

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Innere Medizin
Medizinische Klinik II (Hämatologie, Onkologie, Rheumatologie, Infektiologie)
Direktor: Prof. Dr. Hubert Serve

**Beta-2 selektive Proteasominhibition als Basis einer
synergistischen Wirkung von Ibrutinib und
Proteasominhibitoren gegen Myelomzellen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Johannes Michael Kraus

aus Böblingen

Frankfurt am Main, 2016

Dekan:	Prof. Dr. Josef M. Pfeilschifter
Referent:	Prof. Dr. Hubert Serve
Korreferent:	Prof. Dr. Christoph Driessen
Tag der mündlichen Prüfung:	23. Januar 2018

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	i
Zusammenfassung	ii
Abkürzungsverzeichnis	vi
1 Übergreifende Zusammenfassung	1
1.1 Einführung	1
1.2 Darstellung der Publikation	5
1.3 Diskussion	9
2 Übersicht der zur Veröffentlichung angenommenen Publikationen ...	18
3 Publikation	19
4 Darstellung des eigenen Anteils	33
5 Literaturverzeichnis	34
6 Anhang	40
7 Lebenslauf	42
8 Danksagung	44
9 Schriftliche Erklärung	45

ZUSAMMENFASSUNG

Das Multiple Myelom (MM) macht ungefähr 15 % aller hämatologischen Neoplasien aus¹. Die Einführung neuer Therapieoptionen wie der Hochdosis-Chemotherapie, der immunmodulatorischen Medikamente und der Proteasominhibitoren (PI) haben die Behandlung des MM revolutioniert. Der PI Bortezomib (BTZ) ist zu einem Grundstein der Therapie des MM geworden², aber auch der neu zugelassene PI Carfilzomib (CFZ) wird inzwischen eingesetzt³. Trotz dieser Fortschritte treten Resistenzen gegen PIs zu Therapiebeginn, beziehungsweise fast unweigerlich im Verlauf der Therapie auf und das MM bleibt größtenteils unheilbar⁴. Gegenüber PIs resistente Myelomzellen zeigen Merkmale von Pre-Plasmablasten, welche die Proteasominhibition überleben⁵. Um mit einer Therapie auch diese resistenten Zellen zu erreichen, ist es notwendig, die PIs mit Substanzen zu kombinieren, die sich gegen die gesamte B-Zell-Linie richten.

Ein neuer Hoffnungsträger in der Behandlung von B-Zell-Leukämien ist der Bruton's Tyrosinkinase Inhibitor Ibrutinib (IBR)⁶⁻⁹. IBR greift die in der gesamten B-Zell-Linie exprimierte Bruton's Tyrosinkinase an¹⁰, die als Teil des B-Zell-Rezeptor Signalweges eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung und Funktionalität normaler B-Zellen einnimmt¹¹. Die zytotoxische Aktivität von IBR in MM korreliert speziell mit der Hemmung des nachgeschalteten Signalwegs NF- κ B^{12,13}. Die Kombination von PIs mit IBR wird bereits in klinischen Studien getestet¹⁴⁻¹⁶. Allerdings fehlen zurzeit die molekularen Grundlagen für den therapeutischen Erfolg dieser Kombination.

Zielsetzung dieser Dissertation war es deshalb die drei PIs BTZ, CFZ und das experimentelle, β 2-selektive LU-102 hinsichtlich deren Wirkung auf den NF- κ B Signalweg und in Kombination mit IBR zu untersuchen. Der präklinisch erprobte PI LU-102 wurde hier für den Vergleich mit den aktuell in der MM Therapie verwendeten Inhibitoren BTZ und CFZ hinzugezogen, da er im Gegensatz zu diesen sehr selektiv die β 2-Untereinheit des Proteasom hemmt und damit einen alternativen Ansatz verfolgt.

Es konnte gezeigt werden, dass der β 2-selektive PI LU-102 den NF- κ B Signalweg hemmt und so die Wirkung von IBR unterstützt. Im Gegensatz dazu aktivierten BTZ und CFZ diesen Signalweg und antagonisierten in diesem Punkt die Wirkung von IBR. Weiterhin konnte veranschaulicht werden, dass BTZ in Kombination mit IBR antagonistisch auf die Zytotoxizität in MM Zelllinien wirkt, während CFZ einen grenzwertigen Synergismus mit IBR bei MM Zelllinien zeigt. Den deutlich stärksten Synergismus in Kombination mit IBR zeigte sich bei LU-102.

Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte für die Kombination von IBR mit LU-102 im Vergleich zu den Kombinationen mit BTZ oder CFZ eine deutlich stärkere Hemmung des NF- κ B Signalweges, eine deutlichere Hemmung des Proliferationsmarkers p-STAT3 und eine robustere Aktivierung der Apoptose-Kaskade beobachtet werden. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass LU-102 in Kombination mit IBR *in vitro* die Resistenz gegenüber BTZ oder CFZ überwindet; dieses Ergebnis ließ sich auch an primären Myelomzellen dreier BTZ-refraktären Patienten reproduzieren.

In der Diskussion wurden Hypothesen zum unterschiedlichen Wirkverhalten von BTZ und CFZ sowie LU-102 auf den NF- κ B Signalweg entwickelt: BTZ und CFZ aktivieren den NF- κ B Signalweg, da diese durch Hemmung der für die Proteolyse des Proteasoms geschwindigkeitsbestimmenden β 5-Untereinheit den Abbau von I κ B im kompensatorisch aktivierten lysosomalen System fördern. Das β 2-selektive LU-102 hingegen lässt die proteasomale Proteolyse quantitativ weitgehend unangetastet und führt somit nicht zum lysosomalen Abbau von I κ B. Zudem sorgt LU-102 über einen bisher unbekanntem Mechanismus für eine Hemmung des NF- κ B Signalweges.

Zusammenfassend ist durch die vorliegenden Ergebnisse eine weitere klinische Entwicklung der Kombination von β 2-inhibierenden Proteasominhibitoren, wie LU-102 oder Carfilzomib, mit Ibrutinib im Gegensatz zur Kombination von Bortezomib, welches die β 2-Aktivität nicht inhibiert, mit Ibrutinib für das Multiple Myelom zu empfehlen.

SUMMARY

Multiple myeloma (MM) accounts for about 15 % of all hematologic neoplasia¹. The introduction of new therapy options like high-dose chemotherapy, immunomodulatory agents and proteasome inhibitors (PI) have revolutionized MM therapy. The first-in-class PI Bortezomib (BTZ) has become a backbone of MM therapy², but also the recently approved second-generation PI Carfilzomib (CFZ) is now available³. Despite this progress, PI resistance occurs almost inevitably during or at the beginning of PI therapy and thus MM remains incurable for the majority of patients⁴. PI-resistant MM cells show characteristics of pre-plasmablasts which survive proteasome inhibition⁵. Hence, combining proteasome inhibitor therapy with a broadly active B-cell-targeting drug is a promising concept to overcome PI-refractory MM.

A new agent in therapy of B-cell-leukemia is the Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitor Ibrutinib (IBR)⁶⁻⁹. IBR attacks BTK, which is expressed over the entire B-cell-development¹⁰. BTK plays as part of B-cell-receptor pathway a key role during development and functionality of normal B-cells⁹. IBR-related cytotoxicity particularly correlates with inhibition of the downstream pathway NF- κ B^{12,13}. The combination of PIs and IBR is currently under investigation in clinical studies¹⁴⁻¹⁶. However, the basic molecular principals for therapeutic success of this combination are still lacking.

Therefore, the aim of this work was to compare the three PIs BTZ, CFZ and the β 2-selective LU-102 with regard to their impact on NF- κ B pathway and in combination with Ibrutinib. The pre-clinical PI LU-102 was used in comparison to the established β 5-targeting PIs BRZ and CFZ because it selectively inhibits the β 2-subunit of the proteasome and thereby follows an alternative approach.

In my experiments the β 2-selective PI LU-102 inhibited the NF- κ B pathway and hence supported the effect of IBR. In contrast, BTZ and CFZ activated this pathway and therefore could antagonize the activity of IBR. Furthermore, BTZ in combination with IBR was antagonistic whereas CFZ reached a borderline

synergism in combination with IBR. Both results were exceeded by the high synergism of LU-102 in combination with IBR. Consistent with this data the combination of IBR with LU-102 showed superior inhibition of the NF- κ B pathway and the proliferation marker p-STAT3 as well as the highest activation of the apoptotic cascade. In addition, I could show that LU-102 in combination with IBR *in vitro* overcomes BTZ and CFZ resistance; these results have been reproduced in primary MM cells of three BTZ-refractory patients.

The discussion develops hypotheses for the different effects on the NF- κ B pathway of BTZ and CFZ as well as LU-102: BTZ and CFZ activate the NF- κ B pathway because their inhibition of the proteasomal β 5-subunit, which is speed-driving for proteasomal proteolysis, leads to I κ B degradation in the compensatory lysosomal pathway. In contrast, the β 2-selective LU-102 leaves the proteasomal proteolysis quantitatively untouched and hence does not activate the lysosomal pathway of I κ B. Moreover, LU-102 inhibits the NF- κ B pathway on a yet unknown mechanism.

Overall, the data identified β 2-inhibiting proteasome inhibitors like LU-102 or Carfilzomib as superior combination partners with Ibrutinib in comparison to Bortezomib, which does not target the β 2-activity and suggest a further clinical development of these combinations for multiple myeloma.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Abb.	Abbildung
B	BTK	Bruton's Tyrosinkinase
	p-BTK	phosphorylierte Bruton's Tyrosinkinase
	BTZ	Bortezomib
C	CI	<i>combination index</i>
	CLL	chronisch lymphatische Leukämie
	CFZ	Carfilzomib
F	Fig.	<i>figure</i>
I	IBR	Ibrutinib
	IC ₅₀	<i>half maximal inhibitory concentration</i>
	IκB	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor</i>
	p-IκB	phosphoryliertes/aktiviertes IκB
	IKK	IκB Kinase
K	kD	Kilodalton
L	LU-102	Leiden University Number 102
M	MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
	MCL	Mantelzell-Lymphom
	mg	Milligramm
	MM	Multiples Myelom
	μM	mikromolar (mikromol/l)

N	NF- κ B	<i>nuclear factor-κB</i>
	nM	nanomolar (nanomol/l)
P	PARP	<i>poly adenosine diphosphate ribose polymerase</i>
	PI	Proteasominhibitor
	PLC γ 2	Phospholipase C- γ 2
R	RNA	<i>ribonucleic acid</i>
	mRNA	<i>messenger RNA</i>
S	p-STAT	<i>phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3</i>
U	UPR	<i>unfolded protein response</i>
X	XBP-1	<i>x-box binding protein-1</i>

1 ÜBERGREIFENDE ZUSAMMENFASSUNG

1.1 Einführung

Proteasominhibitoren (PI) haben die Behandlung des Multiplen Myeloms (MM) im letzten Jahrzehnt revolutioniert und sind Grundbaustein der Therapieregime geworden². Allerdings zeigt das fast unausweichliche Auftreten von Resistenzen unter der Behandlung mit Bortezomib (BTZ) als Proteasominhibitor der ersten Generation² die Notwendigkeit einer Weiterentwicklung der PI-basierten Behandlungskonzepte auf.

Das Proteasom ist ein multi-katalytischer Enzymkomplex, der für den Hauptteil des Proteinabbaus in eukaryotischen Zellen verantwortlich ist¹⁷. Die proteolytische Aktivität wird von drei verschiedenen katalytischen Zentren vermittelt: $\beta 1$ mit Caspase-ähnlicher, $\beta 2$ mit Trypsin-ähnlicher und $\beta 5$ mit Chymotrypsin-ähnlicher Aktivität¹⁸. Bortezomib ist ein reversibler Proteasominhibitor, der vor allem die $\beta 5(i)$ -Untereinheit und in geringerem Ausmaß auch die $\beta 1i$ -Untereinheit des Proteasoms hemmt¹⁹. Die Entwicklung von Bortezomib sowie dem neu zugelassenen Proteasominhibitor Carfilzomib (CFZ) basiert auf der Entdeckung der essentiellen Funktion der $\beta 5$ -Untereinheit bei der proteasomalen Proteolyse². Die klinische Aktivität von Carfilzomib als Einzelsubstanz in Bortezomib-refraktären MM ist jedoch mit um die 20 % sehr niedrig²⁰.

Weiterer Fortschritt wurde experimentell durch die Entwicklung von $\beta 2$ - und $\beta 1$ -spezifischen Proteasominhibitoren gemacht, die nicht auf die $\beta 5$ -Untereinheit abzielen. Die $\beta 2$ -Untereinheit des Proteasoms konnte als wichtiger Modulator der Toxizität von Proteasominhibitoren identifiziert werden, die sich gegen die $\beta 5$ -Untereinheit richten²¹⁻²³. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die $\beta 2$ -Aktivität in Bortezomib-refraktären Zellen hochreguliert ist²⁴. LU-102 ist der erste irreversible, zellpermeable Proteasominhibitor, der spezifisch die $\beta 2$ -Untereinheit sowohl des konstitutiven als auch des Immuno-Proteasoms hemmt²². Aktuell wird LU-102 in präklinischen Modellen getestet, um in Kombination mit bewährten Proteasominhibitoren Resistenzen gegenüber Proteasominhibitoren zu überwinden. Das Potential von LU-102 für

den therapeutischen Gebrauch in Kombination mit anderen Krebstherapeutika, die nicht das Proteasom hemmen, wurde bisher noch nicht untersucht.

Neue Erkenntnisse über Proteasominhibitor-refraktäres Myelom *in vivo* zeigen, dass dieses Merkmale von immortalen B-Zellen akkumuliert⁵. Dies macht den Ansatz einer Kombination von Proteasominhibitoren mit Substanzen, die sich gegen die gesamte B-Zell-Linie richten, zu einem vielversprechenden Konzept.

Die Bruton's Tyrosinkinase (BTK) ist eine Nichtrezeptor-Tyrosinkinase, die man über alle Zwischenstufen der B-Zell-Entwicklung hinweg¹⁰, sowie in malignen Plasmazellen und einem Großteil der MM Patienten (> 85%)¹² findet. BTK nimmt eine Schlüsselrolle bei Entwicklung und Funktionalität normaler B-Zellen ein¹¹. Die Signalkaskade der BTK führt über die Phosphorylierung der PLC γ 2 zur Phosphorylierung von I κ B und damit zur Aktivierung des NF- κ B Signalweges, sowie des MAPK und AKT Signalweges. Sowohl MAPK, STAT3, aber vor allem auch NF- κ B sind essentiell für das Überleben von Myelomzellen²⁵.

