját (PI3K aktiváló mutáció vagy PTEN-vesztés) (ld. OMIM164730). Az AKT2 (PKB-B) gén mutációja igen ritka emberi daganatokban, de a gén amplifikációja ovárium- és pancreasrákokban előfordul, ami fokozott aktivitást eredményez (OMIM16473).

Az mTOR-komplexek működését befolyásoló szabályozási zavarok fokozzák az mTOR-ok aktivitását, amely a daganat számára igen előnyös következményekkel jár. Említettük már a fokozott fehérje- és lipidszintézist, a ciklinek expressziójának fokozódását, a CDK-gátlók expressziójának csökkenését. Utóbbiak közül pl. a p27 kóros foszforilációja több lépésen keresztül a citoszkeleton destabilizálásához, a sejtmitotilis növekedéséhez vezet, elősegítve a daganatsejtek terjedését.

Az AKT és az mTOR kapcsolata pozitív és negatív visszacsatolást egyaránt érint. Az mTOR kulcsszerepet játszik az endotélsejtek AKT-mediált túlélésében, proliferációjában és migrációjában. Ezt a hatást az mTORC1 közvetíti az S6K1-en és 4EBP1-en keresztül, egyben negatív visszacsatolással gátolja az AKT-ot. Ezt a visszacsatolást szüntetik meg az mTOR gátlói (pl. rapamycin). Preklinikai adatok szerint az mTOR gátlása rapamycinnel normalizálja a tumor okozta érabnormalitásokat, ez pedig javítja a lokális keringést, növeli az oxigenizációt és a szerek eljutását a daganathoz. Ugyanakkor a rapamycinnel kezelt erek fokozott hajlamot mutattak apoptózisra. Valószínű azonban, hogy az mTORC2 nagyobb szerepet játszik a neoangiogenezisben, mint a C1 komplex, mert stimulálja a HIF-2 α átíródását. Régebben azt gondolták, hogy az mTORC2 érzéketlen a rapamycinnel szemben, de lehet, hogy a hosszabb kezeléskor az mTORC2 is gátlódik. Nem kizárt, hogy a rapamycin és társai terápiás hatásában igen fontos az angiogenezis gátlása, célpontnak használva a tumorsejteket és az endotélsejteket egyaránt.

A sporadikus daganatok mellett az mTOR „holdudvarába” tartozó szabályozók tumorszindrómákban is érintettek lehetnek, pl. sclerosis tuberosa komplex (TSC1/2), Cowden-szindróma (PTEN), neurofibromatosis (NF1/2), Peutz-Jeghers-szindróma (LKB1).

mTOR ELLENI SZEREK

A rapamycin (sirolimus, Wyeth) volt az első mTOR-gátló, amit követtek analógjai (a rapalógok), így a temsirolimus (Torisel, Pfizer), az everolimus (Afinitor, Novartis), és a ridaforolimus (deforolimus, Ariad Pharma). 2010 végén a ClinicalTrials.gov több mint 160 mTOR-ral kapcsolatos klinikai vizsgálatot regisztrált. Közel egy év távlatából ez a szám biztos nem csökkent – ez is jelzi, hogy e helyen valóban csak példák említésére van lehetőség.

A rapalógok közül az everolimus orálisan, a másik két szer orálisan és iv. alkalmazható. A klinikai gyakorlatban elsősorban a temsirolimus és az everolimus terjedt el.

Rapamycin

A rapamycin makrolid antibiotikum, amelyet a Rapa Nui sziget talajából származó *Streptomyces hygroscopicus*-ban találtak. A rapamycint először gombaellenes szerként fejlesztették, majd felismerték immunszuppresszív (gátolja a T-sejtek proliferációját) és a koronáriák resztenózisát gátló hatását. A rapamycin és rokonai a sejten belül kötődnek az FKBP12-höz és szelektíven gátolják az mTORC1-et, az mTORC2-re kifejtett hatás kérdéses.

Temsirolimus

Indikáció: vesesejtes carcinoma – a Torisel olyan, előrehaladott vesesejtes carcinomás betegek elsővonalbeli kezelésére javallott, akiknél a hat prognosztikus kockázati tényező közül legalább három fennáll. Köpenysejtes lymphoma – a Torisel kiújuló és/vagy refrakter köpenysejtes lymphomában (mantle cell lymphoma – MCL) szenvedő felnőtt betegek kezelésére javallott (17).

