

# Pharmacologie des analogues nucléosidiques

*Charles Dumontet*  
*Hospices Civils de Lyon*  
*INSERM UMR 590*

- Les analogues
- Indications
- Mécanismes d'action
- Combinaisons
- Paramètres liés à la réponse ou la résistance
- Nouvelles stratégies thérapeutiques

# Qu'est ce qu'un analogue de nucléoside cytotoxique ?

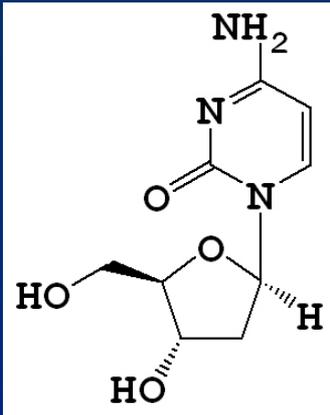
- Molécule structurellement proche d'un nucléoside ou déoxynucléoside physiologique
- A ne pas confondre avec les nucléobases
- La modification peut porter sur la base ou le sucre
- Famille de molécules possédant des activités antimitotiques, antivirales, immunosuppressives, modificatrices de la méthylation

# Propriétés fondamentales

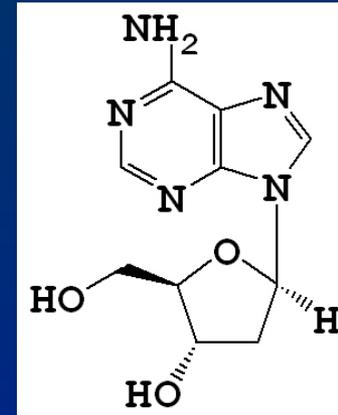
- Analogues des bases puriques ou pyrimidiques
- Doivent être activés en forme di- ou tri-phosphates
- Entrent en compétition avec les nucléotides naturels
- S'intègrent dans les acides nucléiques (ADN +++, ARN +) et inhibent certaines enzymes clés

# Analogues de nucléosides cytotoxiques « classiques »

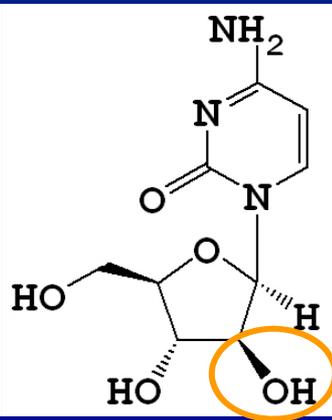
## Deoxycytidine



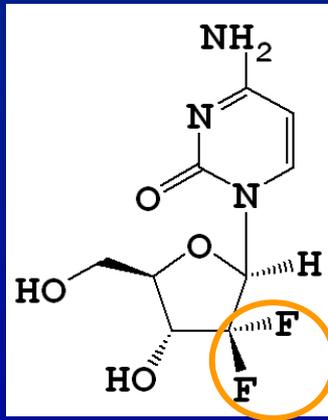
## Deoxyadenosine



## Pyrimidine analogues

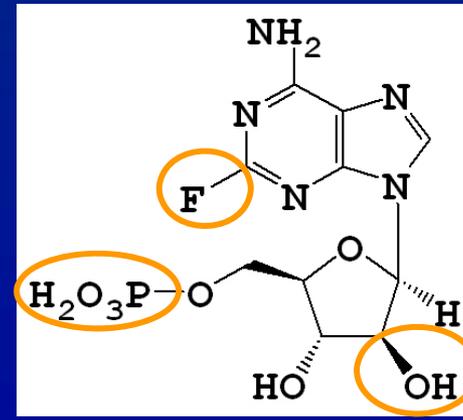


AraC

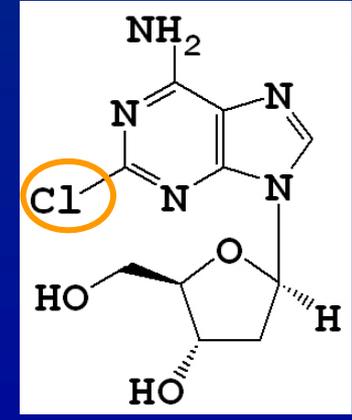


Gemcitabine

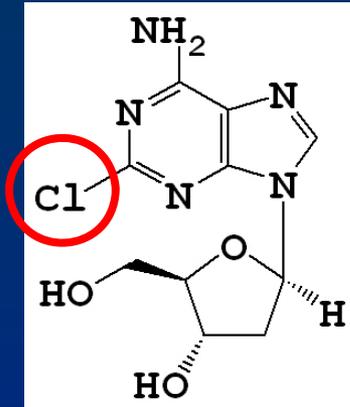
## Purine analogues



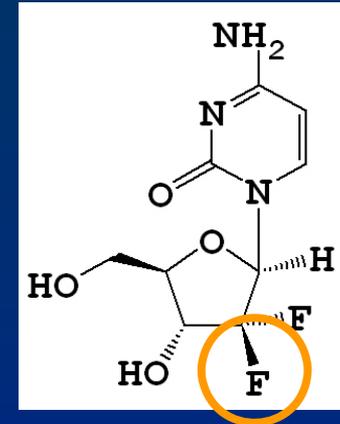
Fludarabine



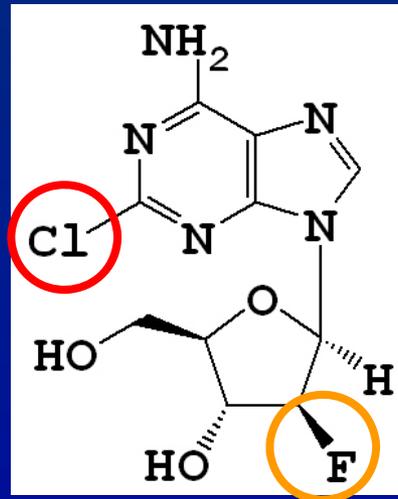
Cladribine



**Cladribine**



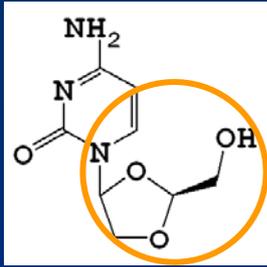
**Gemcitabine**



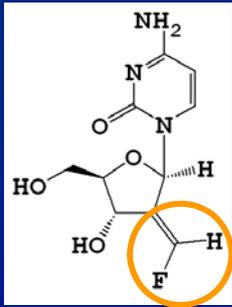
**Clofarabine**

# Les nouveaux analogues de nucléosides

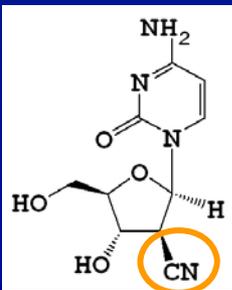
## Analogues pyrimidiques



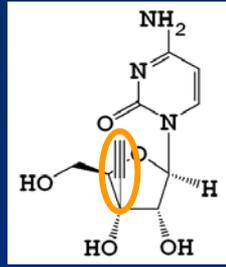
Troxacitabine



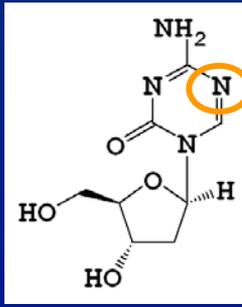
Tézacitabine



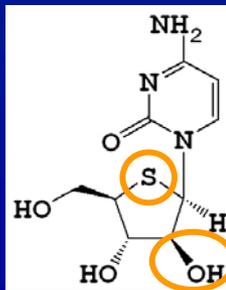
CNDAC



ECyd

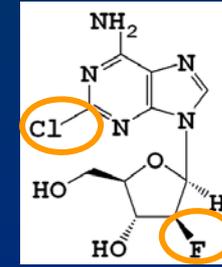


Décitabine

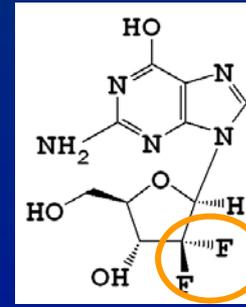


T-araC

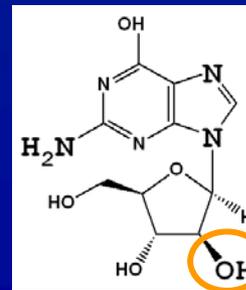
## Analogues puriques



Clofarabine

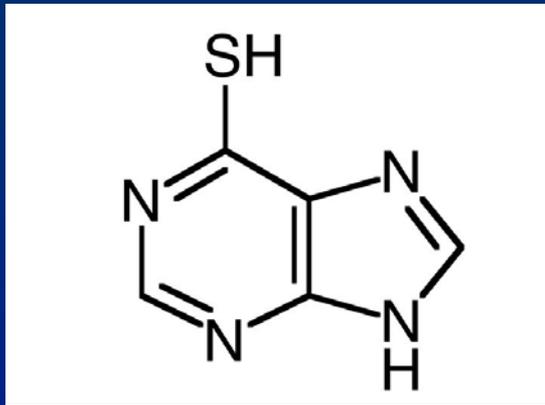


dFdG

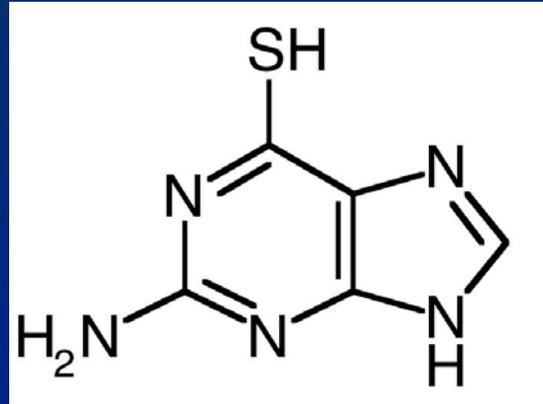


AraG

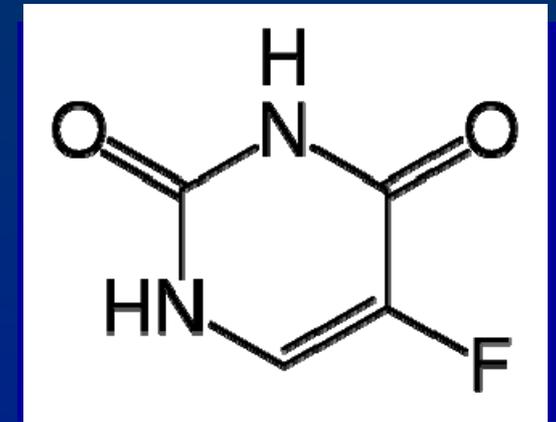
# Nucléobases



6 mercaptopurine



6 thioguanine



5 fluorouracile

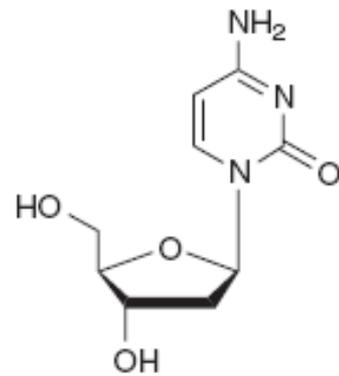
ORL

Cancer colorectal

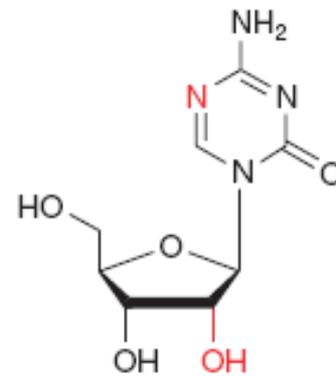
Sein

Leucémie aigue lymphoblastique  
(LAL)

