

PRACA POGŁĄDOWA – Review Article

AGNIESZKA KOSTUR, AGNIESZKA KULCZYŃSKA, JANUSZ KŁOCZKO

Proteasomy – nowy cel leczenia przeciwnowotworowego

Proteasomes – a new target for anticancer therapy

Klinika Hematologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
Kierownik: Prof. dr hab. med. J. Kłoczko

STRESZCZENIE

Proteasom jest wieloenzymatycznym kompleksem odgrywającym istotną rolę w regulacji procesów komórkowych oraz wzroście nowotworów. Degraduje on liczne białka biorące udział w rozwoju komórek w tym endogenny inhibitor czynnika jądrowego – NF-κB/IκB. Degradacja IκB zwiększa aktywność NF-κB, co prowadzi do zwiększonej transkrypcji białek odpowiedzialnych za przeżycie komórek nowotworowych, ich wzrost i zmniejszoną zdolność do apoptozy. Zablockowanie aktywności proteasomu prowadzi do zahamowania wzrostu i rozprzestrzeniania komórek nowotworowych. Zastosowanie egzogennych inhibitorów proteasomów w walce z chorobą nowotworową stworzyło nowe, obiecujące możliwości terapeutyczne. Bortezomib, pierwszy lek z grupy inhibitorów proteasomów, dopuszczony do leczenia opornego/nawrotowego szpiczaka mnogiego wykazuje dużą skuteczność dozowany w monoterapii oraz zwiększa wrażliwość komórek nowotworowych na chemioterapię konwencjonalną. Obecnie w fazie badań klinicznych znajduje się druga generacja inhibitorów proteasomów – salinosporamid A (NPI-0052, Sal-A), karfilzomib (PR-171), MLN9708 i cephalon (CEP-18770).

SŁOWA KLUCZOWE: Szpiczak mnogi – Proteasom – NF-κB – Inhibitory proteasomów – Bortezomib

SUMMARY

The proteasome is a multienzyme complex that plays a central role in the regulation of cellular processes and tumor growth. Proteasome degrades many proteins which take part in cell development. One of them is inhibitor of transcription factor – NF-κB/IκB. Degradation of IκB leads to NF-κB activation and overexpression of proteins responsible for tumor cell growth and survival. Abnormally high expression of proteasomes has been observed in leukemias, multiple myeloma and some solid tumors. Therefore proteasome inhibition became a new target for anticancer therapy. Bortezomib is the first proteasome inhibitor approved for the treatment of patients with relapsed/refractory multiple myeloma. Studies of bortezomib's effectiveness in other hematologic malignancies and solid tumors are still in progress. The second generation of proteasome inhibitors such as salinosporamide A (NPI-0052, Sal-A), carfilzomib (PR-171), MLN9708 and cephalon (CEP-18770) are being studied.

KEY WORDS: Multiple myeloma – Proteasome – NF-κB – Proteasome inhibitors – Bortezomib

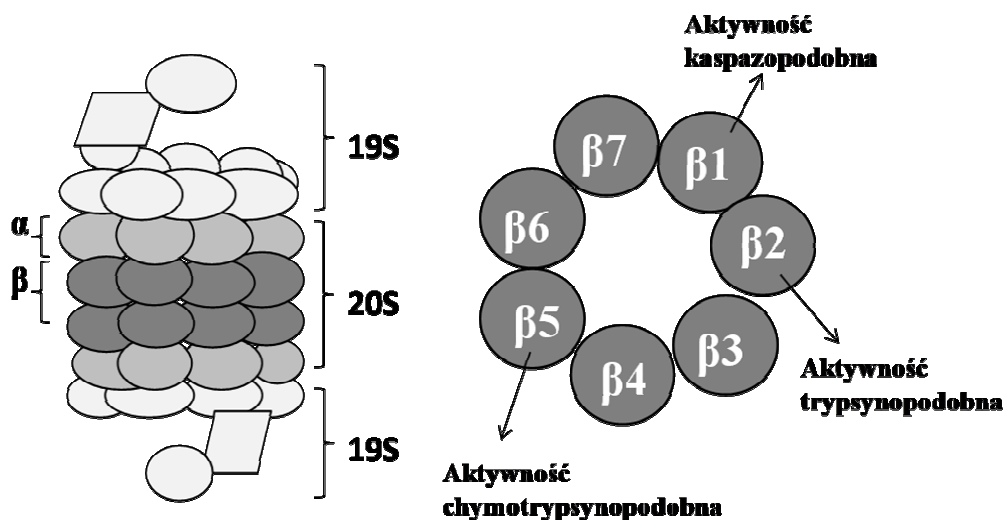
WPROWADZENIE

Degradacja białek jest elementem niezbędnym do utrzymania białkowej homeostazy wewnątrzkomórkowej i prawidłowego funkcjonowania komórki. Uszkodzone, „wysłużone” bądź nieodpowiednio uformowane białka są usuwane z komórki za pomocą skomplikowanych mechanizmów. Przez wiele lat uważano, że niszczenie polipeptydów w większości komórek zachodzi głównie w lizosomach za pomocą zawartych w nich proteaz. W końcowych latach XX w. wykazano, że bakterie oraz niedojrzałe erytrocyty mimo, iż nie posiadają lizosomów szybko i efektywnie niszczą nieprawidłowe białka, a za ich degradację odpowiadają duże wieloenzymatyczne kompleksy, nazwane proteosomami [1]. Obecnie wiemy, że kluczową rolę w degradacji białek wewnątrzkomórkowych odgrywa pozalizosomalny układ