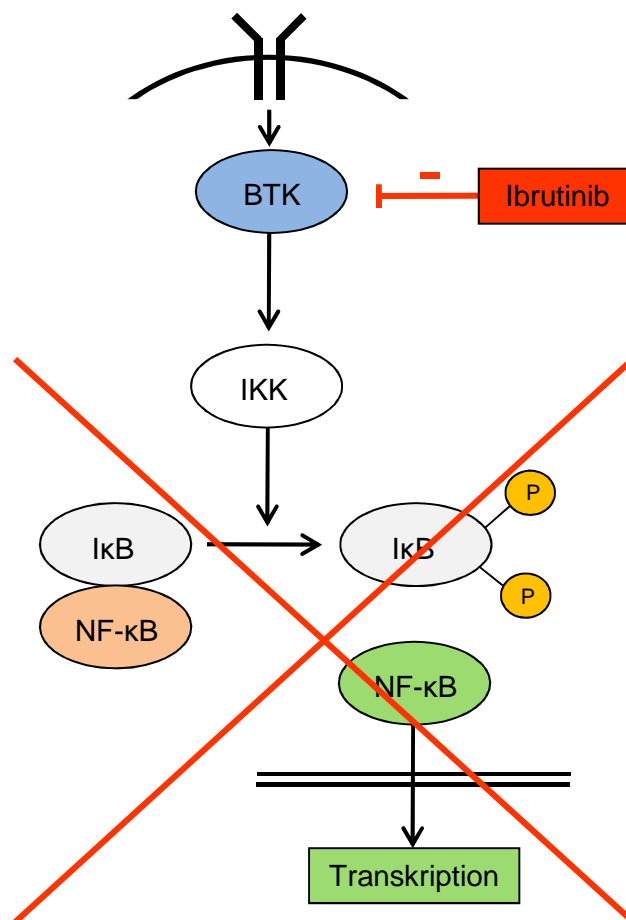
Ibrutinib, der erste zugelassene Inhibitor der Bruton's Tyrosinkinase, zeigt in ersten Ergebnissen bereits abgeschlossener klinischen Studien für chronisch lymphatische Leukämie (CLL), Mantelzell-Lymphom und weitere B-Zell-Leukämien vielversprechende Resultate⁶⁻⁹. In der Behandlung des Multiplen Myeloms wird neben der Therapie mit Ibrutinib als Einzelsubstanz²⁶ bereits das Potential einer Kombinationstherapie von Ibrutinib mit den bewährten Proteasominhibitoren ausgelotet¹⁴. Aktuell sind die molekularen Grundlagen für den therapeutischen Erfolg dieser Kombination allerdings weitgehend ungeklärt. Zudem fehlt weitestgehend auch die Grundlage für eine rationale Auswahl unter den immer zahlreicher vorhandenen und sich in ihrer reaktiven Gruppe, sowie der Selektivität für die Proteasomuntereinheiten unterscheidenden Proteasominhibitoren.

Sowohl der entscheidende Signalweg der BTK, als auch ein wichtiges nachgeschaltetes Signal von Bortezomib, laufen im kanonischen NF- κ B Signalweg zusammen²⁷: wie in Abb. 1.1 zu sehen wird der aktiven BTK nachgeschaltet I κ B zu p-I κ B phosphoryliert, welches wiederum durch Polyubiquitinierung und Abbau im Proteasom NF- κ B freisetzt und dadurch

aktiviert. Folglich wird die zytotoxische Aktivität von Ibrutinib über einen Abfall von p-IkB und einer konsekutiv abnehmenden NF-κB Aktivität vermittelt^{28,12}.

Abb. 1.1: Modell zur Wirkung von Ibrutinib auf den NF-κB Signalweg

Ibrutinib hemmt die Bruton's Tyrosinkinase, verhindert somit die Aktivierung der IKK und die Phosphorylierung von IκB zu p-IκB. NF-κB bleibt damit weiterhin von IκB gehemmt und kann nicht in den Nucleus translozieren.



Im Gegensatz dazu konnte für Bortezomib ein Anstieg von p-IκB und eine Aktivierung der NF-κB Aktivität gezeigt werden²⁹. Aufgrund dessen bestand zu Beginn dieser Arbeit die Annahme, dass Bortezomib die molekulare Wirkung von Ibrutinib auf den NF-κB Signalweg in MM Zellen zumindest in Teilen antagonisieren würde. Zur Illustration für die Aktivität des NF-κB Signalwegs wurde in dieser Dissertation der Quotient von p-IκB/IκB verwendet: ein erhöhter

p-I κ B/I κ B-Quotient zeigt eine Aktivierung und ein erniedrigter p-I κ B/I κ B-Quotient eine Hemmung des NF- κ B Signalwegs an.

Zielsetzung dieser Dissertation war es die drei Proteasominhibitoren Bortezomib, Carfilzomib und LU-102 hinsichtlich deren Wirkung auf den NF- κ B Signalweg und in Kombination mit Ibrutinib zu vergleichen. Der präklinisch erprobte Proteasominhibitor LU-102 wurde hier für den Vergleich mit den aktuell in der MM Therapie verwendeten Inhibitoren Bortezomib und Carfilzomib hinzugezogen, da er im Gegensatz zu diesen selektiv die β 2-Untereinheit des Proteasom hemmt und damit einen alternativen Ansatz verfolgt ²².

1.2 Darstellung der Publikation

BTK-Expression und Ibrutinib-vermittelte Zytotoxizität

Fig. 1A^a zeigt, dass für die MM Zelllinien INA-6, LP-1 und in einem geringeren Ausmaß für MM.1R eine BTK Protein-Expression nachgewiesen werden kann. Die mRNA-Transkriptionslevel von BTK korrelierten mit diesem Ergebnis nur schwach. Weiterhin wiesen die Level an BTK Proteinexpression nur schwache Bezüge zur Sensitivität der Zelllinien gegenüber Ibrutinib-vermittelter Zelltoxizität auf (siehe Fig. 1B).

Für die weiteren Versuche wurde INA-6 als die Zelllinie mit der höchsten BTK-Konzentration herangezogen, da die meisten primären MM Zellbeispiele p-BTK exprimieren und auf eine Behandlung mit 10 µM Ibrutinib ansprechen¹².

Ibrutinib senkt den p-IκB Spiegel und hat keinen direkten Einfluss auf die Proteasomaktivität in MM Zellenlinien

In Fig. 2A konnte gezeigt werden, dass Ibrutinib in INA-6 die p-BTK Expression dosisabhängig hemmt; dies war bereits in nanomolaren Konzentrationen zu beobachten. Weiterhin konnte bestätigt werden, dass Ibrutinib dosisabhängig zu einer Reduktion der p-IκB Expression führt. Ein direkter Effekt von Ibrutinib auf die Proteasomaktivität konnte ausgeschlossen werden (siehe Fig. 2B).

Der β2-selektive Proteasominhibitor LU-102 senkt im Gegensatz zu Bortezomib und Carfilzomib die p-IκB Expression

In Fig. 3 wurde in INA-6 Zellen die Sensitivität der drei Proteasominhibitoren für die einzelnen Proteasomuntereinheiten (β1, β2, β5), die Akkumulation von polyubiquitinierten Proteinen sowie die p-IκB/IκB Expression aufgezeigt. In den mit Bortezomib behandelten Zellen konnte eine β1-/β5-selektive Hemmung der Proteasomaktivität und korrelierend ein entsprechender Anstieg von polyubiquitinierten Proteinen nachgewiesen werden (siehe Fig. 3, *upper panel*). Weiterhin führte Bortezomib zu einem Anstieg der p-IκB und einer leichten Reduktion der IκB-Expression; dies resultierte in einem Anstieg des

^a Siehe Figures im publizierten Artikel

p-IkB/IkB-Quotienten und damit einer Aktivierung des NF-κB Signalwegs. Auch Carfilzomib führte zu einer vergleichbaren Hemmung der β1-/β5-Proteasomaktivität, einer begleitenden Anhäufung polyubiquitinerter Proteine, sowie einer Erhöhung des p-IkB/IkB-Quotienten (siehe Fig. 3, *middle panel*). Anders als Bortezomib zeigte sich unter Carfilzomib bei höheren Konzentrationen allerdings auch eine leichte und reproduzierbare Hemmung der β2-Untereinheit.

Im Gegensatz zu den beiden etablierten Proteasominhibitoren zielt LU-102 spezifisch auf die β2-/β2i-Aktivität des Proteasoms ab, ohne die Aktivitätssignale der β1-/β5-Untereinheiten zu beeinflussen (siehe Fig. 3, *lower panel*). Ein Anstieg polyubiquitinerter Proteine konnte unter LU-102 nicht beobachtet werden. Zudem zeigte sich unter der Behandlung mit LU-102 eine dosisabhängige Senkung der p-IkB Spiegel, sodass eine deutliche Senkung des p-IkB/IkB-Quotienten und damit Hemmung des NF-κB Signalwegs zu beobachten war.

Somit könnte der β2-selektive Proteasominhibitor LU-102 durch Senkung der p-IkB Spiegel und des p-IkB/IkB-Quotienten die von Ibrutinib vermittelte Signalkaskade unterstützen, während die β1-/β5-selektiven Inhibitoren Bortezomib und Carfilzomib die p-IkB Spiegel stabilisieren und den p-IkB/IkB-Quotienten erhöhen beziehungsweise gleich lassen.

Ibrutinib in Kombination mit LU-102 zeigt synergistische Zytotoxizität in MM Zellen

In Fig. 4A wurden die Effekte der Kombination von Ibrutinib mit den unterschiedlichen Proteasominhibitoren auf Zytotoxizität und auf Aktivität des NF-κB Signalweges in INA-6 Zellen veranschaulicht. Ibrutinib in Kombination mit Bortezomib oder Carfilzomib zeigte nur grenzwertig synergistische zytotoxische Aktivität bei Kombinationsindizes von 0,8 und 0,6. Im Gegensatz dazu resultierte die Kombination von Ibrutinib mit LU-102 in einem hohen synergistischen Kombinationsindex von 0,075 (siehe Fig. 4A, *upper panel*). Übereinstimmend damit konnte für die Kombination von Ibrutinib mit LU-102 eine stärkere Suppression von p-IkB, p-p65 und p-STAT3 Proteinexpression,

sowie eine Induktion der *cleaved* Caspasen 3, 7 und 9 sowie *cleaved* PARP nachgewiesen werden.

Ibrutinib in Kombination mit LU-102 zeigt synergistische Zytotoxizität in Proteasominhibitor-resistenten MM Zellen

In einem nächsten Schritt konnte gezeigt werden, dass Ibrutinib in Kombination mit LU-102 auch in den MM Zelllinien AMO-BTZ und AMO-CFZ, die gegenüber den Proteasominhibitoren Bortezomib und Carfilzomib resistent sind, stark synergistisch zytotoxisch wirksam ist (siehe Fig. 4B, *upper panel*). Weitergehend wurden primäre MM Zellen dreier Patienten mit klinischer Bortezomib-Resistenz gewonnen und mit derselben Kombination von Ibrutinib und LU-102 behandelt. Auch hier zeigten sich stark synergistische zytotoxische Effekte zwischen beiden Substanzen (siehe Fig. 4B, *lower panel*).

CFZ und LU-102, nicht jedoch BTZ, zeigen konsistent synergistische Zytotoxizität in Kombination mit Ibrutinib in MM und MCL Zelllinien

Schlussendlich wurde eine Reihe von MM Zelllinien (LP-1, MM.1R, RPMI 8226) und Mantelzell-Lymphom Zelllinien (Granta-519 und Jeko-1), die sich alle im Grad ihrer BTK Expression und Ibrutinib-Sensitivität unterscheiden, mit Bortezomib, Carfilzomib oder LU-102 alleine oder in Kombination mit Ibrutinib behandelt und die Kombinationsindizes (CIs) der Zytotoxizitätstests berechnet. Es zeigte sich, dass Bortezomib ein schlechter Kombinationspartner zu Ibrutinib darstellt, der in 4/5 Zelllinien sogar einen antagonistischen CI von >1 aufzeigt (siehe Table 1, medianer CI 4,9 - Bandbreite 0,3 - 30,3). Im Gegensatz dazu zeigten sowohl Carfilzomib (medianer CI 0,12 - Bandbreite 0,03 - 0,22) als auch LU-102 (medianer CI 0,02 - Bandbreite 0,001 - 0,14) in Kombination mit Ibrutinib in 5/5 Zelllinien synergistische Zytotoxizität.

Visualisierung eines nicht-BTK *off-target* Proteins von Ibrutinib

Wie in Fig. 5 gezeigt ist die synergistische Zytotoxizität von Ibrutinib in Kombination mit LU-102 nicht nur in MM / MCL Zelllinien mit hoher BTK Expression zu beobachten, sondern in fast gleichem Ausmaß auch in Zelllinien

mit fehlender oder sehr geringer BTK Expression. Diese Erkenntnis legt nahe, dass Ibrutinib ein zusätzliches, bisher unbekanntes, zelluläres Ziel angreift. Um dieses mögliche zusätzliche Ziel nachweisen zu können wurde ein zellpermeables und mit einem fluoreszierenden Label verknüpftes Derivat Ibrutinibs entwickelt, welches Ibrutinib-reaktive Proteine visualisieren kann. Damit gelang es in allen B-Zelllinien ein weiteres Protein bei 64 kD zu identifizieren, welches unabhängig von der BTK Expression der Zelllinie nachgewiesen werden konnte. Dieses Protein könnte eine bisher nicht identifizierte Zielkinase von Ibrutinib sein und für die Wirkung von Ibrutinib in BTK-negativen MM und MCL Zelllinien entscheidend sein.

1.3 Diskussion

In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass sich die drei Proteasominhibitoren Bortezomib, Carfilzomib und LU-102 hinsichtlich ihrer Wirkung auf den NF- κ B Signalweg deutlich unterscheiden. Sowohl Bortezomib als auch Carfilzomib aktivieren den NF- κ B Signalweg über eine Stabilisation der p-I κ B und einer gleichzeitigen Reduzierung der I κ B Spiegel (siehe Fig. 3; *right panel*); dies lässt den Quotienten p-I κ B/I κ B ansteigen. Im Gegensatz dazu hemmt LU-102 diesen Signalweg und führt zu einer konzentrationsabhängigen Senkung der p-I κ B Spiegel (siehe Fig. 3; *right panel*); der p-I κ B/I κ B Quotient sinkt. Ibrutinib wiederum verhindert über Hemmung der Aktivierung von BTK zu p-BTK eine Phosphorylierung von I κ B zu p-I κ B und unterbindet so die Aktivierung von NF- κ B (siehe Fig. 2 A); die hierbei sinkenden p-I κ B Spiegel führen zu einer Reduktion des p-I κ B/I κ B Quotienten. Zusammenfassend zeigt sich, dass Ibrutinib und LU-102 beide den NF- κ B Signalweg hemmen beziehungsweise den Quotienten p-I κ B/I κ B senken und im Gegensatz dazu Bortezomib und Carfilzomib diese Kaskade aktivieren beziehungsweise den Quotienten p-I κ B/I κ B erhöhen.

Auf welcher molekularen Grundlage die unterschiedlichen Wirkungen auf den NF- κ B Signalweg von Bortezomib und Carfilzomib auf der einen Seite und LU-102 auf der anderen Seite beruhen, bleibt zu klären.

