

Государственное
бюджетное учреждение
здравоохранения
«Санкт-Петербургский
клинический научно-
практический центр
специализированных видов
медицинской помощи

(онкологический)»
(Санкт-Петербург, Россия)

Частное образовательное
учреждение высшего
образования «Санкт-
Петербургский медико-
социальный институт»
(Санкт-Петербург, Россия)

«Эпигенетические
механизмы регулируют
множество аспектов
биологии опухолей,
от роста и инвазии
до метаболизма
и модуляции иммунного
ответа в микроокружении»

ЭПИГЕНЕТИКА: ВОЗМОЖНОСТИ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ

Н.М. Волков

EPIGENETICS: PERSPECTIVES OF TARGETED THERAPY

Н.М. Волков

Кандидат медицинских наук, ГБУЗ «СПбКНПЦСВМП(о)»;
ЧОУ ВО «Санкт-Петербургский
медико-социальный институт»,

197758, г. Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68а, Лит. А.
SPIN-code: 1605-0256.

N.M. Volkov

Candidate of Medicine, St. Petersburg Clinical Research Center of specialized types
of medical care (Oncology); Saint-Petersburg Medico-Social Institute,
197758, Russia, St. Petersburg, pos. Pesochny, Leningradskaya str., 68a, Lit. A.
SPIN-code: 1605-0256.

Лекция подразумевает теоретическое обоснование роли эпигенетики в регуляции опухолевого роста и функции микроокружения. Описаны предпосылки, определяющие целесообразность терапевтического воздействия на основные эпигенетические сигнальные пути. Представлены некоторые результаты предклинических и клинических исследований в этой области. Обсуждаются перспективы эпигенетических подходов в терапии опухолей.

Ключевые слова: злокачественные опухоли, эпигенетика, терапия, канцерогенез, экспрессия генов.

This lecture presents the theoretic ground for the role of epigenetics in tumor growth regulation and microenvironment function. Background for therapeutic intervention into main epigenetic regulation mechanisms is described. Also some preclinical and clinical research data in this area are presented. Further future perspectives of epigenetic therapies development are discussed.

Key words: malignant tumors, epigenetics, therapy, carcinogenesis, gene expression.

Злокачественные новообразования, как на сегодняшний день уже окончательно выяснилось, – это не только генетическое заболевание. Помимо мутационных перестроек ДНК, эпигенетические механизмы также регулируют множество аспектов биологии опухолей – от опухолевого роста и инвазии до метаболизма и модуляции иммунного ответа в микроокружении. Но в отличие от мутационных изменений в опухолях, которые онкологическая наука на нынешней стадии развития пока не позволяет исправлять, а может лишь использовать специфические уязвимости, возникающие в связи с этими генетическими перестройками, эпигенетические механизмы имеют обратимый характер и могут быть скорректированы специфическими препаратами с целью достижения противоопухолевого эффекта. Более того, как оказалось, модуляция эпигенетических механизмов способна повысить эффективность противоопухолевого иммунного ответа.

И это стало основанием для значительного повышения интереса к эпигенетике в онкологической науке за последние годы.

Эпигенетика определяет то, как генотип организма координированно реагирует на условия среды, и этот ответ может быть отлажен независимо от мутационных изменений в ДНК. Эпигенетические механизмы изменяют структуру хроматина и тем самым определяют дифференциальную экспрессию генов в соответствии с той или иной программой без изменения самой последовательности ДНК, которая остается прежней в процессе развития клетки. Среди прочего, эти механизмы играют определяющую роль и в дифференцировке клеток [1].

Генетические и эпигенетические изменения в опухолях – как бы две стороны одной медали. Зачастую эпигенетические перестройки являются результатом мутации в генах, отвечающих за эпигенетические механизмы, и именно такие мутации наиболее часто выявляются в опухолях [2].

Эпигенетическая регуляция начинается с дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), несущей генетическую информацию, и белков гистонов, которые вместе составляют структурную основу хроматина. Базовая единица хроматина – нуклеосома, представляющая собой участок ДНК в 146 пар оснований, который обвивает октамер из гистоновых белков H2A, H2B, H3 и H4, по два каждого, и линкерного гистона H1. Собственно, хроматин состоит из цепочки выстроенных друг за другом нуклеосом. Причем эпигенетические механизмы регулируют состояние хроматина в том или ином участке, придавая ему открытое или закрытое состояние, определяющее, соответственно, возможность или невозможность транскрипции и, таким образом, экспрессии находящихся на этом участке генов.