Az interferon- α -val összehasonlítva (626 kezeletlen, metasztatikus veserákos beteget vontak be) a teljes túlélés tekintetében a temsirolimus (egyedül vagy kombinációban IFN- α -val) jobbnak bizonyult (7,3 hónap vs. 10,9 hónap) (8). Az alcsoportok retrospektív analízisének kiderült, hogy a nem világossejtes veserák is jobban reagált temsirolimusra, mint IFN- α -ra, valamint, hogy az előnyös hatás elsősorban a rossz prognózisú betegeken és azokon érvényesül, akiknél a kezelés előtt nem történt nephrectomia (14). A temsirolimus biztonsággal és klinikai hatást mutatva (29 beteg, betegségkontroll: 55%) alkalmazható olyan metasztatikus veserákos betegeken is, akiknél a tirozinkináz receptorok elleni szerek (sunitinib, sorafenib) már nem használtak (24).

Everolimus

Indikáció: veserák – az Afinitor az olyan, előrehaladott vesesejtes carcinomában szenvedő betegek kezelésére javallt, akiknek a betegsége a VEGF (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor – vascular endothelial growth factor) elleni ke-

zelés mellett vagy azt követően progrediált. Pancreas-eredetű neuroendokrin tumorok – az Afinitor az inoperábilis vagy metasztatikus, jól- vagy közepesen differenciált, pancreas-eredetű neuroendokrin tumorok kezelésére javallt, progresszív betegségben szenvedő felnőttekben. Subependymalis óriássejtes astrocytoma – mely sclerosis tuberosa talaján alakul ki és sebészi reszekciója nem lehetséges.

Orálisan aktív rapalóg. Fázis II-ben 41, előzőleg kezelt metasztatikus veserákos beteg kapott folyamatosan everolimust (10 mg/nap). Objektív választ találtak a betegek harmadánál, az állapot stabilizálódását a betegek felénél, ami több hónapig tartott (11). Mellékhatásként mucositis, bőr-rash, pneumonitis, hipofoszfatémia vagy hiperglikémia jelentkezett. Az everolimus immunszuppresszív hatással is rendelkezik. Fázis III-ban 410 veserákos beteget kezeltek, akiknél a betegség előrehaladott volt, és az előzetes kezelésre (anti-VEGFR-TK – sunitinib, sorafenib) már nem reagált (20). A randomizált betegek everolimusszal kezelt csoportjában a progresszióig eltelt idő (PFS) 4,9 hónapnak, a placebóval kezeltéknél 1,9 hónapnak mutatkozott. A 6 hónapos progressziómentes időszak esélye 26% és 2% volt. A teljes túlélés a karok között hasonló lett, valószínűleg azért, mert a placebo-csoportban progrediálókat kezelhették everolimusszal („cross-over”). A toxicitást tekintve 3-as szintű (grade 3) fordult elő nem-infekciós pneumonitisnél a betegek 3%-ában. Ahogy várható volt, a többi hasonló szintű tünet az mTOR anyagcserére kifejtett hatásával állt kapcsolatban (hiperglikémia, hipertrigliceridémia, hiperkoleszterinémia), és sokkal gyakrabban fordultak elő az everolimusszal kezeltéknél.

A REACT 1367 metasztatikus veserákos beteget vont be abba a nemzetközi vizsgálatba, amelyben az everolimus hatását értékelték (10 mg/nap) anti-VEGFR-rel szemben intoleráns vagy rezisztenssé vált (kezelés alatt vagy utána) esetekben. A klinikai választ RECIST szerint értékelték 3 havonként az első évben és 6 havonta ezután. A kezelés biztonsága, a mellékhatások és a terápiás eredmények olyanok lettek, mint a RECORD-1 vizsgálatban. A súlyos mellékhatások között szerepelt dyspnoe (5%), pneumonia (4,7%), anémia (4,1%), míg 3/4 szintűnek leggyakrabban anémiát (13,4%), fáradtságot (6,7%) és dyspnoét (6,5%) találtak. A betegség stabilizálódását érték el 51,6%-ban, részleges választ 1,7%-ban. Az everolimus-kezelés medián hossza 14 hét volt. Ez a vizsgálat is azt erősítette meg, hogy az everolimust jól tolerálták a metasztatikus veserákos betegek, és pozitívnak mutatkozott az előny-hátrány aránya is (10).

