

Nowości w badaniach *in vitro* oraz
doświadczenia z nowymi lekami w szpiczaku
mnogim – doniesienia ze spotkania
American Society of Hematology 2008

Marcin Majka

*Zakład Transplantologii
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
Kraków*

Nowe leki

Inhibitory deacetylazy histonowej

**Inhibitory promujące hiperacetylację histonów,
wpływające na czynniki transkrypcyjne i szlaki
sygnałowe przez co przyczyniają się do indukcji
apoptozy w komórkach nowotworowych**

Kwas valpronowy (Valproic acid VPA)

- Powoduje zahamowanie proliferacji
- 48 godzinna inkubacja komórek MM z VPA w stężeniu 1mM wywołuje apoptozę 40 % komórek nowotworowych
- VPA hamuje komórki w fazie G_0/G_1 (49 % do 85 %) i zmniejsza ilość komórek w fazie S (39 % do 6 %)
- Zwiększona zostaje acetylacja histonów oraz poziom p21, przy zmniejszonym poziomie cykliny D1
- Subapoptotyczne dawki VPA wpływają na zmniejszenie wydzielania czynnika wzrostu śróbłonków

Inhibitor HSP90 NVP-AUY922 i oraz inhibitory acetylacji HDACs NVP-LBH589 i SAHA

- Zastosowanie kombinacji inhibitorów zwiększało liczbę komórek apoptotycznych z 12% dla NVP-AUY922 i 22% dla SAHA do 41% gdy inhibitory zostały zastosowane razem
- Barwienia wewnątrzkomórkowe wykazały spadek ekspresji fosforylowanej formy kinazy AKT oraz ERK a także zmniejszenie całkowitego poziomu ekspresji kinazy AKT

KD5170

- KD5170 hamuje proliferację zarówno linii MM jak i komórek CD138+ oraz indukuje ich apoptozę
- Powoduje zwiększenie acetylacji histonów oraz aktywację caspazy-3, -8 i -9
- Powoduje utratę potencjału błon mitochondrialnych i uwalnianie czynników proapoptotycznych takich jak cytochrom c czy smac
- Indukuje stres oksydacyjny co powoduje fragmentację DNA i indukcję apoptozy
- Kombinacja KD5170 z bortezomibem czy TNF powoduje synergistyczna indukcję apoptozy w komórek szpiczakowych
- Wzrost komórek MM w modelu mysim jest silnie zahamowany przez as significantly inhibited ($1401 \text{ mm}^3 \pm 596$ versus $442 \text{ mm}^3 \pm 221$; $P = .009$) i zwiększa długość przeżycia zwierząt doświadczalnych (9 days and 17.5 days; $P = .0095$)

Inhibitory HSP90

Inhibitory hamujące interakcje pomiędzy białkiem HSP90 a białkami targetowymi co powoduje degradację białek docelowych

Apogossypolone (ApoG2)

- Nowy inhibitor HSP90 Apogossypolone (ApoG2), pochodna polifenolu gossypolu
- ApoG2 jest inhibitorem białek antyapoptotycznych Mcl-1 oraz Bcl-2
- Zastosowanie ApoG2 powoduje dawko i czaso- zależny spadek proliferacji komórek MM po 48 godzinach inkubacji
- ApoG2 indukuje apoptozę w komórkach MM (zmiany morfologiczne, formowanie drabinki DNA, aktywacji caspazy 3 i 9)
- ApoG2 powoduje zatrzymanie komórek MM w fazie G2 cyklu komórkowego
- Rozpoczęto próby in vivo w myszach „nude”

Inhibitory kinazy białkowej C

PKC412

- Wykazano zahamowanie proliferacji komórek MM (40 linii komórkowych i 10 pacjentów wliczając w to linie i pacjentów opornych na Dex, czynniki alkilujące, antracykliny, Thal, bortezomib oraz Apo2L/TRAIL) po 72 godzinach ekspozycji do PKC412
- Zaobserwowano cięcie białka PARP po 24 i 72 godzinach inkubacji komórek MM z PKC412
- Synergistyczny efekt indukcji apoptozy komórkach linii MM oraz komórkach CD138+ zaobserwowane stosując PKC412 oraz Bortezomib po 72 godzinach inkubacji
- Kolejność inkubacji z poszczególnymi inhibitorami była istotna a największy efekt hamujący obserwowano gdy PKC412 dodawano do komórek na 6 godzin przed dodaniem Bortezomibu
- Mechanizm hamowania proliferacji i indukcji apoptozy związany jest z blokowaniem takich szlaków jak PI-3K/Akt, IKK- /NF- B oraz hamowaniem inhibitorów apoptozy takich jak FLIP, XIAP, cIAP-2, survivin

Inhibitory białek antyapoptotycznych

AT-101

- AT-101 powoduje zahamowanie proliferacji szeregu linii MM w tym linii opornych na konwencjonalne leczenie (Melphalan, Doxorubicin czy Dexamethasone)
-
- AT-101 hamuje proliferację komórek MM również w obecności IL-6 i VEGF
- Wykazano czaso i dawko zależną indukcję apoptozy przez AT-101
- Cytotoksyczny, dawko zależny efekt AT-101 był obserwowany także w stosunku do świeżo izolowanych komórek CD138+

GX15-070

- GX15-070 indukuje apoptozę poprzez hamowanie interakcji pomiędzy białkami pro- i anty- apoptotycznymi
- GX15-070 zmniejsza żywotność komórek szpiczakowych niezależnie od poziomu białek antyapoptotycznych Bcl-2, MCL-1 oraz Bcl-XL
- Nie zaobserwowano cytotoksyczności GX15-070 w kierunku komórek prawidłowych: limfocytów, komórek podścieliska czy fibroblastów w dawkach toksycznych dla komórek MM
- Aktywację procesu apoptotycznego obserwowano już 12 godzin po dodaniu GX15-070 (aktywacja caspazy 3) i proces ten postępował przez kolejne 96 godzin
- Hodowla komórek szpiczakowych w obecności komórek podścieliska nie chroniła ich przed działaniem GX15-070 podobnie jak zastosowanie IL-6 i IGF-1
- GX15-070 indukował apoptozę również w komórkach CD138+

Inne inhibitory

Inhibitor telomerazy - GRN163L

- Trzytygodniowa inkubacja linii szpiczakowych z GRN163L powodowała podan 96% indukcję apoptozy
- Indukcja apoptozy w komórkach MM korelowała ze spadkiem długości telomerów co było oceniane poprzez FISH
-
- Podobny efekt obserwowano również dla komórek CD138+ potwierdzając możliwość użycia inhibitorów telomerazy w leczeniu szpiczaka mnogiego