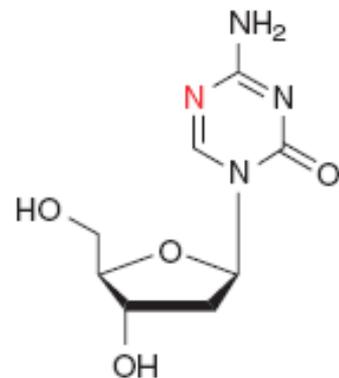
# Modificateurs épigénétiques



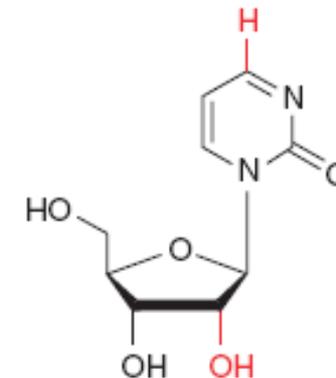
2'-Deoxycytidine



Azacytidine

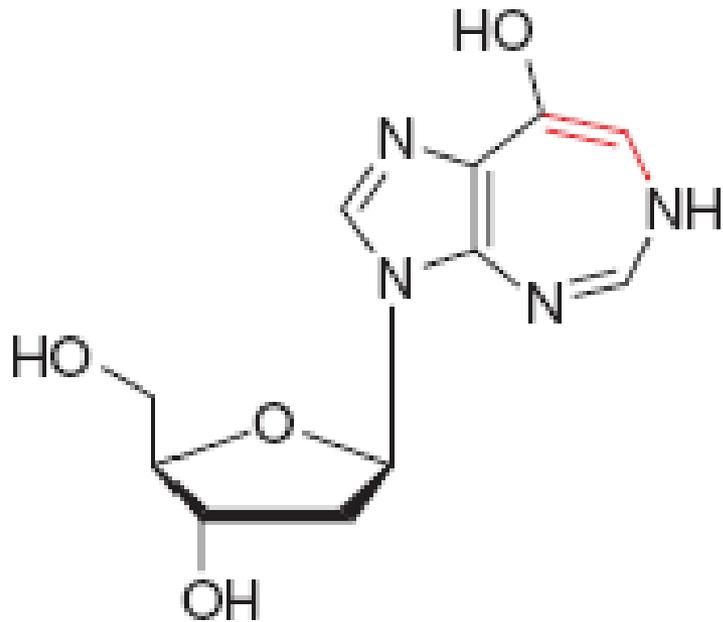


Decitabine



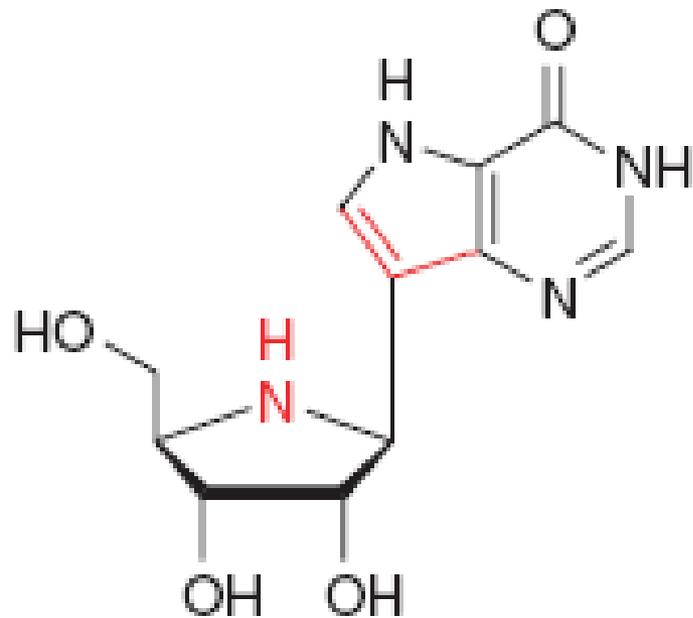
Zebularine

# Autres analogues



Pentostatin

Inhibiteur d'ADA



Forodesine

Inhibiteur de PNP

## Indications des analogues de nucléosides

Molécule	Spécialité	Indications
Cytarabine	Aracytine	LAM, NHL
Gemcitabine	Gemzar	Tumeurs solides (poumon, Pancréas, vessie)
Fludarabine	Fludara	Synd. Lymphoprolifératifs
Cladribine	Leustatine	Tricholeucocytose

Hémopathies malignes +++

Gemcitabine : multiples tumeurs solides

# Mécanismes d'action

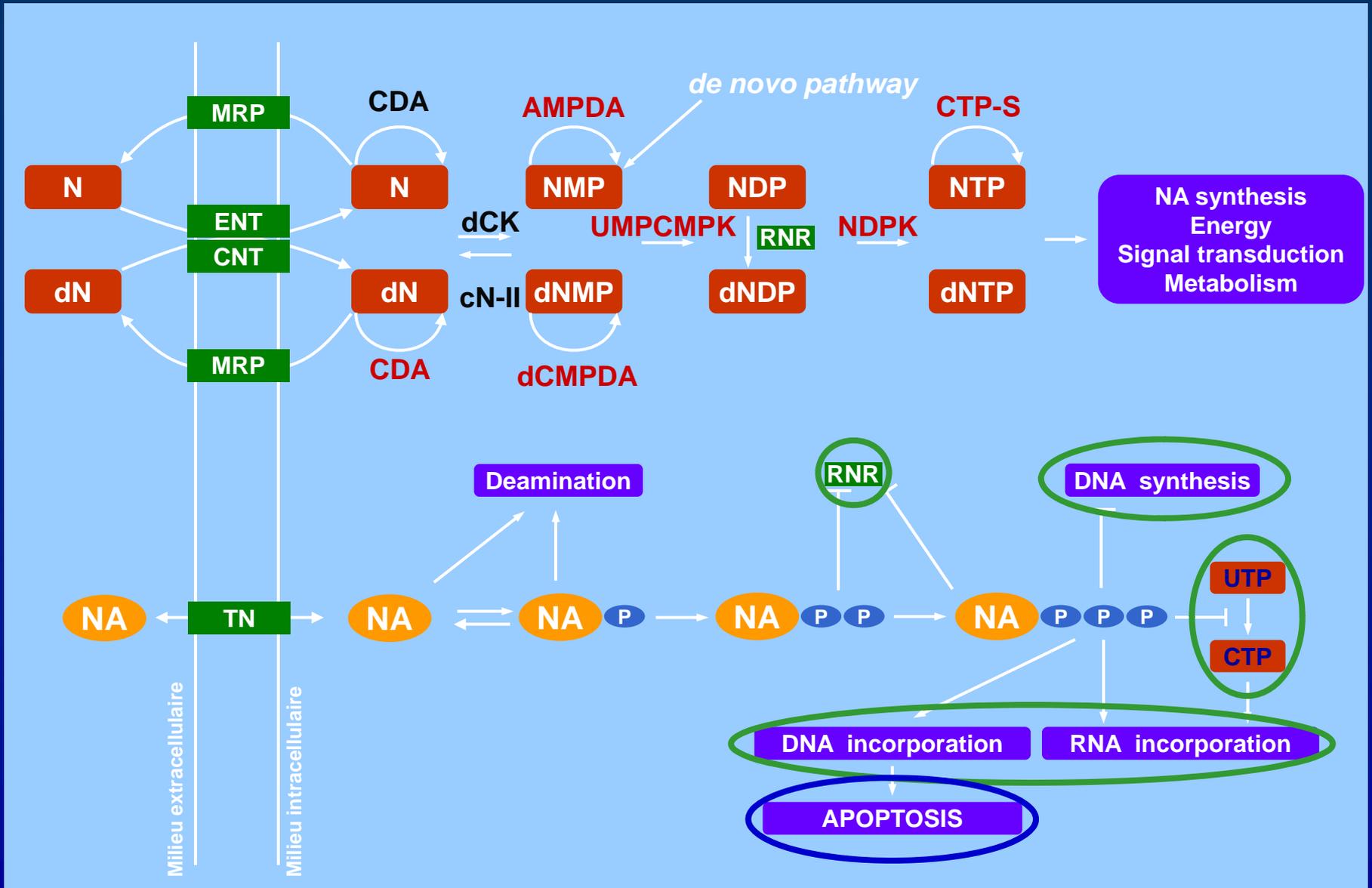
Table 1 Actions of nucleic acid antagonists

<i>Nucleic acid antagonist</i>	<i>Active metabolite</i>	<i>Target</i>	<i>Biological consequence</i>
<i>Nucleobase</i>			
5-Fluorouracil	FdUMP	TS inhibitor	dTTP depletion
	FdUTP	DNA incorporation	Glycosylase activation
	FUTP	RNA incorporation	RNA instability
6-Thioguanine	6-thio-dGTP	DNA incorporation	MMR activation
6-Mercaptopurine	6-thio-dGTP	DNA incorporation	MMR activation
	6-thio-IMP	de novo purine synthesis inhibition	NTP pool imbalance
<i>Nucleoside</i>			
ARA-C	ara-CTP	DNA incorporation	Replication stall/termination
Gemcitabine	dFdCTP	DNA incorporation	Replication stall/termination
	dFdCDP	Ribonucleotide reductase	dNTP depletion
Fludarabine	F-ara-ATP	DNA incorporation	Replication stall/termination
		Apoptosome activation	
		Ribonucleotide reductase	dNTP depletion
Cladribine	CldATP	RNA incorporation	Transcription termination
		DNA incorporation	Replication stall
		Apoptosome activation	
Pentostatin	Itself	Adenosine deaminase inhibition	Deoxyadenosine accumulation
	dATP accumulation	Ribonucleotide reductase	dNTP pool imbalance
5-Azacytidine	5-aza-CTP	RNA & DNA incorporation	Gene activation
	5-aza-2'-dCTP	DNA incorporation	Gene activation

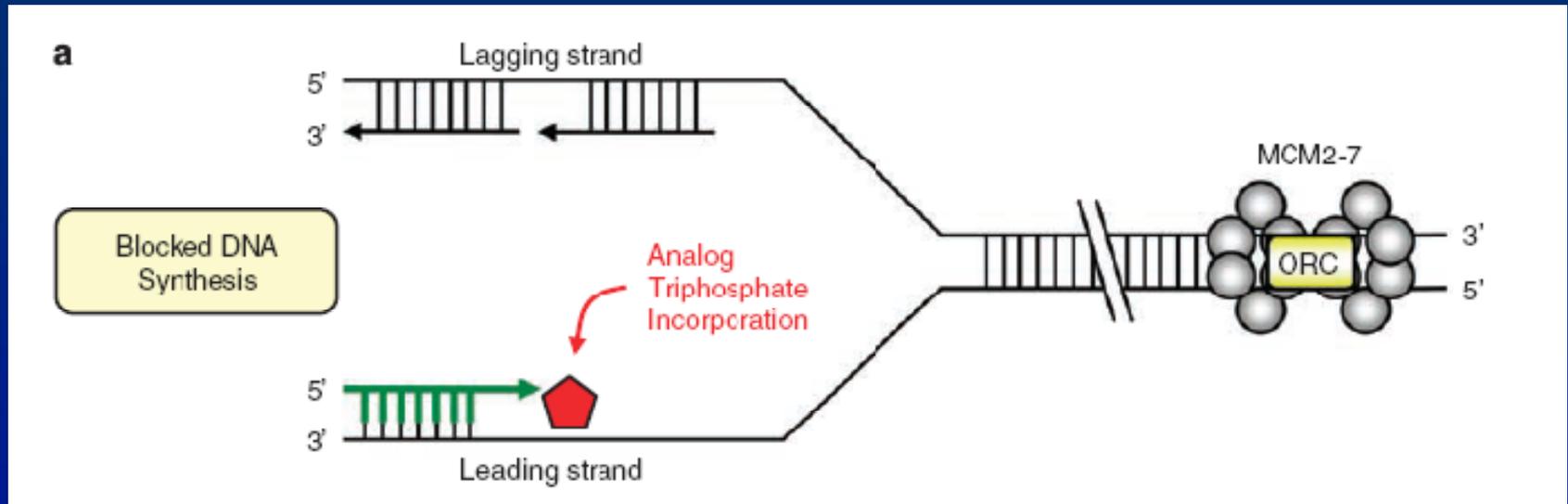
# Activité cytotoxique

- Nécessite une activation en dérivés di- ou triphosphorylés
- Inhibition de la ribonucléotide réductase, de l'ADN polymérase
- Intégration directe dans les acides nucléiques
- Compétition avec le nucléotide correspondant