A veserák mellett más tumorokban is vizsgálják az everolimus hatását. Preklinikai tesztekben jó eredményeket tapasztaltak a petefészek világossejtes carcinomája esetén, kombinációban trabectedinnel (NER-, DNS-hibajavítás gátlója) (6). Tumorelles hatást figyeltek meg everolimus-kezeléssel hepatocelluláris carcinomában, ennek alapján a klinikai vizsgálatok fázis II/III-ban tartanak (3).

VESEDAGANATOK KEZELÉSE

Ezt a témát a fentiekben már érintettük, de mivel a szolid tumorok célzott terápiájában a metasztatikus vesetumorok kezelése jelentette a nagy áttörést (vagy paradigmaváltást, ahogy emlegetik), még több szót érdemel. Számos prospektív klinikai vizsgálat vezetett oda, hogy ma a világossejtes veserák kezelésében elsőfokú evidenciákon nyugszik az ajánlás: (a) első vonalban sunitinib, pazopanib, bevacizumab plusz interferon- α , temsirolimus (rossz prognózis esetén); (b) második vonalban – az elsővonalbeli szerek sikertelensége esetén – everolimus (VEGF/R-TKI után), valamint citokinkezelés után sorafenib, sunitinib és pazopanib. Az első vonalat tehát a VEGF-et vagy receptorait gátló szerek jelentik jó- és közepes prognózis esetén, ami talán azért nem csodálható, mert a világossejtes veserák igen érgazdag (a tumorok közötti különbségek azért elég nagyok), és ezekkel tapasztaltak kiugróan jó terápiás eredményt a prospektív klinikai vizsgálatokban. Ez a hatás azonban rövidtávú (jól érvényesül a progressziómentes túlélésben), viszont hosszabb távon már nem, rezisztencia lép fel (erre utal az, hogy az össztúlélésben klinikai előny az addigi, elsősorban citokin-alapú kezeléshez viszonyítva, már nem mutatkozik) (21). A rezisztenciának több oka lehet, pl. más angiogén faktorok vagy rezisztens VEGF-izomformák szelektálódnak ki, vagy a tumorsejteken és/vagy az endotélsejteken rendkívül intenzív a VEGF/R-termelés, vagy más jelátvivő utak vették át a tumornövekedés irányítását. Ebben a helyzetben, és ide tartozhat a rossz prognózis is, az mTOR-gátlókra hárul a nehezebb feladat. Az még megválaszolatlan, hogy miért a VEGF/R-gátlók kerültek az első vonalba, hiszen nincs olyan marker, amelyik a potenciálisan reagáló betegeket ki tudná szűrni. Ráadásul többségük multikináz-gátló, ami még nehezebbé teszi a legjobb célpont kiválasztását. Igaz, az mTOR-gátlók hatásmódja is sokszoros. Részen angiogenezist gátlók (a HIF-VEGF út gátlásával), részen szinte minden, a daganatok számára fontos sejtfunkciót képesek befolyásolni. Ami tény, a jelenlegi első vonalbeli kezelés hatékonyabb, mint az eddigiek, de az is, hogy a hatás tartama rövid. Ebből következik a kombinált kezelés igénye. Az mTOR-gátlók sikerének értelmezése sokat segíthet a multikináz-gátlók pontos helyének meghatározásában is. A VHL-mutáns és vad típusú világossejtes veserákok genetikai és proteomikai elemzése azt mutatja, hogy ezek eltérő genetikai mintázattal rendelkeznek (4). A VHL-mutáns világossejtes veserákok jelentős részében kimutatható a HIF-jelpálya aktivitása és a következményes „angiogénikus” fenotípus, ugyanakkor e daganatok tartoznak általában a jobb prognózisú csoportba, melyek esetében a multikináz-gátlók oly sikeresnek bizonyultak. A vad típusú VHL-t tartalmazó, de egyben rossz prognózisú világossejtes veserákokban is kimutatható a HIF-regulált

gének expressziója, de emellett számos más kináz aktivitása is, mint az EGFR, MET, PDGFR. Ez arra utalhat, hogy ezekben a daganatokban a HIF aktivitása nem a VHL-szabályozás zavara, hanem onkogén vagy onkogének fokozott aktivitása miatt áll fenn, amit a lipidkináz jelpálya az mTOR-on keresztül közvetít (15). Ez lehet a magyarázata annak, hogy az mTOR-gátlók miért pont a rosszabb prognózisú világossejtes veserákokban aktívak.