Основные эпигенетические механизмы, регулирующие экспрессию генов, включают различные модификации самой ДНК и белков гистонов, а также пре- и посттранскрипционные воздействия за счет некодирующих рибонуклеиновых кислот (РНК) [3].

Основная эпигенетическая модификация ДНК и наиболее известный эпигенетический маркер – это метилирование, при котором цитозин (С) в составе динуклеотида цитозин-фосфат-гуанин (cytosine-phosphate-guanine, CpG) ковалентно связывается с метильной группой (-CH₃), что приводит к образованию 5-метилцитозина. Этот процесс катализируется ферментами ДНК метилтрансферазами (DNMT) [4]. Фрагменты ДНК, богатые CpG-динуклеотидами, называемые CpG-островками (CpG islands), расположенные в сайтах инициации транскрипции и промоторах генов, в норме в основном деметилированы. В то же время геном в целом достаточно беден этими динуклеотидами и наоборот, гиперметилирован, что имеет существенное значение для поддержания стабильности хромосом [5]. Таким образом, гипо- и

гиперметилирование в различных регионах ДНК сосуществует в геноме и может приводить к различным последствиям для фенотипа клетки. Глобальное снижение уровня метилирования часто обнаруживается в некоторых типах опухолей и связано с геномной нестабильностью, повреждением ДНК и реактивацией транспозонов и ретровирусов, персистирующих в геноме [6]. Также гипометилирование протоонкогенов приводит к активации канцерогенеза и метастазирования [7]. Известно, что мутации в ДНК-метилтрансферазах часто приводят к развитию деметилирования ДНК и и злокачественной трансформации клеток [8]. С другой стороны, гиперметилирование и, как результат, подавление экспрессии антионкогенов (таких как, например, BRCA1, BCL2 и др.), обнаруживается во многих опухолях и является фактором злокачественной трансформации клеток [9]. Таким образом, модификации ДНК, вовлеченные в развитие опухолей, разнообразны и не могут быть интерпретированы вне молекулярного контекста, а это означает, что универсальные подходы к коррекции этого механизма эпигенетической регуляции в опухолях с терапевтической целью малоперспективны.

Другой важнейший элемент эпигенетической регуляции – гистоны. Состояние гистонов в нуклеосоме, а именно те или иные их эпигенетические посттрансляционные модификации, определяет конденсированное или неконденсированное состояние хроматина и, соответственно, подавление или активацию экспрессии генов, находящихся в соответствующем участке ДНК [10]. Эти модификации представляют собой присоединение различных химических групп к хвостам гистонов. Наиболее типичны метилирование и ацетилирование, но эти модификации весьма разнообразны: наблюдаются фосфорилирование, убиквитинилирование, рибозилирование и другие [11].

Ацетилирование гистонов чаще всего потенцирует открытое состояние хроматина и активацию экспрессии генов, в то же время метилирование этих белков может вызывать противоположные эффекты в зависимости от позиции модификации и числа присоединенных метильных групп. Процессы формирования паттерна модификаций гистонов или, как его называют в литературе, гистонового кода, происходят при участии различных ферментов, – как привносящих химические группы, так и удаляющих их, например, гистоновых метилтрансфераз и деметилаз, ацетилтрансфераз и деацетилаз. Всего в регуляции состояния хроматина участвуют более 700 различных белков [12]. Посттрансляционные модификации гистонов являются важнейшими регуляторами роста и развития клеток, клеточного цикла, внутриклеточных сигнальных каскадов и метаболизма; при опухолях показана связь aberrантных модификаций гистонов с прогнозом течения заболевания, что делает их привлекательной мишенью для поиска терапевтических подходов [13].