proteolityczny proteasom/ubikwityna [2]. W komórce eukariotycznej znajduje się około 30 tys. proteasomów, które są obecne w cytoplazmie oraz jądrze komórkowym. Odpowiadają one za degradację ponad 80% białek komórkowych oznaczonych wcześniej „pocałunkiem śmierci”, czyli ubikwityną. Proces ubikwitynacji polega na przyłączeniu łańcuchów ubikwityny do białka przeznaczonego do degradacji za pomocą odpowiednich enzymów – E1 (aktywujący ubikwitynę), E2 (przyciągający ubikwitynę) oraz E3 (wiążący ubikwitynę). Kompleks białko-ubikwityna kierowany jest do proteasomu 26S, w którym ulega hydrolizie z uwolnieniem ubikwityny. Do białek degradowanych przez proteasomy zaliczamy m.in.: cykliny, kinazy cykliczne, inhibitory kinaz cyklicznych, produkty onkogenów, produkty genów supresorowych nowotworów, aktywatory i inhibitory transkrypcji, enzymy. Większość białek degradowana jest przez proteasom 26S w procesie zależnym od ubikwityny i ATP [3]. Istnieją jednak białka, które ulegają degradacji przez proteasomy bez uprzedniego wyznaczenia łańcuchami poliubikwityny są to m.in.: dekarboksylaza ornitynowa, troponina C, kalmodulina, p53, białko p21^{cip}, receptor limfocytów T ze zmutowanym polipeptydowym łańcuchem α [4, 5]. Mechanizm proteosomalnej proteolizy białek niezależnej od ubikwityny nie został dotychczas dokładnie poznany.

Budowa proteasomu

W komórkach eukariotycznych rozróżniamy dwa rodzaje proteasomów: 20S i 26S. Kompleks proteasomowy 26S składa się z baryłkowatego rdzenia o stałej sedymentacji 20S oraz dwóch regulatorowych kompleksów 19S (PA28) znajdujących się na obydwu końcach rdzenia. Podjednostki 19S odpowiadają za rozpoznanie i rozfałdowanie ubikwitynowanego białka oraz za jego wnikięcie do części katalitycznej 20S [6].



Ryc. 1. Budowa proteasomu
Fig. 1. Structure of the proteasome

Proteasom 20S ma strukturę cylindra o długości 14,8 nm oraz średnicy 11,3 nm. Zbudowany jest z 28 podjednostek, tworzących 4 pierścienie o łącznej masie około 700kDa. Pierścienie zewnętrzne zbudowane są z 7 różnych podjednostek α , natomiast wewnętrzne z 7 różnych podjednostek β (Rycina 1) [3]. Za połączenie pomiędzy pierścieniami β odpowiedzialna jest podjednostka $\beta 7$. Wszystkie podjednostki α są nieaktywne enzymatycznie. W obrębie podjednostek β jedynie podjednostki $\beta 1$, $\beta 2$ i $\beta 5$

posiadają centra aktywne. W badaniach *in vitro* wykazano trzy główne aktywności proteasomu: chymotrypsynopodobną (za którą odpowiada podjednostka $\beta 5$), trypsynopodobną (podjednostka $\beta 2$) i kaspazopodobną (podjednostka $\beta 1$) oraz co najmniej dwie dodatkowe aktywności: hydrolizującą wiązania pomiędzy rozgałęzionymi aminokwasami m.in. leucyną i hydrolizującą wiązania pomiędzy aminokwasami małymi, obojętymi elektrycznie m.in. glicyną [3]. Podjednostki aktywatora PA28 zwiększają aktywność proteasomu oraz wraz z zespołem białek MHC klasy I biorą udział w prezentacji antygenów limfocytom T.

W porównaniu do komórek prawidłowych komórki nowotworowe wykazują wyższą aktywność proteasomów [7]. Najprawdopodobniej ma to związek z gwałtowną proliferacją komórek nowotworowych, stresem oksydacyjnym, działaniem czynników wzrostu i cytokin m.in. IL-3. Różnica w aktywności proteasomów pomiędzy komórkami nowotworowymi a zdrowymi powoduje, że proteasomy są obiecującym celem terapii przeciwnowotworowej.

NF- κ B

Proteasomy odgrywają istotną rolę w aktywacji czynnika jądrowego - NF- κ B poprzez degradację jego endogennego inhibitora, I- κ B. W wyniku działania na komórkę różnych czynników stresowych, takich jak: czynnik martwicy nowotworu (TNF- α), chemioterapia i radioterapia dochodzi do fosforylacji reszty serynowej cząsteczki I- κ B, która następnie ulega ubikwitynacji i proteasomalnej degradacji, co w konsekwencji prowadzi do uaktywnienia NF- κ B [3]. Po aktywacji, NF- κ B przemieszcza się z cytoplazmy do jądra komórkowego gdzie nasila ekspresję genów odpowiedzialnych za syntezę cytokin prozapalnych (TNF- α , IL-1, IL-6), eikozanoidów (cyklooksigenaza-2, 5-lipoksigenaza), molekuł odpowiedzialnych za adhezję (ICAM-1, VCAM-1, E-selektyna) oraz białek antyapoptycznych (Bcl-2) [8]. NF- κ B odpowiada za przeżycie komórek nowotworowych, ich wzrost i zmniejszoną zdolność do apoptozy [9]. Wysoką ekspresję czynnika jądrowego wykazano w komórkowych wywodzących się z nabłonkowego raka piersi [10], raka trzustki [11], raka pęcherza moczowego [12] oraz brodawkowatego i pęcherzykowatego raka tarczycy [13].