A jelenlegi stratégia által választott célzott szerek adhatók együtt, vagy szekvenciálisan. Ezen a területen még nincs megegyezés, adatok azonban igen (13). Ezek szerint az azonos támadáspontúak szekvenciális adása nem jár klinikai előnnyel, a toxicitás viszont emelkedhet. Értelemszerűen ez azt jelenti, hogy VEGF/R-gátlók után hasonlóat adni nem javasolt. A különböző támadáspontúak közül a legjobb eredményt, a legmagasabb evidenciaszintet everolimusszal lehet elérni. A VEGF/R-gátlás sikertelensége esetén ma metasztatikus világossejtes veserákoknál az everolimus a „standard of care”. Ez kiderül az indikációból is. (A kritikus klinikai vizsgálatot – RECORD-1 – említettük a szer ismertetésénél.) A kulcskérdések egyike természetesen az, hogy mikor kerül sor a szerek váltására, mikor tekinti a klinikus sikertelennek a VEGF/R-gátlóval történt kezelést, és javasolja az everolimus adását. Nyilvánvaló, hogy ez csak szoros monitorozás esetén tehető meg optimálisan. Megbízható markerek hiányában a képalotók rendszeres alkalmazása a legfontosabb.

A szekvenciális kezelés optimalizálása folyik tovább. Így pl. 2011-re várhatók a szisztémás elsővonalbeli kezelés, majd axitinib, illetve sorafenib kombinációjának értékelése, 2012-re a sunitinib majd sorafenib, illetve fordítottjának eredményei, míg 2013-ra az everolimus majd sunitinib és fordítottjának (RECORD-3) adatai.

További kérdés, hogy mi történjen harmadik vonalban. Vannak olyan retrospektív megfigyelések, amelyek szerint pl. VEGFR-gátló és everolimus adása után a VEGFR-gátló ismét klinikai haszonnal járhat.

TOVÁBBI KOMBINÁCIÓK RAPALÓGOKKAL

Bár a rapalógokkal több tumortípusban is klinikai hatást lehetett elérni, a vizsgálatok nagy része elmaradt a várakozásoktól. Mi lehet ennek az oka? A rapalógok a tapasztalatok szerint citosztatikusak és nem citotoxikusak (ebben hasonlítanak a célzott terápiában használt többi szerhez), ami klinikailag főleg a betegség stabilizálásában, kevésbé a regressziójában jelenik meg (23). Az egyik probléma az lehet, hogy a rapalógok nem teljesen szubsztrát-szelektív mTORC1-gátlók, egyes szubsztrátokra jobban hatnak, mint másokra. Így pl. a rapamycin és analógjai gátolják az S6K1 foszforilációját, sokkal kevésbé a 4EBP1-et és ezzel a cap-függő transzlációt, tehát csak részen blokkolják a fehérjeszintézist. A másik

problémát azok a visszajelző mechanizmusok jelentik, amelyek az mTORC1 gátlása aktivál. A visszajelzés – azaz az mTORC1-S6K1-IRS-PI3K gátlásával járó út – elmaradásával aktiválódhat a PI3K-jelút maga. A rapalóg-érzékeny visszacsatolások tirozinkináz receptorokat is aktiválhatnak (20). A két komplex közötti szabályozásra utal, hogy az S6K1 foszforilálhatja a Rictort, gátolva ezzel az mTORC2-t. A gátlás elmaradásával az mTORC2 AKT-ot stimuláló hatása akadálytalanul érvényesülhet (hacsak a hosszabb rapalóg-kezelés ki nem kapcsolja az mTORC2-t). Ugyancsak a visszacsatolás elmaradása aktiválhatja a MAPK-t az S6K1-PI3K-RAS úton keresztül. Ezek a példák is arra utalnak, hogy a rapalógok okozta mTORC1-gátlással a visszacsatolások és így az egyensúlyt biztosító szabályozás elmaradásával monoterápiában csak részleges eredményt tudunk elérni.

