

Aleksandra Kubiak

**„Wpływ wenetoklaksu (WEN) i kladrybiny (2-CdA)
na apoptozę komórek przewlekłej białaczki limfocytowej
w badaniach *in vitro*”**

**Praca na stopień doktora nauk medycznych
w zakresie biologii medycznej**

Promotor pracy: prof. dr hab. n. med. Anna Korycka-Wołowiec

Promotor pomocniczy: dr n. med. Ewelina Ziółkowska

**Katedra i Klinika Hematologii
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Agnieszka Wierzbowska**

Łódź, 2022

VIII. STRESZCZENIE

Przewlekła białaczka limfocytowa (PBL) jest chorobą nowotworową wywodzącą się z dojrzałych limfocytów typu B. W jej patogenezie istotną rolę odgrywa zahamowanie apoptozy, prowadzące do akumulacji komórek białaczkowych we krwi, szpiku, węzłach chłonnych i/lub narządach pozawęzłowych. Pomimo wielu dostępnych opcji terapeutycznych PBL pozostaje chorobą nieuleczalną. Dlatego tak ważne jest poszukiwanie nowych leków, które zastosowane w monoterapii, lub w skojarzeniu z innymi lekami cytotoksycznymi, okażą się skuteczne przy akceptowalnym profilu bezpieczeństwa. Zastosowanie leków w skojarzeniu pozwala bowiem osiągnąć lepsze efekty terapeutyczne oraz minimalizować ryzyko lekooporności.

W ostatnich latach duże nadzieje wiąże się z wenetoklaksem (WEN), stosowanym w leczeniu nowotworów hematologicznych, w tym także PBL. Jest on wysoce selektywnym inhibitorem białek BCL-2, należącym do grupy BH3-*only* mimetyków. Indukuje procesy zaprogramowanej śmierci komórki poprzez aktywację wewnątrzpochodnego szlaku apoptozy. Jego skuteczność kliniczna jest niezależna od obecności del17p, mutacji TP53 oraz stanu funkcjonalnego TP53. Lek okazał się skuteczny nie tylko w monoterapii, ale także w skojarzeniu z innymi lekami jak np. z rituksymabem, obinutuzumabem, bendamustyną i może być stosowany zarówno w pierwszej linii leczenia, jak i u chorych opornych/nawrotowych.

Kładrybina (2-chlorodeoskysyadenozyna; 2-CdA) jest natomiast lekiem znanym i stosowanym od wielu lat w leczeniu PBL. Należy do grupy analogów nukleozydów purynowych, a mechanizm jej działania opiera się na indukowaniu procesów apoptozy w komórkach nowotworowych poprzez szlak wewnątrzpochodny zarówno zależny, jaki niezależny od białka P53. W mechanizmie jej działania bierze się także pod uwagę możliwość indukowania zewnątrzpochodnego szlaku apoptozy. 2-CdA stosowana jest w skojarzeniu z innymi lekami przeciwnowotworowymi, jak cyklofosamid, rituksymab, mitoksantron.

Na podstawie dostępnej wiedzy wenetoklaks nie był dotychczas badany w PBL w skojarzeniu z 2-CdA, jak również z innymi analogami nukleozydów purynowych. Wiadomo natomiast, że obydwa leki indukują apoptozę, jednak poprzez aktywację alternatywnych szlaków sygnałowych. Obecne badania są kontynuacją badań wykonanych w ramach mojej pracy magisterskiej, w której analizowano cytotoksyczność powyższych leków zastosowanych pojedynczo w odniesieniu do komórek PBL *in vitro*.

Celem obecnie przeprowadzonych badań była ocena cytotoksycznego wpływu wenetoklasku w połączeniu z kladrybiną na limfocyty białaczkowe izolowane od nieleczonych chorych na PBL, ocena rodzaju interakcji zachodzących między badanymi lekami, jak również ocena wpływu tych leków zastosowanych w skojarzeniu na ekspresję białek i genów zaangażowanych w apoptozę komórek białaczkowych.

Cele szczegółowe pracy były następujące:

