

Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Wydział Nauk o Zdrowiu

Agata Majchrzak

**Ocena aktywności inhibitorów szlaków mTOR i NFkB
oraz białka BCL-2 na komórki chłoniaka rozlanego z
dużych komórek B**

Evaluation of mTOR, NFkB, BCL-2 inhibitors activity on diffuse
large b-cell lymphoma cells

Promotor pracy: dr hab. n. med. prof. UM Paweł Robak

Klinika Hematologii UM

Łódź, 2024

VI. STRESZCZENIE

DLBCL stanowi agresywną grupę chłoniaków, które cechuje wysoka heterogenność pod względem przebiegu klinicznego, cech molekularnych i genetycznych. Zaliczane są do podtypu NHL, a częstotliwość ich występowania waha się od 30 do 40% wszystkich nowo diagnozowanych przypadków chłoniaków.

Obecnie obowiązująca 5-ta klasyfikacja chłoniaków ustanowiona przez WHO w 2022 roku została stworzona w oparciu o cechy morfologiczne, biologiczne, immunofenotypowe oraz kliniczne [2]. Wśród podtypów wymienić można chłoniaka pierwotnie śródpiersiowego oraz chłoniaka rozlanego z dużych komórek B bliżej nieokreślonego, czyli DLBCL NOS (ang. diffuse large B cell lymphoma non otherwise specified). Znaczenie dla rokowania DLBCL ma również pochodzenie komórek, z których się wywodzą: lepiej rokujący GCB i non-GCB zwany inaczej ABC.

DLBCL stanowi grupę chłoniaków agresywnych, choć wykazuje dość wyraźną wrażliwość na chemio i immunoterapię. W związku z powyższym leczenie u pacjentów z tym typem chłoniaka powinno być wdrożone jak najszybciej. Przełomem w leczeniu okazało się połączenie standardowej chemioterapii z zastosowaniem przeciwciała monoklonalnego anty CD20 rytuksymabu, a w ostatnich latach anty CD79b polatuzumabu wedotyny.

W chłoniakach DLBCL obserwuje się zaburzenia w szlaku NFκB i deregulację białek z rodziny BCL-2 i mTOR. Powoduje to w znacznym stopniu inhibicję procesu apoptozy. W związku z tym ustalono wiele strategii, ukierunkowanych na działanie tych szlaków. Odkrycie inhibitorów drobnocząsteczkowych, zaczęło odgrywać kluczowe znaczenie w celu uzyskania pożądaných efektów klinicznych.

ABT-199 (wenetoklaks) to inhibitor wysoce selektywny dla białka BCL-2. Wykazuje 3-krotnie mniejsze powinowactwo do innego białka z rodziny BCL-2 tj. BCL-XL. Zasadniczą funkcją BCL-2 jest odtworzenie procesu apoptozy. AZD2014 (Vistusertib) jest inhibitorem kinazy serynowo-tyreoninowej mTOR, jednak w przeciwieństwie do Rapamycyny i jej pochodnych blokuje on działanie zarówno kompleksu mTORC1 jak i mTORC2. IMD0354 jest inhibitorem NFκB, który działa poprzez bezpośrednie blokowanie fosforylacji IKKB. Jego działanie przeciwnowotworowe opisywane jest jako hamowanie żywotności komórek oraz

wspomaganie działanie chemioterapeutyków stosowanych w leczeniu. Ma działanie przeciwzapalne poprzez blokowanie szlaku NFkB i produkcji cytokin.

Wczesne badania kliniczne inhibitorów mTOR, NFkB i BCL-2 sugerują ich działanie w wielu nowotworach hematologicznych, jednak nadal ich aktywność jako leki stosowane w monoterapii może być niewystarczająca, dlatego poszukuje się połączeń tych związków z innymi cząsteczkami działającymi na aktywne w danym podtypie nowotworu szlaki sygnałowe.