A fentiek alapján már a formális logika is támogatja a kombinációk alkalmazását. A rapalógok és a tradicionális kemoterápiás szerek kombinálására sok vizsgálat történt – különösebb molekuláris racionalitás nélkül. Erre is lehet azonban példát találni. A p53 funkcióvesztésével leáll az a mechanizmus is, amellyel a DNS-károsodás gátolja az mTORC1-et. Normális körülmények között a p53-AMPK-TSC1/2 út állítja le az mTORC1-et, hogy ne történjen addig lényeges fehérje- és lipidszintézis, amíg a hiba ki nem javítódik. A p53-mutáns daganatos sejtekben a kemoterápiás szerek csak mérsékelten vagy nem is tudnak olyan DNS-károsodást okozni, amelyik a sejt pusztulásához vezet. Mivel ebben az esetben az mTOR aktivitása biztosítja a daganatsejt túlélését, ennek gátlása, kiegészítve a kemoterápiás szerrel, hatékony lehet.

Kombinációra példa az everolimus adása az IGF-et, ennek következtében PI3K-t gátló szomatostatin-analóggal, az octreotiddal. A fázis II vizsgálatban a neuroendokrin tumoroknál 22%-os összválaszarányt értek el, ami sokkal jobb, mint az everolimus monoterápiáé (25). A fázis III vizsgálatot elindították. Fázis II-ben folyamatban van az erlotinib és a rapalógok kombinációja NSCLC-ben. Az ösztrogén a PI3K-n és a MAPK-on keresztül aktiválja az mTOR-komplexekeket (7). Preklinikai vizsgálatban emlőtumoroknál a rapalógok fokozták az antiösztrogének és az aromatázgátlók hatását (3). Előrehaladott emlőrákban az everolimus növelni tudta a letrozol hatását (2). Biztató az everolimus és exemestan, valamint az everolimus és trastuzumab kombinálása a korai klinikai vizsgálatok szerint (12). A trastuzumabbal szembeni rezisztencia egyik okaként a PI3K-jelút aktivitását tartják számon. 47 metasztatikus, HER2-t fokozottan expresszáló emlőrákban szenvedő betegnél vizsgálták (fázis I/II) a trastuzumab és everolimus kombinációjának hatását és 34%-ban találtak klinikai előnyt (részleges válasz, állapot stabilizálódása). A medián PFS 4,1 hónap volt, amit a PTEN hiánya nem befolyásolt. Fáradtság, fertőzések és mucositis jelentkező nem-hema-

1. táblázat. Klinikai vizsgálatok rapalógokkal lymphomák ellen

Temsirolimus és lenalidomid	kiújult vagy refrakter HL vagy NHL
Temsirolimus, rituximab, cladribin	újonnan diagnosztizált MCL
Temsirolimus, rituximab, bendamustin	kiújult FL vagy MCL
Everolimus és sorafenib	kiújult vagy refrakter NHL, HL, vagy MM
Everolimus és bortezomib	kiújult vagy refrakter MCL, NHL
Everolimus plusz panobinostat	kiújult vagy refrakter MM, NHL vagy HL
Everolimus és lenalidomid	kiújult vagy refrakter HL vagy NHL
Everolimus plusz rituximab	kiújult vagy refrakter NHL, HL
Deferolimus	kiújult vagy refrakter NHL, HL

FL: follikuláris lymphoma, HL: Hodgkin-lymphoma, MM: myeloma multiplex, NHL: non-Hodgkin-lymphoma

tológiai toxicitásként (19). Everolimusszal kombinációban sok szert vizsgálnak még, pl. bicalutamid (prosztatarák), temozolomid/sugárterápia (glioblastoma), bavacizumab (petefészekrák, veserák), paclitaxel/bevacizumab (emlőrák, HER2-negatív), sorafenib (májrák), valamint DLBCL ellen, stb. A temsirolimust kombinálták pl. nem metilált MGMT-nél sugárterápiával (glioblastoma), bevacizumabbal (veserák), letrozollal (emlőrák, ER-negatív), stb. Számos klinikai vizsgálat folyik lymphomák ellen (zömmel fázis I/II-ben) (1. táblázat) (1). Ridaforolimusra kevés az adat.