Hideshima et al.²⁹ konnten zeigen, dass nicht nur Bortezomib, sondern auch andere Proteasominhibitoren, wie der reversible, gegen die β 5-Untereinheit gerichtete Proteasominhibitor MG-132³⁰ und der irreversible pan-Proteasominhibitor Lactacystin³¹, in RPMI 8226 MM Zellen über Aktivierung der I κ B-Kinase (IKK) zu einer vermehrten Phosphorylierung von I κ B führen, zusätzlich die I κ B Spiegel senken und damit den NF- κ B Signalweg aktivieren. Vergleichbares konnte kürzlich für Carfilzomib in CLL Zellen gezeigt werden³². Da Bortezomib, Carfilzomib, MG-132 und Lactacystin trotz sehr unterschiedlicher chemischen Struktur und Reversibilität der Bindung zum Proteasom alle eine Aktivierung des NF- κ B Signalweg bewirken, liefern diese

beiden Merkmale nicht die Erklärung für das unterschiedliche Verhalten von Bortezomib und Carfilzomib gegenüber LU-102.

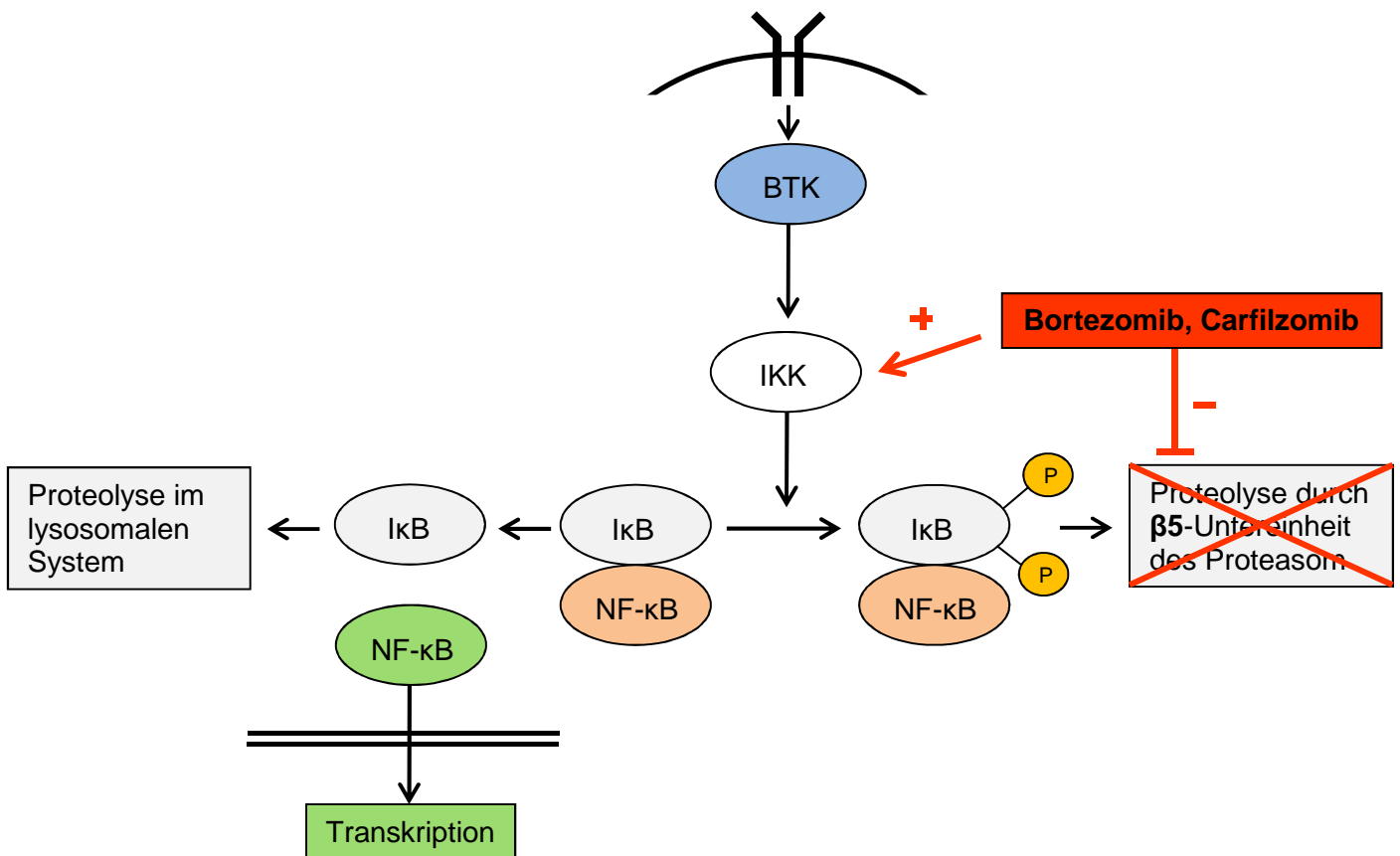
Unterschiede werden aber deutlich, wenn man die Affinität der Inhibitoren zu den einzelnen Untereinheiten des Proteasoms ($\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$) betrachtet: Fig. 3; *left panel* zeigt, konsistent mit Williamson et al.¹⁹ und Demo et al.³³, dass Bortezomib und Carfilzomib sowie die oben aufgeführten Inhibitoren MG-132 und Lactcystin die $\beta 5$ -Untereinheit hemmen. Im Gegensatz dazu inhibiert LU-102, konsistent mit Geurink et al.²², selektiv die $\beta 2$ -Untereinheit des Proteasoms (siehe Fig. 3; *left panel*).

Diese selektive Inhibition der $\beta 2$ -Untereinheit durch LU-102 lässt die proteasomale Proteolyse unbeeinträchtigt, wie in Fig. 3; *right panel* am Fehlen von polyubiquitinierten Proteinen zu sehen ist. Hingegen wird bei Bortezomib und Carfilzomib durch Hemmung der $\beta 5$ -Untereinheit die proteasomale Proteolyse quantitativ gehemmt, wie an der Häufung polyubiquitinierten Proteine zu sehen ist (siehe Fig. 3; *right panel*). Da p-I κ B üblicherweise über das Proteasom abgebaut wird, kann der Anstieg des p-I κ B Spiegels unter Bortezomib oder Carfilzomib, zusätzlich zur oben dargestellten Aktivierung des NF- κ B Signalweges, auch der Hemmung der $\beta 5$ -Untereinheit und der damit einhergehenden Hemmung der proteasomalen Proteolyse zugeschrieben werden.

Dabei ist zu prüfen wie die verminderten I κ B Spiegel unter Bortezomib und damit die Aktivierung von NF- κ B erklärt werden können, wenn der normalerweise beschrittene Abbauweg von p-I κ B über Proteolyse durch die $\beta 5$ -Untereinheit des Proteasoms nicht mehr möglich ist. Eine mögliche Antwort liefern Lee et al.³⁴: eine Hemmung der $\beta 5$ Untereinheit des Proteasoms durch Proteasominhibitoren führt zum Abbau von I κ B im kompensatorisch aktivierten lysosomalen Signalweg (siehe Schema in Abb. 1.2).

Abb. 1.2: Modell zur Wirkung von Bortezomib und Carfilzomib auf den NF- κ B Signalweg

Bortezomib und Carfilzomib aktivieren die IKK und führen damit zur Phosphorylierung von I κ B zu p-I κ B. Da die proteasomale Proteolyse in der β 5-Untereinheit blockiert ist, kann das anfallende p-I κ B nicht abgebaut werden und wird angehäuft. Die Blockade der proteasomalen Proteolyse aktiviert allerdings kompensatorisch den Abbau von I κ B über das lysosomale System, gibt NF- κ B zur Translokation in den Nukleus frei und aktiviert somit den NF- κ B Signalweg.

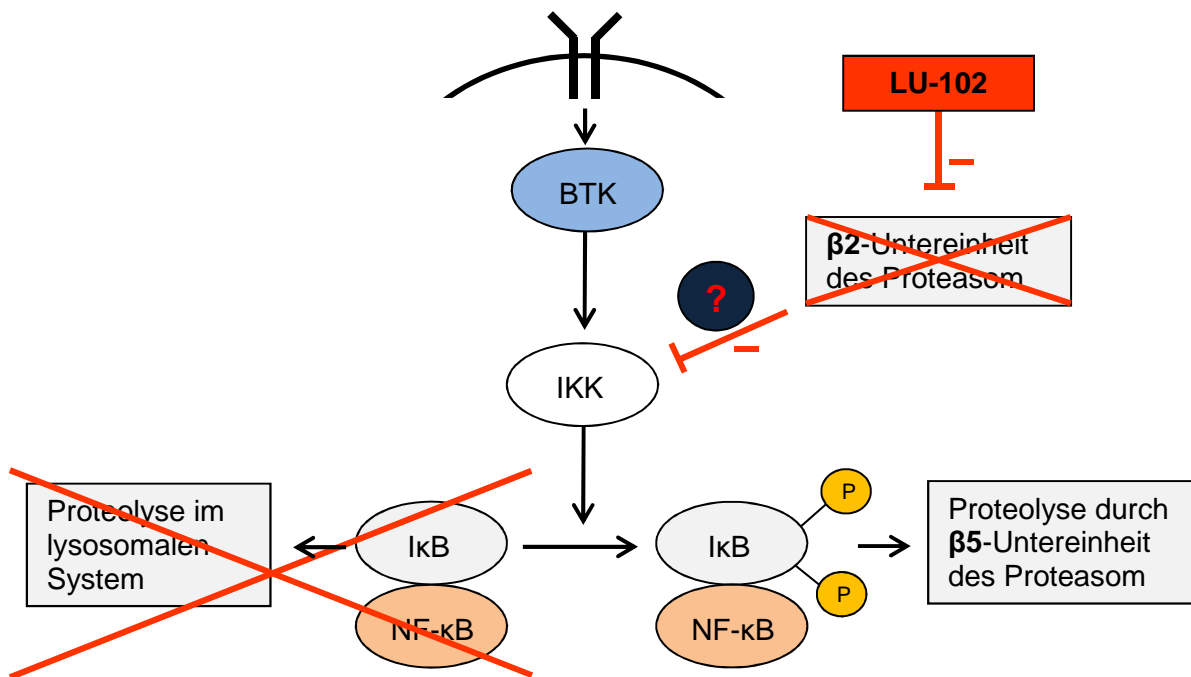


Da LU-102 über Hemmung der β 2-Untereinheit das Gleichgewicht zwischen Proteinbiosynthese und proteasomaler Proteolyse durch die β 5-Untereinheit unangetastet lässt, wird die lysosomale Proteolyse nicht aktiviert. I κ B kann weiterhin nach Phosphorylierung zu p-I κ B über die β 5-Untereinheit des Proteasoms abgebaut werden. Somit wird der p-I κ B Spiegel keinesfalls erhöht. Ungeklärt aber bleibt die Frage, warum LU-102 über eine β 2-Inhibition den

p-IkB Spiegel sogar senkt. Möglich wäre, dass die Hemmung der β 2-Untereinheit durch LU-102 ein normalerweise durch diese Untereinheit abgebautes Enzym aktiv lässt, welches für die Hemmung eines Schlüsselenzyms im NF- κ B Signalweg zuständig ist und dadurch die p-IkB Spiegel abgesenkt werden (Schema siehe in Abb. 1.3).

Abb. 1.3: Modell zur Wirkung von LU-102 auf den NF- κ B Signalweg

LU-102 hemmt die β 2-Untereinheit des Proteasoms. Dies lässt die proteasomale Proteolyse durch die β 5-Untereinheit unangetastet und führt somit nicht zur Aktivierung des lysosomalen Abbausystems. Zudem bleibt durch Hemmung der β 2-Untereinheit möglicherweise ein in der Regel durch diese Untereinheit abgebautes Enzym aktiv, welches für die Hemmung eines Schlüsselproteins im NF- κ B Signalweg zuständig ist. Diese könnte zu einem Absinken der p-IkB Spiegel und einer Hemmung des NF- κ B Signalweges führen.



Zusammenfassend ist festzuhalten, dass aller Wahrscheinlichkeit nach die unterschiedliche Selektivität zu den Untereinheiten des Proteasoms für die unterschiedlichen Wirkungen auf den NF- κ B Signalweg verantwortlich sind; bei Bortezomib und Carfilzomib für die β 5-Untereinheit und bei LU-102 für die

β 2-Untereinheit. LU-102 bewirkt ebenso wie Ibrutinib eine Hemmung des NF- κ B Signalwegs, während Bortezomib und Carfilzomib diesen aktivieren und damit zumindest in diesem Teilaspekt die Wirkung von Ibrutinib antagonisieren.

Mit den hier vorliegenden Daten übereinstimmend zeigen Rushworth et al. ¹³, dass Ibrutinib die zytotoxische Wirkung von Bortezomib auf primären Myelomzellen sowie MM Zelllinien verstärkt. Allerdings zeigen die dargestellten Ergebnisse, dass Bortezomib in Kombination mit Ibrutinib in MM Zelllinien antagonistisch wirkt (medianer CI: 4,9 - siehe Table 1), während Carfilzomib einen Synergismus mit Ibrutinib bei MM Zelllinien aufzeigt (medianer CI: 0,12 - siehe Table 1). Dies deckt sich mit den Ergebnissen eines Screenings für Kombinationspartner von Ibrutinib in Mantelzell-Lymphom Zelllinien ³⁵. Den deutlich stärksten Synergismus in Kombination mit Ibrutinib zeigte sich bei LU-102 (medianer CI: 0,02 - siehe Table 1). Warum die Inhibition der β 2-Untereinheit des Proteasoms die Zytotoxizität von Ibrutinib derart steigert bleibt bis auf die dargelegten Hypothesen weiter unklar. Dem dargestellten Synergismus von Carfilzomib im Gegensatz zu Bortezomib in Kombination mit Ibrutinib könnte zu Grunde liegen, dass Carfilzomib neben der Hemmung der β 5-Untereinheit in höheren Konzentrationen auch die β 2-Untereinheit des Proteasoms hemmt (siehe Fig. 3; *left panel*).

Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus den Zytotoxizitäts-Tests konnte in dieser Dissertation für die Kombination von Ibrutinib mit LU-102, im Vergleich zu den Kombinationen mit Bortezomib oder Carfilzomib, in mehreren Western Blots eine deutlich stärkere Hemmung des NF- κ B Signalweges, eine deutlichere Hemmung des Proliferationsmarkers p-STAT3 und eine robustere Aktivierung der Apoptose-Kaskade nachgewiesen werden (siehe Fig. 4 A; *lower panel, left*).

Obwohl die Einführung neuer Substanzen wie Bortezomib und Carfilzomib in der letzten Dekade große Fortschritte in der Therapie des Multiplen Myeloms hervorgebracht haben und die Überlebensraten der Patienten verbessert wurde, bleibt die Erkrankung größtenteils unheilbar ⁴. Ein signifikanter Anteil an

Patienten, die anfangs gut auf eine Therapie mit Bortezomib ansprechen, fallen im Therapieverlauf letztlich in eine refraktäre Erkrankung zurück: sie entwickeln eine erworbene Resistenz gegenüber Bortezomib. Weiterhin zeigen ungefähr 20 – 30 % der Patienten primär kein Ansprechen auf Bortezomib² und sind gegenüber Bortezomib von Beginn an resistent. Deshalb ist die Überwindung dieser Resistenzen eine der größten Herausforderungen der MM Therapie.