Inhibitory proteasomów

Istnieje wiele związków zarówno naturalnych i syntetycznych, które hamują czynność proteasomu poprzez odwracalne, bądź nieodwracalne wiązanie z miejscem aktywnym podjednostki katalitycznej 20S. Inhibitorami naturalnymi proteasomów są między innymi – epoxomycyna, eponemycyna, dihydroeponemycyna, laktacystyna, gliotoxin, syringolin A i glidobaktin A [14]. Inhibitory syntetyczne są peptydami z aktywną grupą funkcyjną aldehydową, winylosulfonową lub benzamidową. Większość tych związków odznacza się małą swoistością, słabą stabilnością metaboliczną oraz tym, że wiążą się z proteasomem w sposób nieodwracalny, co ogranicza ich zastosowanie terapeutyczne. Od strony klinicznej najbardziej obiecującymi inhibitorami proteasomów są dipeptydy kwasu boronowego. Związki te mają 1000x większą siłę działania niż analogi aldehydów peptydowych oraz wykazują dużą swoistość w stosunku do proteasomów. Dipeptydy kwasu boronowego hamują odwracalnie aktywność chymotrypsynopodobną oraz powoli dysocjują, dzięki czemu zapewniają stabilną inhibicję proteasomu. Pierwszym inhibitorem proteasomów, który został zastosowany u pacjentów z chorobami nowotworowymi jest bortezomib (PS-341) – rozpuszczalny w wodzie dipeptyd kwasu boronowego, który odwracalnie i selektywnie hamuje proteasomy.

Działanie cytotoksyczne bortezomibu wykazano w badaniach przeprowadzonych *in vitro* na 60 liniach komórkowych wywodzących się z różnych typów nowotworów ludzkich [15]. W komórkach niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC), bortezomib zatrzymuje cykl komórkowy w fazie G₂-M, powodując ich apoptozę. Zatrzymanie cyklu komórkowego jest związane ze wzrostem fosforylacji i rozpadem antyapoptycznego białka Bcl-2 oraz z kumulacją cykliny A i B2 [16]. Bortezomib indukuje

apoptozę komórek nowotworowych szpiczaka mnogiego [17], raka trzustki [18, 19], prostaty [20], jajnika [20] oraz raka głowy i szyi [21].

Inhibitory proteasomów mają korzystny indeks terapeutyczny. Komórki szpiczaka mnogiego oraz komórki białaczkowe są bardziej wrażliwe na inhibicję proteasomów w porównaniu do szpikowych komórek progenitorowych CD34+ oraz limfocytów osób zdrowych [22].

Mechanizm przeciwnowotworowego działania inhibitorów proteasomów

Zablokowanie funkcji proteasomów pociąga za sobą szereg zdarzeń, które ostatecznie doprowadzają do zahamowania wzrostu i rozprzestrzeniania się komórek nowotworowych. Inhibicja układu proteasomalnego:

1. Hamuje degradację białek regulatorowych cyklu komórkowego. Konsekwencją zahamowania degradacji białek regulatorowych cyklu komórkowego jest kumulacja wewnątrzkomórkowych białek m.in. białka supresorowego nowotworów p53 oraz inhibitorów kinaz zależnych od cyklin p21 i p27. Białko p21 indukowane przez białko p53 zatrzymuje cykl komórkowy w fazie G1 [23]. Poza tym białko p53 pobudza komórkę do produkcji proapoptycznego białka Bax, które z kolei hamuje antyapoptyczne białka Bcl-2 i Bcl-x_L, co prowadzi do uwolnienia cząsteczek cytochromu c, aktywacji kaskady kaspaz i w konsekwencji do śmierci komórki [24].

2. Hamuje szlak NF-κB. Zwiększoną aktywność NF-κB obserwowano w komórkach nowotworowych pochodzących z linii komórkowych jak i od pacjentów z chorobami nowotworowymi. Wysoka aktywność wiąże się ze wzrostem/proliferacją komórek nowotworowych, ich rozprzestrzenianiem się oraz opornością na leczenie. Inhibitory proteasomów indukują apoptozę komórek nowotworowych poprzez zahamowanie aktywacji NF-κB. W stanie spoczynku komórki NF-κB hamowany jest przez endogenny inhibitor I-κB. W wyniku pobudzenia komórki I-κB ulega fosforylacji, ubikwitynacji i degradacji za pomocą proteasomów. Zaktywowany NF-κB przemieszcza się z cytoplazmy do jądra komórkowego gdzie wywołuje transkrypcję czynników odpowiedzialnych za wzrost i przeżycie komórek. Inhibitory proteasomów zapobiegają degradacji I-κB, a co za tym idzie przeciwdziałają powstawaniu czynników antyapoptycznych indukowanych przez NF-κB. Zahamowanie fosforylacji i ubikwitynacji I-κB nie tylko zapobiega aktywacji NF-κB, ale również powoduje wzrost wrażliwości komórek nowotworowych na chemioterapię i radioterapię.