1. Ocena cytotoksycznego wpływu WEN i 2-CdA na komórki PBL w 48-godzinnej hodowli *in vitro*, pod kątem ustalenia charakteru interakcji zachodzących pomiędzy lekami zastosowanymi w połączeniu oraz wyboru optymalnych stężeń badanych leków do dalszych badań.
2. Ocena wpływu badanych leków zastosowanych w skojarzeniu na apoptozę komórek białaczkowych poprzez ocenę apoptozy indukowanej lekami (DIA), ocenę zmian potencjału błony mitochondrialnej (DIA ψ m) oraz ekspresję aktywnych form kaspazy -9, -3 i -8 (DICE) i porównanie uzyskanych wyników z efektem wywoływanym przez te leki stosowane pojedynczo.
3. Ocena wpływu badanych leków zastosowanych pojedynczo i w skojarzeniu na ekspresję następujących białek: P53, BCL-2, BIM, BAX, PUMA, NOXA, FADD, FLIP, BIK, SMAD2+3, SMAD7, NOTCH1, BCL-2A1 uczestniczących w wewnątrz- i zewnątrzpochodnym szlaku apoptozy.
4. Ocena wpływu badanych leków zastosowanych pojedynczo i w skojarzeniu na ekspresję genów uczestniczących w apoptozie: *BCL2, BAX, BBC3, BIM, P53, APAF1, BAK, BID, BIK, CAS3, CASP8, CASP9, CFLAR, FADD, NOTCH1, PMAIP, SMAD3*.

Materiał badany stanowiła krew obwodowa uzyskana od 103 (47 K, 56 M), nieleczonych chorych na PBL, w wieku 43-88 lat (średnia 68 lat), którzy w okresie od października 2018r. do maja 2021r. byli pacjentami Kliniki Hematologii UM w Łodzi lub Poradni Hematologicznej przy Wojewódzkim Wielospecjalistycznym Centrum Onkologii i Traumatologii w Łodzi. Do badań ekspresji wybranych białek i kodujących je genów wykorzystano krew uzyskaną od 40 chorych (15 K, 25 M), których wiek nie różnił się istotnie od wieku chorych w całej badanej populacji. Krew do badań była pozyskiwana podczas rutynowych badań diagnostycznych. Wszyscy chorzy wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu. Badanie uzyskało akceptację Komisji Bioetycznej UM w Łodzi.

Początkowo do badań wykorzystano WEN w 7 stężeniach z zakresu 2,5- 160 nM, i 2-CdA również w 7 stężeniach z zakresu 0,2- 16,0 μM. Ostatecznie do oceny ekspresji białek i genów zastosowano WEN w stężeniu 40 nM w skojarzeniu z 2-CdA w stężeniu 16 μM, wykazując bardzo silne działanie synergistyczne. Izolowane z krwi obwodowej komórki jednojądrowe inkubowano *in vitro* przez 48 godzin z dodatkiem leków w wymienionych stężeniach. Kontrolę stanowiła hodowla bez leków. Dodatkową kontrolę stanowiły komórki uzyskane od chorych przed użyciem ich do hodowli. Odsetek komórek wykazujących ekspresję badanych białek oceniano metodą cytometrii przepływowej, natomiast ekspresję genów oceniano metodą NanoString.

Analiza statystyczna uzyskanych wyników przeprowadzona była z zastosowaniem testu Wilcozona dla prób zależnych z uwzględnieniem poprawki Bonfferoniego na wielokrotne porównania, przyjmując za statystycznie istotne $p < 0,008$ (ocena cytotoksyczności, apoptozy, zmian potencjału mitochondrialnego i ekspresji białek), testu Manna-Whitney'a do porównania wskaźnika BCL-2/BAX dla grup chorych wyodrębnionych pod kątem zaawansowania klinicznego, przyjmując za istotne $p < 0,05$ oraz testu t-Studenta z poprawką Benjamini-Hochberga na wielokrotne porównania, przyjmując za istotne $p < 0,05$ (ocena ekspresji genów).

Wykazano, że WEN zastosowany zarówno pojedynczo, jak i w skojarzeniu z 2-CdA istotnie zmniejszał odsetek komórek wykazujących ekspresję białka BCL-2. Wskaźnik BCL-2/BAX był istotnie wyższy w komórkach PBL bez dodania leków niż w hodowlach po zastosowaniu WEN i/lub 2-CdA. Ponadto inkubacja komórek PBL bez leków powodowała zwiększenie ekspresji genu *FADD* i *BID*, zmniejszenie ekspresji genów *PMAIP*, *BCL-2*, *BAX*, *BIM*, *BAK* i *CFLAR*, podczas gdy-ekspresja, *P53*, *BBC3*, *APAF-1*, *NOTCH1*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *BIK* i *SMAD3* nie ulegała zmianie. WEN powodował istotne zwiększenie ekspresji 7 genów (*APAF1*, *BBC3*, *BID*, *BIK*, *FADD*, *NOTCH1*, *SMAD3*) i zmniejszenie ekspresji 2 genów- (*BCL-2* i *PMAIP*) w porównaniu z materiałem kontrolnym przed hodowlą oraz istotne zwiększenie ekspresji wszystkich badanych genów (poza *PMAIP* i nieistotnym wzrostem ekspresji *BCL-2*) w porównaniu z materiałem kontrolnym po hodowli. Wykazano także, że skojarzenie WEN z 2-CdA znamienne zwiększało ekspresję aż 13 genów (*APAF1*, *BAX*, *BBC3*, *BID*, *BIK*, *BIM*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *FADD*, *NOTCH1*, *P53*, *SMAD3*) i znamienne zmniejszało ekspresję *PMAIP* w porównaniu z materiałem kontrolnym przed hodowlą oraz zwiększało ekspresję wszystkich genów z wyjątkiem *PMAIP* i *SMAD3* w porównaniu z materiałem kontrolnym po hodowli.