Badania *in vitro* prowadzone były na wybranych liniach komórkowych: TOLEDO, KARPAS1106P i RIVA (Ri-1). Linia Komórkowa TOLEDO to linia komórkowa, która została wyizolowana w 1990 roku, reprezentuje komórki chłoniaka DLBCL, są to limfocyty B wykazujące ekspresję antygenów: CD10+, CD19+, CD38+, CD20+ oraz bez ekspresji antygenów CD23 i CD39. Linia komórkowa TOLEDO charakteryzuje się licznymi aberracjami chromosomowymi, komórki tej linii nie są zakażone wirusem EBV i reprezentują podtyp GCB chłoniaka DLBCL. Kolejną linią komórkową, na której prowadzone były badania jest linia RIVA, została ona wyizolowana od 48 letniej kobiety chorującej na chłoniaka B-komórkowego. Jest to linia komórkowa reprezentująca podtyp ABC chłoniaka DLBCL. Komórki tej linii wykazują ekspresję antygenów CD20+, CD38+, FMC7+ i HLA-DR+, podobnie jak linia TOLEDO, linia komórkowa RIVA nie jest zakażona wirusem EBV. Linia komórkowa KARPAS 1106P to komórki wyizolowane od 23-letniej pacjentki chorującej na chłoniaka pierwotnego śródpiersia, komórki tej linii nie wykazują ekspresji BCL-2.

Schemat podawania leków

- Linia komórkowa RIVA: kontrola, AZD2014(10uM), IMD0354 (5uM), ABT-199 (5nM), AZD2014+IMD0354, AZD2014+ABT-199, ABT-199+IMD0354, AZD2014+IMD0354+ABT-199
- Linia komórkowa TOLEDO: kontrola, AZD2014 (10uM), IMD0354 (10uM), ABT-199 (30nM), AZD2014+IMD0354, AZD2014+ABT-199, ABT-199+IMD0354, AZD2014+IMD0354+ABT-199

- Linia komórkowa KARPAS: kontrola, AZD2014 (5uM), IMD0354 (10uM), ABT-199 (50uM), AZD2014+IMD0354, AZD2014+ABT-199, ABT-199+IMD0354, AZD2014+IMD0354+ABT-199

Reasumując, na podstawie wyników przeprowadzonych badań własnych sformułowano następujące wnioski:

1. Dla linii komórkowej RIVA (podtyp ABC chłoniaka DLBCL):

- pojedynczo najsilniej proapoptotycznie na komórki nowotworowe działał ABT-199
- w parach działanie było podobne przy zastosowaniu AZD2014+ABT-199 oraz ABT-199+IMD0354
- połączenie 3 leków nie działało silniej w porównaniu do par leków AZD2014+ABT-199 oraz ABT-199+IMD0354

2. Dla linii komórkowej KARPAS (PMBL):

- pojedynczo najsilniej proapoptotycznie na komórki nowotworowe działał ABT-199
- w parach działanie było najsilniejsze przy zastosowaniu AZD2014+ABT-199
- połączenie 3 leków nie działało silniej w porównaniu do pary leków AZD2014+ABT-199

3. Dla linii komórkowej TOLEDO (postać GCB chłoniaka DLBCL):

- pojedynczo brak różnic statystycznych w zastosowanych lekach
- w parach działanie było najsilniejsze przy zastosowaniu AZD2014+ABT-199
- połączenie 3 leków nie działało silniej w porównaniu do pary leków AZD2014+ABT-199

VII. SUMMARY

DLBCL is an aggressive group of lymphoma characterized by high heterogeneity in clinical, molecular and genetic features. They belong to the subtype NHL, and their incidence ranges between 30 and 40% of all newly diagnosed cases.

The current 5th classification of lymphomas established by WHO in 2022 was created on the basis of morphological, biological, immunophenotype and clinical features [2]. The subtypes include primary mediastinal B cell lymphoma (PMBL) and diffuse large B cell lymphoma not otherwise specified, (DLBCL NOS). The origin of the cells from which the cancer clone originates is also important for the prognosis of DLBCL: GCB (germinal center B-cell type) subtype with better prognosis and non-GCB, also known as ABC (activated B-cell type), a type derived from activated B cells.

DLBCL lymphomas are a group of aggressive, although they show a quite clear sensitivity to immuno- and chemotherapy. Accordingly, the treatment of patients with this subtype of lymphoma should be initiated as soon as possible. Progress in the treatment of DLBCL was connection of standard chemotherapy with monoclonal antibodies. First with rituximab- anti CD20 monoclonal antibody and more lately polatuzumab vedotin that links to anti CD79b antigen.

