

**Dr Jolanta Grembecka**

Department of Pathology, University of Michigan

Streszczenie wykładu:

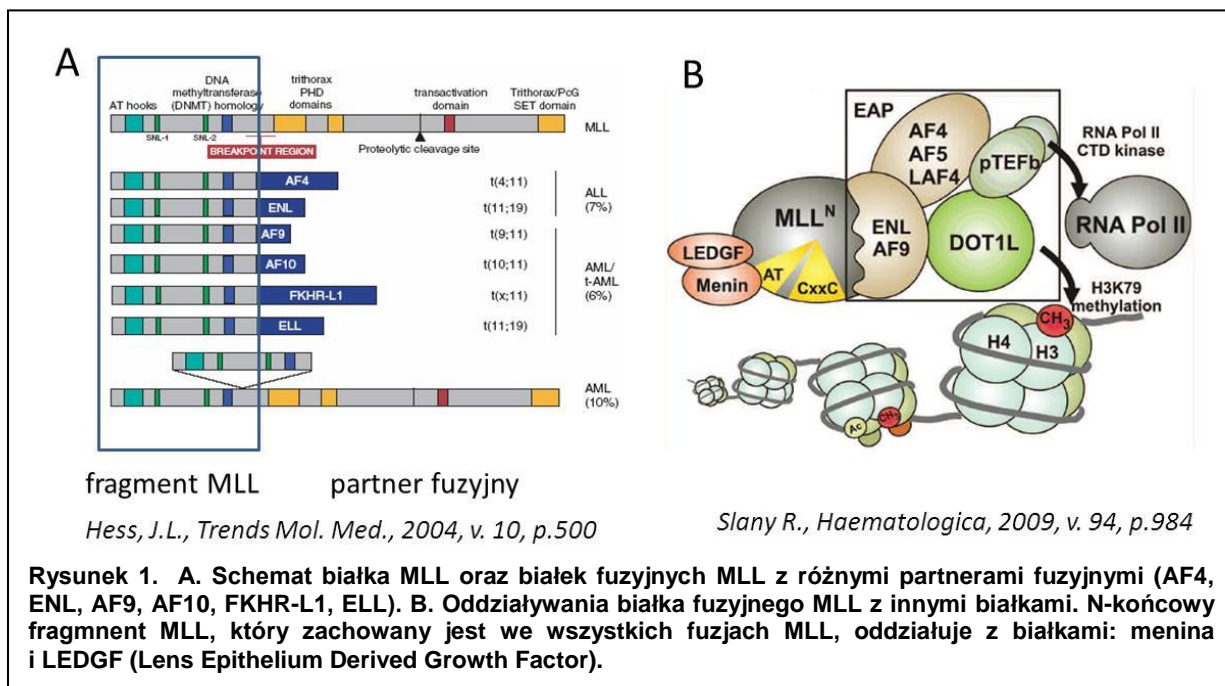
## **TERAPIA CELOWANA – NOWA METODA W LECZENIU PRZECIWBIAŁACZKOWYM**

Poszukiwanie nowych leków, które mogłyby skutecznie i selektywnie eliminować komórki nowotworowe nie niszcząc zdrowych komórek jest przedmiotem badań naukowych prowadzonych zarówno przez firmy farmaceutyczne jak i ośrodki akademickie. Wiele leków przeciwnowotworowych nowej generacji skierowanych jest przeciwko nowotworom, w których proces transformacji uzależniony jest od aktywności jednego białka, kodowanego przez gen zwany onkogenem. W komórkach nowotworowych onkogeny są często zmutowane lub ekspresjonowane na podwyższonym poziomie, co powoduje zmiany w przekazywaniu sygnałów wewnątrzcząsteczkowych, zwiększenie proliferacji tych komórek oraz transformację nowotworową. Terapia celowana polega na selektywnym eliminowaniu komórek nowotworowych przez zastosowanie leków, które blokują podwyższoną aktywność białek odpowiedzialnych za niekontrolowaną proliferację komórek nowotworowych. Inny rodzaj terapii celowanej polega na indukowaniu apoptozy lub blokowaniu angiogenezy w komórkach nowotworowych. Aktualnie zatwierdzonych jest kilkadziesiąt niskocząsteczkowych związków lub przeciwciał monoklonalnych jako leki celowane do stosowania u pacjentów z różnymi typami nowotworów, a inne są przedmiotem badań klinicznych i przedklinicznych. Wysoka wybiórczość działania tych leków w stosunku do białek o podwyższonej aktywności w komórkach nowotworowych oznacza, że są one dużo mniej toksyczne dla pacjentów i mają mniejsze działania niepożądane niż związki stosowane w konwencjonalnej chemioterapii.