Inhibitor CDK1/2 - LCQ195

- LCQ195 wykazał dawko zależne hamowanie wzrostu 12 na 28 linii szpiczakowych w tym opornych na dexamethason, melphalan, thalidomid i ich pochodne
- LCQ195 działał także hamująco na komórki CD138+ izolowane od pacjentów poddanych leczeniu w tym opornych na konwencjonalne leczenie
- LCQ195 wykazywał niską toksyczność w kierunku komórek podścieliska, leukocytów i hepatocytów
- Stosowanie IL6, IGF-1 czy komórek podścieliska nie chroniło przed toksycznym działaniem LCQ195
- LCQ195 powodował hamowanie komórek MM w fazie S cyklu oraz zmniejszenie ekspresji takich białek jak HSP90, B-raf, cyclina D1 i cyclina E2
- Obserwowano aktywację caspazy- 3 i -8 oraz cięcie białka PARP w ciągu 16 do 24 godzin od rozpoczęcia hodowli z LCQ195

Antagonista czynnika wzrostu hepatocytów – NK4

- Fragment czynnika wzrostu hepatocytów (HGF) blokujący jego wiązanie z receptorem MET
- Wykazano, że NK4 silnie blokuje wzrost linii szpiczakowych produkujących autokrynnie HGF protein significantly inhibited growth of the two HGF-producing cells in vitro
- Zastosowanie NK4 wraz z dexamethasonem (Dex) powodowało zahamowanie wzrostu zarówno komórek wrażliwych jak i opornych na jego działanie
- NK4 hamował aktywację szlaków sygnałowych ERK1/2 bez wpływu na szlak JAK-STAT3
- Podanie konstruktu adenowirusowego zawierającego cDNA dla NK4 (Ad-NK4) do myszy lcr/scid powodowało pojawienie się tego białka w plazmie, wątrobie, płucach i nerkach. Maksymalny efekt obserwowano po 10–14 dniach od podania ale NK4 można było wykryć przez 21 dni
- Podanie konstruktu Ad-NK4 myszom lcr-SCID zaszczepionym uprzednio komórkami szpiczaka mnogiego wywoływało zahamowanie wzrostu nowotworów w porównaniu z pustym wektorem (n=10, $p < .05$)
- Podanie Ad-NK4 wraz z Dex powodowało jeszcze silniejszy efekt hamowania wzrostu komórek nowotworowych

Przeciwciała anty-VEGF

- Badania wykonano w układzie in vivo
- Myszy SCID zostały zaszczepione fragmentem guza wielkości od 2.0 do 4.0 mm³, który rósł następnie przez 14 dni kiedy to w surowicy myszy pojawiły się ludzkie IgG
- Przeciwciała przeciw VEGF podawane były do otrzewnowo dwa razy w tygodniu w dawce 5 mg/kg
- U myszy otrzymujących przeciwciała przeciw VEGF zaobserwowano znaczące zahamowanie wzrostu guza ($P = 0.0005$) i redukcje w poziomie paraproteiny ($P = 0.0002$) 42 dni po rozpoczęciu leczenia (70% spadek paraproteiny i 80% spadek objętości guza)
- Stosowanie przeciwciał przeciw VEGF nie wywoływało żadnych skutków ubocznych

Nowe cele terapeutyczne

Kinaza p90RSK2

- Aktywator kinazy ERK hamujący apoptozę oraz regulujący cykl komórkowy and plays an active role in anti-apoptosis signaling and cell cycle regulation
- Zmniejszenie ekspresji RSK2 za pomocą siRNA indukowało apoptozę komórkach szpiczaka mnogiego wykazujących ekspresję FGFR3
- FMK, inhibitor RSK wywoływał apoptozę w komórkach szpiczaka t(4;14)
- Podobnie fmk powodował zahamowanie wzrostu komórek CD138+ od pacjentów t(4;14) pozytywnych

Kinaza polo-like 1 (PLK1)

- Plk1 jest związana z centrosomami i pełni kluczową rolę w regulacji mitozy. Obserwuje się jej zwiększoną ekspresję w szeregu nowotworów w tym w szpiczaku mnogim
- Inhibitor Plk1 (BI2536) hamował proliferację linii szpiczakowych w nanomolarnych stężeniach
- BI2536 znosił także oporność na działanie dexamethasonu
- Bortezomib w połączeniu z BI2536 wykazywały znacząco silniejsze działanie niż każdy z czynników osobno
- Obserwowano blokowanie komórek w fazie G2/M poprzedzające wejście w apoptozę
- BI2536 wywoływał zahamowanie wzrostu komórek szpiczakowych w modelu mysim (NOD/SCID)

Kinaza Aurora

- Wykazano ekspresję kinazy Aurora w komórkach szpiczaka mnogiego za pomocą metody Affymetrix u 50% pacjentów
- Inhibitor kinazy Aurora, VX680, indukował apoptozę w komórkach szpiczaka mnogiego – zarówno w liniach komórkowych jak i komórkach CD138+
- Ekspresja kinazy Aurora negatywnie korelowała z długością przeżycia pacjentów oraz epizodami remisji

Inne cele terapeutyczne

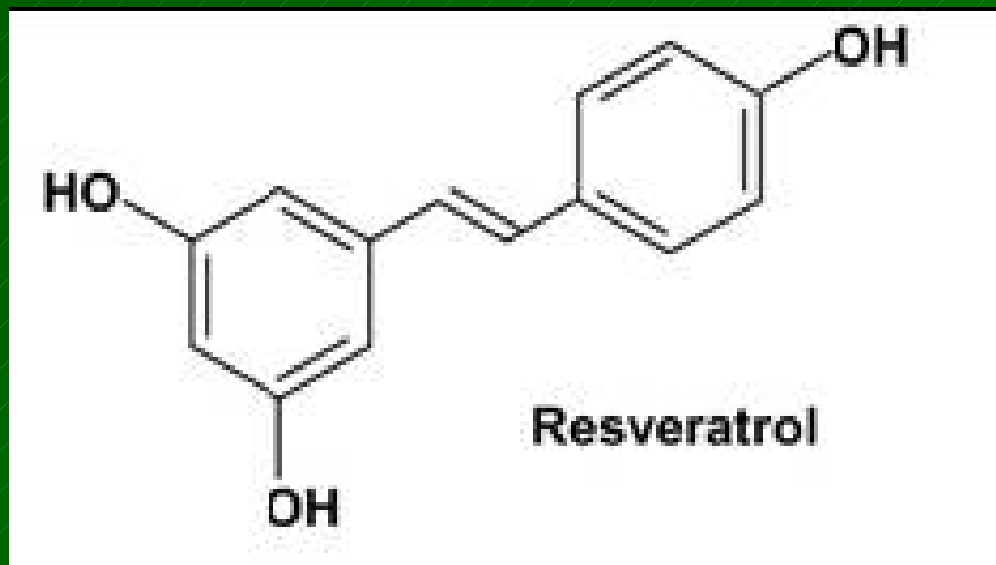
- β -Catenina
- DKK1
- Czynn timeranskrypcyjny Sp1
- Notch
- Hedgehog
- Macierzyste komórki nowotworowe