# Métabolisme des nucléosides et de leurs analogues

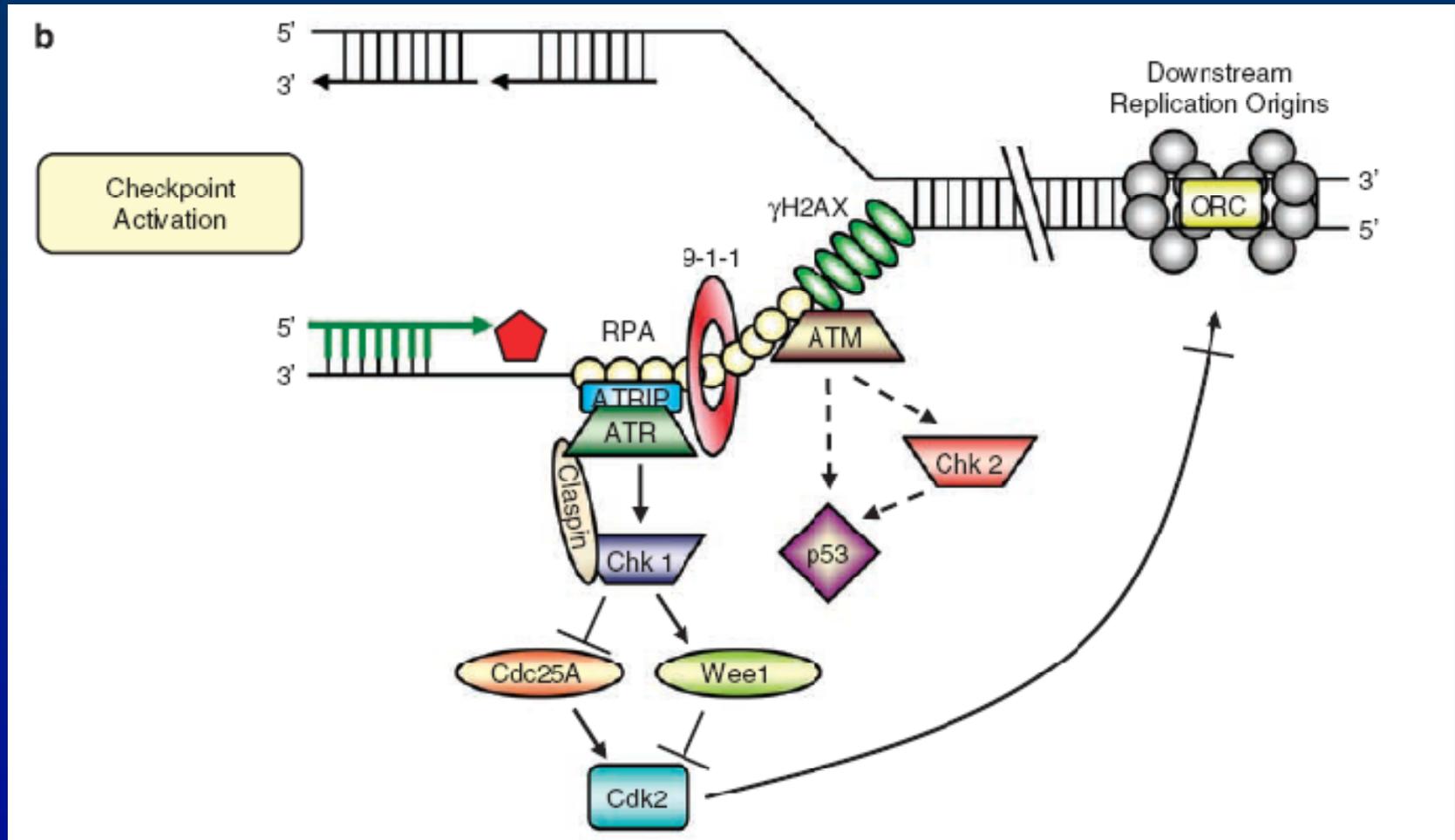


# Conséquences des lésions de l'ADN (1)



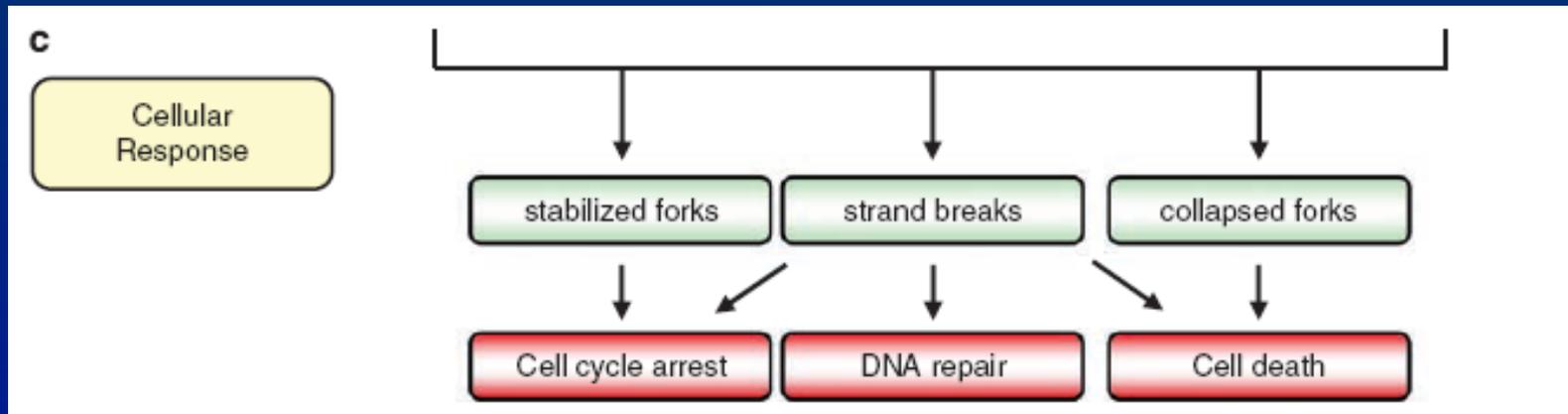
Blocage de la fourche de réplication

# Conséquences des lésions de l'ADN (2)



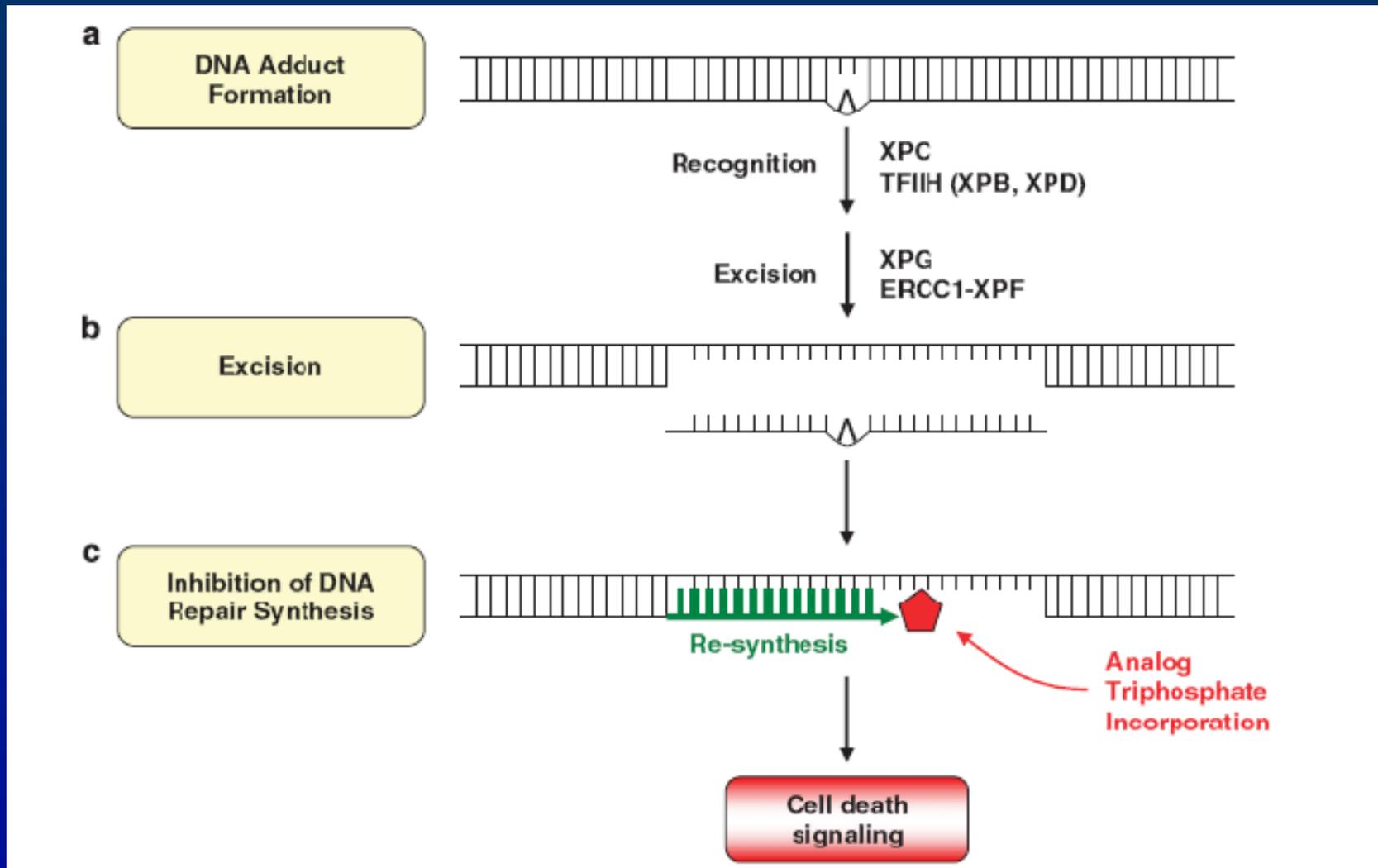
Activation des check-points

# Conséquences des lésions de l'ADN (3)



Conséquences sur la prolifération

# Conséquences des lésions de l'ADN (4)



Systemes de réparation

# Analogues et associations thérapeutiques

- Les analogues inhibent la synthèse d'ADN et bloquent les cellules en phase S du cycle cellulaire
- Combinaisons possibles avec d'autres composés :
  - ayant des mécanismes d'action complémentaires (dauno + araC dans 3+7)
  - alkylants
  - de différents analogues

# Synergie analogues et alkylants

Potentialisation d'agents alkylants :

- *DHAP, Gem/CDDP, fludarabine/cyclophosphamide*
- Effet radiosensibilisant : gemcitabine +++

- Les analogues cytotoxiques peuvent bloquer les mécanismes de réparation de lésions de l'ADN produites par les alkylants ou platines

- Les alkylants provoquent des lésions d'ADN dans lesquels peuvent s'incorporer les analogues de nucléosides

# Synergie entre analogues

- Rationnel fort pour associer des analogues entre eux : modification des pools endogènes
- Modèles précliniques : la clofarabine induit une augmentation de la forme active d'aracytine  
1 microM clofarabine.  
10 microM ara-C alone → 86 microM ara-CTP  
Si clofarabine 1 microM → 248 microM ara-CTP

Paramètres corrélés à la réponse  
ou à la résistance  
aux analogues de nucléosides

# Méthodes d'étude

- Modèles de résistance *in vitro* et *in vivo*
- Echantillons frais étudiés *ex vivo*
- Corrélation biocliniques
  