Es konnte gezeigt werden, dass die initiale Vermutung, die Bortezomibresistenz habe ihren Ursprung in Mutationen der $\beta 5$ -Untereinheit des Proteasoms^{36,37}, sich in Analysen von Bortezomib-refraktären Patienten nicht bestätigen ließ^{38,39}. Jedoch konnten kürzlich Leung-Hagesteijn et al.⁵ sowohl *in vitro*, als auch an primären Zellen zeigen, dass der Resistenz gegenüber Bortezomib wahrscheinlich ein Selektionsprozess der Myelomzellen unter dem Selektionsdruck der Therapie mit Bortezomib zu Grunde liegt. Dieser Prozess führt zur Anhäufung von Myelomzellen mit Merkmalen von Pre-Plasmablasten und niedrigen Spiegeln des XBP-1, welches eines der Hauptregulatoren der *unfolded protein response* (UPR) darstellt, gleichzeitig für die Differenzierung zu Plasmazellen unabdingbar ist⁴⁰ und auch die Sensitivität gegenüber Bortezomib bestimmt⁵. Die Ergebnisse von Leung-Hagesteijn et al.⁵ konnten durch die Beobachtung von Stessman et al.⁴¹ untermauert werden, die aufzeigten, dass die Resistenz von Myelomzellen gegenüber Bortezomib *in vitro* durch induzierte Expression von Plasmazellmarkern wieder rückgängig gemacht werden kann. Um folglich nicht nur die Proteasominhibitor-sensitiven Myelomzellen zu therapieren, sondern auch dieser XBP-1 negativen und deshalb gegenüber Bortezomib resistenten Zellen habhaft zu werden, ist es sinnvoll, Proteasominhibitoren mit Substanzen wie Ibrutinib zu kombinieren, die sich gegen die gesamte B-Zell-Linie richten¹⁰.

In dieser Dissertation wurde zum ersten Mal das Konzept einer Kombinationstherapie von Proteasominhibitoren mit Ibrutinib an einem *in vitro* Modell untersucht, welches die oben beschriebenen fundamentalen Eigenschaften aufweist: die hier verwendeten Bortezomib-resistenten und Carfilzomib-resistenten AMO-1 MM Zelllinien (AMO-BTZ und AMO-CFZ) wurden unter dem Selektionsdruck der Proteasominhibitoren generiert (siehe

Abb. 6.1 - 3 im Anhang). Diese zeigen im Vergleich mit ihrer Mutterlinie AMO-1 stark verminderte XBP-1 Spiegel, aber gleichzeitig keine Mutation der β 5-Untereinheit auf und stellen dahingehend ein sehr gutes Modell der *in vivo* Situation dar²⁴. Verglichen mit ihrer Mutterzelllinie zeigt AMO-BTZ zudem eine erhöhte Aktivität der β 2-Untereinheit auf, die nicht von Bortezomib inhibiert wird. Diese Eigenschaft könnte ebenso ein Mechanismus zur Bortezomib Resistenz darstellen²⁴. Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen, dass die Kombinationstherapie des β 2-selektiven Proteasominhibitors LU-102 und Ibrutinib die Resistenz gegenüber Bortezomib und Carfilzomib überwinden kann und vergleichbar mit den Proteasominhibitor-sensiblen Mutterzelllinie eine stark synergistische, zytotoxische Aktivität gegenüber den Proteasominhibitor resistenten Myelomzellen aufweist (siehe Fig. 4 A; *upper panel*). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese Eigenschaft der Resistenzüberwindung ebenso zu beobachten war, wenn primäre Myelomzellen dreier Bortezomib-resistenter Patienten mit der Kombination von LU-102 und Ibrutinib konfrontiert wurden, während die einzelnen Substanzen jeweils keinen Effekt zeigten (siehe Fig. 4 A; *lower panel*). Die Kombination von Ibrutinib mit dem β 2-selektiven Proteasominhibitor LU-102 könnte daher eine rationale Strategie zur Überwindung der Resistenz des Multiplen Myeloms gegenüber Proteasominhibitoren darstellen.

Bei näherer Betrachtung der Ergebnisse ist auffällig, dass das Ausmaß der Ibrutinib induzierten Zytotoxizität nicht mit den Protein- und mRNA Spiegeln von BTK korreliert: so zeigt zwar die Zelllinie INA-6 mit der höchsten Expression von BTK-Protein und -mRNA ein sehr frühes, konzentrationsabhängiges Ansprechen auf Ibrutinib, jedoch unterscheiden sich die Zelllinien Granta-519 und MM.1R in ihrem Ansprechen, trotz vergleichbarer BTK-Expression. Im Gegensatz dazu zeigt die Zelllinie RPMI 8226, trotz fast vollständig fehlender Expression, ein besseres Ansprechen als LP-1 (siehe Fig. 1 A + B). Weiterhin konnte in diesen Versuchen ein quantitativ relevantes Ansprechen auf Ibrutinib erst in einem Konzentrationsbereich von 1 - 10 μ M gezeigt werden. Dies ist in vollkommener Übereinstimmung mit veröffentlichten Daten, bei welchen die IC_{50}

für Ibrutinib *in vitro* für Multiples Myelom, Mantelzell-Lymphom und diffus großzelliges Lymphom durchgehend bei $> 1 \mu\text{M}$ lag^{12,13,42,43}. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zur initial für Ibrutinib gezeigten IC_{50} von $0,5 \text{ nM}$ ⁴⁴ und den Ibrutinib Plasmaspiegeln von 125 nM nach einer festgeschriebenen oralen Dosis von 560 mg in einer klinischen Phase-I Studie⁹.

Ibrutinib ist nicht sehr selektiv für BTK und mindestens 20 weitere Kinasen werden durch Ibrutinib in niedrigen, nanomolaren IC_{50} *in vitro* gehemmt⁴⁴. Diese Tatsache in Verbindung mit den in dieser Dissertation gezeigten Daten legt den Schluss nahe, dass die für die Erforschung von Ibrutinib in *in vitro* gebräuchlichen Konzentrationen für MM und MCL zusätzliche, bisher nicht identifizierte Kinasen angreifen, die in besonderem Maße bei BTK-negativen Zellen signifikant zur Wirkung von Ibrutinib *in vitro* beitragen. Dies sollte bei der Beurteilung von *in vitro* Arbeiten berücksichtigt werden, die mit Konzentrationen von über $1 \mu\text{M}$ arbeiten. Die Tatsache, dass das Ausmaß der Synergismen zwischen Ibrutinib und Carfilzomib oder LU-102 für BTK-negative und BTK-positive Zelllinien in den Ergebnissen vergleichbar sind, lässt vermuten, dass die anderen von Ibrutinib inhibierten Kinasen für die beobachteten Synergien sogar wichtiger sind als BTK selbst. Um diese möglichen zusätzlichen Ziel-Proteine nachweisen zu können, wurde für diese Arbeit ein zellpermeables und mit einem fluoreszierenden Label verknüpftes Derivat Ibrutinibs entwickelt, welches Ibrutinib-reaktive Proteine visualisieren kann. Damit gelang es in allen B-Zelllinien ein weiteres Protein bei 64 kD zu identifizieren, welches unabhängig von der BTK Expression der Zelllinie nachgewiesen werden konnte. Dieses Protein könnte eine bisher nicht identifizierte Zielkinase von Ibrutinib sein und für die Wirkung von Ibrutinib in BTK-negativen MM und MCL Zelllinien entscheidend sein.

Zusammenfassend konnte in dieser Dissertation gezeigt werden, dass Carfilzomib und LU-102 im Vergleich zu Bortezomib in Kombination mit Ibrutinib die stärkere synergistische zytotoxische Wirkung auf MM Zellen aufzeigen und dass dies höchstwahrscheinlich auf ein höheres Ausmaß an synergistischer Wirkung auf die Regulation des NF- κB Signalweges über das Verhältnis von

p-I κ B/I κ B zurückzuführen ist. Weiterhin wurde aufgezeigt, dass der neue präklinische, β 2-selektive Proteasominhibitor LU-102 in Kombination mit Ibrutinib *in vitro* Resistenzen gegenüber Bortezomib und Carfilzomib überwinden kann.

2 ÜBERSICHT DER ZUR VERÖFFENTLICHUNG ANGENOMMENEN PUBLIKATIONEN

Kraus J, Kraus M, Liu N, et al. The novel β 2-selective proteasome inhibitor LU-102 decreases phosphorylation of I kappa B and induces highly synergistic cytotoxicity in combination with ibrutinib in multiple myeloma cells. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2015;76(2):383-396. doi:10.1007/s00280-015-2801-0.

Oral presentation at 12th International Conference on Malignant Lymphoma
J. Kraus, M. Kraus, J. Bader, H. Overkleeft, C. Driessen. THE NOVEL PROTEASOME INHIBITOR LU-102, BUT NOT BORTEZOMIB OR CARFILZOMIB, DECREASES P-IKB LEVELS IN MYELOMA CELLS, AND IS SYNERGISTIC WITH IBRUTINIB TO OVERCOME BORTEZOMIB/CARFILZOMIB RESISTANCE IN VITRO. ORAL PRESENTATIONS. *Hematological Oncology*. 2013;31(S1):96-150. doi:10.1002/hon.2057.

The novel β 2-selective proteasome inhibitor LU-102 decreases phosphorylation of I kappa B and induces highly synergistic cytotoxicity in combination with ibrutinib in multiple myeloma cells

Johannes Kraus¹ · Marianne Kraus¹ · Nora Liu² · Lenka Besse¹ · Jürgen Bader¹ · Paul P. Geurink² · Gerjan de Bruin² · Alexei F. Kisselev³ · Herman Overkleef² · Christoph Driessen¹

Received: 27 March 2015 / Accepted: 8 June 2015 / Published online: 23 June 2015
© The Author(s) 2015. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract

Purpose Proteasome-inhibiting drugs (PI) are gaining importance in hematologic oncology. The proteasome carries three proteolytically active subunits (β 1, β 2, β 5). All established PI (bortezomib and carfilzomib), as well as experimental drugs in the field (dalanzomib, oprozomib, and ixazomib), by design target the rate-limiting β 5 subunit. It is unknown whether β 2-selective proteasome inhibition can also be exploited toward anticancer treatment. Combining PI with the pan B-cell-directed Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib appears a natural option for future improved treatment of multiple myeloma (MM) and B-cell lymphomas. However, bortezomib induces phosphorylation of I κ B and activation of NF- κ B in MM cells, while ibrutinib inhibits the I κ B/NF- κ B axis, suggesting antagonistic signaling. A β 2-selective proteasome inhibitor may lack such antagonistic signaling effects.

Methods We recently introduced LU-102, the first β 2-selective PI available for preclinical testing. We here compare bortezomib with carfilzomib and LU-102 in MM and MCL in vitro with regard to their effects on pI κ B/NF- κ B signaling and their cytotoxic activity in combination with ibrutinib.

Results LU-102 reduced phosphorylation of I κ B, in contrast to bortezomib and carfilzomib, and was a superior inhibitor of NF- κ B activation in MM cells. This translated into highly synergistic cytotoxicity between LU-102 and ibrutinib, which was able to overcome BTZ resistance and CFZ resistance. By contrast, BTZ lacked consistent synergistic cytotoxicity with ibrutinib.

Conclusion Ibrutinib is highly synergistic with β 2-selective proteasome inhibition against MM and MCL in vitro. Novel β 2-selective proteasome inhibitors may be exploited to overcome bortezomib/carfilzomib resistance and boost the activity of BTK inhibitors against B-cell-derived malignancies.

Keywords Protease inhibitors · Myeloma therapy · Signal transduction · Drug resistance

Introduction

Treatment with proteasome inhibitors (PI) has become a backbone of therapy for multiple myeloma (MM) [1] and mantle cell lymphoma (MCL). This has established the proteasome as a molecular target and the manipulation of protein homeostasis as a therapeutic principle in cancer. However, bortezomib (BTZ), the first in class approved PI, is lacking significant single-agent activity in other B-cell-derived malignancies, so that several combination treatments are under clinical investigation [2]. In addition, resistance to BTZ almost inevitably occurs in MM and MCL patients during the course of the disease [1], underscoring the need to improve the activity of PI-based treatments.

The proteasome is a multicatalytic multiprotein protease complex responsible for the majority of protein destruction

✉ Christoph Driessen
christoph.driessen@kssg.ch

¹ Experimental Oncology and Hematology, Department of Oncology and Hematology, Kantonsspital St. Gallen, 9007 St. Gallen, Switzerland

² Gorlaeus Laboratories, Leiden Institute of Chemistry and Netherlands Proteomics Centre, Einsteinweg 55, 2333 CC Leiden, The Netherlands

³ Department of Pharmacology and Toxicology, Norris Cotton Cancer Center, Geisel School of Medicine at Dartmouth, 1 Medical Center Drive HB7936, Lebanon, NH 03756, USA

in eukaryotic cells [3]. Its proteolytic activity is mediated by three distinct active sites in the $\beta 1$, $\beta 2$, and $\beta 5$ subunits that hydrolyze substrates with distinct substrate specificities (caspase-like, trypsin-like, and chymotrypsin-like). BTZ is a peptide-based, reversible inhibitor of the $\beta 5$ -type, and to a lesser extent the $\beta 1$ -type proteasome subunits, that was developed based on the finding that the $\beta 5$ active site mediates the rate-limiting activity for proteasomal proteolysis [1]. Several second-generation, peptide-based, irreversible PI are in clinical development, including the FDA-approved carfilzomib (CFZ), as well as ixazomib [4] and oprozomib [5], which all by design target the $\beta 5$ proteasome activity. The clinical activity of CFZ in BTZ-refractory MM is low and in the 20 % range [6].

Continuing progress in resolving the three-dimensional structure of the proteasome in complex with PI has facilitated the development of PI that selectively target the non- $\beta 5$ proteasome subunits, i.e., $\beta 2$, $\beta 1$ and the immuno-proteasome. The $\beta 2$ proteasome activity has been identified as critical factor that modulates the cytotoxicity of $\beta 5$ -targeted proteasome inhibitors [7–9], corresponding with the finding that $\beta 2$ proteasome activity is upregulated in BTZ-refractory cells [10]. We have recently developed LU-102, the first irreversible, cell-permeable, $\beta 2$ -selective PI as a chemical lead for preclinical development [8], which is currently being tested in combination with the approved PI to overcome PI resistance in preclinical models. The potential of LU-102 for therapeutic use in combination with non-PI anticancer agents remains to be defined.

B-cell-derived malignancies represent a natural target population for the development of PI-based combination therapies, such as CLL and mantle cell lymphoma [11, 12]. In addition, PI-refractory myeloma *in vivo* accumulates features of immature B cells [13], also implementing the use of pan B-cell-directed targeted agents against advanced MM. Hence, combining proteasome inhibitor therapy with a broadly active B-cell-targeting drug is a promising concept to further exploit the cytotoxic anticancer activity of PI, in particular in MCL, CLL, and BTZ-refractory MM.