Wyniki

Resveratrol

Wykorzystanie Resveratrolu w badaniach nad nowotworzeniem

Resveratrol - trans-3,4,5-trihydroxystilbene



Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes. Meishiang Jang, Lining Cai, George O. Udeani, Karla V. Slowing, Cathy F. Thomas, Christopher W. W. Beecher, Harry H. S. Fong, Norman R. Farnsworth, A. Douglas Kinghorn, Rajendra G. Mehta, Richard C. Moon, John M. Pezzuto. *Science* 1997; 275: 218-220

Badania nad Resveratrole w szpiczaku mnogim

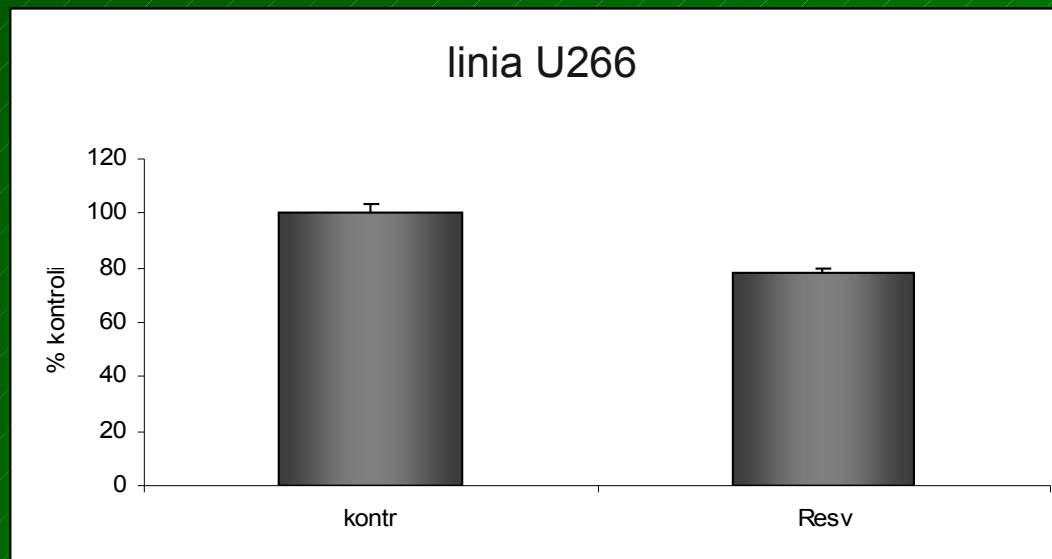
Resveratrol Inhibits Myeloma Cell Growth, Prevents Osteoclast Formation, and Promotes Osteoblast Differentiation. Patrice Boissy, Thomas L. Andersen, Basem M. Abdallah, Moustapha Kassem, Torben Plesner, and Jean-Marie Delaisse. *Cancer Res* 2005; 65: 9943-9952

Resveratrol downregulates the constitutional activation of nuclear factor-kB in multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and invasion, arrest of cell cycle, and induction of apoptosis. Chunyan Sun, Yu Hu*, Xinyue Liu, Tao Wu, Yadan Wang, Wenjuan He, Wenning Wei. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2006; 165: 9–19

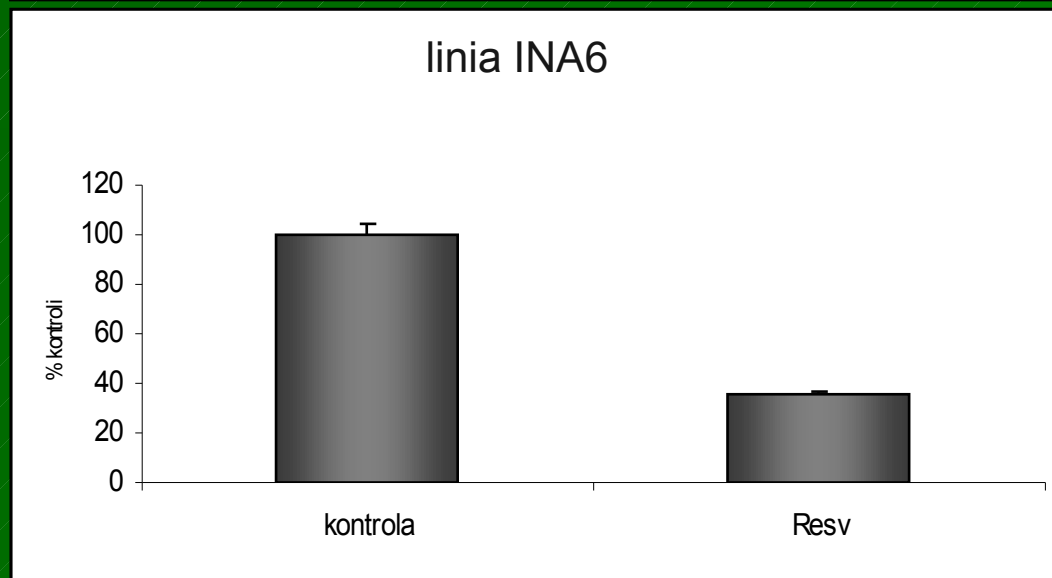
Resveratrol inhibits proliferation, induces apoptosis, and overcomes chemoresistance through down-regulation of STAT3 and nuclear factor-B-regulated antiapoptotic and cell survival gene products in human multiple myeloma cells. Anjana Bhardwaj, Gautam Sethi, Saroj Vadhan-Raj, Carlos Bueso-Ramos, Yasunari Takada, Upasna Gaur, Asha S. Nair, Shishir Shishodia, and Bharat B. Aggarwal. *Blood* 2007;109:2293-2302.