- Etude de polymorphismes
- Etude de niveaux d'expression
- Etudes fonctionnelles



# Polymorphismes

Différences de séquence génique, homo- ou hétérozygote

Impact potentiel sur l'activité ou le niveau d'expression de la protéine

Etudes par PCR de gènes ciblés, ou par techniques à haut débit

# Polymorphismes et analogues

Gene	Protein	DNA Mutation / Polymorphism	Protein Mutation / Polymorphism	Effect
<i>SLC29A1</i>	hENT1		M33I M89C L92Q G154C S160C G179A F334S N338S	Modified sensitivity to inhibitors
<i>SLC29A1</i>	hENT1		G184L/C/V	Poor targeting to membrane
<i>SLC29A1</i>	hENT1		M89C L92Q G154C S160C G179L/C/V	Modified affinity and transport of nucleosides
<i>SLC29A1</i>	hENT1		I216T E391K	No differences in uptake kinetics for these natural polymorphisms
<i>SLC29A1</i>	hENT1	-1345C>G -1050G>A -706G>C	- - -	Increased expression for some haplotypes of these natural polymorphisms
<i>SLC29A2</i>	hENT2		I33M	Modified sensitivity to inhibitors
<i>SLC29A2</i>	hENT2	845-846del	Frameshift at 282	No transport activity
<i>SLC28A1</i>	hCNT1		G476A/L	Poor targeting to membrane
<i>SLC28A1</i>	hCNT1		F316Y/A/H	Increased sensitivity to guanosine inhibition
<i>SLC28A1</i>	hCNT1	1153del	S546P	No thymidine transport
<i>SLC28A1</i>	hCNT1		V189I	Decreased affinity for gemcitabine
<i>SLC28A2</i>	hCNT2		S354A	Increased transport of cladribine
<i>SLC28A3</i>	hCNT3	1099G>A	G367R	No nucleoside transport

# Variants génétiques avec une conséquence phénotypique

Gene group	Gene	Protein	DNA Mutation / Polymorphism	Protein Mutation / Polymorphism	Effect
Intracellular metabolism	<i>CDA</i>	CDA	79A>C 208G>A	Q27L A70T	Modified affinity to araC and gemcitabine
	<i>CDA</i>	CDA	-92A>G -451C>T -897C>A	-	Modified expression activity for ATC haplotype
	<i>DCTD</i>	dCMP deaminase	172A>G	N58D	Decreased activity on monophosphorylated gemcitabine
	<i>DCK</i>	dCK	-201C>T -360C>G	- -	Better outcome for araC-treated Asian AML patients with -360CG/-201CT or -360GG/-201TT than with -360CC/-210CC
Drug targets	<i>RRM1</i>	RRM1	-37C>A -524T>C	- -	Better outcome for gemcitabine-treated NSCLC patients with -37CC/-524TT than -37CA/-524TC
	<i>RRM1</i>	RRM1	2464G>A	A744A	Higher sensitivity to gemcitabine for cell lines with the A allele

## dCK promoter

2 SNPs identified in an Asian population clinically relevant for AML patients treated with araC haplotypes -360CG/-201CT and -360GG/-201TT were associated with an increase of promoter activity and a better clinical outcome than -360CC/-201CC

## CDA gene

the missense variant L27Q (79A>C) has an increased affinity for araC and gemcitabine

the threonine variant of A70T (208G>A) has only 32-40% deaminase activity on araC as compared to the alanine variant

# Niveaux d'expression

Etude de l'impact du niveau d'expression de protéines clés de transport, de métabolisme ou cibles

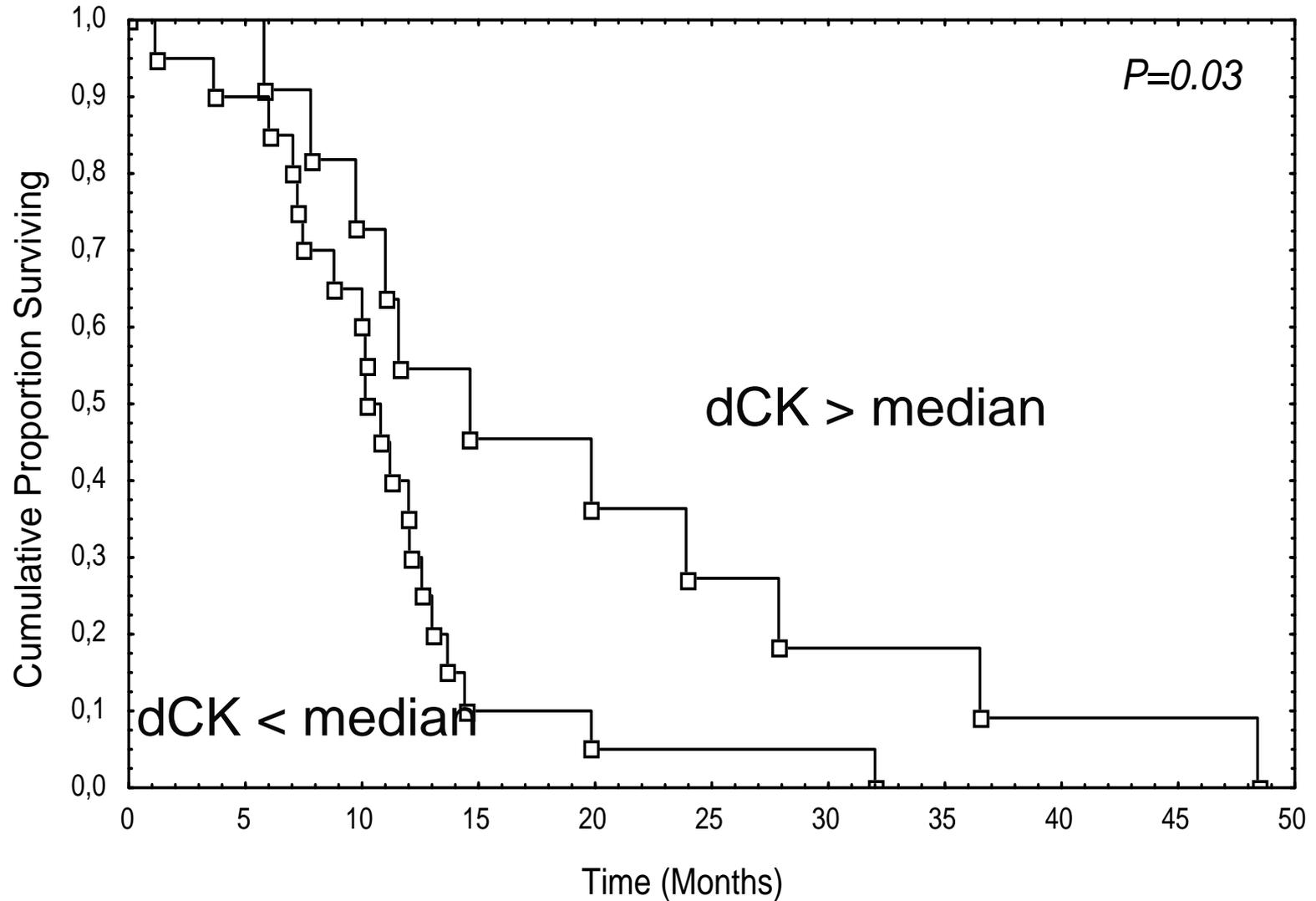
Analyse de lignées, de cellules fraîches exposées ex vivo, d'échantillons préthérapeutiques

Etudes par IHC ou cytométrie

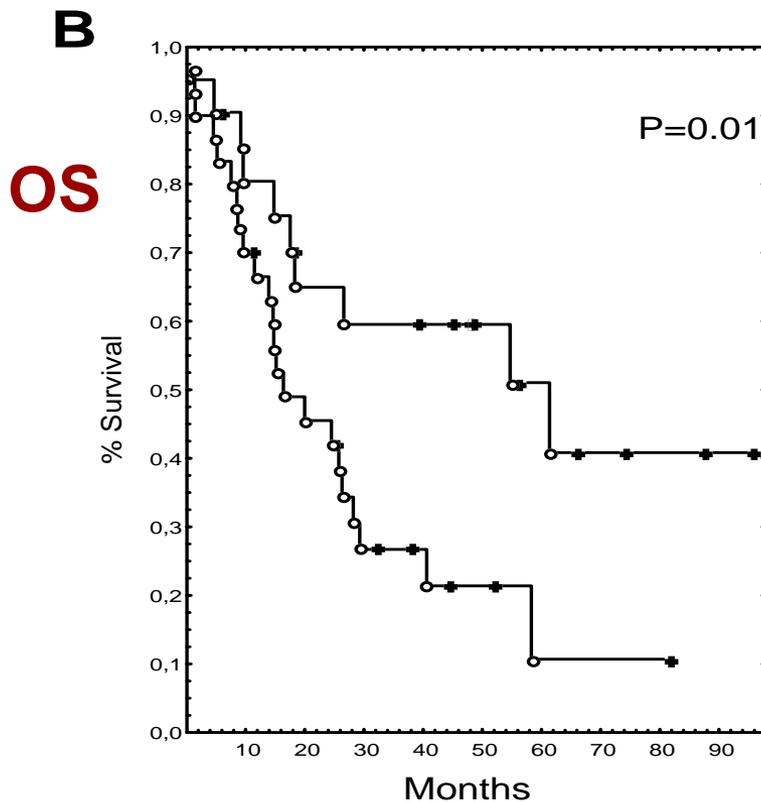
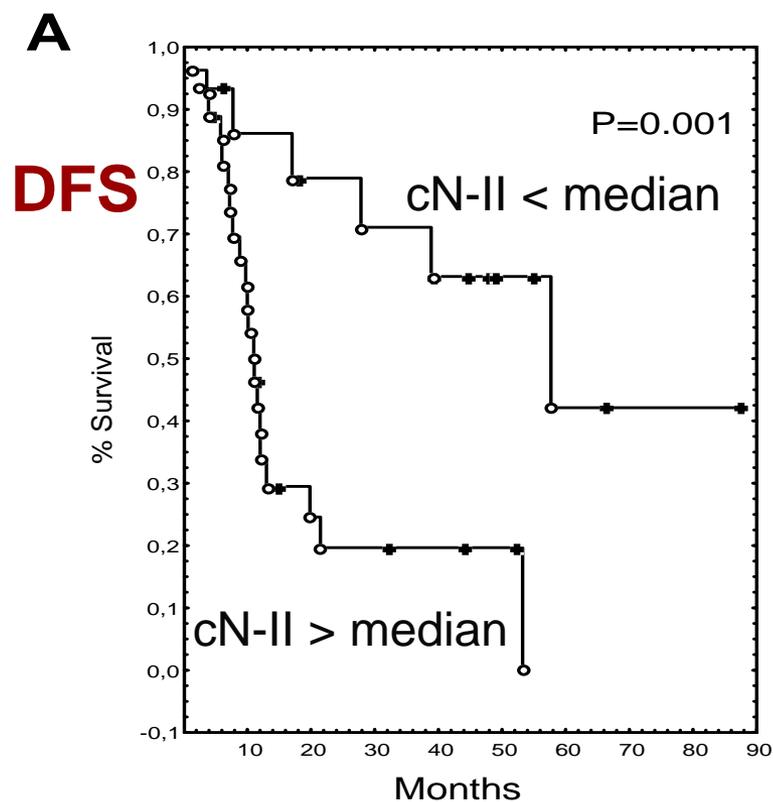
<b>Gene/Protein</b>	<b>In vitro</b>	<b>Cell lines</b>	<b>Transfected cells</b>	<b>Animal models</b>	<b>Clinical samples and patients</b>
SLC29A1/hENT1		[34, 56-60, 66]			[57, 63-65, 67, 68, 135]
SLC29A2/hENT2					[65]
SLC28A1/hCNT1			[61]		
SLC28A2/hCNT2			[62]		
SLC28A3/hCNT3					[69]
ABCC5/MRP5		[76]	[76]		
ABCC4/MRP4			[72]		
NT5C1/cN-I			[133]		
NT5C2/cN-II	[129]	[131]			[130, 134, 135, 137, 138, 140]
NT5C3/cN-III					[137]
cdN					[69, 139]
dCK		[56, 58-60, 87, 104, 105, 107, 109, 110, 112, 131]	[98]	[98]	[69, 82, 113, 136]
CDA		[59, 109, 112]	[124, 126]		[119, 120, 127]
RNRM1		[33, 76, 107, 109, 162, 165, 166]	[33, 76, 168]	[30, 35]	[33, 163, 168-171]
RNRM2		[110]	[146]	[146]	