The Bruton tyrosin kinase (BTK) is a non-receptor tyrosine kinase expressed throughout the entire B-cell differentiation [14], which plays a key role in B-cell development and function [15]. BTK signals through phosphorylation of PLC- γ , leading to phosphorylation of I κ B and activation of the NF- κ B signaling pathway, and also induces MAPK and AKT signaling. MAPK, STAT3, and in particular NF- κ B, are critical signaling pathways for MM cell survival [16]. Ibrutinib is approved as first in class BTK inhibitor in MCL, chronic lymphatic leukemia, and Waldenström's disease, and has shown clinical activity in MM and other B-cell-derived neoplasms. Combining ibrutinib with PI is currently explored using BTZ or CFZ, respectively, in MM and MCL.

The major signaling pathway of BTK as well as strong downstream signaling effects of BTZ converge in the canonical NF- κ B pathway [17]: I κ B is phosphorylated downstream of active BTK, generating p-I κ B which is a target for ubiquitination and proteasomal disposal, liberating the transactivating activity of NF- κ B. Hence, the cytotoxic activity of ibrutinib is mediated via a decrease in p-I κ B, leading to decreased NF- κ B activity. By contrast, BTZ has been shown to increase p-I κ B and induce NF- κ B activity in MM cells [18]. This implies that combination therapies between BTZ and BTK inhibitors may have opposing effects on NF- κ B signaling, which would be expected to limit their activity. However, also negative regulation of the NF- κ B pathways by BTZ and induction of I κ B α degradation have been shown [19–21]. The mechanism of the stabilization of p-I κ B and NF- κ B activity by BTZ in MM is poorly understood, but may involve off-target effects of BTZ, which is known to inhibit also lysosomal serine proteases such as cathepsin G and potentially other proteases [22]. Novel irreversible PI such as CFZ and LU-102 are more selective for the proteasome and lack such off-target activity, so that they may be more suitable combination partners for ibrutinib to treat MM. The aim of the current study was to compare ibrutinib in combination with BTZ to combinations of ibrutinib with either CFZ or LU-102 with respect to the resulting effects on BTK signaling and cytotoxicity in MM cells, including BTZ-resistant myeloma. This aims at providing a preclinical rationale to select either BTZ or CFZ as combination partner for ibrutinib in MM clinical trials, and in addition shall allow to further explore a potential use of $\beta 2$ -selective proteasome inhibitors as combination partners in targeted therapies, in particular in the MM field.

Methods and materials

Cells and inhibitors

Human myeloma cell lines RPMI 8226, LP-1, AMO-1, U-266, MM.1S, MM.1R, human mantle cell lymphoma cell lines Granta-519 and Jeko-1, and the acute myeloid leukemia cell line THP-1 were obtained from ATCC, human myeloma cell lines INA-6, JK-6, L363 from M. Gramatzki, Kiel, and were maintained in FCS-supplemented RPMI 1640 medium with gentamycin. INA-6 is IL-6 dependent which was used at 500 U/ml. AMO-BTZ/CFZ cells were adapted to proteasome inhibitor-containing culture conditions from the AMO-1 parental line as described [10]. The proteasome inhibitors bortezomib, carfilzomib, and LU-102 [8] were synthesized at the Leiden Institute of Chemistry, and ibrutinib was obtained from Pharmacyclics. The activity-based ibrutinib probe was synthesized and used as described recently [27].

MTT assay, Western blot, Western blot quantification, antibodies

CellTiter 96[®] AQueous One Solution cell proliferation assay (Promega) was used to determine cell viability in MTT assays. Mean values from quadruplicate samples of one representative experiment representing at least three independent experiments are presented. SDS-PAGE and Western blot was performed as described [10]. Western blots were quantified using Bio 1D software (Vilber Lourmat); Fluorescence signals of DMSO-treated cells were considered baseline levels. Anti-BTK (Tyr223), anti-p-BTK (pTyr223), anti-p-65, and anti-cleaved caspase 3, 7, 9, anti-STAT3, and anti-p-STAT3 antibodies were purchased from Cell Signalling Technology (Boston, USA), anti-I κ B α and anti-p-I κ B α from Becton–Dickinson (Heidelberg, Germany), anti-cleaved PARP from Promega (Madison, USA), anti-GAPDH and anti- β -actin from Sigma (St. Louis, USA), and anti-polyubiquitinated proteins from Viva Bioscience (Exeter, UK).

Determination of proteasome activity by active site labeling

The covalent, proteasome-specific affinity probe Bodipy TMR-Ahx3L3VS (MV-151) was synthesized and used as described [23]. Both the constitutive and the immune-proteasome subunits were irreversibly labeled by MV151 in intact cells and resolved after cell lysis by SDS-PAGE. Proteasome subunit-specific fluorescence signals were in-gel measured with the Fusion FX7 (Vilber Lourmat) and quantified using Bio 1D software.

RNA extraction and real-time PCR

RNA was extracted from 5×10^6 cells using phenol–chloroform method. Reverse transcription was performed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems). Real-time PCR primers for GAPDH and BTK were purchased from Qiagen. Relative quantitative real-time PCR used SYBR green technology (Roche) on cDNA generated from the reverse transcription of purified RNA. After preamplification (95 °C for 10 min), the PCRs were amplified for 45 cycles (95 °C for 10 s, 55 °C for 20 s and 72 °C for 20 s) on a LightCycler[®] 480 (Roche). Each mRNA expression was normalized against GAPDH mRNA expression using the standard curve method.

Patient cells

The primary myeloma cell samples were obtained after written informed consent and approval by the

independent ethics review board, in accordance with ICH-GCP and local regulations. Malignant plasma cells were retrieved by bone marrow aspiration from patients with multiple myeloma progressing under bortezomib-containing therapy (BTZ-resistant) or responding to bortezomib (BTZ-sensitive), based on IMWG criteria. The purity of the cell sample was >80 % myeloma cells after Ficoll separation, as assessed by morphology. Cells were cultured in FCS-supplemented RPMI 1640 medium with gentamycin.

Statistical analysis

Unless stated otherwise, one representative experiment out of at least three independent experiments is shown; for MTT assays, mean values from quadruplicate samples are represented. Error bars indicate the standard deviation between the individual experiments or samples. Synergism between ibrutinib and the different proteasome inhibitors was calculated using MTT assays in conjunction with the combination index described by Chou et al. [24]. A combination Index <0.8 indicates synergism, >1 indicates antagonism. The statistical significance was calculated using student's *t* test.

Results

BTK expression and ibrutinib-mediated cytotoxicity in MM cell lines

We analyzed a panel of MM and mantle cell lymphoma (MCL) cell lines with respect to protein and mRNA expression of BTK and p-BTK, respectively, and correlated the results with the cytotoxic effect of ibrutinib *in vitro*. Consistent with published data [25, 26], we found sizable BTK protein expression in the MM cell lines INA-6, LP-1, and to a lesser extent in MM.1R cells, in contrast to the remaining MM cell lines (AMO-1, AMO-BTZ, AMO-CFZ, JK-6, L363, MM.1S, RPMI 8226 and U-266; Fig. 1a). The mRNA transcription levels for BTK only poorly correlated with the respective protein expression, also in agreement with earlier studies [25]. Interestingly, the sensitivity of MM and MCL cell lines for ibrutinib-induced cytotoxicity also only poorly reflected the protein expression levels of p-BTK in the individual cell lines (Fig. 1b). Because the majority of primary human MM cell samples express p-BTK protein and are sensitive to cytotoxic treatment with ibrutinib 10 μ M *in vitro* [26], we selected INA-6 MM cells as a suitable model system to study the effects of ibrutinib in combination with proteasome inhibitors on MM cell lines *in vitro*.

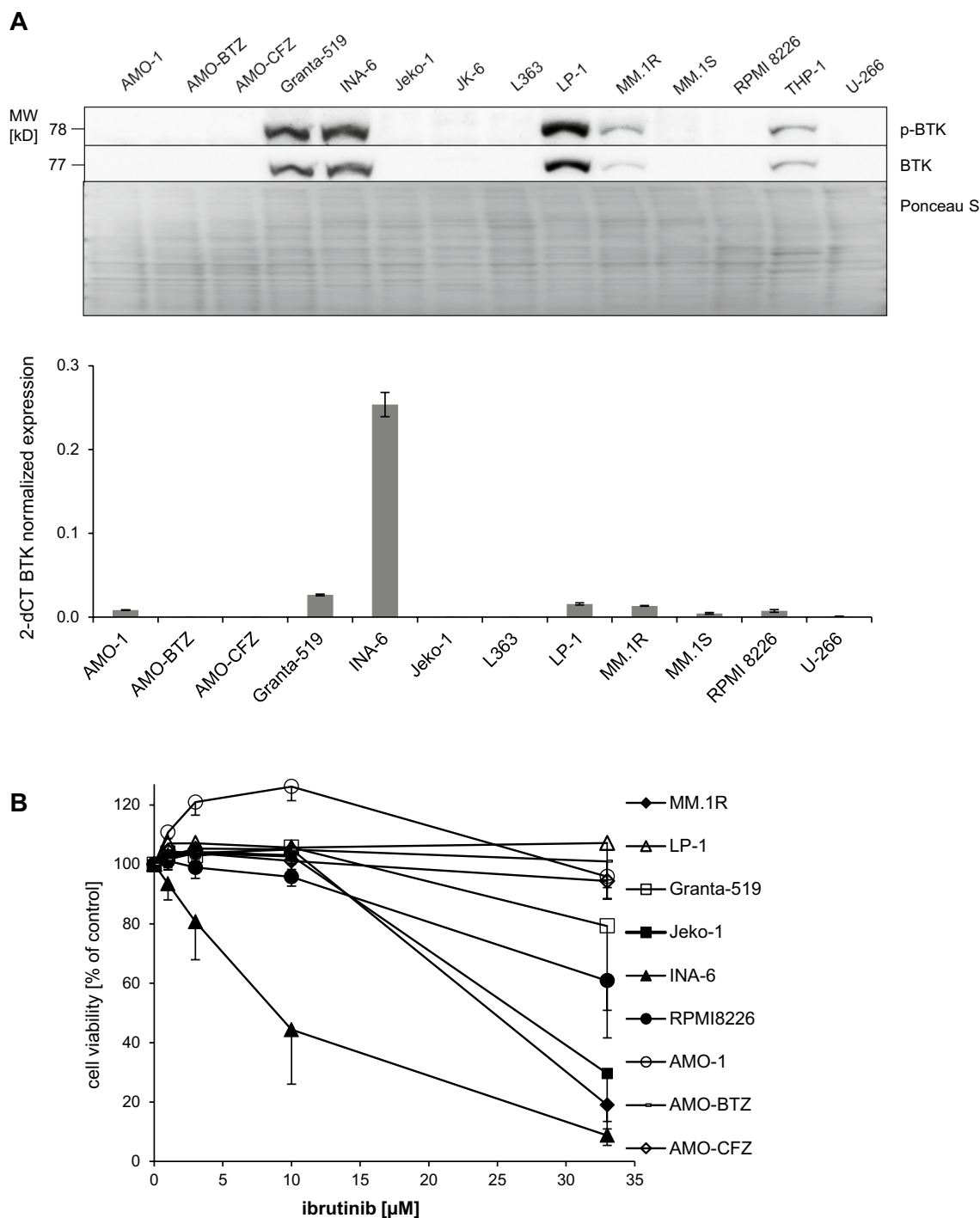


Fig. 1 BTK expression and ibritinib-mediated cytotoxicity in MM cell lines. **a** Upper panel MM cell lines (AMO-1, AMO-BTZ, AMO-CFZ, INA-6, JK-6, L363, LP-1, MM.1R, MM.1S, RPMI 8226 and U-266), MCL cell lines (Granta-519 and Jeko-1), and AML cell line (THP-1) were analyzed with respect to protein expression of BTK. After cell lysis, equal amounts of protein were resolved by SDS-PAGE, and Western blots against BTK and activated BTK (p-BTK) were performed. Ponceau S staining of the same PVDF membrane that was

used for the blots confirms equal protein contents between lanes. Lower panel The same cell lines were analyzed for BTK mRNA expression by real-time PCR. Results are expressed in relation to mRNA for GAPDH. **b** MM cell lines (MM.1R, LP-1, INA-6, RPMI 8226, AMO-1, AMO-BTZ and AMO-CFZ) and MCL cell lines (Granta-519 and Jeko-1) were incubated with ibritinib at indicated concentrations for 48 h and cell viability was assessed by MTT proliferation assay

Ibrutinib reduces p-I κ B levels and lacks a direct effect on proteasome activity in MM cell lines

We next assessed the molecular effects of ibrutinib on the p-BTK/p-I κ B signaling cascade as well as on the proteasome activity in INA-6 cells. As expected, ibrutinib inhibited the p-BTK expression in a dose-dependent manner already at nanomolar concentrations (Fig. 2a). Likewise, a dose-dependent reduction in p-I κ B expression consistent with the known effect of ibrutinib on BTK signaling was observed, starting at high nanomolar drug levels. As expected, ibrutinib had no direct effect on the activity of the proteasomal β 1, β 2, or β 5 subunits, as visualized by the cell-permeable, pan-proteasome-selective, activity-based probe MV151 that irreversibly targets the active constitutive and immuno-proteasome subunits in situ and allows their direct quantification by fluorescence detection (Fig. 2b).

