

# Proteasoomremmers bij acute leukemie

## Proteasome inhibitors in acute leukemia

dr. D. Niewerth

### Samenvatting

Op 14 november 2014 promoveerde D. Niewerth aan de Vrije Universiteit van Amsterdam op haar promotieonderzoek getiteld: 'Proteasoomremmers bij acute leukemie', onder begeleiding van promotoren prof. dr. G.J.L. Kaspers en prof. dr. S. Zweegman, en copromotoren dr. J. Cloos en dr. G. Jansen. In deze proefschriftbespreking worden de belangrijkste bevindingen van het onderzoek weergegeven.

*(Ned Tijdschr Hematol 2015;12:160-2)*

### Summary

On November 14, 2014, D. Niewerth was promoted at the VU University Medical Center in Amsterdam on her PhD thesis entitled: 'Proteasome inhibitors in acute leukemia', under the supervision of prof. G.J.L. Kaspers, MD, PhD, and prof. S. Zweegman, MD, PhD, and the co-supervision of J. Cloos, PhD and dr. G. Jansen, PhD. The most important findings of this investigation are summarized in this report.

### Inleiding

Een recidief na een eerdere succesvolle behandeling van leukemie behoort tot een van de meest belangrijke problemen binnen de kinderoncologie: 20-30% van de kinderen krijgt een recidief na behandeling, wat resulteert in slechts 10-40% kans op genezing voor de subtypen met een slechte prognose.<sup>1,2</sup> Voor deze patiënten met een lage overlevingskans is het daarom noodzakelijk medicijnen te ontwikkelen met nieuwe werkingsmechanismen. Een nieuw middel dat daarbij zijn effectiviteit reeds heeft bewezen, is de proteasoomremmer bortezomib, dat wordt gebruikt bij de behandeling van volwassenen met multipel myeloom (MM) en lymfoom.<sup>3</sup> Het werkingsmechanisme van bortezomib is de remming van proteasomen die verantwoordelijk zijn voor de afbraak van de meeste intracellulaire eiwitten.<sup>4</sup> Naast het constitutief proteasoom dat voorkomt in alle cellen, bestaat ook het immuunproteasoom dat voornamelijk tot expressie komt in cellen van het immuunsysteem en in leukemiecellen. Gebaseerd op veelbelovende resultaten in de kliniek is bortezomib geselecteerd voor onderzoek als nieuwe antileukemische therapie voor kinderen met acute lymfatische leukemie (ALL) en acute myeloïde

leukemie (AML).<sup>5</sup>

In dit proefschrift is de focus gelegd op de antileukemische effecten van bortezomib in humane cellijnen van hematologische maligniteiten en in kinderleukemiecellen. Het ontstaan van resistentie tegen bortezomib gedurende behandeling van MM-patiënten en de veelvoorkomende bijeffecten, zoals perifere neuropathie, hebben bijgedragen aan de ontwikkeling van (orale) tweede generatie proteasoomremmers met irreversibele in plaats van reversibele binding aan het proteasoom, betere farmacokinetiek en een geoptimaliseerde therapeutische index.<sup>6</sup> In de studies beschreven in dit proefschrift is de moleculaire basis van resistentie tegen bortezomib en ook van tweede generatie proteasoomremmers in leukemiecellen onderzocht. Gebaseerd op deze studies zijn parameters bepaald die kunnen helpen bij de selectie van patiënten die baat hebben bij therapie met bortezomib. Dit is van belang bij de keuze van de meest optimale individuele gerichte therapie en het voorkomen van onnodige therapie. Bovendien zijn strategieën onderzocht om bortezomib-resistentie te voorkomen of te bestrijden.<sup>7</sup>

Correspondentie graag richten aan mw. dr. D. Niewerth, onderzoeker, afdeling Kinderoncologie/Hematologie, VU medisch centrum, De Boelelaan 1117, 1081 HV Amsterdam, tel.: 020 444 73 17, e-mailadres: d.niewerth@vumc.nl

Belangenconflict: geen gemeld. Financiële ondersteuning: geen gemeld.