Malignancy	Patients	Treatment	Gene	Method	Clinical marker	Result	Conclusion
Chronic lymphocytic leukaemia	56	Fludarabine	hCNT3	Quantitative RT-PCR	Complete response rate	High expression: 11% Low expression: 69%	hCNT3 mRNA expression decreases complete response rate and increases risk of disease progression
Acute myeloid leukaemia	122	AraC	dCK	-360 and -201 genotype	2 years disease free survival	-360CG/-201CT and -360GG/-201TT: 30.7% -360CC/-201CC: 23.2%	dCK genotype is associated with outcome from araC treatment
Chronic lymphocytic leukaemia	56	Fludarabine	dCK	Quantitative RT-PCR	Risk of disease progression	Hazard ratio for low expression: 0.48	Decreased dCK mRNA expression increases the risk of disease progression
Acute myeloid leukaemia	108	AraC	cN-II	Quantitative RT-PCR	Disease free survival	High expression: 11 months Low expression: 17.5 months	cN-II mRNA expression decreases disease free survival
Acute myeloid leukaemia	96	AraC	cN-II	Quantitative RT-PCR	Overall survival	Hazard ratio for high expression: 2	cN-II mRNA expression decreases overall survival
Acute myeloid leukaemia	115	AraC	cN-II	Quantitative RT-PCR	Overall survival	Hazard ratio for high expression: 2	cN-II mRNA expression decreases overall survival
Myelodysplastic syndrome		AraC	cN-II	Quantitative RT-PCR	Overall survival	High expression: 15 months Low expression: 22 months	cN-II mRNA expression decreases overall survival

# Predictive value of dCK on Relapse-free survival in AML



# Implication de la cN-II dans la résistance à l'araC - LAM

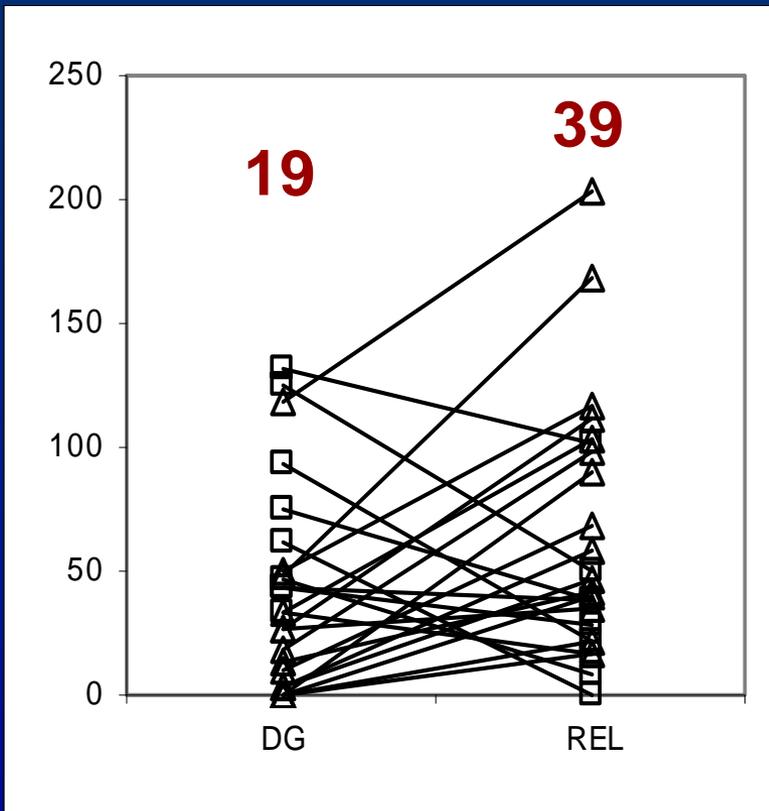


→ Rôle de la cN-II dans la réponse au traitement par cytarabine

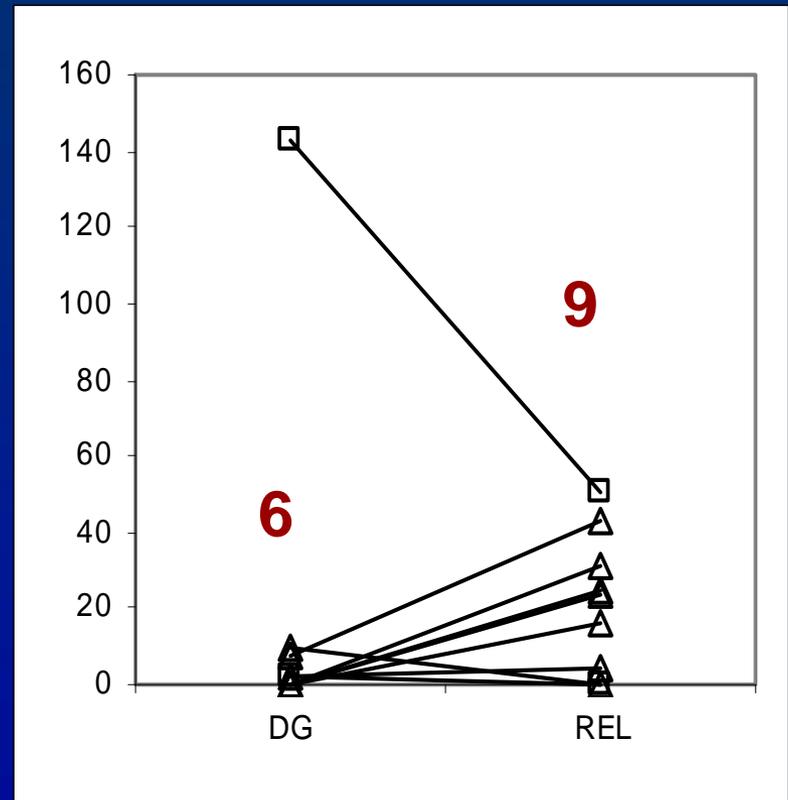
Galmarini CM et al., *Blood*, 2001

# Variations diagnostic/rechute

## cN-II

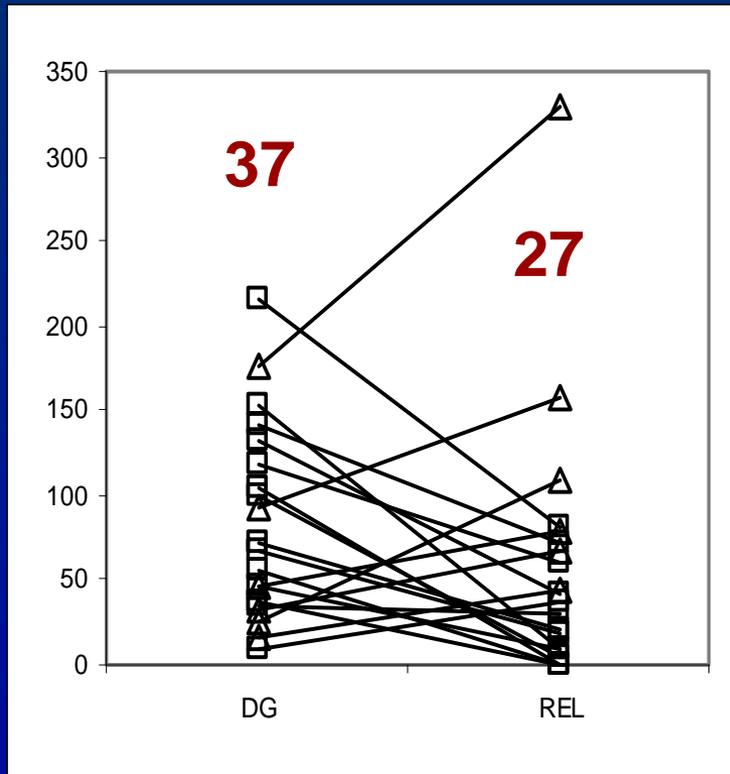


## CDA

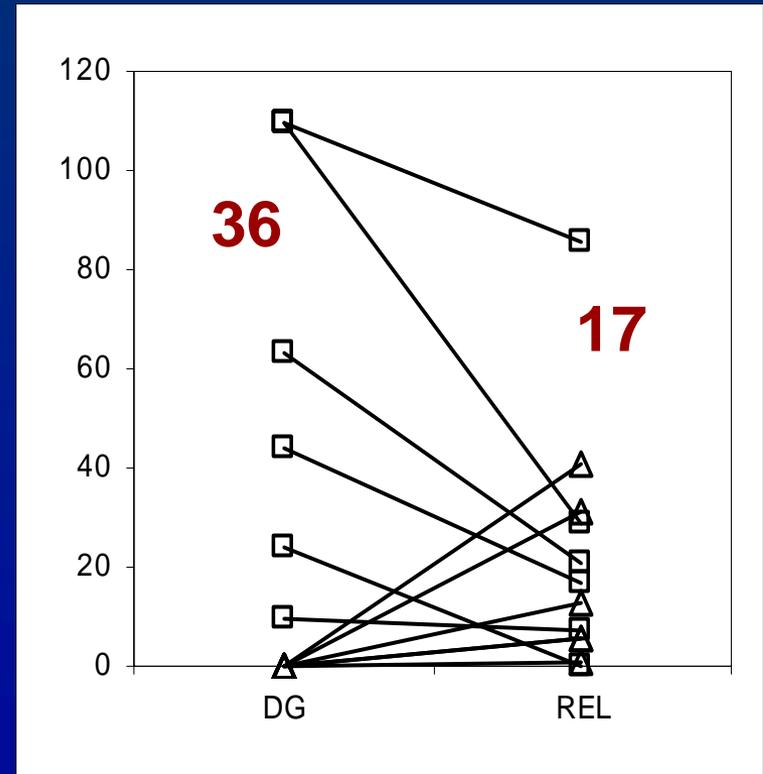


# Variations diagnostic/rechute

## hENT



## dCK



# Facteurs prédictifs de réponse

- Encore beaucoup de travail à faire !
- Approches ciblées ou screening à haut débit
- Difficultés propres à la recherche translationnelle
- Peu d'utilisation des nouvelles méthodes avec les molécules classiques

Comment peut-on faire mieux ?

# Nouvelles stratégies thérapeutiques

- Nouvelles formes galéniques
- Nouveaux agents
- Réversion des mécanismes de résistance

# *Approches galéniques*

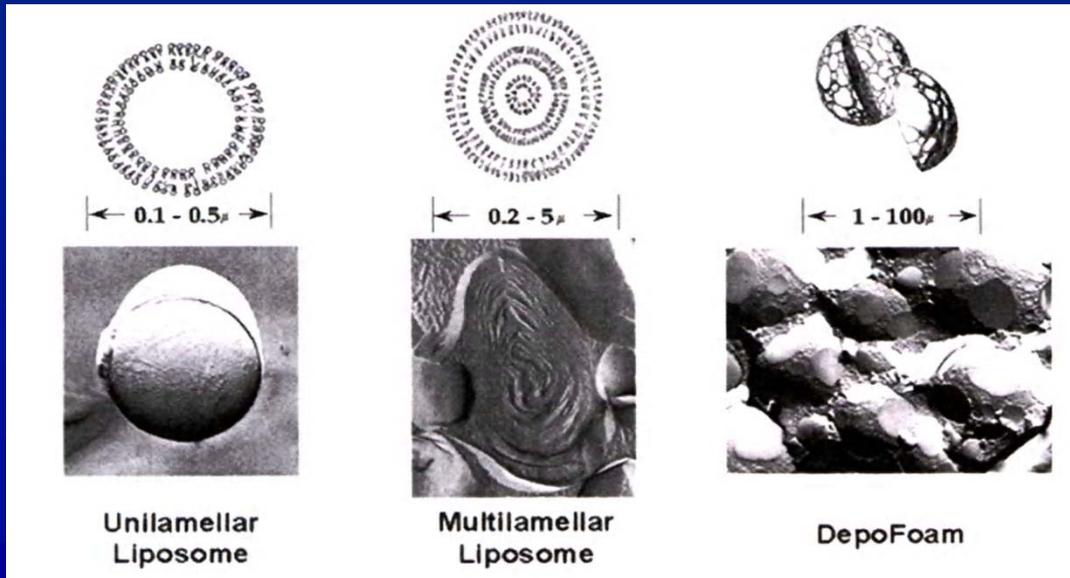
# Vecteurs liposomiaux

Les analogues sont de petites molécules hydrophiles qui diffusent peu à travers la bicouche lipidique.