Wpływ Resveratrolu na proliferację komórek szpiczaka

Resv. 200 μ M

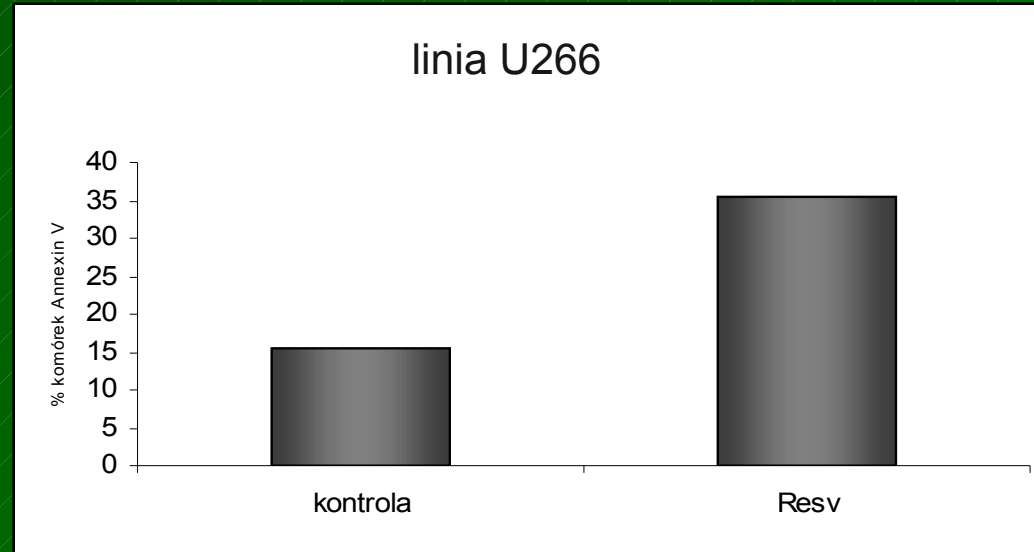


Resv. 200 μ M

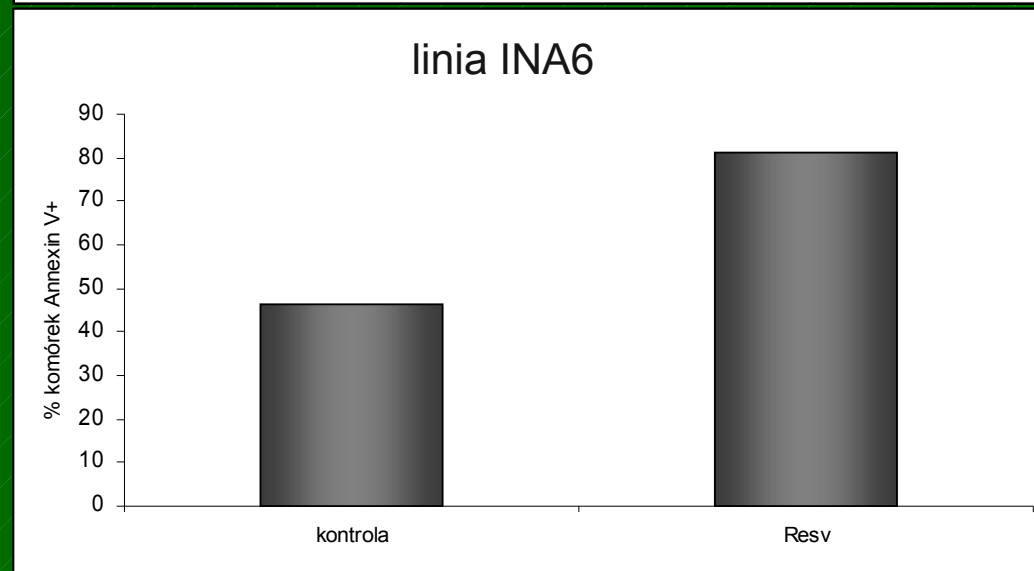


Wpływ Resveratrolu na apoptozę komórek szpiczaka

Resv. 200 μ M

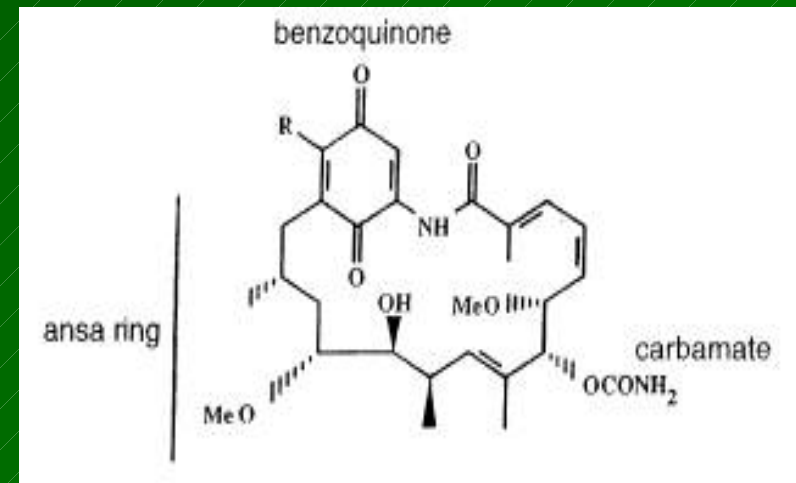


Resv. 200 μ M



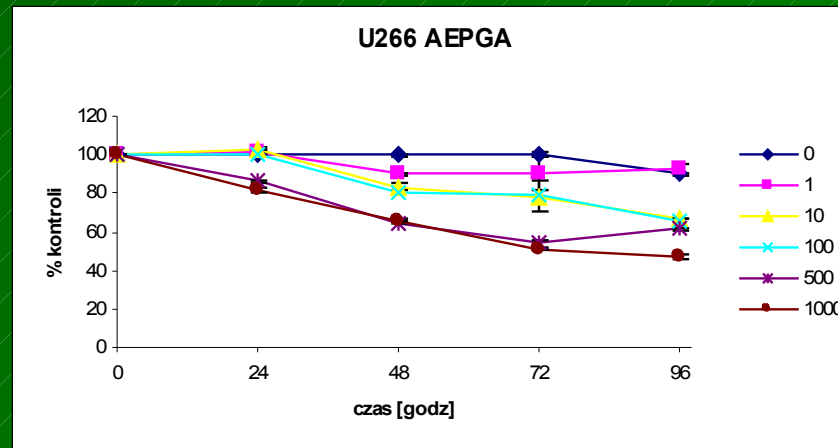
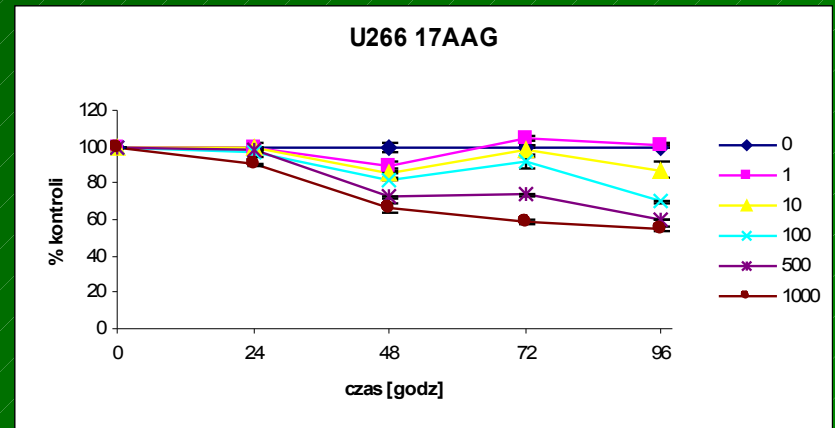
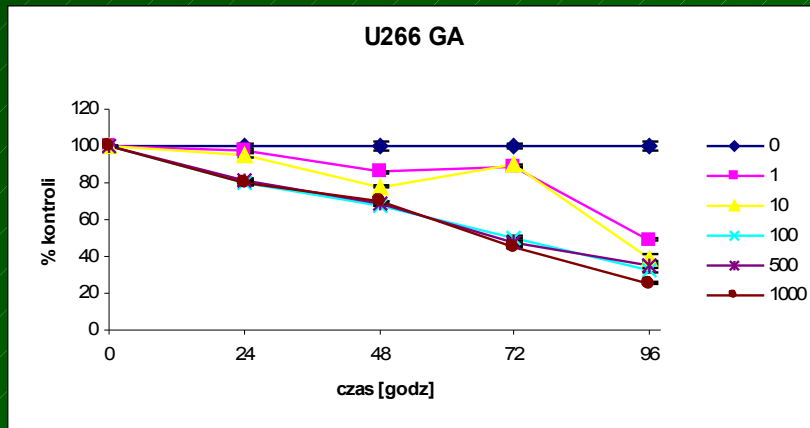
Inhibitory białka HSP90

Geldanamycin (GA)