**Trefwoorden:** acute leukemie, bortezomib, proteasoomremmer

**Keywords:** acute leukemia, bortezomib, proteasome inhibitor

## Resistentie tegen proteasoomremmers in vitro

Om de resistentiemechanismen van proteasoomremmers in kaart te brengen, zijn een ALL-, AML- en MM-celijn resistent gemaakt door langdurige blootstelling aan bortezomib, marizomib of immuunproteasoomremmer PR-924. Bij al deze resistente cellen werden mutaties in het *PSMB5*-gen gezien, dat codeert voor de actieve  $\beta 5$ -subunit van het proteasoom. Alle verschillende gevonden mutaties bevinden zich in de S1-pocket waar alle 3 proteasoomremmers binden aan het proteasoom. Gebaseerd op computersimulatiemodellen met bortezomib is geconstateerd dat deze mutaties zorgen voor verminderde binding van bortezomib aan de gemuteerde  $\beta 5$ -subunit.<sup>8</sup> Daarnaast waren de katalytische constitutieve proteasoomsubunitniveaus verhoogd vergeleken met gevoelige cellen, terwijl katalytische immuunproteasoomniveaus voornamelijk verlaagd waren. Leukemiecellen met verworven resistentie tegen bortezomib, marizomib of PR-924 hebben dus dezelfde overlappende moleculaire resistentiemechanismen. Omdat bekend is dat interferon- $\gamma$  de expressie van het immuunproteasoom kan verhogen, is onderzocht of blootstelling aan interferon- $\gamma$  de 3 verschillende bortezomib-resistente tumorcellijnen kon sensibiliseren voor proteasoomremming. Deze behandeling verhoogde de niveaus van het katalytisch actieve immuunproteasoom in bortezomib-resistente cellen met in parallel verlaagde niveaus van zowel de gemuteerde als ongemuteerde allelen van constitutief  $\beta 5$ . Deze eigenschappen resulteerden in verhoogde gevoeligheid van bortezomib-resistente cellen voor bortezomib en meest prominent voor de immuunproteasoomremmer ONX0914. Dit sensibiliserende effect werd tenietgedaan in afwezigheid van  $\beta 5i$ , maar niet door verminderde expressie van  $\beta 1i$ , wat indiceert dat verminderde expressie van de  $\beta 5i$ -subunit een belangrijke factor is in resistentie tegen bortezomib.<sup>9</sup>

## Verificatie in kinderleukemiecellen

Om te verifiëren of deze in vitro bepaalde parameters ook klinisch relevant zijn, zijn ook ex vivo leukemiecellen onderzocht. In geen van de patiëntcellen zijn mutaties gevonden in het *PSMB5*-gen. Daarnaast zijn de proteasoomsubunitniveaus bepaald in ALL- en AML-patiëntcellen, afgenomen bij de initiële diagnose.<sup>10</sup> De proteasoomcompositie van leukemiecellen bestaat voornamelijk uit immuunproteasomen. Daarnaast hebben ALL-cellen hogere immuunproteasoomniveaus dan AML-cellen, terwijl de totale proteasoomhoeveelheid niet verschilt tussen deze 2 typen leukemie. ALL-cellen waren gevoe-

liger dan AML-cellen voor de proteasoomremmers bortezomib, carfilzomib, oprozomib, ONX 0914, en het glucocorticoïd dexamethason. Omdat een goede respons op glucocorticoïden bij kinderen met ALL een gunstige prognostische factor is, was het interessant om te zien dat het antileukemische effect van dexamethason werd versterkt in combinatie met bortezomib, resulterende in additieve of synergistische effecten. Na classificatie in subgroepen waren de prognostisch ongunstige pro-B ALL- en T-ALL-groepen even gevoelig voor bortezomib als de pre-B/common-ALL-groep. Correlaties tussen proteasoomsubunitniveaus en gevoeligheid voor proteasoomremming onthulde dat ratio's van immuun-/constitutief proteasoomsubunits significant correleerden met de gevoeligheid voor proteasoomremmers in kinder-ALL en -AML-cellen. Tot slot is onderzocht of ratio's van immuun-/constitutief proteasoomsubunits correleren met klinische respons op bortezomib. Hiervoor hadden we de unieke gelegenheid om cellen van refractaire kinderen of kinderen met een eerste recidief van acute leukemie te includeren van 2 Amerikaanse Children's Oncology Group (COG) fase 2-studies voor kinder-ALL (COG-AALLP107) en kinder-AML (COG-AAML07P1). Hierbij zijn kinderen behandeld met reïnductiechemotherapie met daarbij ook bortezomib. Eiwitexpressie van proteasoomsubunits die zijn bepaald voorafgaand aan de reïnductiechemotherapie liet zien dat ratio's van  $\beta 5i/\beta 5$  en  $\beta 1i/\beta 1$  significant hoger waren in ALL-cellen dan in AML-cellen. Patiënten die complete remissie (CR) bereikten na reïnductietherapie hadden significant hogere  $\beta 5i/\beta 5$ - en  $\beta 1i/\beta 1$ -ratio's vergeleken met patiënten die geen CR bereikten.