Les liposomes « améliorés » sont des formulations à contenu augmenté en cholestérole, en glycérophospholipides à longues chaînes, en PEG

# Preparations liposomales

- ✓ Unilamellar liposomes - one lipid bilayer -  $\varnothing$  50-250 nm, large aqueous core well adapted to water-soluble compounds
- ✓ Multilamellar liposomes - concentric lipid bilayers -  $\varnothing$  1-5  $\mu\text{m}$
- ✓ Multivesicular liposomes - nonconcentric lipid bilayers in a « honeycomb » arrangement -  $\varnothing$  1-10  $\mu\text{m}$



# Depocyt: pharmacocinétique améliorée

Approved for intratecal administration

Cytarabine: 10 mg/mL

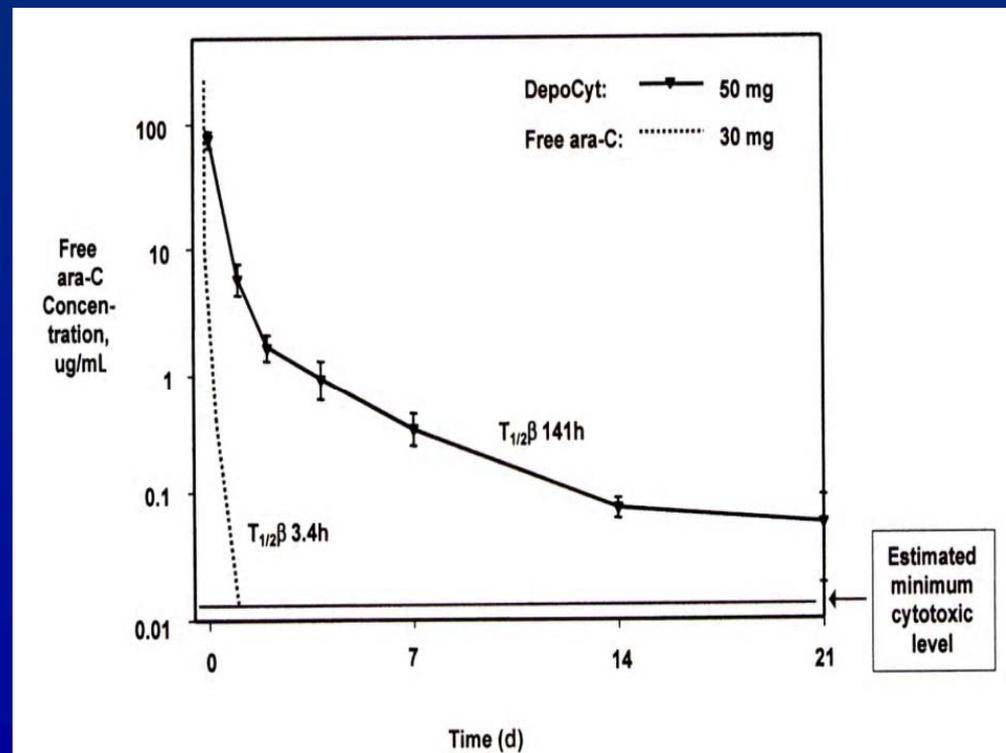
Dioleoylphosphatidylcholine (DOPC); 5.7 mg/mL

Dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG): 1.0 mg/mL

Cholesterol: 4.1 mg/mL

Triolein: 1.2 mg/mL

Longer half-life of compound  
Better encapsulation efficiency  
Better mechanical stability  
Better storage



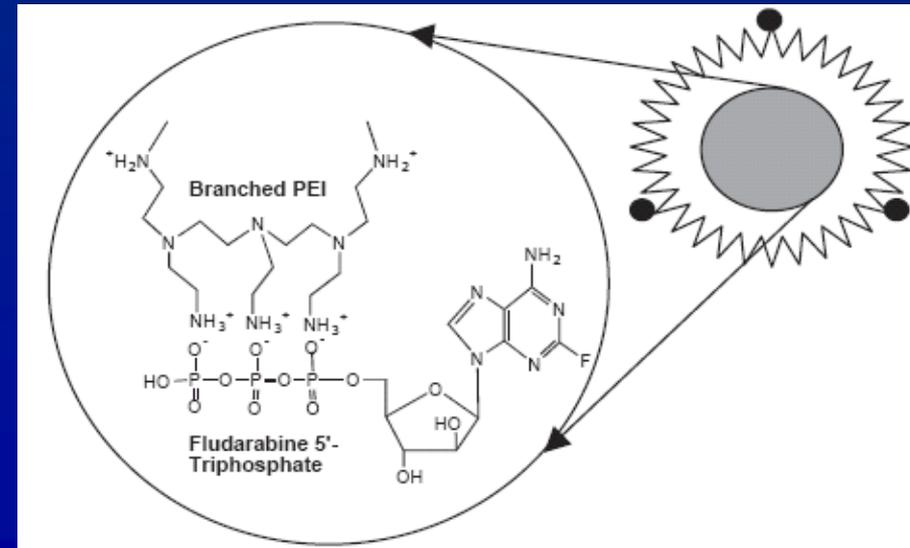
# Formulations non liposomales

## Hydrogels

- ✓ 3D network of hydrophilic polymers
- ✓ Useful for topical or intra-cavity administration

## Nanogel formulations

- ✓ Hydrophilic nanosized particle, 150 nm
- ✓ Ionizable polymer which can bind biomolecules of opposite charge
- ✓ Easily dispersed in water and administrable i.v.
- ✓ Applied to fludarabine triphosphate, bound to polyethylenimine



# Formulations non liposomales

## Microparticules

- ✓ Spherical polymeric particles, capsules or spheres, of 1-250  $\mu\text{m}$
- ✓ Microspheres using natural polymers (gelatin, albumin, chitosan, alginate)

## Nanoparticules

- ✓ Submicronic particles
- ✓ Potential for improve intratumor delivery
- ✓ Based on biodegradable (polyesters,...) or non biodegradable (methacrylate, polyamide) compounds

## Cyclodextrines

- ✓ Form inclusion complexes with guest molecules
- ✓ Reduce the volume required for administration
- ✓ Improve bioavailability for poorly hydrophilic compounds

*Nouveaux composés*

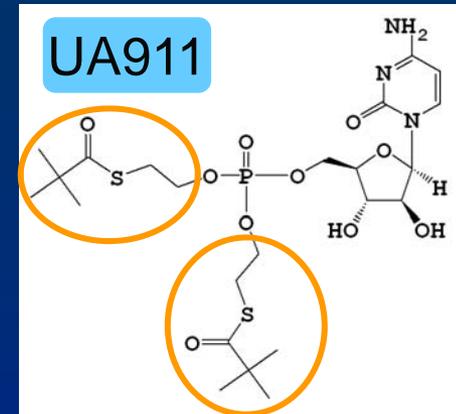
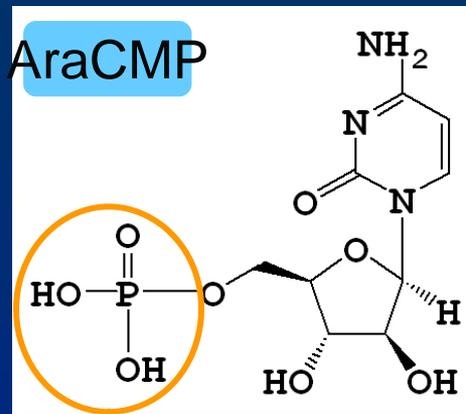
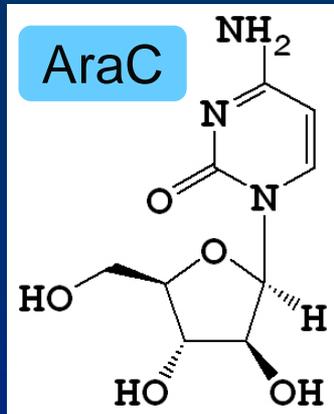
## Peut-on améliorer l'activité des composés existants en les préactivant ?

Les composés actifs connus (araC, gemcitabine,...) nécessitent d'être phosphorylés pour être cytotoxiques.

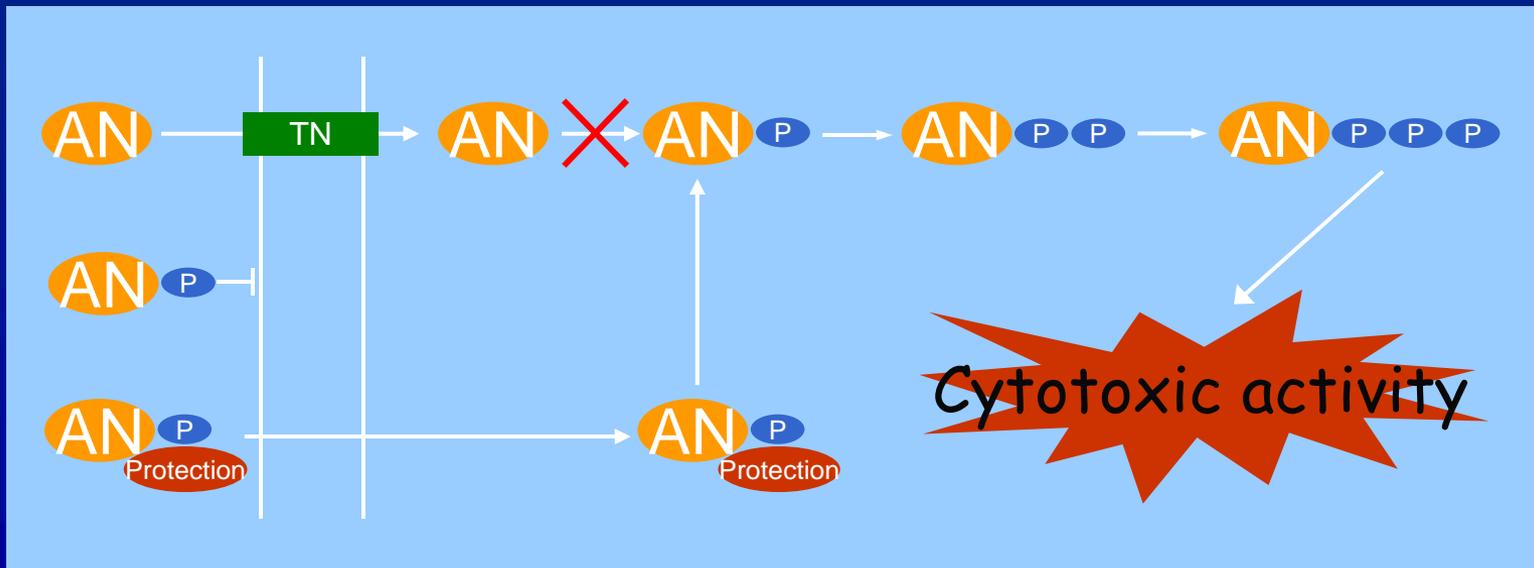
On ne peut pas donner ces formes phosphorylées car elles sont hydrolysées et non transportées.