В последнее время все больше внимания уделяется еще одному элементу эпигенетической регуляции – некодирующим рибонуклеиновым кислотам (нк-РНК), то есть РНК, не несущим информации о аминокислотной последовательности белка. Некодирующие РНК классифицируются в зависимости от длины на микро-РНК (ми-РНК, от 19 до 31 пар оснований) и длинные некодирующие РНК (более 200 пар оснований). Как бы это ни казалось неожиданным, в клетках транскрибируется существенно большая часть генома, чем потом подвергается трансляции и формирует белки. На долю некодирующих РНК приходится около 80%. Регулирующая роль нк-РНК реализуется на разных уровнях: модуляции структуры хроматина, регуляции транскрипции и посттранскрипционных модификаций [14]. Причем нк-РНК способны осуществлять свою функцию через взаимодействие как с ДНК, другими РНК, так и с белками. Наряду с метилированием ДНК и модификациями гистонов было показано вовлечение нк-РНК в сложную регуляторную сеть проонкогенных и антионкогенных факторов. Известна aberrантная экспрессия некоторых ми-РНК при различных опухолях [15, 16].

Эпигенетический портрет опухоли определяет основной фенотип клеток, создающий условия для реализации генетических альтераций и способствующий канцерогенезу. Однако в отличие от изменений генома в опухолевой клетке, эпигенетические изменения обратимы и могут быть скорректированы, и это открывает огромное поле для изучения новых терапевтических подходов в противоопухолевом лечении [17]. На сегодняшний день разрабатывается целый ряд эпигенетических препаратов, которые воздействуют на структуру хроматина, процессы регуляции транскрипции генов и посттранскрипционной модификации, в основном, блокируя ферменты, участвующие в этих процессах. В первую очередь результатом их применения становится реактивация эпигенетически подавленной экспрессии антионкогенов [12]. Изучаемые эпигенетические подходы к терапии направлены на восстановление «нормального» эпигенетического портрета клеток, что должно вернуть их к «нормальному» фенотипу.

Точкой приложения основных эпигенетических препаратов являются ферменты, участвующие в формировании и поддержании регуляторных модификаций. Наиболее изучены стратегии блокирования ДНК метилтрансфераз и гистоновых деацетилаз. Собственно, на сегодняшний день в мире уже зарегистрированы для клинического применения несколько препаратов из группы деметилирующих агентов (ингибиторов DNMT) – 5-азациитидин и децитабин для лечения миелодиспластического синдрома и острого миелоидного лейкоза, а также целый ряд ингибиторов гистоновых деацетилаз: вориностат, ромидепсин и белиностат для лечения Т-клеточных лимфом и панобиностат для лечения множественной миеломы. Применение этих препаратов приводит к остановке

деления злокачественных клеток и клеточной смерти [9]. Однако исследование применения этих препаратов в монорежиме при солидных опухолях не принесло желаемого результата.

Некодирующие РНК также изучаются как мишень для лекарственного воздействия. Причем исследуются подходы как к блокированию гиперэкспрессированных нк-РНК, так и к внесению извне гипоекспрессированных или генетически измененных регуляторных молекул с целью восстановления экспрессионного профиля клеток [18, 19]. Например, было обнаружено, что экспрессия семейства миРНК MiR-34 подавлена при широком спектре опухолей, что приводит к нарушению регуляции ряда генов, ответственных за контроль клеточного цикла и пролиферации, – таких как MYC [20]. Был синтезирован аналог этой ми-РНК MRX34, который в предклинических исследованиях вводили с использованием нанотехнологических средств доставки мышам с ксенографтами колоректального рака, что привело к развитию противоопухолевого эффекта в виде уменьшения опухоли и метастазов [21].

Основные перспективы эпигенетической терапии при солидных опухолях связывают с комбинированным применением их с цитостатиками, таргетными препаратами и иммунотерапией [3]. Основной проблемой противоопухолевой лекарственной терапии является резистентность, как первичная, так и приобретенная. Причем она может быть связана как с геномными факторами, так и с изменением экспрессионного профиля клетки в процессе приспособления к внешнему воздействию. Один из потенциальных путей реверсии резистентности – это коррекция эпигеномного профиля.

Уже несколько клинических исследований изучали комбинации ингибиторов HDAC и DNMT со стандартными применяемыми в клинике противоопухолевыми препаратами. Например, совместное применение панобиностата и децитабина с темозоломидом при резистентной к стандартному лечению меланоме показало существенные клинические результаты [22]. Комбинация вориностата с бевацизумабом имела преимущество в эффективности по сравнению с монотерапией при метастатическом раке почки [23].