3. Aktywuje NH₂-końcową kinazę c-Jun (c-Jun NH₂-terminal kinase). Aktywacja NH₂-końcowej kinazy c-Jun prowadzi do zwiększenia ekspresji Fas i c-myc oraz do aktywacji kaspazy-8, po której następowo aktywacji ulega kaspaza-3. Ta następnie tnie enzymatycznie podjednostkę katalityczną kinazy białkowej zależnej od DNA i białka ATM/ATR, co ostatecznie prowadzi do upośledzenia naprawy DNA i śmierci komórki.

4. Hamuje szlak kinazy białkowej aktywowanej przez mitogeny (p44/42 MAPK). Zahamowanie p44/42 MAPK przyczynia się do zniesienia oporności komórek nowotworowych na chemioterapię.

5. Hamuje degradację czynnika indukującego apoptozę (AIF). AIF jest białkiem zlokalizowanym w przestrzeni międzybłonowej mitochondrium. Podczas apoptozy uwalniany jest do cytoplazmy komórki skąd migruje do jądra komórkowego, wiąże się z DNA powodując jego degradację i w efekcie śmierć komórki. AIF jest niezależnym od kaspaz czynnikiem indukującym apoptozę. Po przedostaniu się z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium do cytoplazmy AIF jest degradowany przez proteasomy. W wyniku zahamowania funkcji proteasomów dochodzi do kumulacji AIF i inicjacji niezależnej od kaspaz apoptozy [25].

Znaczenie inhibitorów proteasomów w leczeniu nowotworów opornych na chemioterapię i radioterapię

Komórki nowotworowe wykazują często oporność na konwencjonalną chemioterapię i/lub radioterapię, co w znacznym stopniu ogranicza efektywność stosowanego leczenia. „Uwrażliwienie” opornych na leczenie komórek staje się ważnym celem terapii przeciwnowotworowej. Liczne badania wskazują, iż inhibitory proteasomów zwiększają wrażliwość komórek nowotworowych na chemioterapię i radioterapię [26, 27, 28]. W badaniu przeprowadzonym przez Ma i wsp. bortezomib skuteczniej hamował wzrost komórek szpiczaka mnogiego opornych na konwencjonalną chemioterapię w porównaniu do komórek na nią wrażliwych. Ponadto komórki, które były odporne na leczenie doxorubicyną, mitoxantronem i melfalanem stawały się wrażliwe na wymienione chemioterapeutyki po wcześniejszym zastosowaniu bortezomibu [29]. W badaniu Russo i wsp. bortezomib hamował wzrost aktywności NF- κ B w komórkach nowotworowych raka okrężnicy oraz zwiększał wrażliwość tych komórek na zastosowaną radioterapię [30]. Stosując myszy model przeszczepu ksenogenicznego ludzkiego szpiczaka Cusack i wsp. wykazali, że spadek aktywności czynnika jądrowego NF- κ B po zastosowaniu inhibitorów proteasomów korelował ze wzrostem wrażliwości na chemioterapię oraz nasileniem apoptozy komórek nowotworowych [31]. Większa wrażliwość szybko proliferujących komórek nowotworowych na inhibitory proteasomów wiąże się z ich szybszym wychwytem i wolniejszą inaktywacją [24].

Rola inhibitorów proteasomów w chorobach rozrostowych układu krwiotwórczego

Inhibitory proteasomów wykazują działanie przeciwnowotworowe w chorobach rozrostowych układu krwiotwórczego. W szczególności bortezomib wykazuje znaczną skuteczność w leczeniu szpiczaka mnogiego. Hideshima i wsp. badali działanie bortezomibu na Dex-wrażliwe i Dex-oporne komórki ludzkiej linii szpiczaka mnogiego oraz na Dox-, Mit-, i Mel- odporne RPMI8226 komórki szpiczaka. Zaobserwowali, że po pierwsze, bortezomib bezpośrednio hamuje proliferację i indukuje apoptozę ludzkich komórek linii MM oraz świeżo wyizolowanych komórek od pacjentów ze szpiczakiem. Po drugie, hamuje szlaki sygnałowe kinazy białkowej aktywowanej przez mitogeny (MAPK), po trzecie, wywołuje apoptozę w dzikich (pod względem p53) jak i zmutowanych komórkach nowotworowych MM, co sugeruje, że apoptoza indukowana przez bortezomib następuje w sposób zależny, jak i niezależny od p53, po czwarte, bortezomib wykazuje synergistyczne działanie z deksametazonem. Bortezomib przeciwdziała również powstawaniu oporności komórek szpiczaka mnogiego na apoptozę, jak ma to miejsce w czasie konwencjonalnego leczenia np. deksametazonem, a także hamuje parakrynną wzrost ludzkich komórek szpiczaka poprzez zahamowanie transkrypcji i wydzielania IL-6 i IGF-1, co zmniejsza przyleganie patologicznych plazmacytów do komórek zrębu szpiku kostnego [17].