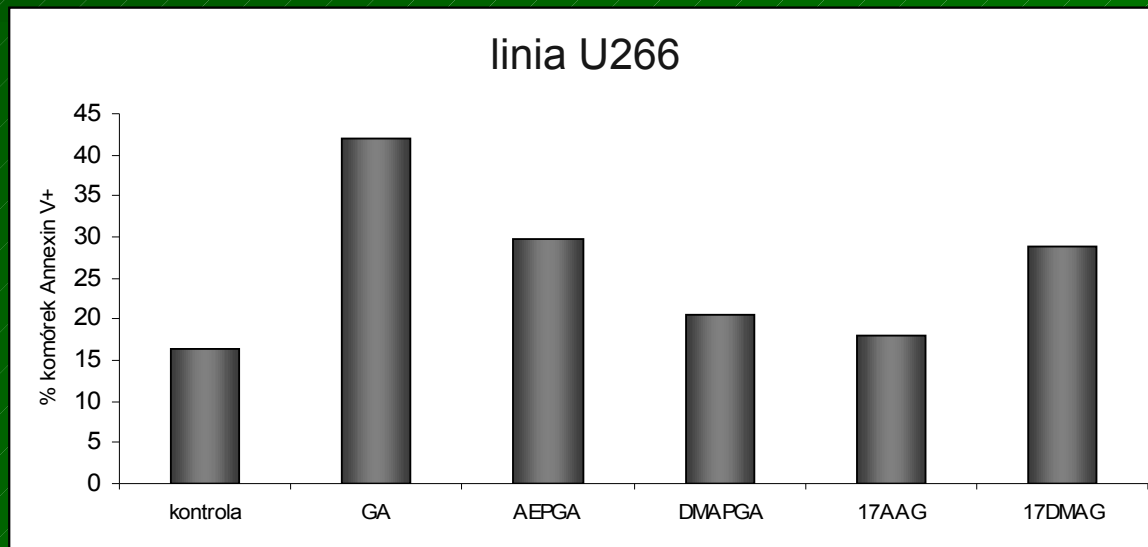


- Pochodzenie *Streptomyces hygroscopicus*
- Blokuje działanie HSP90
- Posiada przeciwnowotworowe właściwości
- Hamuje ekspresję: zmutowanej formy p53, v-Src, Bcr-Abl, erbB2, Raf-1 and MET
- Blokuje proliferację i indukuje apoptozę komórek nowotworowych
- Uwrażliwia komórki na chemio - i radio - terapię

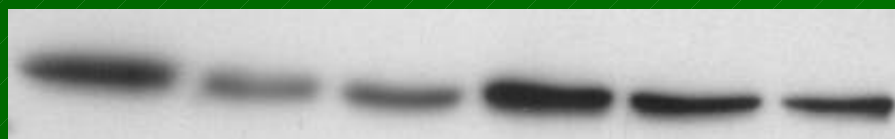
Wpływ inhibitorów Hsp90 na proliferację komórek szpiczaka