Особый интерес в онкологической науке сегодня, в период расцвета иммунотерапии опухолей, проявляется также к комбинации эпигенетической терапии с ингибиторами иммунных контрольных точек. Как оказалось, применение ингибиторов HDAC и DNMT способно потенцировать иммунный ответ за счет разнообразных механизмов. Так, например, происходит деблокирование экспрессии многих генов, среди которых и персистирующие в геноме ретровирусы, которые активируют клеточные механизмы противовирусной защиты и усиливают презентацию антигенов, в т. ч. и нео-антигенов. Кроме того, эпигенетическое перепрограммирование способно

напрямую изменить функциональную активность Т-лимфоцитов и способствовать их выходу из состояния истощения, которое, собственно, и является результатом эпигенетической программы, запускаемой в ответ на длительную стимуляцию антигеном, и ограничивает их потенциал [24]. В настоящее время проводится ряд исследований комбинаций ингибиторов HDAC и DNMT с современными ингибиторами иммунных контрольных точек PD-1/PD-L1 и CTLA-4.

Действие эпигенетических препаратов способно затрагивать множество биологических процессов, и трудно оценить все изменения, которые происходят при этом в совокупности [25]. Так, применение ингибиторов HDAC вызывает как повышение, так и

снижение экспрессии сотен генов в клетке. И осмысление механизмов их действия на уровне генома и протеома еще впереди. Но поскольку злокачественные опухоли имеют комплексную многофакторную природу, при которой различные каскады могут быть как подавлены, так и активированы либо в процессе канцерогенеза, либо в ответ на проводимое лечение, постольку понимание всего процесса станет возможным только при совокупной оценке всех факторов, включая эпигеном, микроокружение и метаболизм опухолей. И только такая оценка позволит сделать принципиальный прорыв в развитии эффективного индивидуализированного противоопухолевого лечения.

Список литературы

1. Haig D. The (dual) origin of epigenetics // Cold Spring Harb Symp Quant Biol. – 2004. – Т. 69. – С. 67–70.
2. You J.S., Jones P.A. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? // Cancer Cell. – 2012. – Т. 22, № 1. – С. 9–20.
3. Miranda Furtado C.L., Dos Santos Luciano M.C., Silva Santos R.D., Furtado G.P., Moraes M.O., Pessoa C. Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment // Epigenetics. – 2019. – Т. 14, № 12. – С. 1164–1176.
4. Bestor T.H. The DNA methyltransferases of mammals // Hum Mol Genet. – 2000. – Т. 9, № 16. – С. 2395–402.
5. Deaton A.M., Bird A. CpG islands and the regulation of transcription // Genes Dev. – 2011. – Т. 25, № 10. – С. 1010–22.
6. Robertson K.D. DNA methylation, methyltransferases, and cancer // Oncogene. – 2001. – Т. 20, № 24. – С. 3139–55.
7. Hur K., Cejas P., Feliu J., Moreno-Rubio J., Burgos E., Boland C.R., Goel A. Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) leads to activation of proto-oncogenes in human colorectal cancer metastasis // Gut. – 2014. – Т. 63, № 4. – С. 635–46.
8. Zhang W., Xu J. DNA methyltransferases and their roles in tumorigenesis // Biomark Res. – 2017. – Т. 5. – С. 1.
9. Bennett R.L., Licht J.D. Targeting Epigenetics in Cancer // Annu Rev Pharmacol Toxicol. – 2018. – Т. 58. – С. 187–207.
10. Barth T.K., Imhof A. Fast signals and slow marks: the dynamics of histone modifications // Trends Biochem Sci. – 2010. – Т. 35, № 11. – С. 618–26.
11. Tweedie-Cullen R.Y., Brunner A.M., Grossmann J., Mohanna S., Sichau D., Nanni P., Panse C., Mansuy I.M. Identification of combinatorial patterns of post-translational modifications on individual histones in the mouse brain // PLoS One. – 2012. – Т. 7, № 5. – С. e36980.
12. Bates S.E. Epigenetic Therapies for Cancer // N Engl J Med. – 2020. – Т. 383, № 7. – С. 650–663.
13. Shanmugam M.K., Arfuso F., Arumugam S., Chinnathambi A., Jinsong B., Warriar S., Wang L. Z., Kumar A.P., Abn K.S., Setbi G., Lakshmanan M. Role of novel histone modifications in cancer // Oncotarget. – 2018. – Т. 9, № 13. – С. 11414–11426.
14. Chen J., Miao Z., Xue B., Shan Y., Weng G., Shen B. Long Non-coding RNAs in Urologic Malignancies: Functional Roles and Clinical Translation // J Cancer. – 2016. – Т. 7, № 13. – С. 1842–1855.
15. Hernandez R., Sanchez-Jimenez E., Melguizo C., Prados J., Rama A.R. Downregulated microRNAs in the colorectal cancer: diagnostic and therapeutic perspectives // BMB Rep. – 2018. – Т. 51, № 11. – С. 563–571.
16. Memari F., Joneidi Z., Taberi B., Aval S.F., Rooftan A., Zarghami N. Epigenetics and Epi-miRNAs: Potential markers/therapeutics in leukemia // Biomed Pharmacother. – 2018. – Т. 106. – С. 1668–1677.
17. Sharma S., Kelly T.K., Jones P.A. Epigenetics in cancer // Carcinogenesis. – 2010. – Т. 31, № 1. – С. 27–36.
18. Inamura K. Major Tumor Suppressor and Oncogenic Non-Coding RNAs: Clinical Relevance in Lung Cancer // Cells. – 2017. – Т. 6, № 2.
19. Ji W., Sun B., Su C. Targeting MicroRNAs in Cancer Gene Therapy // Genes (Basel). – 2017. – Т. 8, № 1.
20. Farooqi A.A., Tabassum S., Ahmad A. MicroRNA-34a: A Versatile Regulator of Myriads of Targets in Different Cancers // Int J Mol Sci. – 2017. – Т. 18, № 10.
21. Tazawa H., Tsuchiya N., Izumiya M., Nakagama H. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2007. – Т. 104, № 39. – С. 15472–7.
22. Xia C., Leon-Ferre R., Laux D., Deutsch J., Smith B.J., Frees M., Milhem M. Treatment of resistant metastatic melanoma using sequential epigenetic therapy (decitabine and panobinostat) combined with chemotherapy (temozolomide) // Cancer Chemother Pharmacol. – 2014. – Т. 74, № 4. – С. 691–7.
23. Pili R., Liu G., Chintala S., Verbeul H., Rehman S., Attwood K., Lodge M.A., Wahl R., Martin J.I., Miles K.M., Paesante S., Adelaiye R., Godoy A., King S., Zwiebel J., Carducci M.A. Combination of the histone deacetylase inhibitor