The β 2-selective proteasome inhibitor LU-102 decreases p-I κ B expression, in contrast to bortezomib or carfilzomib

The cytotoxic activity of ibrutinib is transmitted via reduction in p-I κ B levels, while in contrast BTZ has been shown to moderately increase p-I κ B in MM cells [18], which would predict to limit the synergistic activity of both drugs. We therefore compared the effect of BTZ on p-I κ B with that of CFZ, as well as the β 2-selective peptide vinylsulfonamide-type proteasome inhibitor LU-102 [8]. INA-6 MM cells were incubated with the respective proteasome inhibitors in a concentration range that included the IC₅₀ for each inhibitor, and their differential effects on proteasome activity, the accumulation of polyubiquitinated cellular protein, and p-I κ B/I κ B protein expression were visualized (Fig. 3). In BTZ-treated cells, we observed a concentration-dependent, β 1-/ β 5-selective reduction in proteasome activity that was accompanied by a respective increase in polyubiquitinated protein. Also in agreement with published data, BTZ treatment led to a slight decrease in I κ B, while p-I κ B expression increased (Fig. 3, upper panel), resulting in an increased p-I κ B/I κ B ratio. CFZ treatment did likewise reduce the β 1/ β 5 proteasome activity signal with a concomitant increase in polyubiquitinated protein, comparable to BTZ. CFZ treatment at higher concentrations (10 nM and higher) in addition resulted in a small, but reproducible reduction in β 2 activity, unlike BTZ. The ratio of p-I κ B/I κ B expression likewise increased under CFZ treatment (Fig. 3, middle panel). In contrast to both approved proteasome inhibitors, LU-102 specifically targeted the β 2-/2i-type proteasome activity, without affecting the activity signals for β 1/ β 5 subunits

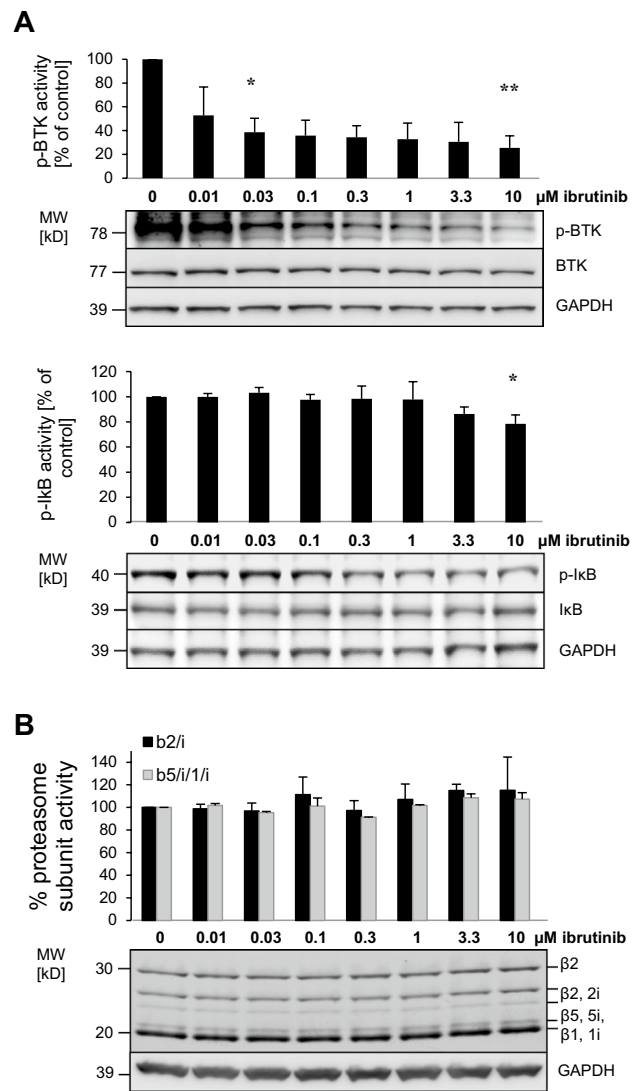


Fig. 2 Molecular effects of ibrutinib on the target proteins p-BTK/BTK, the downstream p-I κ B/I κ B activation and proteasome subunit activity. **a** Upper panel INA-6 cells were incubated with increasing ibrutinib concentrations (0–10 μ M) for 4 h, and p-BTK and BTK proteins were assessed by Western blot. The bar graph illustrates the quantitative comparison of the fluorescence signals retrieved for p-BTK protein at the respective ibrutinib concentrations, relative to baseline (DMSO-treated). Lower panel INA-6 cells were incubated with increasing ibrutinib concentrations (0–10 μ M) for 8 h, before I κ B and activated I κ B (p-I κ B) proteins were determined by Western blot and quantified as described above. For a statistically significant quantitative difference from baseline, * p < 0.05; ** p < 0.01. **b** After incubation with increasing ibrutinib concentrations (0–10 μ M), active proteasome subunits in INA-6 cells were affinity-labeled using the fluorescent, pan-proteasome reactive, cell-permeable probe MV-151 for 1 h. After resolution by SDS-PAGE, the fluorescence signals representing active proteasome β 1, β 2, β 5 polypeptides and the respective immuno-proteasome species β 1i, β 2i, β 5i were visualized using a fluorescent reader and quantitated. Conventional Western blotting against GAPDH demonstrates equal protein load of the samples. The bar graph above illustrates the quantitative comparison of the specific fluorescence signals detected for the proteasomal β 1(i)/ β 5(i) and β 2(i) activities, relative to DMSO-treated baseline

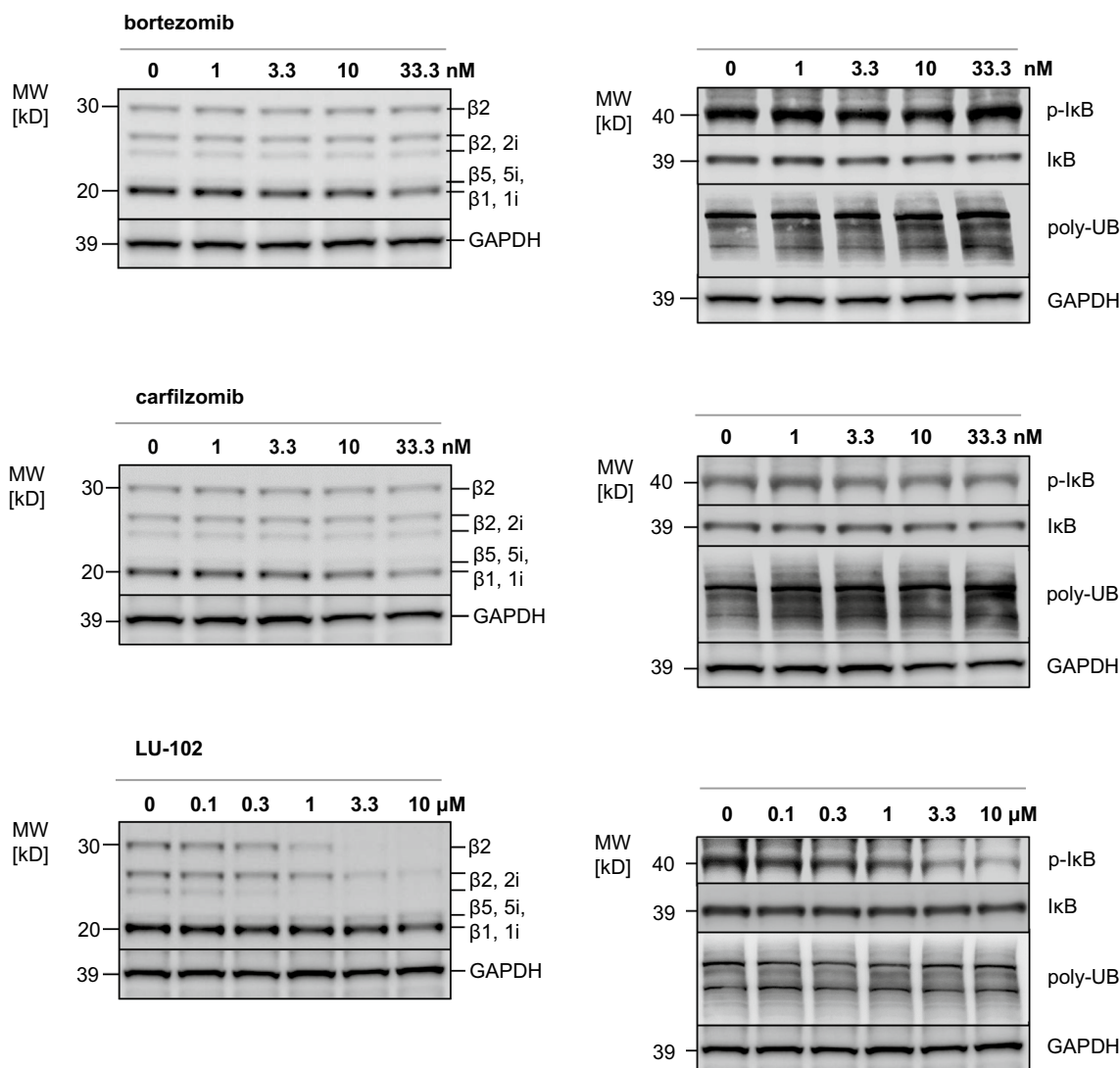


Fig. 3 Molecular effects of bortezomib, carfilzomib, and the β 2-specific proteasome inhibitor LU-102 on proteasome subunit activities, the p-I κ B/I κ B ratio and polyubiquitinated protein. *Left panels* After incubation with increasing proteasome inhibitor concentrations (bortezomib, carfilzomib: 0–33.3 nM; LU-102: 0–10 μ M), active proteasome subunits in INA-6 cells were affinity-labeled using

the cell-permeable probe MV-151, and visualized as before. *Right panels* INA-6 cells were incubated with the respective proteasome inhibitors, as before, followed by assessment of p-I κ B, I κ B, and polyubiquitinated proteins (poly-UB) by Western blots. One representative of two experiments performed

(Fig. 3, lower panel). An increase in polyubiquitinated protein was not observed with LU-102 treatment, suggesting less effective quantitative reduction in protein degradation during β 2-selective proteasome inhibition. Surprisingly, and in contrast to BTZ and CFZ, LU-102 treatment resulted in a concentration-dependent decrease in p-I κ B levels, so that a significant decrease in the ratio of p-I κ B/I κ B expression was observed in INA-6 cells after LU-102 treatment. Thus, the β 2-selective proteasome inhibitor LU-102 decreases cellular p-I κ B levels and the p-I κ B/I κ B ratio and therefore may support the signaling cascade triggered by ibrutinib, in contrast to the β 1/ β 5-selective proteasome inhibitors CFZ and BTZ

that stabilize p-I κ B levels and increase the p-I κ B/I κ B ratio. We speculated that LU-102 may result in superior synergistic cytotoxic activity in combination with ibrutinib, compared to BTZ or CFZ.

Ibrutinib in combination with LU-102 shows superior synergistic cytotoxicity against MM cells

We next analyzed the effects of ibrutinib in combination with the different proteasome inhibitors on cytotoxicity and activity of the NF- κ B pathway in INA-6 MM cells. The combination of ibrutinib with either BTZ or CFZ at

sub-cytotoxic concentrations did not significantly affect cell viability, compared with ibrutinib alone (Fig. 4a, upper panel), and resulted in borderline synergistic cytotoxic activity with combination indices of 0.6 and 0.8, respectively. By contrast, the combination of ibrutinib with sub-effective LU-102 resulted in a highly synergistic cytotoxic effect on INA-6 cells with a combination index of 0.075. While myeloma cell viability after treatment with ibrutinib in combination with BTZ or CFZ was 46 and 42 %, respectively, and thus in the same order of magnitude as after ibrutinib monotherapy, it was reduced to 7 % by combination treatment with LU-102. Consistent with this, as well as with the data described above, the combination of ibrutinib with LU-102 showed superior suppression of p-I κ B, p-p65, and p-STAT3 protein expression, as well as induction of cleaved caspase 3, 7 and 9 and cleaved PARP, compared with ibrutinib in combination with either bortezomib or carfilzomib (Fig. 4a, lower panel). These findings demonstrate that LU-102 is a superior combination partner for ibrutinib, compared with CFZ or BTZ, to induce cytotoxicity in MM cells.

Ibrutinib in combination with LU-102 shows synergistic cytotoxicity against proteasome inhibitor-resistant MM cells

We next explored to what extent the combination of LU-102 and ibrutinib may likewise be cytotoxic against MM cells resistant against BTZ or CFZ. To serve as a model for proteasome inhibitor resistance, AMO-1 MM cell lines were adapted to grow in the presence of the two approved proteasome inhibitors as published before for bortezomib, yielding AMO-1 cell populations with differential sensitivity for BTZ or CFZ (AMO-1, AMO-BTZ, AMO-CFZ, supplemental material). Interestingly, CFZ-adapted cells (AMO-CFZ) were still sensitive to BTZ at high concentrations, while BTZ-adapted cells (AMO-BTZ) lacked CFZ sensitivity up to 100 nM, suggesting different mechanisms of proteasome inhibitor resistance between these two cell populations or the two drugs. When these cell populations were exposed to ibrutinib or LU-102 at sub-effective concentrations or to the combination of both drugs, respectively, we observed strong synergistic cytotoxic activity of this combination against the AMO-1 wild-type cells as well as the CFZ- or BTZ-adapted populations (Fig. 4b, upper panel and supplemental material). To further support that MM cells that are resistant to the approved proteasome inhibitors are sensitive to the combination of LU-102 and ibrutinib, we obtained primary MM cells from three patients with clinically bortezomib-resistant MM and exposed them to bortezomib 10 nM or LU-102 1 μ M, ibrutinib 10 μ M, or the combination of the latter two in vitro (Fig. 4b, lower panel). Cell viability was largely unaffected

by either of the drugs alone, while the combination between LU-102 and IBR again yielded a highly synergistic cytotoxic effect between both compounds (CI 0.015).

BTZ does not induce consistent, synergistic cytotoxicity with ibrutinib in MM and MCL cell lines, in contrast to CFZ and LU-102

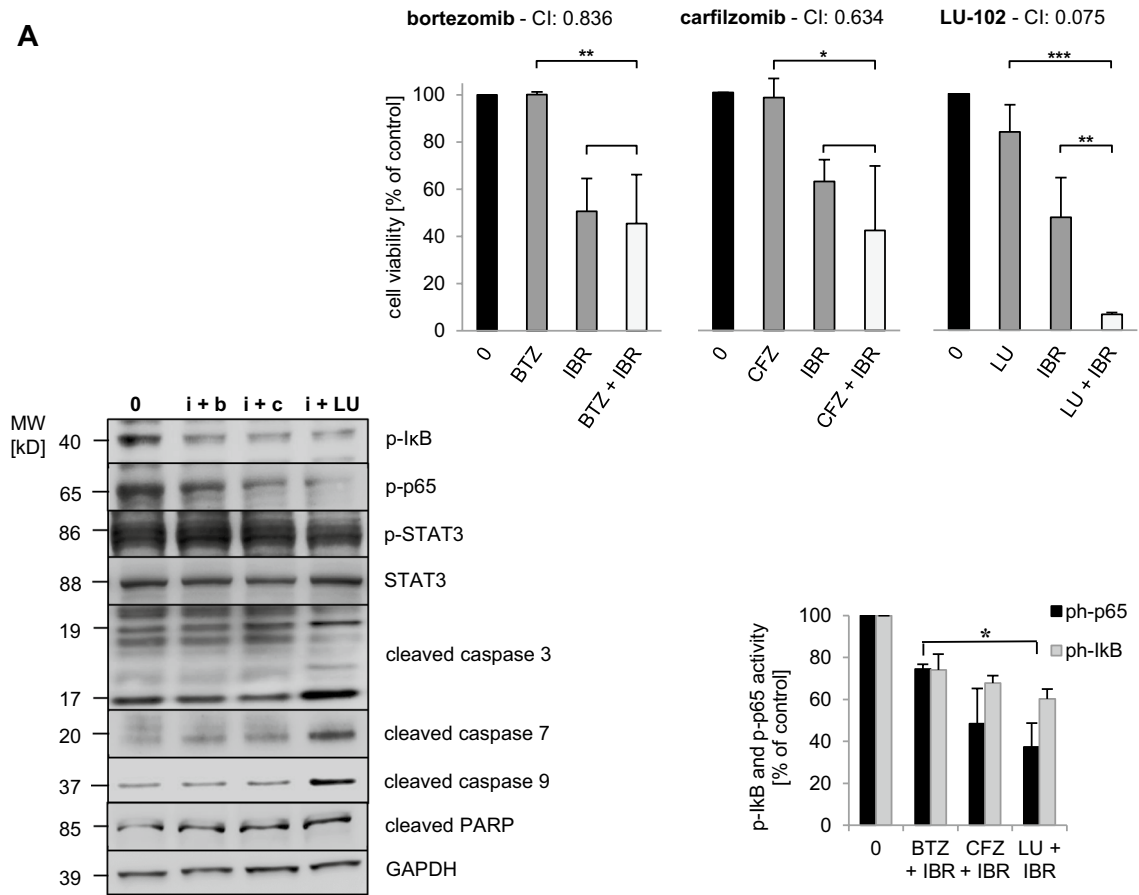
We finally challenged a panel of MM cell lines (LP-1, MM.1R, RPMI 8226) and MCL cell lines (Granta-519 and Jeko-1), which differed in their degree of BTK expression and ibrutinib sensitivity, with sub-effective concentrations of BTZ, CFZ, or LU-102, in the presence or absence of ibrutinib (Fig. 5), and calculated the respective combination indices for synergy (CI) after assessment of cytotoxicity by MTT assay. We observed that, in particular, BTZ was a poor combination partner with ibrutinib that did even result in an antagonistic CI of >1 in 4/5 of the cell lines tested (Table 1, median CI 4.9, range 0.3–30.3). By contrast, synergistic cytotoxicity with ibrutinib was seen in 5/5 cell lines with CFZ (median CI 0.12, range 0.03–0.22) and in 5/5 cell lines with LU-102 as combination partner (median 0.02, range 0.001–0.14). Our results therefore demonstrate that BTZ is a relatively poor combination partner to increase the cytotoxic effect of ibrutinib against MM or MCL cells, while CFZ, and in particular LU-102, show consistently strong synergistic cytotoxicity with ibrutinib. LU-102 appears to have an even stronger synergistic potential in combination with ibrutinib than CFZ, based on the CI values calculated.