W badaniu na mysim modelu ksenogenicznego przeszczepu szpiczaka bortezomib przeciwdziałał tworzeniu naczyń krwionośnych, hamował wzrost patologicznych plazmacytów, podwajał przeżycie myszy w porównaniu z osobnikami kontrolnymi, a u znacznej części osobników indukował całkowitą regresję nowotworu [32].

W badaniach *in vitro*, bortezomib hamuje wzrost Bcr/Abl dodatnich komórek przewlekłej białaczki szpikowej, zarówno wrażliwych jak i opornych na inhibitor kinazy tyrozynowej - imatinib. Zahamowanie wzrostu koreluje z zahamowaniem cyklu komórkowego w fazie G2-M i jest związane z redukcją NF- κ B, zmniejszeniem ekspresji Bcl-x_L, aktywacją kaspazy-3 oraz zmniejszeniem ekspresji i fosforylacji Bcr/Abl. Przy sekwencyjnym leczeniu imatinibem i bortezomibem występuje działanie synergistyczne w indukowaniu apoptozy komórek wrażliwych na imatinib, natomiast podawane jednocześnie działają antagonistycznie [33].

NF- κ B odgrywa istotną rolę w patogenezie białaczki z komórek T u osób dorosłych (ATL). W komórkach ATL MET-1 bortezomib obniża zdolność NF- κ B do wiązania z DNA, lecz nie wpływa na poziom I κ B. W ATL u myszy indukowanej przez iniekcję komórek MET-1, bortezomib był nieefek-

tywny w zapobieganiu progresji choroby, podczas gdy daclizumab - humanizowane przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko receptorowi α IL-2, wywoływał częściową odpowiedź. W terapii skojarzonej, z użyciem bortezomibu i daclizumabu, stwierdzono całkowitą odpowiedź u 38% zwierząt [34].

An i wsp. wykazali, że *in vitro* bortezomib indukuje apoptozę w liniach komórkowych Jurkat, Molt-4, K562, HL-60 oraz U937, a także w komórkach nowotworowych innych tkanek [35].

W badaniu klinicznym przeprowadzonym przez Richardsona i wsp. zastosowano bortezomib u 202 chorych z nawrotowym i opornym na leczenie szpiczakiem mnogim. Jedna trzecia chorych wykazała odpowiedź na leczenie, a średni czas trwania odpowiedzi wynosił 12 miesięcy [36]. Wyniki tego badania doprowadziły do zarejestrowania bortezomibu przez FDA (US Food and Drug Administration) w maju 2003 roku, dla chorych z nawrotowym/opornym szpiczakiem mnogim. W późniejszym randomizowanym badaniu wykazano, że leczenie bortezomibem w monoterapii w porównaniu z zastosowaniem wysokich dawek deksametazonu powoduje znaczące wydłużenie średniego czasu do progresji choroby u pacjentów z nawrotowym/opornym szpiczakiem mnogim [37]. Orłowski i wsp. zastosowali połączenie bortezomibu z pegylowaną liposomalną doxorubicyną (PLD) u 646 pacjentów z nawrotowym lub opornym na leczenie szpiczakiem mnogim. Połączenie PLD z bortezomibem doprowadziło do wydłużenia czasu do progresji choroby o 3 miesiące w porównaniu z grupą chorych leczonych za pomocą bortezomibu. Czas całkowitego przeżycia 15 miesięcy od rozpoczęcia leczenia osiągnięto u 76% pacjentów leczonych za pomocą schematu PLD+bortezomib i u 65% pacjentów otrzymujących bortezomib. Czas trwania odpowiedzi wzrósł z 7.0 do 10.2 miesięcy u pacjentów przyjmujących PLD i bortezomib [38].

Obecnie trwające badania wskazują, że bortezomib może być pomocny w leczeniu chłoniaka strefy brzeżnej (MZL), chłoniaka grudkowego (FL) oraz chłoniaka z komórek płaszczka (MCL). Badania *in vitro* przeprowadzone przez Phama i wsp. na komórkach nowotworowych wyizolowanych od pacjentów z chłoniakiem płaszczka, wykazały, że bortezomib hamuje cykl komórkowy w fazie G1 i indukuje apoptozę. Śmierć komórki powiązana jest ze spadkiem regulacji antyapoptycznych białek (BCL-xL, bfl/A1) oraz aktywacją kaspazy-3, co prowadzi do uwolnienia cytochromu c z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów do cytoplazmy. Zatrzymanie cyklu komórkowego spowodowane jest zmniejszeniem ekspresji cykliny D1 - markera progresji MCL [39]. Bortezomib indukuje również apoptozę w liniach komórkowych chłoniaka SUDHL6, ale nie w komórkach SUDHL4. Ponadto indukuje apoptozę w komórkach w których zahamowano ekspresję białka szoku cieplnego 27 (hsp-27) za pomocą anty-sensownych oligonukleotydów. Odwrotnie, pobudzenie ekspresji hsp-27 w komórkach SUDHL6 uodparnia je na bortezomib [40].

Obiecujące są również wyniki stosowania bortezomibu u pacjentów z oporną i nawracającą makroglobulinemią Waldenströma [41].

