

Streszczenie

Zjawisko oporności nowotworów na terapię jest jednym z największych wyzwań współczesnej onkologii, co sprawia że istnieje nieustanna potrzeba badań nad nowymi lekami. Głównym celem niniejszej pracy było zbadanie potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej nowej pochodnej dikarboksyimidu, związku BK124, w ramach badań przedklinicznych *in vitro* oraz *in vivo*. Badania przeprowadzono w modelach przewlekłej białaczki szpikowej (ang. chronic myelogenous leukemia, CML): w linii ludzkich komórek K562, pochodzących z kryzy blastycznej CML, w komórkach macierzystych i progenitorowych białaczki pobranych od pacjentów oraz w mysim modelu CML po ksenotransplantacji komórek K562.

Stosując metody cytometrii przepływowej, test MTT oraz metody immunoblottingu stwierdzono, że związek BK124 wywołuje w komórkach K562 apoptozę ($IC_{50} = 2,5 \mu M$) oraz wpływa na poziom białek szlaków onkogennych. 24-godzinna inkubacja z BK124 skutkowała aktywacją kaspazy 9 oraz kinaz MAP: p38MAPK i JNK, czemu towarzyszyła jądrowa lokalizacja białka p21^{waf1/cip1} i FOXO3a oraz blokada cyklu komórkowego w fazie G2/M. Ponadto, zaobserwowano obniżony poziom kinazy BCR-ABL1, a także białek onkogennych szlaków JAK/STAT, PI3K/AKT/mTOR oraz NF- κ B.

Następnie opracowano nietoksyczną formulację BK124, umożliwiającą podania drogą iniekcji u zwierząt, wyznaczono podstawowe parametry farmakokinetyczne związku BK124 i ustalono optymalną drogę podania oraz dawkę. Związek BK124 podany dootrzewnowo w dawce 20 mg/kg masy ciała zwalczał skutecznie komórki nowotworowe *in vivo* w mysim modelu ksenotransplantacyjnym, bez widocznego pogorszenia dobrostanu myszy i toksycznego wpływu na narządy wewnętrzne.

Ponadto, używając testu MTT oraz cytometrii przepływowej wykazano cytotoksyczność związku BK124 wobec komórek o wysokiej oporności na leki: komórek z ekspresją genu glikoproteiny P (PgP) i opornością wielolekową typu I (K562-MDR1) oraz komórkach macierzystych białaczki od nieleczonych pacjentów w fazie chronicznej CML. Wykazano, że związek BK124 prawdopodobnie nie jest substratem dla pompy MDR1 ($IC_{50} = 2,35 \mu M$). Co więcej, inkubacja komórek K562 w subletalnym stężeniu BK124 przez sześć miesięcy obniżała poziom transkryptu genu *PgP* (*ABCB1*). Dikarboksyimid BK124 był również toksyczny dla białaczkowych komórek macierzystych i progenitorowych CD34⁺ ($IC_{50} = 1,5 \mu M$), w tym szczególnie niebezpiecznej subpopulacji komórek macierzystych CD34⁺CD38⁻ inicjujących nowotwór.

Biorąc pod uwagę korzystne własności farmakokinetyczne BK124 jako potencjalnego leku przeciwnowotworowego, szczególną zdolność BK124 do pokonania oporności wielolekowej oraz wysoką aktywność cytotoksyczną wobec komórek macierzystych nowotworu można stwierdzić, że przyszły rozwój BK124 może poszerzyć możliwości terapii chorych cierpiących na przewlekłą białaczkę szpikową, a także potencjalnie na inne nowotwory, na które nie ma obecnie terapii lub też w których występuje zjawisko oporności na leki.

Abstract

Cancer resistance to therapy is one of the greatest challenges of the contemporary oncology and as a result there is a constant need for research on new medications. The main objective of this study was to investigate the potential anticancer activity of a new dicarboximide derivative, compound BK124, in preclinical studies *in vitro* and *in vivo*. The studies were carried out in models of chronic myelogenous leukemia (CML): in the human K562 cell line, derived from the CML blast crisis, in leukemia stem and progenitor cells taken from patients, and in a mouse model of CML after K562 cell xenotransplantation.

Using flow cytometry, MTT and immunoblotting methods, it was found that the BK124 compound induces apoptosis in K562 cells ($IC_{50} = 2.5 \mu M$) and affects the level of proteins of oncogenic pathways. A 24-hour incubation with BK124 resulted in the activation of caspase 9 and MAP kinases: p38MAPK and JNK, which was accompanied by nuclear localization of p21waf1/cip1 and FOXO3a proteins and blockade of the cell cycle in the G2/M phase. In addition, decreased levels of BCR-ABL1 kinase as well as oncogenic proteins of the JAK/STAT, PI3K/AKT/mTOR and NF- κ B pathways were observed.

Then, a non-toxic formulation of BK124 was developed, enabling administration by injection in animals, and the basic pharmacokinetic parameters of the BK124 compound were determined, as well as the optimal route of administration and dose. Compound BK124 administered intraperitoneally at a dose of 20 mg/kg of body weight was effective in combating tumor cells *in vivo* in a mouse xenotransplantation model, without any apparent deterioration in the well-being of the mice or toxic effects on internal organs.

In addition, using the MTT assay and flow cytometry, BK124 was shown to be cytotoxic to highly drug-resistant cells: K562 cells with multidrug resistance type I (K562-MDR1) expressing the gene encoding P-glycoprotein (PgP), and to the leukemia stem cells from untreated CML patients in the chronic phase. Compound BK124 was shown to be probably not a substrate for the MDR1 pump ($IC_{50} = 2.35 \mu M$). Moreover, incubation of K562 cells with a sub-lethal concentration of BK124 for six months downregulated the PgP (*ABCB1*) gene transcript. BK124 dicarboximide was also toxic to CD34+ leukemic stem and progenitor cells ($IC_{50} = 1.5 \mu M$), including the particularly dangerous subpopulation of CD34+CD38- cancer-initiating stem cells.

Taking into account the favorable pharmacokinetic properties of BK124 as a potential anti-cancer drug, the special ability of BK124 to overcome multidrug resistance and the high cytotoxic activity against cancer stem cells, it can be concluded that the future development of BK124 may broaden the therapeutic possibilities of patients suffering from chronic myelogenous leukemia, and potentially other cancers, that are not yet effectively treated, as well as for patients who have developed resistance to existing therapy.