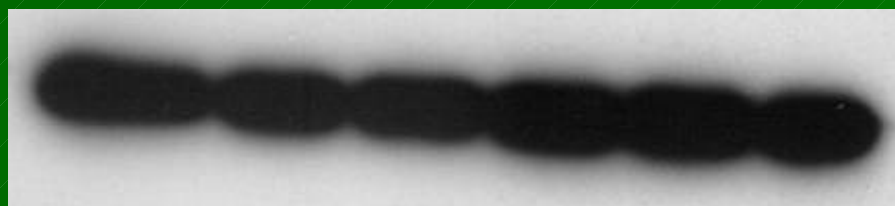
Wpływ inhibitorów Hsp90 na indukcję apoptozy



kont. GA AEP DMAP AAG DMAG

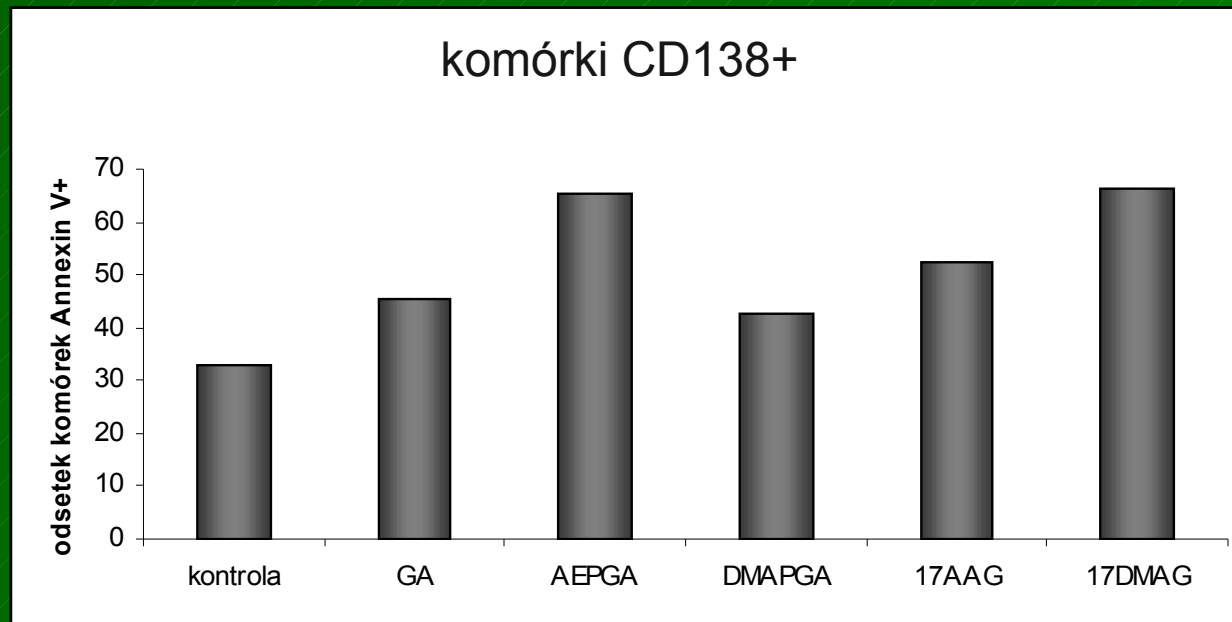
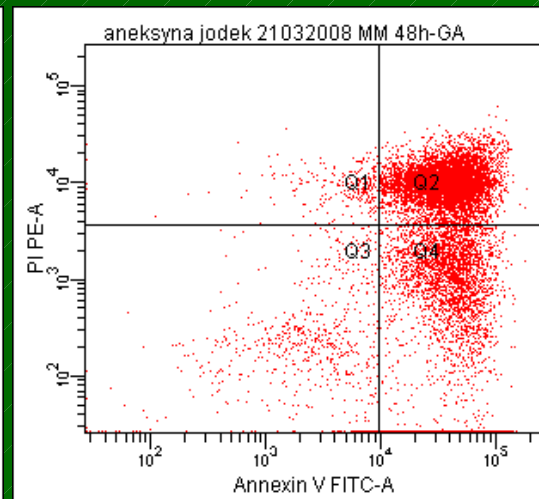
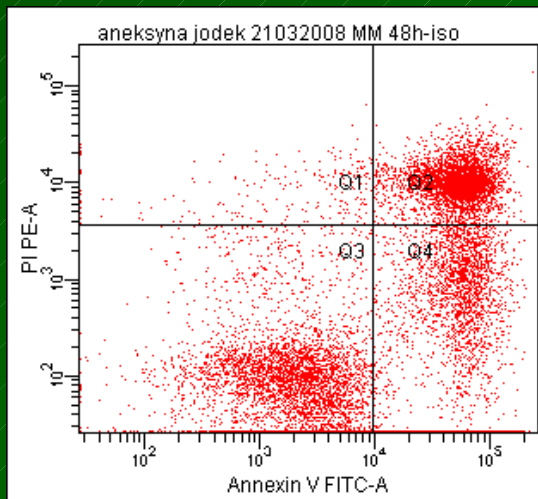