Białaczka zaliczana jest do chorób nowotworowych i polega na ilościowej i jakościowej zmianie leukocytów (białych krwinek) we krwi, szpiku kostnym i narządach wewnętrznych (śledziona, węzły chłonne). Molekularne podstawy białaczki wynikają z mutacji genowych, wśród których najczęściej spotykane są translokacje, inwersje i duplikacje chromosomowe. Dla przykładu, molekularnym podłożem przewlekłej białaczki szpikowej (chronic myeloid leukemia, CML) jest mutacja genu polegająca na połączeniu genu *BCR* (którego produktem jest kinaza serynowo-tyrozynowa) z genem *ABL* (którego produktem jest kinaza tyrozynowa). W efekcie powstaje gen fuzyjny *BCR-ABL* odpowiadający za produkcję białka bcr-abl, które prowadzi do wzmożonej proliferacji macierzystych komórek szpiku kostnego. Leczenie pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową (CML) polega na zastosowaniu terapii celowanej z wykorzystaniem leku o nazwie Gleevec (Imatinib), który jest niskocząsteczkowym inhibitorem kinazy tyrozynowej Abl i blokuje aktywność tej kinazy, powodując zahamowanie nadmiernej proliferacji komórek szpiku kostnego. Gleevec oraz analogi tego leku stosowane są z dużym powodzeniem od około 10 lat w leczeniu pacjentów z CML. Terapie celowane stosuje się również w leczeniu białaczek ostrych. Przykładem jest zastosowanie kwasu all-trans retinowego (ATRA) w leczeniu ostrej białaczki promielocytarnej (Acute Promyelocytic Leukemia, APL),

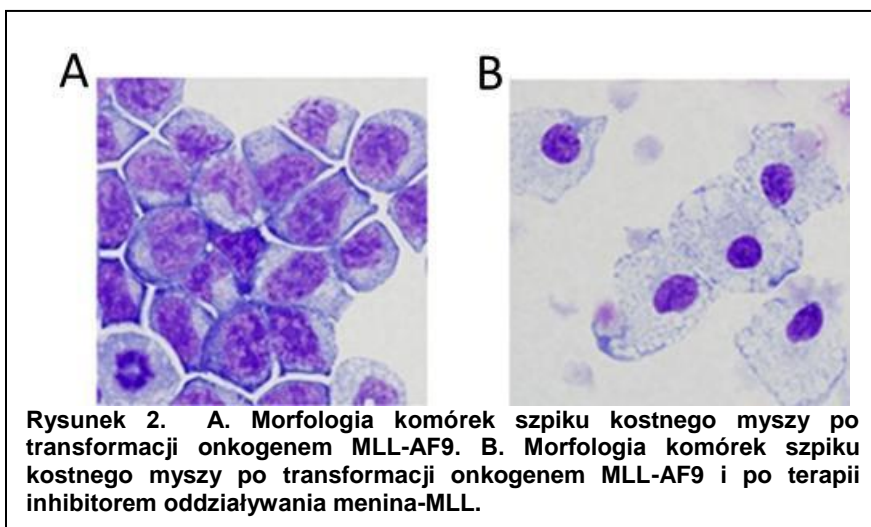
której molekularnym podłożem jest translokacja chromosomowa t(15;17) indukująca powstanie genu fuzyjnego PML-RARA. Zastosowanie ATRA, pochodnej witaminy A, która wiąże się do RARA (Retinoic Acid Receptor Alpha) indukuje proces różnicowania komórek białaczkowych, które następnie ulegają apoptozie, skutecznie redukując liczbę tych komórek.