## Conclusie

Bortezomib en tweede generatie proteasoomremmers zijn goede kandidaten voor implementatie in de behandeling van acute leukemie bij kinderen. In het bijzonder zijn de nieuwe oraal beschikbare tweede generatie proteasoomremmers zeer interessant. De resultaten van dit proefschrift zijn van belang voor de toekomstige behandeling van kinderleukemie, met name voor het voorkomen van de toxiciteit van bortezomib, het omzeilen van bortezomib-resistentie en verdere evaluatie van de synergie in combinatie met andere medicijnen zoals glucocorticoïden. Deze resultaten impliceren dat leukemiepatiënten met hogere immuunproteasoomniveaus en lagere constitutief proteasoomniveaus voorafgaand aan behandeling met bortezomib beter zullen reageren op bortezomib-gebaseerde therapie dan patiënten met hogere constitutief proteasoomniveaus. Om vast te stellen

## Aanwijzingen voor de praktijk

- 1. Gebaseerd op preklinische gegevens blijken combinaties van bortezomib, en in het bijzonder de oraal beschikbare tweede generatie proteasoomremmers, met conventionele chemotherapie veelbelovende behandelingsmogelijkheden voor kinderen met (refractaire en gerecidiveerde) acute leukemie.**
- 2. Hogere ratio's van immuun-/constitutief proteasoom in kinderleukemiecellen voorafgaand aan behandeling zouden van voorspellende waarde kunnen zijn voor verhoogde klinische gevoeligheid voor bortezomib-gebaseerde behandeling.**

of de immuun-/constitutief proteasoomratio een bepalende factor is voor de gevoeligheid voor proteasoomremmers, is nader en prospectief onderzoek noodzakelijk in grotere patiëntencohorten.

### Referenties

1. Pui CH, Mullighan CG, Evans WE, et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood* 2012;120:1165-74.
2. Kaspers GJ. Pediatric acute myeloid leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther* 2012;12:405-13.
3. McBride A, Ryan PY. Proteasome inhibitors in the treatment of multiple myeloma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2013;13:339-58.
4. Navon A, Ciechanover A. The 26 S proteasome: from basic mechanisms to drug targeting. *J Biol Chem* 2009;284:33713-8.
5. Niewerth D, Dingjan I, Cloos J, et al. Proteasome inhibitors in acute leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther* 2013;13:327-37.
6. Kirk CJ. Discovery and development of second-generation proteasome inhibitors. *Semin Hematol* 2012;49:207-14.
7. Niewerth D, Franke NE, Jansen G, et al. Het voorspellen van de gevoeligheid van kinderleukemiecellen voor proteasoomremmers. *Ned Tijdschr Kindergeneeskd* 2014;82:79-88.
8. Franke NE, Niewerth D, Assaraf YG, et al. Impaired bortezomib binding to mutant beta5 subunit of the proteasome is the underlying basis for bortezomib resistance in leukemia cells. *Leukemia* 2012;26:757-68.
9. Niewerth D, Kaspers GJ, Assaraf YG, et al. Interferon- $\gamma$ -induced upregulation of immunoproteasome subunit assembly overcomes bortezomib resistance in human hematological cell lines. *J Hematol Oncol* 2014;7:7.
10. Niewerth D, Franke NE, Jansen G, et al. Higher ratio immune vs. constitutive proteasome level as novel indicator of sensitivity of pediatric acute leukemia cells to proteasome inhibitors. *Haematologica* 2013;98:1896-904.

*Ontvangen 1 april 2015, geaccepteerd 15 april 2015.*

*1/2 BS Revolade of Arzerra  
krijgen voor 15 mei bericht*