Visualization of a non-BTK off-target protein of ibrutinib

Interestingly, the synergistic cytotoxic activity between ibrutinib and LU-102 was observed not only in MM/MCL cell lines with high BTK expression, but to almost the same extent also in cells with low/absent detectable BTK protein expression. This suggested that ibrutinib may have additional, as yet unknown cellular targets.

To identify putative additional cellular targets for ibrutinib, we synthesized a cell-permeable derivative of ibrutinib with an incorporated fluorescent label that can be used to tag and visualize ibrutinib-reactive proteins in intact cells after cell lysis and SDS-PAGE due to the covalent target binding of the active compound [27]. Intact cells were incubated with this activity-based ibrutinib probe (ibrutinib-ABP) and subjected to subsequent cell lysis, SDS-PAGE, and fluorescence in-gel detection (Fig. 6). To verify the ibrutinib-sensitive nature of binding of the probe and the specificity of the labeled polypeptides, control cells were pre-incubated either with ibrutinib or with an inactive version of the probe that lacked the reactive group for covalent target binding (mock). Active BTK was identified as prominently labeled protein

A



B

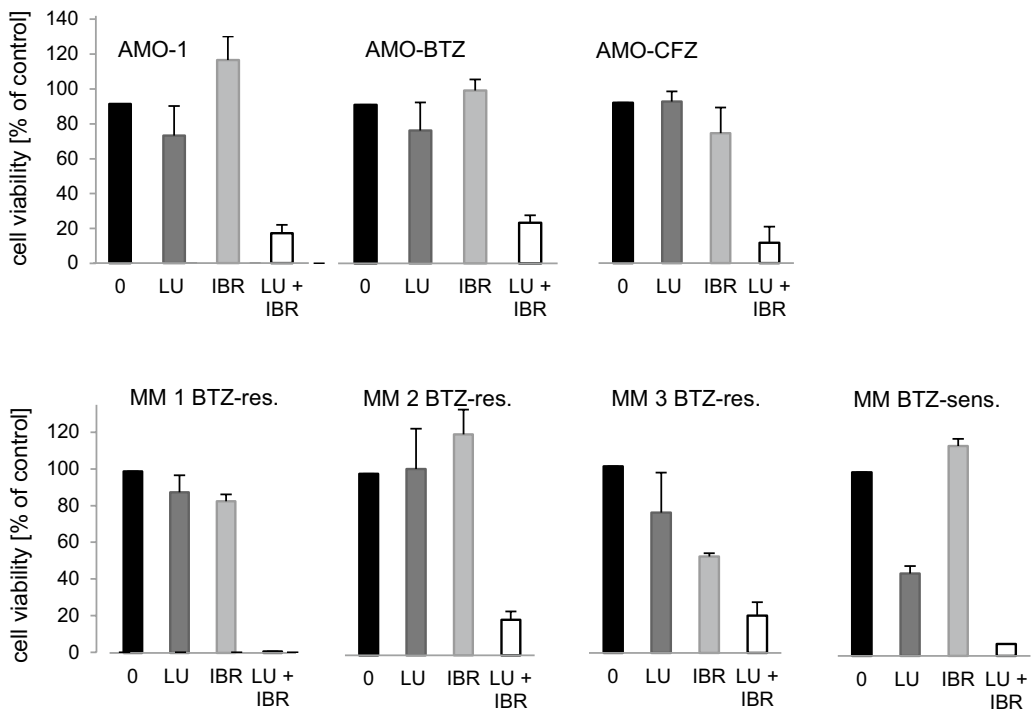


Fig. 4 Cytotoxic effect of ibrutinib in combination with bortezomib, carfilzomib, and LU-102. **a** Upper panel INA-6 cells were incubated with bortezomib (BTZ) 3.3 nM, carfilzomib (CFZ) 3.3 nM, LU-102 (LU) 3.3 μ M or ibrutinib (IBR) 10 μ M or a combination of ibrutinib with one of the proteasome inhibitors, and cell viability was assessed. (CI combination index). Statistically significant differences were expressed as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.005$. Lower panel, left After incubation of INA-6 cells with DMSO control (0), or a combination of ibrutinib (i) 10 μ M and either bortezomib (b) 10 nM, carfilzomib (c) 10 nM or LU-102 (LU) 3.3 μ M, Western blots against p-I κ B, p-p65, p-STAT3, STAT3, cleaved caspases 3, 7, 9 and cleaved poly ADP ribose polymerase (PARP) proteins were performed and quantified as before. Right quantification of the Western blot signals retrieved for p-p65 and p-I κ B. Bar graphs represent amounts of the detected p-p65 and p-I κ B species under the different treatments, relative to baseline values with DMSO treatment. Asterisk indicates a statistically significant quantitative difference between BTZ- and LU-102-treated samples $p < 0.05$. **b** Upper panel AMO-1, AMO-BTZ, and AMO-CFZ cells were incubated with LU-102 and ibrutinib (AMO-1: LU-102 3.3 μ M, ibrutinib 10 μ M; AMO-BTZ: LU-102 10 μ M and ibrutinib 10 μ M; AMO-CFZ: LU-102 3.3 μ M and ibrutinib 33.3 μ M) or with the combination of both for 48 h and cell viability was assessed by MTT assay. Lower panel Primary MM cells from four myeloma patients with bortezomib-resistant (3 patients, BTZ-res.) or bortezomib-sensitive (1 patient, BTZ-sensitive) MM were exposed to bortezomib (BTZ) 10 nM or LU-102 (LU) 1 μ M, ibrutinib (IBR) 10 μ M, or the combination of the latter two for 48 h, and cell viability was assessed

species in BTK-positive cells, based on its expected MW of 78 kD, and the nature of labeling that could be blocked by preincubation with ibrutinib but could only be partly competed by the non-covalent mock competitor of the affinity label. Also as expected, and consistent with our results from Western blots, INA-6 cells showed a robust BTK signal, while this signal was considerably lower in RPMI 8226, AMO-1, AMO-BTZ, and Jeko-1 cells, as well as in non-B-cell-type samples. Treatment of INA-6 cells with 1 mM ibrutinib entirely abolished the BTK activity signal in the absence of significant cytotoxicity (see Fig. 1b, indicating that BTK-expressing MM cells may not undergo significant cytotoxicity upon BTK inhibition alone.

We observed a second protein species of lower labeling intensity at 64 kD (upper band of the doublet polypeptides at 61 and 64 kD), which was decorated by the probe in specific way, comparable to BTK labeling, and whose labeling was antagonized by ibrutinib or, to a lesser extent, the non-covalent label with selectivity similar to that of BTK. This protein was detectable with low, but reproducible signal intensity in all B-cell lines used, irrespective of their BTK expression, and in particular in AMO-1 and AMO-BTZ cells. This labeled 64-kD polypeptide was absent from BT-549 breast cancer cells. We hypothesize that this protein is likely an as yet unidentified target kinase of ibrutinib distinct from BTK that may be the relevant for the effects of ibrutinib on BTK-negative MM and MCL cells alone or in combination with proteasome inhibition.

Discussion

Our data demonstrate that LU-102 has superior synergistic cytotoxic activity with ibrutinib on MM and MCL cells, compared to BTZ, most likely due to its synergistic inhibition of p-I κ B and the canonical NF- κ B pathway, and that the combination of ibrutinib and LU-102 can overcome BTZ and CFZ resistance in vitro. We furthermore provide a first example that PI that target different proteasome active subunits can differentially affect cancer cell signaling or the activity of targeted cancer therapies: β 2-selective proteasome inhibition did not result in gross quantitative inhibition of proteolytic degradation, as seen by the absence of accumulating polyubiquitinated protein after LU-102 treatment, but reduced p-I κ B levels and was more effective in mediating cytotoxicity in combination with ibrutinib, compared with bortezomib that is exclusively inhibiting β 5/ β 1 activity (Fig. 3). This has implications for the development of future proteasome-inhibiting therapies and drugs, where to date little attention is being paid to the different patterns

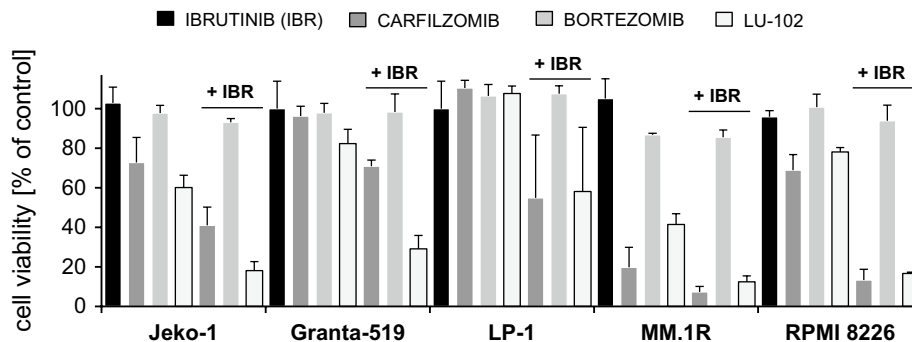


Fig. 5 Cytotoxic effect of ibrutinib in combination with proteasome inhibitors. MCL cell lines (Jeko-1 and Granta-519) and MM cell lines (LP-1, MM.1R and RPMI 8226) were incubated with ibrutinib 10 μ M (IBR), bortezomib 10 nM (BTZ), carfilzomib 10 nM (CFZ) and

LU-102 3.3 μ M (LU), or a combination of ibrutinib with one of the proteasome inhibitors for 48 h, and cell viability was assessed by MTT test. Results are expressed relative to cells treated with DMSO (0)

Table 1 Combination Index (CI) for cytotoxic activity, MTT test

	BTK protein	IBR + BTZ	IBR + CFZ	IBR + LU-102
Granta-519 (MCL)	++	5.109	0.099	0.036
Jeko-1 (MCL)	–	4.994	0.144	0.015
LP-1 (MM)	++	30.333	0.031	0.001
MM.1R (MM)	+	4.319	0.220	0.145
RPMI 8226 (MM)	–	0.300	0.032	0.023
INA-6 (MM)	+++	0.83	0.63	0.075
Median		4.9	0.12	0.02

Combination indices (CI) for synergistic cytotoxic activity in vitro (Fig. 5) between ibrutinib (IBR) in combination with either bortezomib (BTZ), carfilzomib (CFZ), or LU-102 were calculated from MTT tests as described in materials and methods using the MCL and MM cell lines indicated. A CI < 0.8 indicates synergism, a CI > 1 antagonism. The different degrees of expression of BTK protein are indicated for the respective cell lines, as assessed by Western blot (– for no detectable BTK protein, +, ++, +++ for little, moderate and strong BTK protein expression, respectively)

of inhibition of the total of six active subunits of the constitutive and immuno-proteasome.

The potential use of proteasome inhibition in combination with the BTK inhibitor ibrutinib (IBR) in MM has already entered clinical trials (ClinicalTrials.gov, NCT01962792), although we currently lack understanding of the molecular interactions between both targeted pathways. Moreover, proteasome inhibitors with different active groups and molecular targets continue to be developed, while we have little rationale that guides our choice of proteasome inhibitor selected for such a strategy. Based on published information, we predicted that bortezomib may partially counteract the molecular mechanism of action of ibrutinib in MM cells, because it induces NF- κ B activation in MM cells [18], while ibrutinib acts, at least partially, through NF- κ B inhibition in MM [26].