Az eddigi tapasztalatok szerint talán azokban az esetekben várható a legjobb terápiás hatás a kombinációktól, ha a rapalógok mellett olyan szerek vesznek bennük részt, amelyek jelátviteli csomópontokat és ezzel a visszacsatolásokat is gátolni tudják – pl. EGFR1/2-, IGF-1R-, PI3K-, BRAF-, MEK-gátlók. A potenciális korlátokat nyilvánvalóan a toxicitás jelentheti.

KETTŐS GÁTLÓK

A molekuláris racionalitások az utóbbi időben két fejlesztési stratégiát indítottak el: az mTOR katalitikus gátlói mindkét komplex ellen hathatnak, míg a PI3K-mTOR kettős gátlók a jelút forró pontjait iktatják ki. Mindkét esetben kikapcsolhatókká válnak azok a visszacsatolások is (legalábbis nagy részben), amelyek a rapalógok hatékonyságát korlátozták. Ezekkel a szerekkel a vizsgálatok fázis I/II-ben tartanak (5, 9, 16, 27).

(a) mTOR aktív helyét gátlók (fázis I/II) (gátolják mindkét komplexben az mTOR-t): AZD8055, OSI-027, INK-128, PP-242.

(b) PI3K és mTOR-kináz kettős gátlói: BEZ235/NVP, BGT226, XL765, GDC0980, GSK2126458, PF04691502.

EGYÉB TERÁPIÁS KÉRDÉSEK

Ahogy említettük, az mTORC1-gátlók terápiás alkalmazásának egyik problémája az, hogy az mTORC1 funkciójának kiesésével (amit ezek a szerek feltehetően csak részlegesen tudnak elérni) megszűnik a visszacsatolás gátló hatása is, pl. az AKT felé. Kisebb a probléma, ha az mTORC1 metabolizmusban résztvevő célfehérjéi gátlódnak (pl. fokozott glikolízis, fehérje- és lipidszintézis), mert ebben az esetben olyan gátlásról van szó, amely a daganatos és normális sejtek eltérő szabályozásában érvényesül. Az aktivált mTOR által előidézett metabolikus stresszhez való adaptálásban résztvevő anyagcsereutak gátlása hatékonysággal kecsegtet (feltételezeten „druggable” célpontokról van szó) (26).

Említést érdemel, hogy a rapalogokkal klinikai eredményeket lehetett elérni a TSC1/2 inaktivációjával járó szindrómákban, illetve az ezekben megjelenő tumorokban (pl. faciális angiofibroma, vese-angiomylipoma, lymphangioleiomyomatosis, subependymalis óriássejtes astrocytoma) – bizonyítva ezzel is, hogy szelektált (!) betegeken az mTOR-gátlók igen hatékonyak lehetnek.

Az mTOR1 és az elhízás közötti kapcsolat újabban merült fel és vezetett – többek között – a metformin (orális hipoglikémiát okozó szer a 2-es típusú diabetes kezelésében) daganatellenes hatásának kipróbálására. A feltételezés szerint a metformin az AMPK-n keresztül gátló az mTORC1-et.