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski:

1. Wenetoklaks w połączeniu z 2-chorodeoksyadenozyną działa synergistycznie na komórki białaczkowe w warunkach *in vitro*.
2. Skojarzenie obydwu leków silniej indukuje apoptozę komórek PBL zarówno szlakiem wewnątrz-, jak i zewnątrzpochodnym w hodowlach *in vitro*, w porównaniu z lekami zastosowanymi pojedynczo, zwiększając na ekspresję większości genów proapoptotycznych i kodowanych przez nie białek.
3. Leki zastosowane w skojarzeniu nie wpływały istotnie na ekspresję genu *BCL-2* genu, natomiast zmniejszały ekspresję białka BCL-2.
4. Uzasadnione wydaje się podjęcie dalszych badań nad skutecznością wenetoklaksu w skojarzeniu z 2-chorodeoksyadenozyną na materiale uzyskanym od większej grupy chorych z uwzględnieniem stadium zaawansowania klinicznego oraz podłoża genetycznego i molekularnego przewlekłej białaczki limfocytowej, w tym stanu mutacyjnego *IGVH*.

IX. SUMMARY

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a neoplastic disease derived from mature B lymphocytes. In its pathogenesis, the inhibition of apoptosis plays an important role, leading to the accumulation of leukemic cells in the blood, bone marrow, lymph nodes and / or extra-nodal organs. Despite the current availability of many therapeutic options , CLL remains an incurable disease. Therefore, it is important to develop new drugs that, used either alone or in combination, will prove effectiveness with an acceptable safety profile. The combination of drugs allows to achieve better therapeutic effects and to minimize the risk of drug resistance.

In recent years, high expectations have been associated with venetoclax (VEN), used in the treatment of hematological neoplasm, including CLL. This highly selective inhibitor of BCL-2 protein belongs to the group of BH3-only mimetics. It induces the programmed cell death by activating the intrinsic apoptotic pathway. Its clinical efficacy is independent of the functional status of TP53 affected by either of del17p, or *TP53* mutation.. The drug turned out to be effective not only in monotherapy, but also in combination with other drugs, such as anti-CD20 antibodies (rituximab, obinutuzumab) or bendamustine, and it can be used both in first-line treatment and in relapsed /refractory patients.

Cladribine (2-chlorodeoxyadenosine; 2-CdA) is a drug known and used for many years in the treatment of CLL. As a purine nucleoside analogue, its mechanism of action is based on the induction of apoptosis in malignant cells through the intrinsic pathway, both dependent and independent of the P53 protein. The mechanism of its action may also include the induction of the extrinsic pathway of apoptosis. 2-CdA is used in combination with other anti-neoplasm drugs, such as cyclophosphamide, rituximab, and mitoxantrone. To the best of our knowledge, venetoclax has not been studied yet in CLL in combination with 2-CdA, nor with other purine nucleoside analogues. However, both drugs are known to induce apoptosis, but through the activation of alternative signaling pathways. The current research is a continuation of the work carried out as a part of my master thesis, in which I analyzed the cytotoxic activity of those drugs used alone on CLL cells in vitro.

The aim of this study was to assess the cytotoxic effect of venetoclax in combination with cladribine on leukemic lymphocytes isolated from untreated CLL patients, to assess the type of interactions between the studied drugs, as well as to assess

the effect of these drugs in combination on the expression of proteins and genes involved in the apoptosis of leukemic cells. .

The detailed objectives of the work included:

1. Assessment of the cytotoxic effect of VEN and 2-CdA on CLL cells in the 48-hour *in vitro* culture in order to determine the nature of the interaction between the drugs used in combination and to choose the optimal concentrations of the tested drugs for further studies.
2. Assessment of the effect of the drugs tested used in combination on apoptosis of leukemic cells by determination of drug-induced apoptosis (DIA), changes in mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) and the drug-induced expression of active forms of caspase -9, -3 and -8 (DICE) as well as the comparison of these results with the effects of these drugs when used alone.
3. Assessment of the effect of the drugs tested used individually and in combination on the expression of the following proteins: P53, BCL-2, BIM, BAX, PUMA, NOXA, FADD, FLIP, BIK, SMAD2 + 3, SMAD7, NOTCH1, BCL-2A1 which participate in the intrinsic and the extrinsic pathway of apoptosis.
4. Assessment of the effect of the drugs tested used individually and in combination on the expression of several genes involved in apoptosis, including *BCL2*, *BAX*, *BBC3*, *BIM*, *P53*, *APAF1*, *BAK*, *BID*, *BIK*, *CAS3*, *CASP8*, *CASP9*, *CFLAR*, *FADD*, *NOTCH1*, *PMAIP*, *SMAD3*.