Pomimo sukcesów w leczeniu białaczek przy użyciu terapii celowanych, w wielu typach białaczek ostrych o innym podłożu molekularnym ciągle brak skutecznych leków. Przykładem są białaczki wywoływane translokacjami genu *MLL* (*Mixed Lineage Leukemia*), które stanowią około 10% wszystkich białaczek ostrych. Rokowania dla pacjentów z tym typem białaczki są złe, gdyż jedynie 35% pacjentów przeżywa dłużej niż 5 lat od momentu rozpoznania choroby, co wskazuje, że konwencjonalne metody leczenia (chemioterapia i przeszczep szpiku kostnego) nie są zadowalająco skuteczne. Molekularnym podłożem tych białaczek jest translokacja w obrębie genu *MLL* zlokalizowanego na chromosomie 11q23 z partnerem fuzyjnym, co powoduje powstanie genu fuzyjnego *MLL* kodującego białko fuzyjne MLL (**Rys. 1A**). Dotychczas zidentyfikowano ponad 50 białek, które mogą pełnić rolę partnera fuzyjnego MLL. Wśród nich AF4, AF9, ENL i AF10 należą do najczęściej spotykanych partnerów fuzyjnych MLL. Białko fuzyjne MLL zawiera N-końcowy fragment MLL oraz partnera fuzyjnego na C-końcu (**Rys. 1A**). Białko fuzyjne MLL oddziałuje z różnymi białkami (**Rys. 1B**), a w oddziaływaniach te zaangażowane są zarówno partner fuzyjny jak i N-końcowy fragment MLL, który zachowany jest we wszystkich białkach fuzyjnych MLL. N-końcowy fragment MLL oddziałuje z meniną, białkiem kodowanym przez gen *MEN1* (*Multiple Endocrine Neoplasia 1*). Praca naukowa opublikowana w czasopiśmie *Cell* (Yokoyama et al., *Cell*, 2005) oraz inne doniesienia naukowe pokazują, że oddziaływanie menina-MLL niezbędne jest dla utrzymania właściwości onkogennych fuzji MLL w białaczkach. Zahamowanie tego oddziaływania indukowane przez genetyczne manipulacje powoduje zatrzymanie proliferacji komórek białaczkowych, indukuje różnicowanie tych komórek, a co ważniejsze blokuje rozwój białaczki u myszy. Wyniki te wskazują, że oddziaływanie menina-MLL jest ważnym i interesującym celem dla rozwoju nowych terapii celowanych przeciw białaczkom ostrym z translokacjami *MLL*. Zahamowanie tego oddziaływania przez niskocząsteczkowe związki mogłoby stworzyć nowe szanse dla pacjentów cierpiących na ten typ białaczki.



**Rysunek 1. A.** Schemat białka MLL oraz białek fuzyjnych MLL z różnymi partnerami fuzyjnymi (AF4, ENL, AF9, AF10, FKHR-L1, ELL). **B.** Oddziaływania białka fuzyjnego MLL z innymi białkami. N-końcowy fragment MLL, który zachowany jest we wszystkich fuzjach MLL, oddziałuje z białkami: menina i LEDGF (Lens Epithelium Derived Growth Factor).

Nasze laboratorium na Uniwersytecie w Michigan zajmuje się rozwijaniem niskocząsteczkowych związków, które blokują oddziaływanie menina-MLL i ich wykorzystaniem jako potencjalne leki do terapii celowanej w leczeniu białaczki z translokacjami genu *MLL*. Dzięki zastosowaniu biochemicznych testów zidentyfikowaliśmy grupę niskocząsteczkowych związków chemicznych, które wiążą się do meniny i hamują oddziaływanie meniny z MLL, zarówno w testach *in vitro*, w tym także w komórkach ludzkich białaczek. Związki te stanowią pierwsze opublikowane dotychczas inhibitory oddziaływania menina-MLL (Grembecka et al., *Nature Chemical Biology*, 2012). Badania strukturalne wykazały, że związki te wiążą się do meniny w miejscu wiążącym MLL i odtwarzają oddziaływania obecne w kompleksie menina-MLL. Chemiczne modyfikacje tych związków znacznie poprawiły ich aktywność



Rysunek 2. A. Morfologia komórek szpiku kostnego myszy po transformacji onkogenem MLL-AF9. B. Morfologia komórek szpiku kostnego myszy po transformacji onkogenem MLL-AF9 i po terapii inhibitorem oddziaływania menina-MLL.

zarówno w testach *in vitro* jak i w komórkach białaczkowych z translokacjami MLL. Związki te powodują silne zahamowanie proliferacji komórek białaczkowych, indukują apoptozę oraz różnicowanie tych komórek (Fig. 2). Ponadto, związki te powodują obniżenie poziomu ekspresji

genów *Hoxa9* oraz *Meis1*, których podwyższony poziom jest charakterystyczny dla białaczek z translokacjami *MLL*. Efekty te potwierdzają bardzo specyficzny mechanizm działania tych związków w komórkach białaczkowych. Ponadto, związki te nie działają na komórki bez translokacji w obrębie genu *MLL*, co potwierdza ich wybiórczość i swoistość działania. Badania na myszach wykazały, że związki te nie są toksyczne dla normalnych komórek myszy. Obecnie prowadzimy badania przedkliniczne tych związków polegające na ich testowaniu u myszy białaczkowych z translokacją *MLL-AF9*. Wstępne wyniki tych badań są obiecujące i pokazują zwiększoną przeżywalność myszy obciążonych białaczką po terapii inhibitorami oddziaływania menina-MLL. Aktualnie nasze badania skupione są na dalszych chemicznych modyfikacjach tych związków dla poprawienia ich właściwości fizykochemicznych w celu uzyskania odpowiednich ilości związków do testów klinicznych u ludzi. Zrealizowanie tego celu może doprowadzić do rozwoju nowej terapii celowanej dla chorych na ostre białaczki z translokacjami genu *MLL*.