vorinostat with bevacizumab in patients with clear-cell renal cell carcinoma: a multicentre, single-arm phase I/II clinical trial // *Br J Cancer*. – 2017. – Т. 116, № 7. – С. 874–883.

24. Jones P.A., Obtani H., Chakravarthy A., De Carvalho D.D. Epigenetic therapy in immune-oncology // *Nat Rev Cancer*. – 2019. – Т. 19, № 3. – С. 151–161.

25. Yang A.S., Yang B.J. The failure of epigenetic combination therapy for cancer and what it might be telling us about DNA methylation inhibitors // *Epigenomics*. – 2016. – Т. 8, № 1. – С. 9–12.

References

1. Haig D. The (dual) origin of epigenetics. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 2004; 69: 67-70. Doi: 10.1101/sqb.2004.69.67.

2. You J.S., Jones P.A. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer cell*. 2012;22(1):9-20. Doi: 10.1016/j.ccr.2012.06.008.

3. Miranda Furtado C.L., Dos Santos Luciano M.C., Silva Santos R.D., Furtado G.P., Moraes M.O., Pessoa C. Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment. *Epigenetics*. 2019; 14(12): 1164-76. Doi: 10.1080/15592294.2019.1640546.

4. Bestor T.H. The DNA methyltransferases of mammals. *Human molecular genetics*. 2000; 9(16): 2395-402. Doi: 10.1093/hmg/9.16.2395.

5. Deaton A.M., Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & development*. 2011; 25(10): 1010-22. Doi: 10.1101/gad.2037511.

6. Robertson K.D. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene*. 2001; 20(24): 3139-55. Doi: 10.1038/sj.onc.1204341.

7. Hur K., Cejas P., Feliu J., Moreno-Rubio J., Burgos E., Boland C.R., et al. Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) leads to activation of proto-oncogenes in human colorectal cancer metastasis. *Gut*. 2014; 63(4): 635-46. Doi: 10.1136/gutjnl-2012-304219.