The leukemic cells were obtained from the peripheral blood of 103 (47 women, 56 men) previously untreated patients with CLL, aged 43-88 (mean 68) years, followed by Hematology Clinic of the Medical University in Łódź or the Hematology Clinic at the Provincial Multispecialist Center of Oncology and Traumatology in Łódź from October 2018 to May 2021. Lymphocytes obtained from 40 patients (15 F, 25 M), out of the whole population studied, was used to evaluate the expression of selected proteins and the corresponding genes. Blood was collected during routine diagnostic tests. All patients gave their written consent to participate in the study. The study was approved by the Bioethics Committee of the Medical University of Łódź.

The selection of the optimal concentration of VEN and 2-CdA was based on the initial tests which used VEN at 7 concentrations from 2.5 to 160 nM, and 2-CdA at 7 concentrations from 0.2 to 16.0 μ M. VEN at the concentration of 40 nM and 2-CdA at the concentration of 16 μ M were selected for further studies, this combination showed a very strong synergistic effect. Mononuclear cells isolated from peripheral blood were

incubated *in vitro* for 48 hours with the addition of drugs in the concentrations listed above. Cultures without drugs were used as a control. Values obtained on cells after culture were adjusted by values obtained before culture. The percentage of cells expressing the studied proteins was assessed by flow cytometry, while the expression of genes was assessed by the NanoString method.

Statistical analysis of the results was carried out using the Wilcoxon signed rank test with Bonferroni correction for multiple comparisons, assuming statistically significant $p < 0.008$ (assessment of cytotoxicity, apoptosis, changes in mitochondrial potential and protein expression), Mann-Whitney test for comparison of BCL-2 / BAX ratio for groups of patients distinguished by clinical advancement, assuming $p < 0.05$ as significant, and the Student's t-test with Benjamini-Hochberg correction for multiple comparisons, assuming $p < 0.05$ as statistically significant (gene expression assessment).

It was shown that VEN used both alone and in combination with 2-CdA significantly decreased the percentage of cells expressing the BCL-2 protein. The BCL-2 / BAX ratio was significantly higher in CLL control cells than in cultures after VEN and / or 2-CdA treatment. In addition, incubation of CLL cells without drugs resulted in the increase of the expression of the *FADD* and *BID* gene, a decrease of the expression of the *PMAIP*, *BCL-2*, *BAX*, *BIM*, *BAK* and *CFLAR* genes, while the expression, *TP53*, *BBC3*, *APAF-1*, *NOTCH1*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *BIK* and *SMAD3* did not change. VEN caused a significant increase of the expression of 7 genes (*APAF1*, *BBC3*, *BID*, *BIK*, *FADD*, *NOTCH1*, *SMAD3*) and a decrease of the expression of 2 genes (*BCL-2* and *PMAIP*) compared to the value before culture, and significant increase of the expression of all genes tested (except *PMAIP* and insignificant increase of *BCL-2* expression) as compared to the post-culture control. It was also shown that the combination of VEN with 2-CdA significantly increased the expression of 13 genes (*APAF1*, *BAX*, *BBC3*, *BID*, *BIK*, *BIM*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *FADD*, *NOTCH1*, *P53*, *SMAD3*) and significantly decreased *PMAIP* expression as compared their values before incubation and increased the expression of all genes except *PMAIP* and *SMAD3* in comparison with the cells cultured without drugs.

Based on the research, the following conclusions were drawn:

1. Venetoclax in combination with 2-chorodeoxyadenosine has a very strong synergistic effect on leukemia cells *in vitro*.
2. The combination of these drugs induced stronger CLL cells apoptosis in cultures *in vitro* on both intrinsic and extrinsic pathways that each drug used alone by

increasing the expression of most pro-apoptotic factors on both gene and protein level.

3. The drugs used in combination do not significantly affect the expression of the *BCL-2* gene, but decreases the expression of corresponding protein.
4. Our results suggest a necessity of further studies on the efficacy of venetoclax in association with 2-chlorodeoxyadenosine in terms of induction of the apoptosis of CLL cells. Those studies should be performed on cells obtained from larger patients' group with and should include a large panel of cytogenetic and molecular prognostic factors of CLL, including *IGVH* status.