IRODALOM

- Argyriou P, Economopoulou P, Papageorgiou S. The role of mTOR inhibitors for the treatment of B-cell lymphoma. *Adv Hematol* 2012;435342, 2012
- Baselga J, Semiglazov V, van Dam P, et al. Phase II randomized study of neoadjuvant everolimus plus letrozole in patients with estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 27:2630–2637, 2009
- Beeram M, Tam QT, Tekmal RR, et al. Akt-induced endocrine therapy resistance is reversed by inhibition of mTOR signaling. *Ann Oncol* 18:1325–1328, 2007
- Beroukhi R, Bruner J-P, Di Napoli A, et al. Patterns of gene expression and copy number alterations in von-Hippel Lindau disease-associated and sporadic clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Res* 69:4674–4681, 2009
- Burris H, Rodon J, Sharma S, et al. First-in-human phase I study of the oral inhibitor BEZ235 in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 28(Suppl): abstract 3005, 2010
- Carracedo A, Pandolfi PP. The PTEN-PI3K pathway: of feed-backs and cross-talks. *Oncogene* 27:5527–5541, 2008
- Coleman KM, Smith CL. Intracellular signaling pathway: nongenomic action of estrogens and ligand-independent activation of estrogen receptors. *Front Biosci* 6:D1379–D1391, 2001
- Dutcher JP, Szczylik C, Tannir NM, et al. Correlation of survival with tumor histology, age and prognostic age group for previously untreated patients with advanced renal cell carcinoma (adv RCC) receiving temsirolimus (TEMSR) or interferon- α (IFN). *J Clin Oncol* 25(Suppl):abstract 5033, 2007
- Garcia-Echeverria C. Allosteric and ATP-competitive kinase inhibitors of mTOR for cancer treatment. *Bioorg Med Chem Lett* 20:4308–4312, 2008
- Grünwald V, Karakiewicz PI, Baybek SE, et al. An international expanded-access programme of everolimus: addressing safety and efficacy in patients with metastatic renal cell carcinoma who progress after initial vascular endothelial growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor therapy. *Eur J Cancer* doi:10.1016/j.ejca.2011.06.054, 2011
- Jac J, Giessinger SK, Wills J, Chiang S. A phase II trial of RAD001 in patients with metastatic renal cell carcinoma (MRC). *J Clin Oncol* 25(Suppl): abstract 5107, 2007
- Jerusalem GH. Maintenance with everolimus (RAD001) and trastuzumab (T) after discontinuation of chemotherapy in patients with heavily pretreated HER2-positive metastatic breast cancer (MBC) pooled data of extension cohorts of phase Ib/II studies. *J Clin Oncol* 28(Suppl 15):1041, 2010
- Larkin J, Swanton C, Pickering L. Optimizing treatment of metastatic renal cell carcinoma by exchanging mechanism of action. *Expert Rev Anticancer Ther* 11:639–649, 2011
- Logan TF, McDermott D, Dutcher JP, et al. Exploratory analysis of the influence of nephrectomy status on temsirolimus efficacy in patients with advanced renal cell carcinoma and poor-risk features. *J Clin Oncol* 26(Suppl): abstract 5050, 2008
- Mabuchi AS, Hisamatsu T, Kawase C, et al. The activity of trabectedin as a single agent or in combination with everolimus for clear cell carcinoma of the ovary. *Clin Cancer Res* 17:4462–4473, 2011
- Markman B, Dienstmann R, Tabernero J. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway – Beyond rapalogs. *Oncotarget* 1:530–543, 2010
- Mekhail TM, Abou-Jawde RM, Boumerhi G, et al. Validation and extension of the Memorial Sloan Kettering prognostic factors model for survival in patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 23:832–841, 2005
- Menon S, Manning BD. Common corruption of the mTOR signaling network in human tumors. *Oncogene* 27:S43–S51, 2008
- Morrow PK, Wulf GM, Ensor J, et al. Phase I/II study of trastuzumab in combination with everolimus (RAD001) in patients with HER2-overexpressing metastatic breast cancer who progressed on trastuzumab-based therapy. *J Clin Oncol* 29:3126–3132, 2011
- Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, et al. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomized, placebo controlled phase III trial. *Lancet* 372:449–456, 2008
- Rini BI. New strategies in kidney cancer: therapeutic advances through understanding the molecular basis of responses and resistance. *Clin Cancer Res* 16:1348–1354, 2010
- Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, et al. Roles of Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy implications for cancer and aging. *Aging* 3:192–222, 2011
- Wander SA, Hennessy BT, Slingerland JM. Next-generation mTOR inhibitors in clinical oncology: how pathway complexity informs therapeutic strategy. *J Clin Invest* 121:1231–1241, 2011
- Weikert S, Kempkensteffen C, Busch J, et al. Sequential mTOR inhibitor treatment with temsirolimus in metastatic renal cell carcinoma following failure of VEGF receptor tyrosine kinase inhibitors. *World J Urol* doi 10.1007/s00345-011-0676-1, 2011
- Yao JC, Phan AT, Chang DZ, et al. Efficacy of RAD001 (everolimus) and octreotide LAR in advanced low- and intermediate-grade neuroendocrine tumors: results of phase II study. *J Clin Oncol* 26:4311–4318, 2008
- Yecies JL, Manning BD. mTOR links oncogenic signaling to tumor cell metabolism. *J Mol Med* 89:221–228, 2011
- Zhang Y-J, Duan Y, Zheng XFS. Targeting the mTOR kinase domain: the second generation of mTOR inhibitors. *Drug Discovery Today* 16:325–331, 2011