Les cellules cancéreuses peuvent limiter l'accumulation de formes actives phosphorylées.

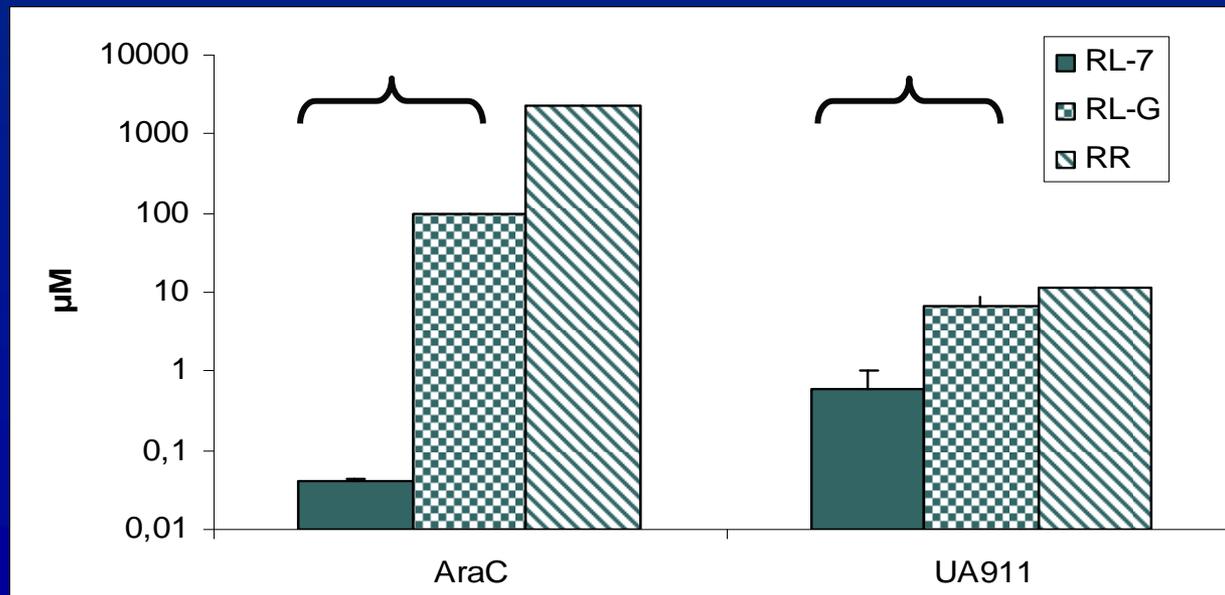
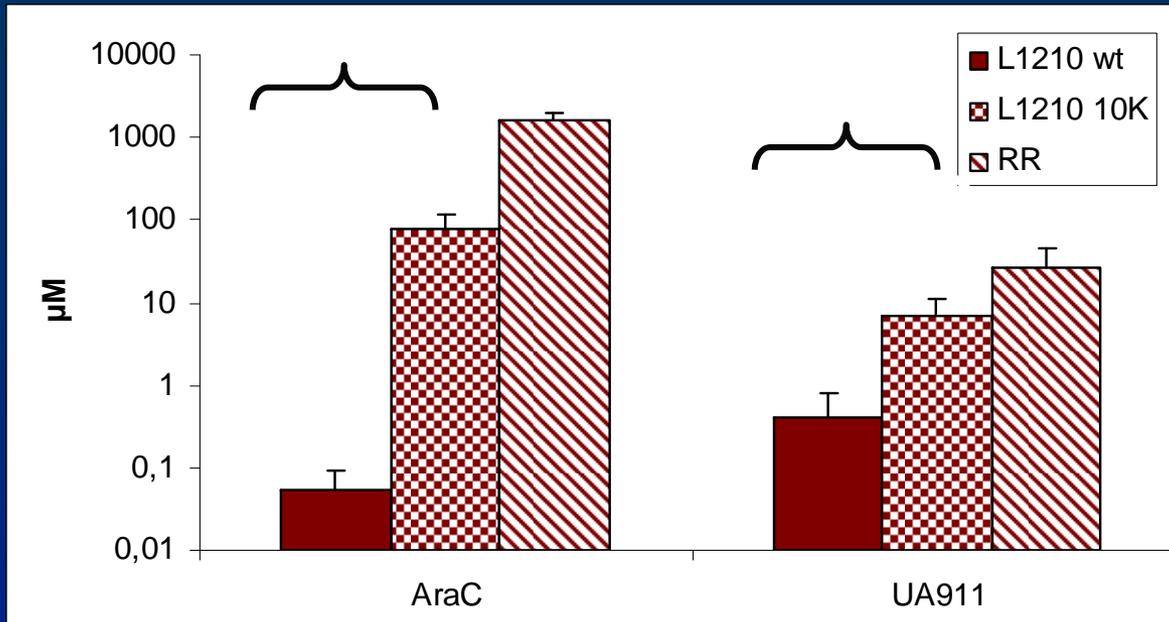
# UA911 - Pronucleotides

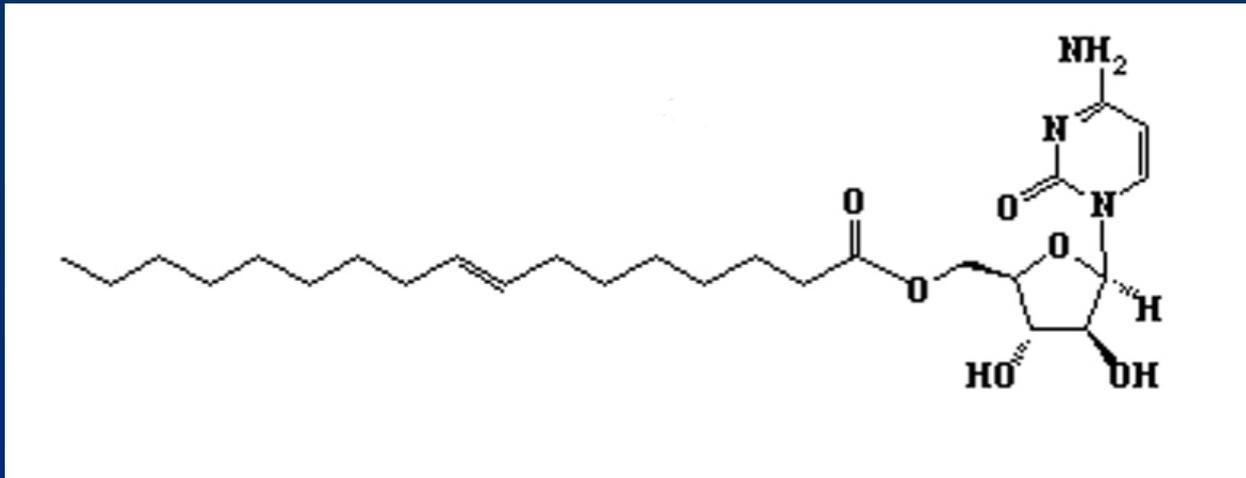


Collaboration with Christian Perigaud, Montpellier

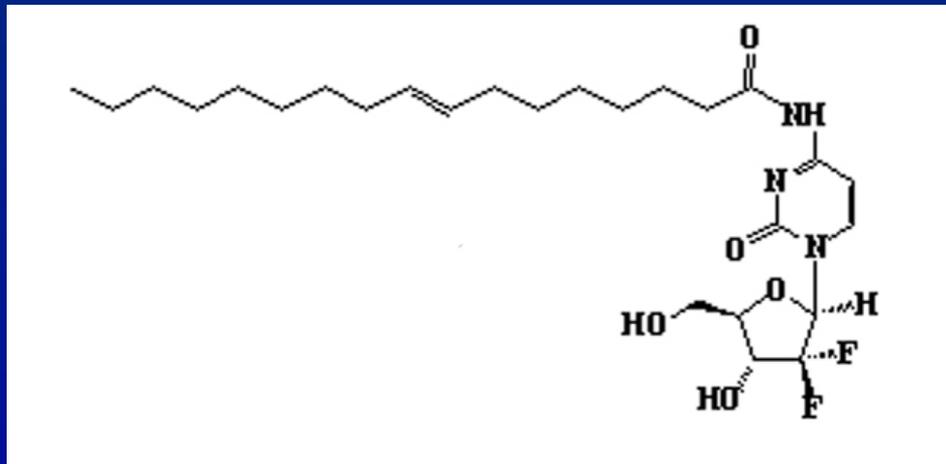


# Sensibilisation de cellules résistantes par l'UA911

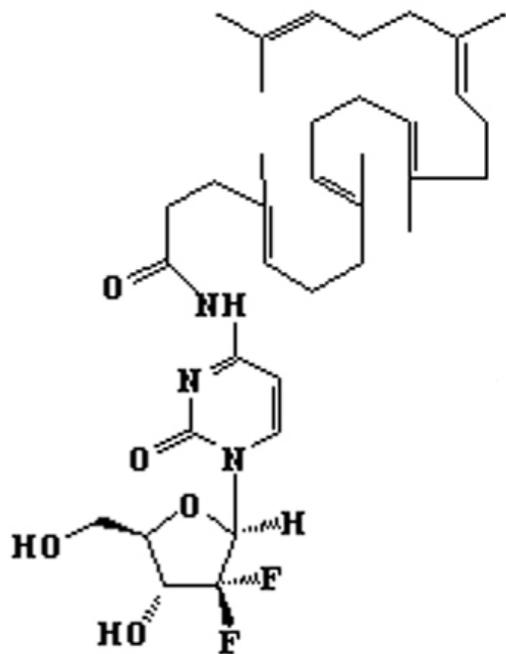




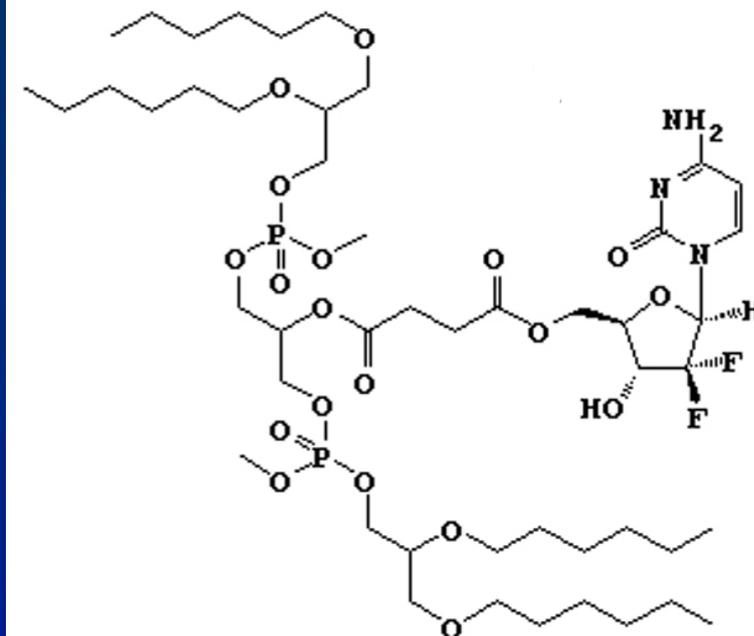
ester of elaidic acid and araC  
(CP-4055) - Elacyt™



ester of elaidic acid and gemcitabine (CP-4125)



4-(N)trisnor  
squalenoyl  
gemcitabine



Cardiolipine bound  
gemcitabine (NEO6002)