Nowe inhibitory proteasomów

Sukces, jaki odniósł bortezomib u chorych z lekoopornym/nawrotowym szpiczakiem mnogim, skłonił badaczy do podjęcia badań nad drugą generacją inhibitorów proteasomów o odmiennych od bortezomibu właściwościach chemicznych i mechanizmie działania. Obecnie w fazie badań klinicznych znajdują się: salinosporamid A (NPI-0052, Sal-A), karfilzomib (PR-171), MLN9708 oraz cephalon (CEP-18770).

Salinosporamid A jest nieodwracalnym inhibitorem podjednostki β 5 proteasomu otrzymywanym ze szczepu morskiego promieniowca *Salinispora tropica* [42]. Różni się on od bortezomibu zarówno strukturą chemiczną jak i mechanizmem działania, co wskazuje na możliwość kojarzenia z bortezomibem. W badaniu przeprowadzonym przez Chauhan i wsp. zaobserwowano synergistyczne przeciwszpiczakowe działanie NPI-0052 i bortezomibu, zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*. Synergistyczne działanie w indukowaniu apoptozy komórek szpiczaka mnogiego było związane z:

- aktywacją kaspazy-8, -9, -3 oraz polimerazy poli-ADP-rybozy (PARP),
- zahamowaniem migracji plazmocytów i angiogenezy,
- zahamowaniem chymotrypsynopodobnej, trypsynopodobnej i kaspazopodobnej aktywności proteasomu,
- zahamowaniem szlaku NF- κ B [43].

NPI-0052 jest w trakcie I fazy badań klinicznych.

Karfilzomib hamuje w sposób nieodwracalny chymotrypsynopodobną aktywność proteasomu, aktywuje wewnętrzny jak i zewnętrzny szlak kaspaz, powoduje depolaryzację błony mitochondrialnej, uwolnienie cytochromu c i innych białek apoptogennych [44]. Karfilzomib odznacza się skutecznością w przypadku oporności na bortezomib, co wykazano na liniach komórkowych MM oraz plazmocytach wyizolowanych od pacjentów opornych na leczenie bortezomibem [45]. Obecnie trwają badania II fazy z udziałem chorych z opornym i nawrotowym szpiczakiem mnogim, fazy Ib z zastosowaniem karfilzomibu w połączeniu z lenalidomidem i deksametazonem oraz fazy Ib/II u pacjentów z guzami litymi.

MLN9708 jest analogiem kwasu boronowego, który w osoczu ulega natychmiast hydrolyzie do MLN2238. Odwracalnie hamuje chymotrypsynopodobną aktywność proteasomu, w porównaniu do bortezomibu odznacza się znacznie krótszym okresem półtrwania oraz możliwością podania doustnego [46]. U myszy MLN2238 silniej hamował aktywność proteasomów komórek nowotworowych znajdujących się w szpiku kostnym niż na obwodzie. W mysim modelu MDA-MB-231 hamował wzrost komórek raka piersi [47]. Obecnie trwa I faza badań klinicznych, w której MLN2238 dozowany jest u pacjentów z chłoniakami i nowotworami niehematologicznymi.

Cephalon podobnie jak MLN9708 jest analogiem kwasu boronowego hamującym odwracalnie aktywność chymotrypsynopodobną proteasomu 20S [48]. W komórkach ludzkiej linii szpiczaka mnogiego indukuje apoptozę komórek nowotworowych poprzez zahamowanie szlaku NF- κ B oraz aktywację kaspaz [49]. W mysim modelu szpiczaka mnogiego zaobserwowano synergistyczną aktywność cephalonu z doxorubicyną, melfalanem i trójtlenkiem arsenu. Ponadto cephalon skojarzony z melfalanem silniej hamował wzrost nowotworowych plazmocytów w porównaniu z samym melfalanem [50]. Cephalon jest obecnie w I fazie badań klinicznych w której uczestniczą pacjenci z chłoniakami niezłaniowymi i zaawansowanymi guzami litymi.

PODSUMOWANIE

Proteasomy odgrywają znaczącą rolę w transformacji nowotworów, ponieważ są odpowiedzialne za degradację wielu białek istotnych w rozwoju nowotworu, m.in. inhibitorów cyklu komórkowego i białek proapoptycznych. Ponadto proteasomy biorą udział w aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, który jest odpowiedzialny za przeżycie komórek nowotworowych, ich wzrost i zmniejszoną zdolność do apoptozy. Zahamowanie aktywności proteasomów przez ich selektywne inhibitory prowadzi do zmniejszenia aktywności NF- κ B, rozregulowania cyklu komórkowego oraz do indukcji apoptozy wskutek nagromadzenia się wewnątrzkomórkowych białek regulatorowych takich jak: I- κ B, p53, inhibitorów zależnych od cyklin (p21, p27), a także białka proapoptycznego Bax. Inhibicja proteasomów okazała się istotną strategią terapeutyczną leczenia nowotworów. Pierwszy lek z klasy inhibitorów proteasomów – bortezomib, wykazuje wysoką skuteczność terapeutyczną w stosunku do lekooporne-go/nawrotowego szpiczaka mnogiego, jak również zwiększa wrażliwość komórek szpiczakowych na konwencjonalną chemioterapię. Obecnie trwają badania oceniające skuteczność bortezomibu w innych chorobach hematologicznych i guzach litych. Nowe nadzieje wiąże się z drugą generacją inhibitorów proteasomów - salinosporamidem A (NPI-0052, Sal-A), karfilzomibem (PR-171), MLN9708 oraz cephalonem (CEP-18770), inhibitory te są obecnie w fazie badań klinicznych.