← AKT



← GAPDH

Wpływ inhibitorów Hsp90 na indukcję apoptozy

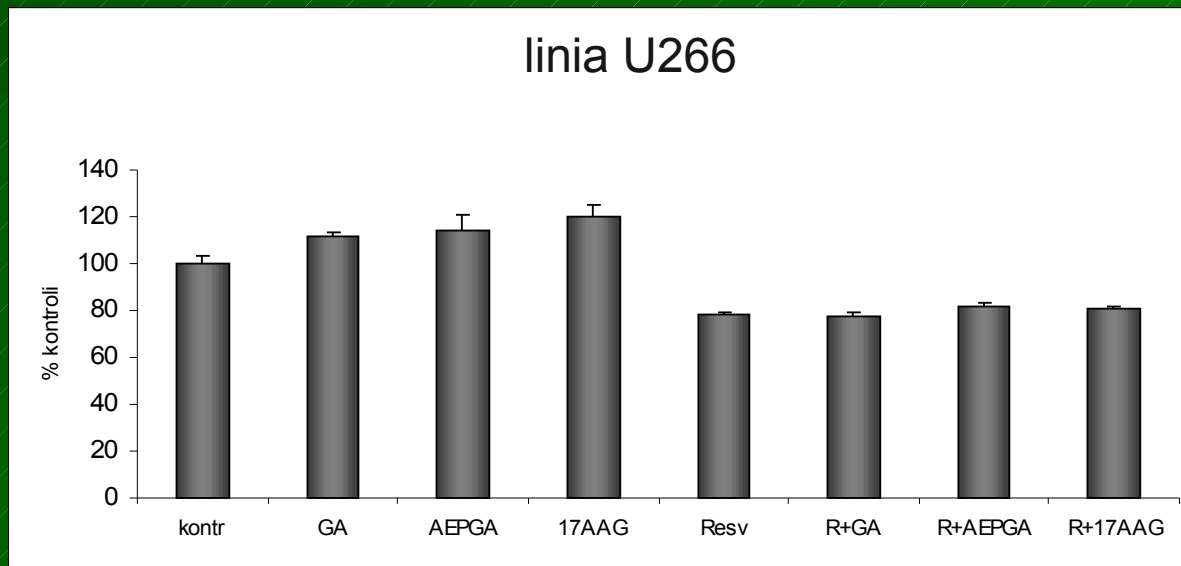


GAs 100nM

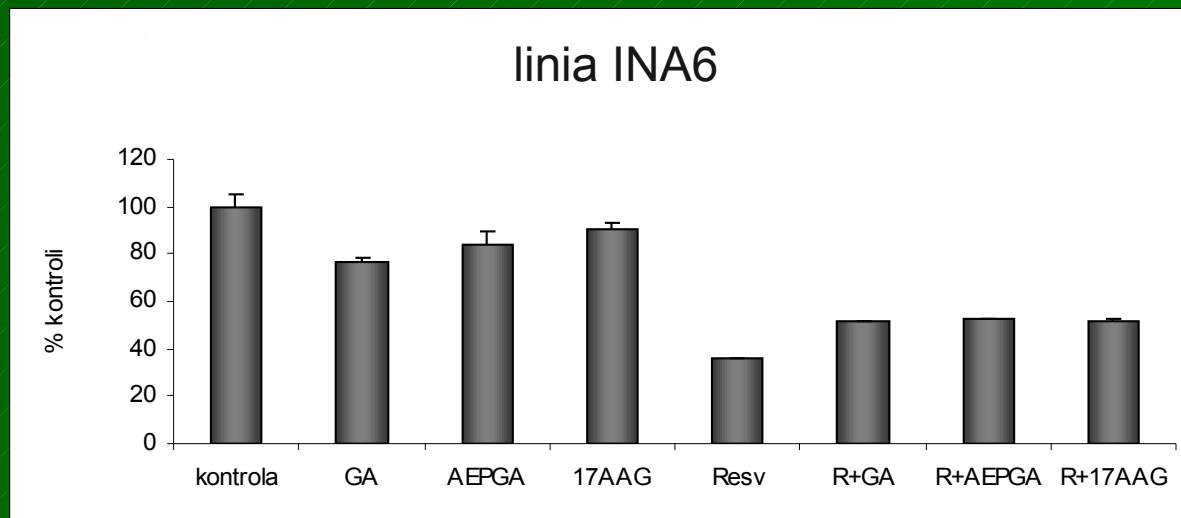
Resveratrol i inhibitory białka HSP90

Wpływ Resveratrolu i inhibitorów Hsp90 na proliferację komórek szpiczakowych

Resv. 200 μ M
GAs 10nM

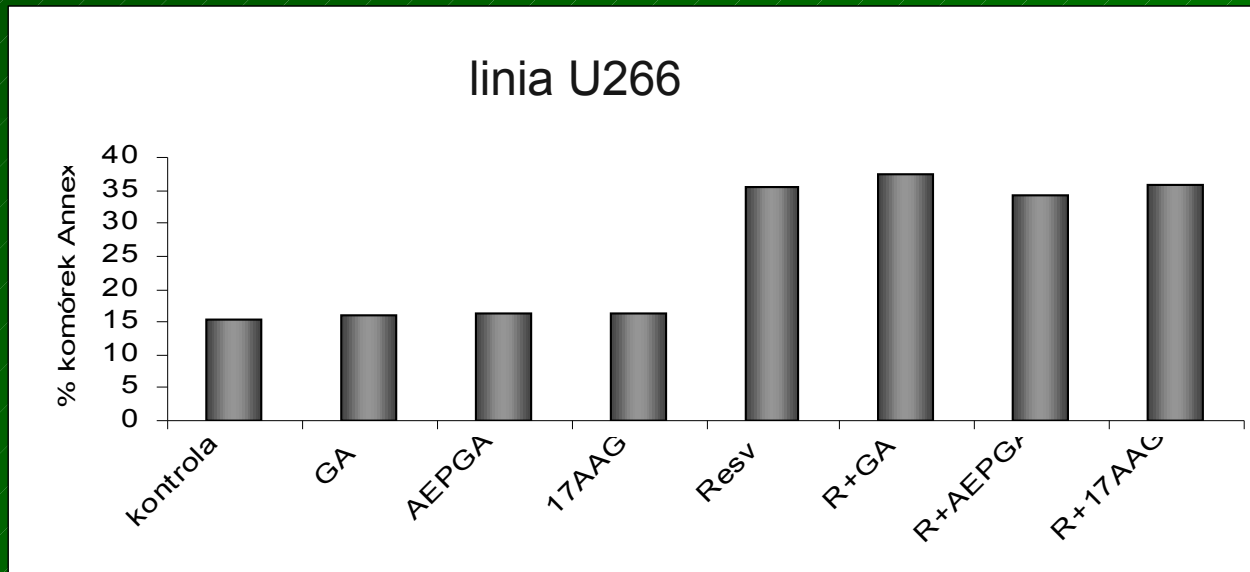


Resv. 200 μ M
GAs 10nM

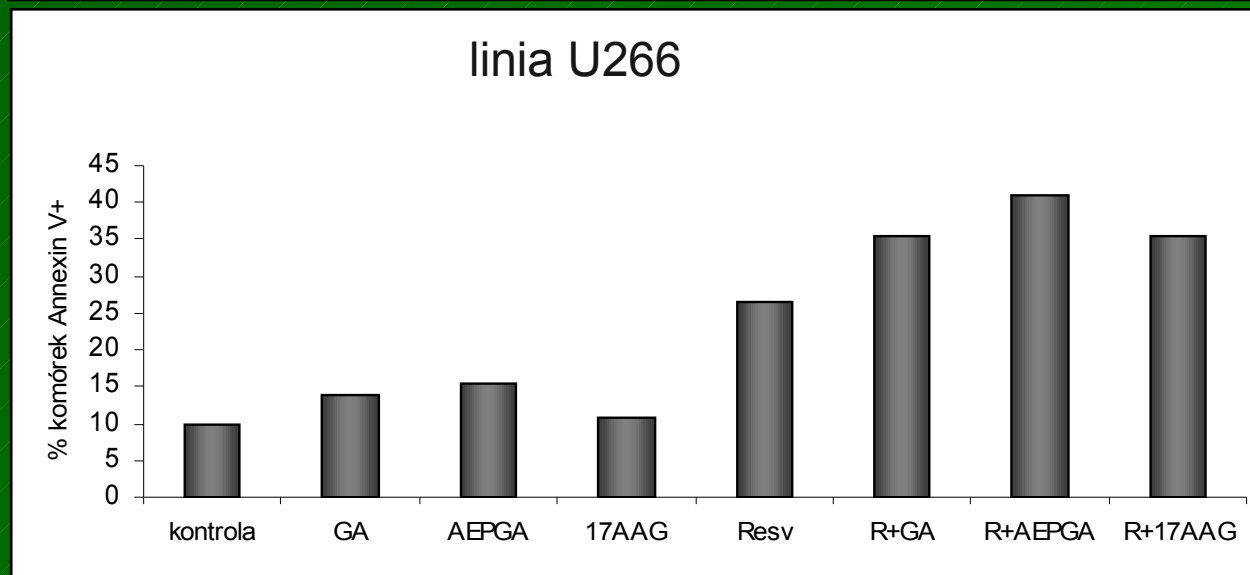


Wpływ Resveratrolu i inhibitorów Hsp90 na indukcję apoptozy