8. Zhang W., Xu J. DNA methyltransferases and their roles in tumorigenesis. *Biomarker research*. 2017; 5: 1. Doi: 10.1186/s40364-017-0081-z.

9. Bennett R.L., Licht J.D. Targeting Epigenetics in Cancer. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2018; 58: 187-207. Doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010716-105106.

10. Barth T.K., Imbof A. Fast signals and slow marks: the dynamics of histone modifications. *Trends in biochemical sciences*. 2010; 35(11): 618-26. Doi: 10.1016/j.tibs.2010.05.006.

11. Tweedie-Cullen R.Y., Brunner A.M., Grossmann J., Mohanna S., Sichau D., Nanni P., et al. Identification of combinatorial patterns of post-translational modifications on individual histones in the mouse brain. *PloS one*. 2012; 7(5): e36980. Doi: 10.1371/journal.pone.0036980.

12. Bates S.E. Epigenetic Therapies for Cancer. *The New England journal of medicine*. 2020; 383(7): 650-63. Doi: 10.1056/NEJMra1805035.

13. Shanmugam M.K., Arfuso F., Arumugam S., Chinnathambi A., Jinsong B., Warriar S., et al. Role of novel histone modifications in cancer. *Oncotarget*. 2018; 9(13): 11414-26. Doi: 10.18632/oncotarget.23356.

14. Chen J., Miao Z., Xue B., Shan Y., Weng G., Shen B. Long Non-coding RNAs in Urologic Malignancies: Functional Roles and Clinical Translation. *Journal of Cancer*. 2016; 7(13): 1842-55. Doi: 10.7150/jca.15876.

15. Hernandez R., Sanchez-Jimenez E., Melguizo C., Prados J., Rama A.R. Downregulated microRNAs in the colorectal cancer: diagnostic and therapeutic perspectives. *BMB reports*. 2018; 51(11): 563-71. U.

16. Memari F., Joneidi Z., Taberi B., Aval S.F., Rooitani A., Zarghami N. Epigenetics and Epi-miRNAs: Potential markers/therapeutics in leukemia. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2018; 106: 1668-77. Doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.133.

17. Sharma S., Kelly T.K., Jones P.A. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 2010; 31(1): 27-36. Doi: 10.1093/carcin/bgp220.

18. Inamura K. Major Tumor Suppressor and Oncogenic Non-Coding RNAs: Clinical Relevance in Lung Cancer. *Cells*. 2017; 6(2). Doi: 10.3390/cells6020012.

19. Ji W., Sun B., Su C. Targeting MicroRNAs in Cancer Gene Therapy. *Genes*. 2017; 8(1). Doi: 10.3390/genes8010021.

20. Farooqi A.A., Tabassum S., Ahmad A. MicroRNA-34a: A Versatile Regulator of Myriads of Targets in Different Cancers. *International journal of molecular sciences*. 2017; 18(10). Doi: 10.3390/ijms18102089.

21. Tazawa H., Tsuchiya N., Izumiya M., Nakagama H. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007; 104(39): 15472-7. Doi: 10.1073/pnas.0707351104.

22. Xia C., Leon-Ferre R., Laux D., Deutsch J., Smith B.J., Frees M., et al. Treatment of resistant metastatic melanoma using sequential epigenetic therapy (decitabine and panobinostat) combined with chemotherapy (temozolomide). *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2014; 74(4): 691-7. Doi: 10.1007/s00280-014-2501-1.

23. Pili R., Liu G., Chintala S., Verbeul H., Rebman S., Attwood K., et al. Combination of the histone deacetylase inhibitor vorinostat with bevacizumab in patients with clear-cell renal cell carcinoma: a multicentre, single-arm phase I/II clinical trial. *British journal of cancer*. 2017; 116(7): 874-83. Doi: 10.1038/bjc.2017.33.

24. Jones P.A., Obtani H., Chakravarthy A., De Carvalho D.D. Epigenetic therapy in immune-oncology. *Nature reviews Cancer*. 2019; 19(3): 151-61. Doi: 10.1038/s41568-019-0109-9.

25. Yang A.S., Yang B.J. The failure of epigenetic combination therapy for cancer and what it might be telling us about DNA methylation inhibitors. *Epigenomics*. 2016; 8(1): 9-12. Doi: 10.2217/epi.15.94.