PIŚMIENNICTWO

1. Arrigo AP, Tanaka K, Goldberg AL, Welch WJ. Identity of the 19S <prosome> particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature*. 1988; **331**: 192-194.
2. Ciechanover A, Iwai K. The ubiquitin system: from basic mechanisms to the patient bed. *IUBMB Life* 2004; **56**: 193-201.
3. Adams J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat. Rev.* 2003; **29** (suppl. 1): 3-9.
4. Verma R, Deshaies RJ. A proteasome howdunit: the case of the missing signal. *Cell*. 2000; **101**: 341-344.
5. Orłowski M, Wilk S. Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Arch Biochem Biophys.* 2003; **415**: 1-5.
6. Goldberg AL. Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. *Biochem. Soc. Trans.* 2007; **35**: 12-17.
7. Ostrowska H, Hempel D, Holub M, Sokołowski J, Kloczko J. Assessment of circulating proteasome chymotrypsin-like activity in plasma of patients with acute and chronic leukemia. *Clin Biochem.* 2008; **41**: 1377-1383.
8. Adams J. Proteasome inhibition: a novel approach to cancer therapy. *Trend in Mol Med.* 2002; **8** (suppl.): 49-54.
9. Chen C, Edelstein LC, Gelines C. The Rel/NF-KappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol Cell Biol.* 2000; **20**: 2687-2695.
10. Sovak MA, Bellas RE, Kim DW. et al. Aberrant nuclear factor-kappaB/rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J. Clin. Invest.* 1997; **100**: 2952-60.
11. Wang W, Abbuzzese JL, Evans DB, Larry L, Cleary KR, Chiao PJ. The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin. Cancer Res.* 1999; **5**: 119-127.
12. Sumitomo M, Tachibana M, Ozu C. et al. Induction of apoptosis of cytokine-producing bladder cancer cells by adenovirus-mediated IkappaBalpha overexpression. *Hum. Gene Ther.* 1999; **10**: 37-47.
13. Visconti R, Cerutti J, Battista S. et al. Expression of the neoplastic phenotype by human thyroid carcinoma cell lines requires NFkappaB p65 protein expression. *Oncogene.* 1997; **15**: 1987-94.
14. Jung T, Catalgol B, Grune T. The proteasomal system. *Mol Aspects Med.* 2009; **30**: 191-296.
15. Adams J, Palombella VJ, Sausville EA. et al. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res.* 1999; **59**: 2615-22.
16. Ling YH, Liebes L, Ng B. et al. PS-341, a novel proteasome inhibitor, induces Bcl-2 phosphorylation and cleavage in association with G2-M phase arrest and apoptosis. *Mol Cancer Ther.* 2002; **1**: 841-849.
17. Hideshima T, Richardson P, Chauhan D. et al. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res.* 2001; **61**: 3071-76.
18. Bold RJ, Virudachalam S, McConkey DJ. Chemosensitization of pancreatic cancer by inhibition of the 26S proteasome. *J Surg Res.* 2001; **100**: 11-17.
19. Shah SA, Potter MW, McDade TP. et al. 26S proteasome inhibition induces apoptosis and limits growth of human pancreatic cancer. *J Cell Biochem.* 2001; **82**: 110-122.
20. Frankel A, Man S, Elliott P, Adams J, Kerbel RS. Lack of multicellular drug resistance observed in human ovarian and prostate carcinoma treated with the proteasome inhibitor PS-341. *Clin Cancer Res.* 2000; **6**: 3719-3728.
21. Sunwoo JB, Chen Z, Dong G. et al. Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of Nuclear Factor-KappaB, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2001; **7**: 1419-1428.
22. Servida F, Soligo D, Delia D. et al. Sensitivity of human multiple myelomas and myeloid leukemias to the proteasome inhibitor I. *Leukemia.* 2005; **19**: 2324-31.
23. Almond JB, Cohen GM. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia.* 2002; **16**: 433-443.
24. Voorhees PM, Dees EC, O'Neil B, Orłowski RZ. The proteasome as a target for cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2003; **9**: 6316-6325.
25. Kroemer G. Mitochondrial control of apoptosis. *Bull. Acad. Natl. Med.* 2001; **185**: 1135-42.
26. Li QQ, Yunbam MK, Zhong X. et al. Lactacystin enhances cisplatin sensitivity in resistant human ovarian cancer cell lines via inhibition of DNA repair and ERCC-1 expression. *Cell Mol. Biol.* 2001; (Noisy. -Je-grand) 47 Online Pub, OL61-OL72.
27. Oyaizu H, Adachi Y, Okumura T. et al. Proteasome inhibitor 1 enhances paclitaxel-induced apoptosis in human lung adenocarcinoma cell line. *Oncol. Rep.* 2001; **8**: 825-829.
28. Patel NM, Nozaki S, Shortle NH. et al. Paclitaxel sensitivity of breast cancer cell with constitutively active NF-kB is enhanced by IκB α super-repressor and parthenolide. *Oncogene.* 2000; **19**: 4159-4169.
29. Ma MH, Yang HH, Parker K. et al. The proteasome inhibitor PS-341 markedly enhances sensitivity of multiple myeloma tumor cells to chemotherapeutic agents. *Clin Cancer Res.* 2003; **9**: 1136-1144.
30. Russo SM, Tepper JE, Baldwin AS. et al. Enhancement of radiosensitivity by proteasome inhibition: implications for a role of NF-kB. *Int Radiat Oncol Biol Phys.* 2001; **50**: 183-193.