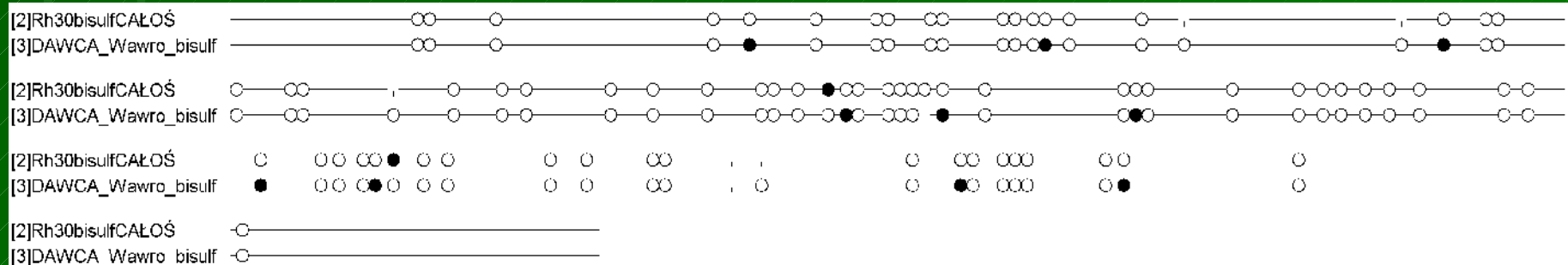
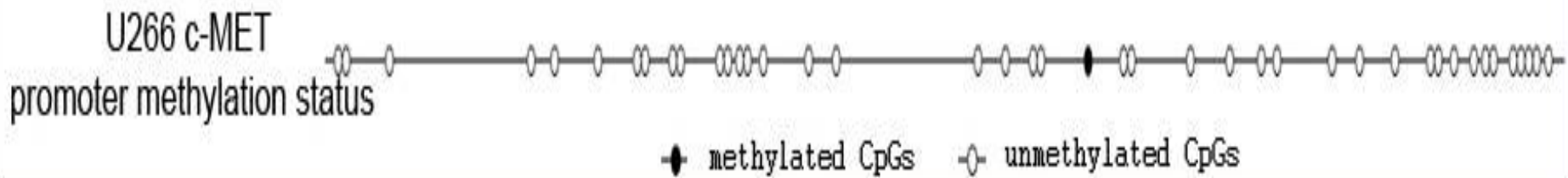
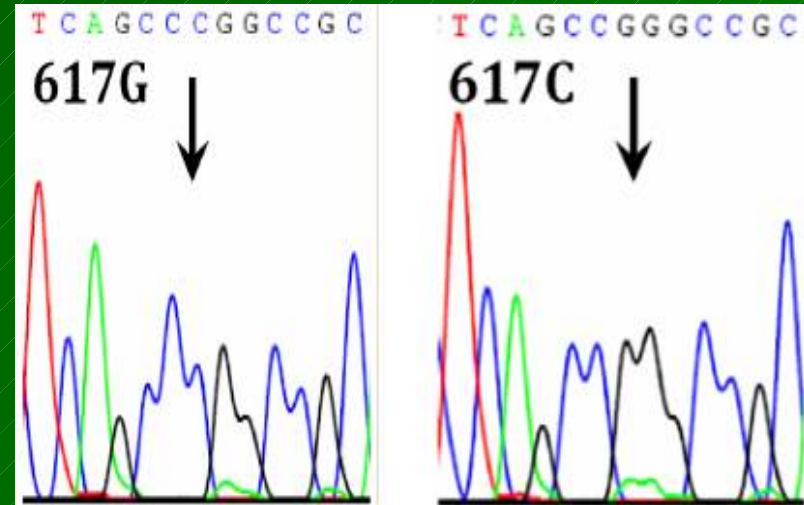
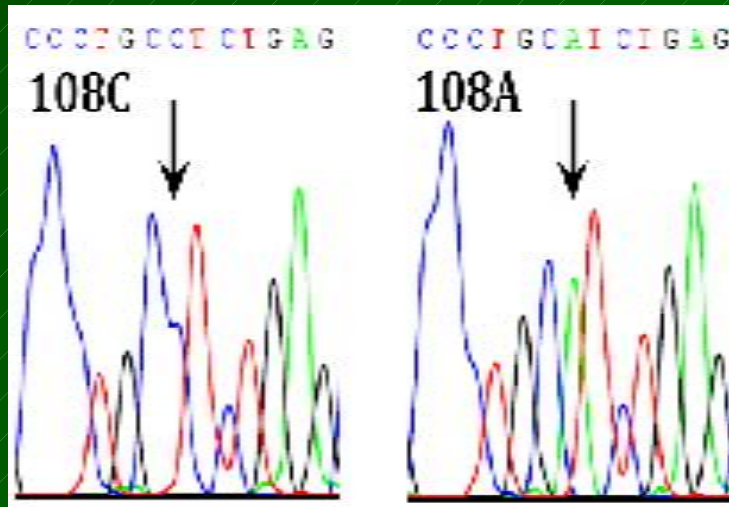
Resv. 200 μ M
GAs 10nM



Resv. 200 μ M
GAs 100nM



Sekwencja nukleotydowa oraz status metylacji promotora *MET*



Podziękowania

Zakład Transplantologii

- Anna Zebzda
- Ewa Łukasiewicz
- Wojciech Czogała

Katedra Hematologii

- Aleksander B. Skotnicki
- Artur Jurczyszyn