In DLBCL lymphomas, disturbances in the NFkB pathway and deregulation of BCL-2 and mTOR family proteins are observed. This significantly inhibits the apoptosis process. Therefore, many strategies have been established to target the functioning of these pathways. The discovery of small molecule inhibitors has become crucial to achieving desired clinical effects.

ABT-199 (venetoclax) is a highly selective inhibitor for the Bcl-2 protein. It has a 3-fold lower affinity for another protein from the BCL-2 family, i.e. BCL-XL. The main function of BCL-2 is to restore the apoptosis process. AZD2014 (Vistusertib) is an inhibitor of the serine-threonine kinase mTOR, but unlike Rapamycin and its derivatives, it blocks the action of both the mTORC1 and mTORC2 complexes. IMD0354 is an NFkB inhibitor that works by directly blocking IKKB phosphorylation. Its anticancer effect is described as inhibiting cell viability

and supporting the action of chemotherapy drugs used in treatment. It has anti-inflammatory effects by blocking the NFκB pathway and cytokine production.

Early clinical trials of mTOR, NFκB and Bcl-2 inhibitors suggest their activity in many hematological cancers, but their activity as monotherapy agents may still be insufficient, therefore combinations of these compounds with other molecules acting on those active in a given cancer subtype are being sought. signaling pathways.

In vitro studies were conducted on selected cell lines: TOLEDO, KARPAS1106P and RIVA (Ri-1). The TOLEDO Cell Line is a cell line that was isolated in 1990, representing DLBCL lymphoma cells, these are B lymphocytes expressing the following antigens: CD10+, CD19+, CD38+, CD20+ and those without the expression of CD23 and CD39 antigens. The TOLEDO cell line is characterized by numerous chromosomal aberrations, the cells of this line are not infected with EBV and represent the GCB subtype of DLBCL lymphoma. Another cell line on which research was conducted is the RIVA line, it was isolated from a 48-year-old woman suffering from B-cell lymphoma. This is a cell line representing the ABC subtype of DLBCL lymphoma. Cells of this line express CD20+, CD38+, FMC7+ and HLA-DR+ antigens. Similarly to the TOLEDO line, the RIVA cell line is not infected with EBV. The KARPAS 1106P cell line are cells isolated from a 23-year-old patient suffering from primary mediastinal lymphoma. The cells of this line do not express BCL-2.

Drug administration regimen

- RIVA cell line: control, AZD2014(10uM), IMD0354 (5uM), ABT-199 (5nM), AZD2014+IMD0354, AZD2014+ABT-199, ABT-199+IMD0354, AZD2014+IMD0354+ABT-199
- TOLEDO cell line: control, AZD2014 (10uM), IMD0354 (10uM), ABT-199 (30nM), AZD2014+IMD0354, AZD2014+ABT-199, ABT-199+IMD0354, AZD2014+IMD0354+ABT-199
- KARPAS cell line: control, AZD2014 (5uM), IMD0354 (10uM), ABT-199 (50uM), AZD2014+IMD0354, AZD2014+ABT-199, ABT-199+IMD0354, AZD2014+IMD0354+ABT-199

To sum up, based on the results of our own research, the following conclusions were formulated:

1. For the RIVA cell line (ABC subtype of DLBCL lymphoma)

- individually, ABT-199 had the strongest pro-apoptotic effect on cancer cells
- in pairs, the effect was similar when using AZD2014+ABT-199 and ABT-199+IMD0354
- the combination of 3 drugs did not have a stronger effect compared to the drug pairs AZD2014+ABT-199 and ABT-199+IMD0354

2. For KARPAS cell line (PMBL):

- individually, ABT-199 had the strongest pro-apoptotic effect on cancer cells
- in pairs, the effect was strongest when using AZD2014+ABT-199
- the combination of 3 drugs did not have a stronger effect compared to the drug pair AZD2014 + ABT-199

3. For TOLEDO cell line (GCB form of DLBCL lymphoma):

- individually, no statistical differences in the drugs used
- in pairs, the effect was strongest when using AZD2014+ABT-199
- the combination of 3 drugs did not have a stronger effect compared to the drug pair AZD2014 + ABT-199