31. Cusack JC, Liu R, Houston M. et al. Enhanced chemosensitivity to CPT-11 with proteasome inhibitor PS-341: implications for systemic Nuclear FactorKappaB inhibition. *Cancer Res.* 2001; **61**: 3535-3540.
32. LeBlanc R, Catley LP, Hideshima T. et al. Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth *in vivo* and prolongs survival in murine model. *Cancer Res.* 2002; **62**: 4996-5000.
33. Gatto S, Scappini B, Pham L. et al. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth and induces apoptosis in Bcr/Abl-positive cell lines sensitive and resistant to imatinib mesylate. *Haematologica.* 2003; **88**: 853-863.
34. Tan C, Waldmann TA. Proteasome inhibitor PS-341, a potential therapeutic agent for adult T-cell leukemia. *Cancer Res.* 2002; **62**: 1083-1086.
35. An WG, Hwang SG, Trepel JB. et al. Protease inhibitor-induced apoptosis: accumulation of wt p53, p21WAF1/CIP1, and induction of apoptosis are independent markers of proteasome inhibition. *Leukemia.* 2000; **14**: 1276-83.
36. Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC. Bortezomib (PS-341) a novel, first-in class proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and other cancers. *Cancer Control.* 2003; **10**: 361-9.
37. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW. et al. Bortezomib or High-Dose Dexamethasone for Relapsed Multiple Myeloma. *N Engl J Med.* 2005; **352**: 2487-98.
38. Orlowski RZ, Nagler A, Sonneveld P. et al. Randomized Phase III Study of Pegylated Liposomal Doxorubicin Plus Bortezomib Compared With Bortezomib Alone in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma: Combination Therapy Improves Time to Progression. *J Clin Oncol.* 2007; **25**: 3892-3901.
39. Pham LV, Tamayo AT, Yoshimura LC, Lo P, Ford RJ. Inhibition of constitutive NF-kappa B activation in mantle cell lymphoma B cells leads to induction of cell cycle arrest and apoptosis. *J Immunol.* 2003; **171**: 88-95.
40. Chauhan D, Li G, Shringarpure R. et al. Blockade of Hsp27 overcomes bortezomib/proteasome inhibitor PS-341 resistance in lymphoma cells. *Cancer Res.* 2003; **63**: 6174-6177.
41. Dimopoulos MA, Anagnostopoulos A, Kyrtonis MC. et al. Treatment of relapsed or refractory Waldenstrom's macroglobulinemia with bortezomib. *Haematologica.* 2005; **90**: 1655-58.
42. Tsueng G, Teisan S, Lam KS. Defined salt formulations for the growth of *Salinispora tropica* strain NPS21184 and the production of salinosporamide A (NPI-0052) and related analogs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008; **78**: 827-832.
43. Chauhan D, Singh A, Brahmandam M. et al. Combination of proteasome inhibitors bortezomib and NPI-0052 trigger *in vivo* synergistic cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood.* 2008; **111**: 1654-64.
44. Demo SD, Kirk CJ, Aujay MA. et al. Antitumor activity of PR-171, a novel irreversible inhibitor of the proteasome. *Cancer Res.* 2007; **67**: 6383-91.
45. Kuhn DJ, Chen Q, Voorhees PM. et al. Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. *Blood.* 2007; **110**: 3281-90.
46. Kupperman E. et al. Preclinical evaluation of the orally active proteasome inhibitor MLN9708 in preclinical models of human cancer [abstract]. *Proc AACR Annu. Meet. (suppl.)*, 2009; Abstract 5636.
47. Bannerman B. et al. The proteasome inhibitor MLN9708 has strong antitumor activity in the murine bone marrow compartment *in vivo* [abstract]. *Proc. AACR Annu. Meet. (suppl.)*, 2009; Abstract 5635.
48. Dorsey BD, Iqbal M, Chatterjee S. et al. Discovery of a potent, selective, and orally active proteasome inhibitor for the treatment of cancer. *J. Med. Chem.* 2008; **51**: 1068-1072.
49. Piva R, Ruggeri B, Williams M. et al. CEP-18770: a novel, orally active proteasome inhibitor with a tumor-selective pharmacologic profile competitive with bortezomib. *Blood.* 2008; **111**: 2765-2775.
50. Sanchez E, Campbell RA, Steinberg JA. et al. The novel proteasome inhibitor CEP-18770 inhibits myeloma tumor growth *in vitro* and *in vivo* and enhances the anti-MM effects of melphalan. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts).* 2008; **112**: 843.

Praca wpłynęła do Redakcji 21.04.2010 r. i została zakwalifikowana do druku 21.04.2010 r.

Adres Autora:

Agnieszka Kostur
Klinika Hematologii
ul. M. Skłodowskiej-Curie 24A
15-276 Białystok
Tel. 85-7468488