*Modification des mécanismes  
de résistance*

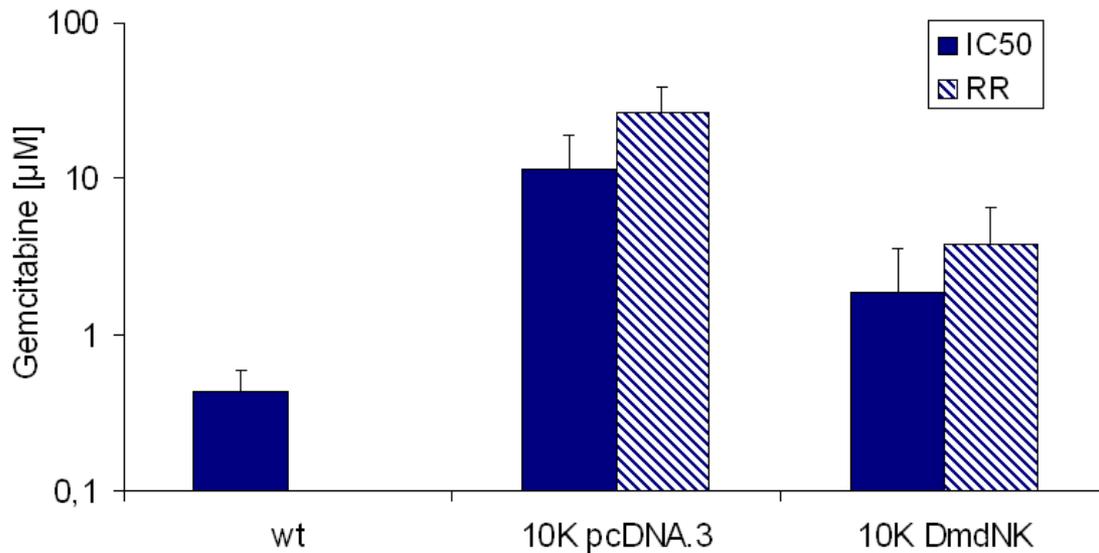
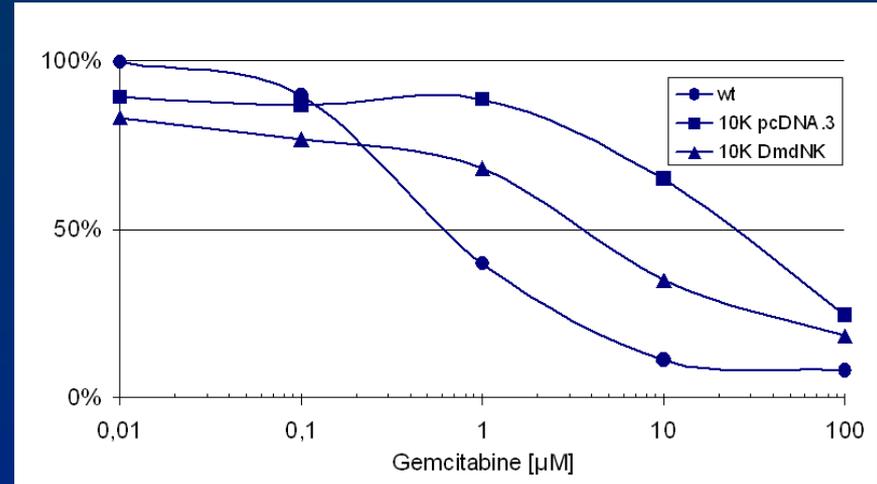
# Strategies to reverse resistance due to dCK deficiency

- *Stimulation de l'expression ou de l'activité de la déoxycytidine kinase*
  - *Stimulation par les analogues eux-mêmes*
  - *Activitateurs (Bryostatine-1)*
  - *Régulation épigénétique du promoteur de la dCK*
- *Thérapie génique*
  - *Transfection de dCk*
  - *Tranfection d'autres kinases telles que la Drosophila nucleoside kinase - DmdNK*

# Messa 10K - Transfection avec la DmdNK



Expression of DmdNK in Messa 10K



Les cellules résistantes à la gemcitabine sont sensibilisées par transfection de la dmdNK.

# Et potentiellement...

Inhibition des enzymes cataboliques : déaminases, nucléotidases

Régulation des pools endogènes

Contrôle du niveau d'expression des cibles

Inhibition des mécanismes de réparation de l'ADN

# Conclusions

- Une vieille famille qui s'enrichit
- Potentiel important pour les associations thérapeutiques
- Des mécanismes d'action relativement bien décrits avec beaucoup de travail à faire sur les facteurs prédictifs et les mécanismes de résistance



# Modèles de résistance

## *Modèles in vitro*

Obtenus par augmentation progressive de la concentration de l'agent de sélection

## *Modèles in vivo*

Obtenus par exposition de souris porteurs de tumeurs transplantées à des doses croissantes d'agent de sélection et réimplantation dans de nouvelles souris, etc.

# Caractérisation des modèles résistants

## *Phénotype de résistance*

Recherche d'une résistance croissance à des molécules similaires

Résistance à des agents non apparentés

## *Etude des mécanismes de résistance*

Analyse par rt-PCR de gènes impliqués dans le transport, le métabolisme, le ciblage

Transport des agents

Etudes protéomiques

# Exemple d'une lignée résistante

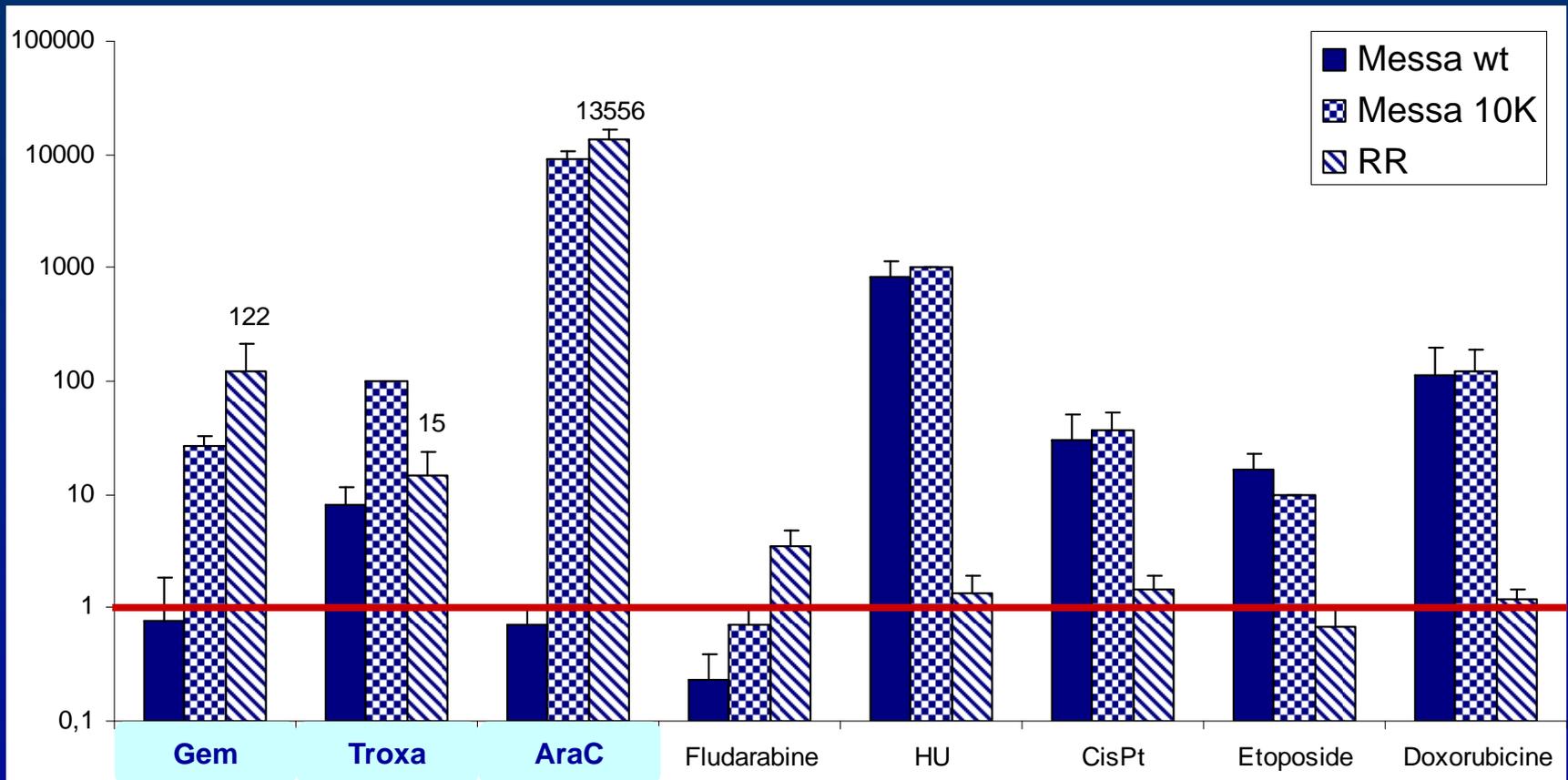
Messa

Leimyosarcome utérin

Exposée à la gemcitabine *in vitro* pour  
une période de 3 mois

Analyse du phénotype et des  
mécanismes

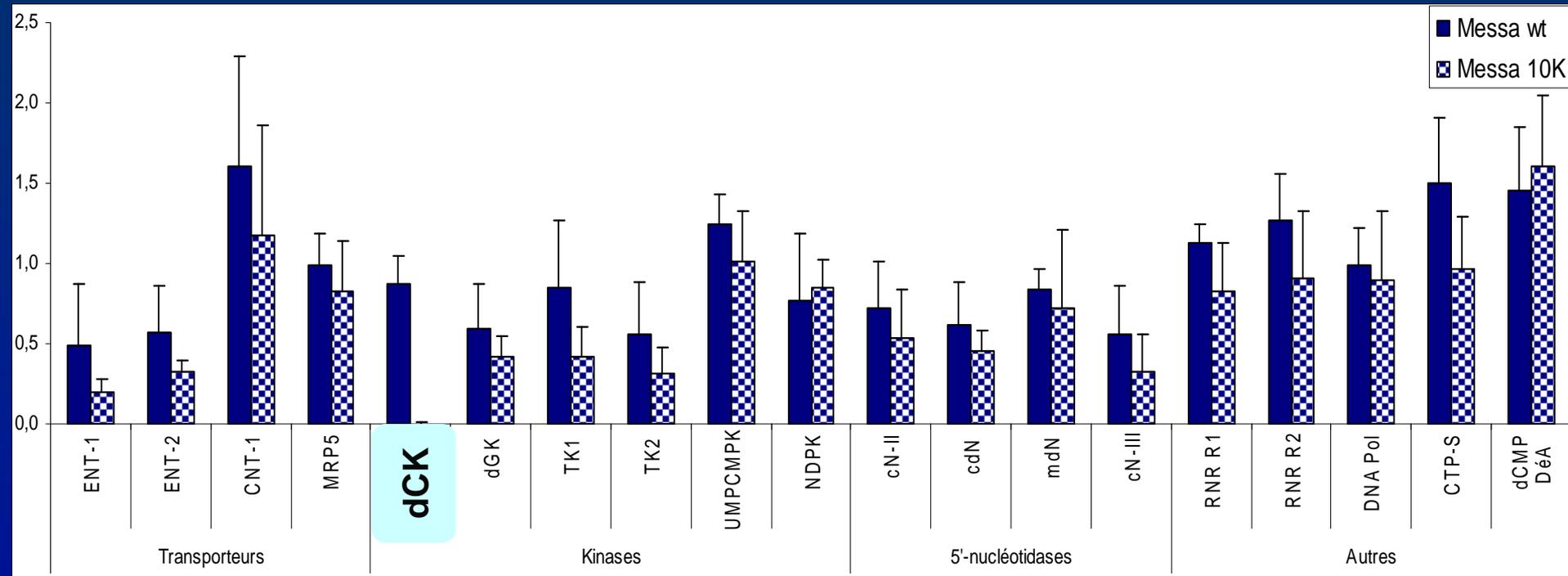
## MTT results



Résistance croisée avec des analogues structuraux

# Messa – Gene expression

RT-PCR analysis in parental and resistant cells



**dCK is undetectable**