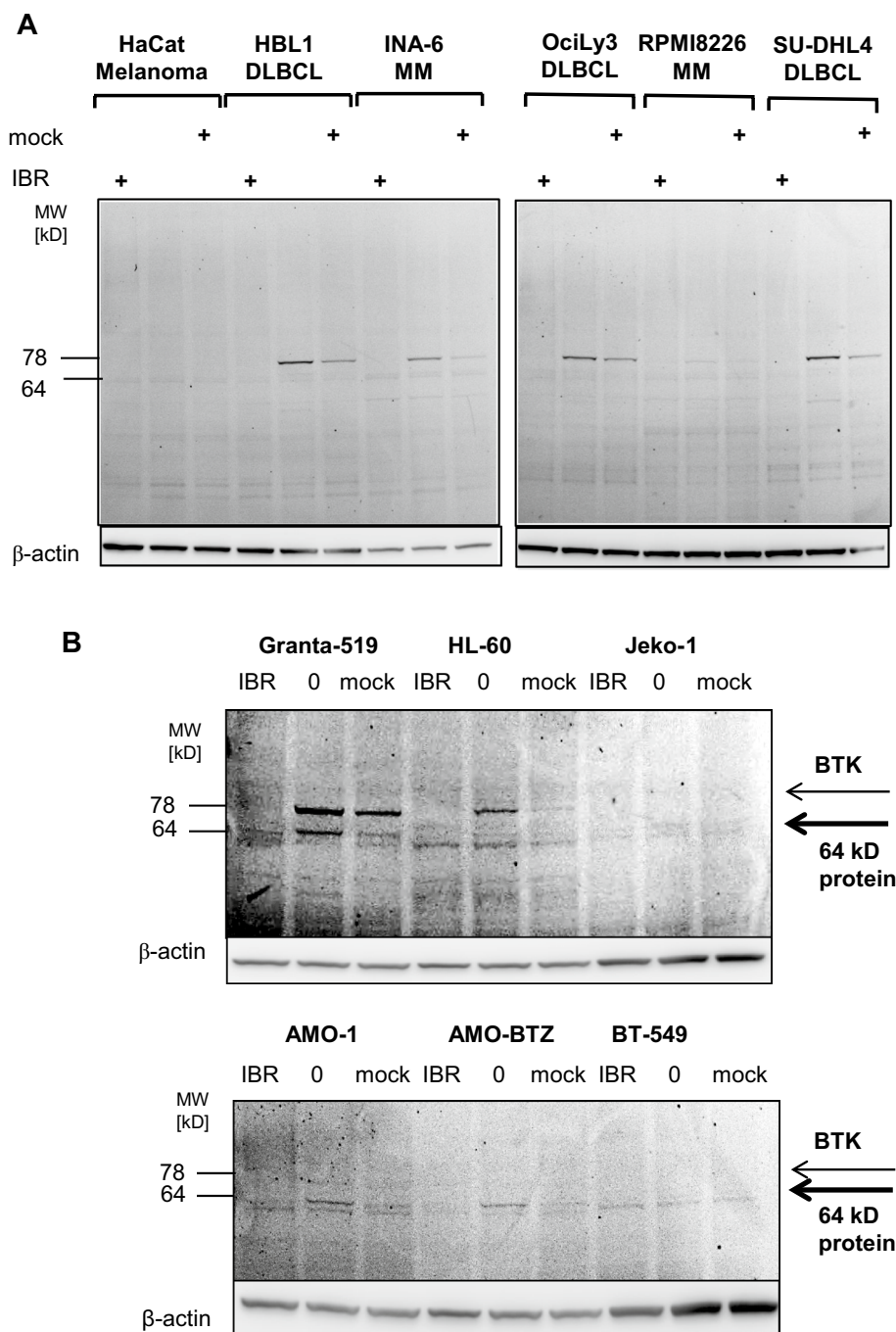
The molecular basis for the different effects of bortezomib and carfilzomib, on the one hand, and LU-102 on the other hand, on the p-I κ B/I κ B balance remains to be explained. Consistent with our data from INA-6 cells, Hideshima demonstrated in RPMI 8226 myeloma cells, that not only bortezomib, but also the β 5-directed, reversible peptide aldehyde proteasome inhibitor MG-132 and the irreversible pan-proteasome inhibitor lactacystin resulted in accumulation of p-I κ B and decreased I κ B levels which are predicted to counteract the molecular activity of ibrutinib. Thus, neither the nature of the chemical warhead of the proteasome inhibitor (peptide aldehyde, epoxyketone, β -lactone, and peptide boronate), nor its reversibility of target binding seems to be of importance for these differential effects. In contrast to the proteasome inhibitors mentioned above, LU-102 does not inhibit or co-inhibit the rate-limiting β 5 subunit of the proteasome, but provides β 2-selective proteasome inhibition. This β 2-selective proteasome inhibition results in a less effective quantitative inhibition of proteasomal proteolysis, as demonstrated by the absence of accumulated polyubiquitinated protein in

our results. Because p-I κ B is a known proteasome substrate that undergoes proteasomal degradation, we speculate that the increase in p-I κ B after carfilzomib/bortezomib treatment may be attributed to the quantitative inhibition of protein destruction by these β 5-inhibiting agents, in contrast to LU-102.

Recent data show that β 5-directed proteasome inhibition can result in I κ B α degradation via the lysosomal pathway that is induced in an I κ B-kinase-independent manner [28]. Our results are consistent with the model that p-I κ B-independent lysosomal degradation of I κ B α occurs in MM cells exposed to β 5-targeted proteasome inhibitors like carfilzomib or bortezomib. By contrast, because the β 2-directed inhibitor LU-102 does not quantitatively affect the global balance between protein biosynthesis and destruction, LU-102 may not activate the lysosomal system to bypass the obstructed proteasomal proteolysis. Indeed, it has been demonstrated that blocking autophagy prevents bortezomib-induced NF- κ B activation by reducing I κ B α degradation in lymphoma cells [29].

Ibrutinib can increase the cytotoxic effect of bortezomib on myeloma patient cells in vitro [30], consistent with our results. However, we lack information about the nature of this effect, whether it is synergistic or may even in part be antagonistic, i.e., less than additive. The latter could still result in an increased cytotoxicity, compared with one drug alone, but would argue against further clinical development of both drugs in combination. In our results, bortezomib was not synergistic with ibrutinib in myeloma or mantle cell lymphoma cell lines (CI median 4.9), while carfilzomib showed a consistent synergism (CI median 0.12), in agreement with recent data from combinatorial drug screening in mantle cell lymphoma [31]. The most robust synergistic cytotoxicity, however, was induced by LU-102 (CI median 0.028, range 0.001–0.14), consistent with our analysis of p-I κ B/I κ B signaling, in multiple cell lines of MM and MCL as well as in bortezomib-resistant primary MM

Fig. 6 Visualization of ibrutinib-targeted proteins using a fluorescent synthetic ibrutinib-analog as activity-based covalent problem. **a** DLBCL type cell lines (HBL1, OciLy3, SU-DHL4), MM (INA-6, RPMI 8226) and the HaCat melanoma cell line were incubated with either DMSO, ibrutinib (IBR), or a mock version of ibrutinib-ABP lacking the active warhead (mock, 1 μ M each), before cells were exposed to activity-based covalent affinity labeling (1 μ M) by incubation with ibrutinib-ABP. After cell lysis, cellular protein was dissolved by SDS-PAGE and fluorescent signals visualized using a fluorescence reader. Western blotting for β -actin served as loading control from the same samples. **b** BTK-expressing (Granta-519, HL-60) cell lines and cell lines without BTK expression (Jeko-1, AMO-1, AMO-BTZ, as well as the breast cancer cell line BT-549) were incubated with DMSO (0), ibrutinib (IBR), or a mock treated as before, and ibrutinib-reactive protein species were visualized as before. Western blotting for β -actin served as loading control



cells. Interestingly, this synergistic cytotoxic activity can be observed not only in MM/MCL cells lines with high BTK expression, but to almost the same extent also in cells with low/absent detectable BTK protein expression. This suggested that ibrutinib may have additional, as yet unknown cellular targets that may be involved in mediating this effect. At present, it is unclear how inhibition of the β 2 proteasome activity fosters synergistic cytotoxicity with ibrutinib. In contrast to bortezomib, also carfilzomib has some β 2-inhibiting activity, which may provide the mechanistic

link for the higher degree of synergy of carfilzomib or LU-102 with ibrutinib, compared with bortezomib. The proteasome is involved in controlling the intracellular levels of not only structural, but also most regulatory cellular proteins involved in cell cycling, proliferation, and differentiation. The different substrate specificities of the β 5 versus β 2 are consistent with the hypothesis that β 5 inhibition versus β 2 inhibition may differentially affect the turnover of some key regulatory proteins. A key role of individual “unlocking” proteases that can control the proteolytic destruction

of individual substrate proteins in a multiprotease proteolytic pathway has been demonstrated for lysosomal antigen processing [32]. The $\beta 2$ proteasome subunit may likewise control the degradation of a regulatory key protein that is involved in mediating ibrutinib-induced cell death.

Overcoming proteasome inhibitor resistance is a major problem for MM therapy. Recent data from thorough analysis of *in vitro* models and patient material demonstrate that proteasome inhibitor resistance is most likely a selection process of myeloma cells under the selective pressure of proteasome inhibitors. During this process, myeloma cells with preplasmoblast-like features and low levels of XBP-1, the major regulator of the unfolded protein response that at the same time determines plasmoblast differentiation and proteasome inhibitor sensitivity, accumulate [13]. Combining proteasome inhibition with a targeted therapy directed against the entire B-cell lineage, including immature cells, such as BTK inhibition, is a rational strategy to simultaneously treat both, the proteasome inhibitor-sensitive mature myeloma cells and the proteasome inhibitor-resistant immature cell populations. We here investigate this concept in an *in vitro* model that reflects these fundamental principles: The bortezomib-resistant and carfilzomib-resistant AMO-1 cells (AMO-BTZ, AMO-CFZ) used here have been generated under the selective pressure of the proteasome-inhibiting drugs and show significantly decreased XBP-1 levels, compared with the AMO-1 parental line, but at the same time lack mutations in the active sites of the proteasome ([10] and M. Kraus, unpublished results), so that they in this respect closely mimic the situation encountered *in vivo*. Compared to their parental cells, AMO-BTZ in particular expresses increased activity of the $\beta 2$ proteasome subunit that is not targeted by bortezomib, a feature that might also contribute to BTZ resistance [10]. Our results demonstrate that combination treatment with the $\beta 2$ inhibitor LU-102 and ibrutinib overcomes the features of proteasome inhibitor resistance and has significant synergistic cytotoxic activity against proteasome inhibitor-adapted myeloma cells, comparable to the proteasome inhibitor-sensitive parental cell line. Importantly, this feature was similarly observed when primary multiple myeloma cells from a patient with bortezomib-refractory disease were challenged with LU-102 in combination with ibrutinib, while both agents alone had no cytotoxic effect. It has been previously shown that the co-administration of ibrutinib with bortezomib increased cytotoxicity in bortezomib-resistant MCL and DLBCL cells; however, the NF- κ B inducing effect of bortezomib has only been observed in MM and may be linked to the highly developed protein biosynthesis machinery of MM cells [18]. Murray et al. [33] very recently demonstrated that BTK activity was enhanced in bortezomib-resistant

MM, and that co-treatment of MM cells with ibrutinib or a p65-targeted lentiviral construct and bortezomib can partly restore bortezomib sensitivity, highlighting the crucial role of NF- κ B activity in bortezomib-resistant MM. Our results support this concept and furthermore show that ibrutinib in combination with the $\beta 2$ -selective PI LU-102 results in superior inhibition of NF- κ B activation and significantly improved synergistic cytotoxicity, compared with bortezomib. The combination of ibrutinib and $\beta 2$ -selective proteasome inhibition may therefore represent a rational strategy to overcome proteasome inhibitor resistance of MM. At the same time, our results suggest therapeutic potential also for proteasome inhibitors that do not target the rate-limiting $\beta 5$ proteasome subunit.

Although our data strongly support synergistic cytotoxicity between LU-102 and ibrutinib on myeloma cells, involving at least partly the NF κ B pathway, BTK is likely not the only relevant target of ibrutinib in this setting. In our results, as well as other studies investigating the cytotoxic activity of ibrutinib on myeloma cells *in vitro* [26, 30], only very high concentrations of ibrutinib (10 μ M) triggered a direct cytotoxic effect on myeloma cells, and BTK-negative cells were sensitive for synergistic cytotoxicity with ibrutinib and LU-102, suggesting alternative targets that are likewise inhibited by ibrutinib in myeloma cells. Indeed, ibrutinib (formerly PCI-32765) is known to target >20 different kinases at IC₅₀ values below 1 μ M [34]. Importantly, the cytotoxic activity of ibrutinib in myeloma has meanwhile been confirmed in a clinical phase II trial, but also clinically the ibrutinib dose required for maximum clinical mono-activity against myeloma was twice the standard dose used in CLL (840 mg daily, Viji R, et al. ASH 2014. Abstract 31), also suggesting alternative targets with slightly lower affinity involved in ibrutinib activity in myeloma. Using a fluorescence-labeled derivative of ibrutinib, we here demonstrate that indeed ibrutinib a non-cytotoxic concentration of 1 μ M not only eliminates BTK activity in MM cells, but specifically targets also an unidentified 64-kD polypeptide that is present also in bortezomib-resistant myeloma cells that lacked detectable BTK expression but were sensitive to the combination ibrutinib + LU-102. We are currently on the way to design a biotin derivative of this ibrutinib probe to be able to isolate and identify the 64-kDa protein species and to prove its functional importance. At current stage, our data suggest that ibrutinib has additional, non-BTK targets in myeloma cells, which may be of functional relevance for the mechanism of action of ibrutinib against myeloma.

Acknowledgments This research was supported by the Swiss National Research Foundation SNF (Grant 31003A_143924/1 to C.D.) and by institutional research support from the Kantonsspital St Gallen (CTU-Grant) to J. Kraus.

Conflict of interest All authors declare to have no conflict of interest.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

- Moreau P, Richardson PG, Cavo M et al (2012) Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later. *Blood* 120:947–959
- Bose P, Batalo MS, Holkova B, Grant S (2014) Bortezomib for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Expert Opin Pharmacother* 15:2443–2459
- Ciechanover A (2005) Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:79–87
- Richardson PG, Baz R, Wang M et al (2014) Phase 1 study of twice-weekly ixazomib, an oral proteasome inhibitor, in relapsed/refractory multiple myeloma patients. *Blood* 124:1038–1046
- Zhou HJ, Aujay MA, Bennett MK et al (2009) Design and synthesis of an orally bioavailable and selective peptide epoxyketone proteasome inhibitor (PR-047). *J Med Chem* 52:3028–3038
- Siegel DS, Martin T, Wang M et al (2012) A phase 2 study of single-agent carfilzomib (PX-171-003-A1) in patients with relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood* 120:2817–2825
- Britton M, Lucas MM, Downey SL et al (2009) Selective inhibitor of proteasome's caspase-like sites sensitizes cells to specific inhibition of chymotrypsin-like sites. *Chem Biol* 16:1278–1289
- Geurink PP, van der Linden WA, Mirabella AC et al (2013) Incorporation of non-natural amino acids improves cell permeability and potency of specific inhibitors of proteasome trypsin-like sites. *J Med Chem* 56:1262–1275
- Mirabella AC, Pletnev AA, Downey SL et al (2011) Specific cell-permeable inhibitor of proteasome trypsin-like sites selectively sensitizes myeloma cells to bortezomib and carfilzomib. *Chem Biol* 18:608–618
- Ruckrich T, Kraus M, Gogel J et al (2009) Characterization of the ubiquitin-proteasome system in bortezomib-adapted cells. *Leukemia* 23:1098–1105
- Robak T, Huang H, Jin J et al (2015) Bortezomib-based therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med* 372:944–953
- Lamothe B, Cervantes-Gomez F, Sivina M, Wierda WG, Keating MJ, Gandhi V (2015) Proteasome inhibitor carfilzomib complements ibrutinib's action in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 125:407–410
- Leung-Hagesteijn C, Erdmann N, Cheung G et al (2013) Xbp1s-negative tumor B cells and pre-plasmablasts mediate therapeutic proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma. *Cancer Cell* 24:289–304
- De WM, Verschuren MC, Kraakman ME et al (1993) The Bruton's tyrosine kinase gene is expressed throughout B cell differentiation, from early precursor B cell stages preceding immunoglobulin gene rearrangement up to mature B cell stages. *Eur J Immunol* 23:3109–3114
- De WM, Mensink RG, Kraakman ME, Schuurman RK, Hendriks RW (1994) Mutation analysis of the Bruton's tyrosine kinase gene in X-linked agammaglobulinemia: identification of a mutation which affects the same codon as is altered in immunodeficient xid mice. *Hum Mol Genet* 3:161–166
- Gilmore TD (2007) Multiple myeloma: lusty for NF-kappaB. *Cancer Cell* 12:95–97
- Wu ZH, Shi Y (2013) When ubiquitin meets NF-kappaB: a trove for anti-cancer drug development. *Curr Pharm Des* 19:3263–3275
- Hideshima T, Ikeda H, Chauhan D et al (2009) Bortezomib induces canonical nuclear factor-kappaB activation in multiple myeloma cells. *Blood* 114:1046–1052
- Fabre C, Mimura N, Bobb K et al (2012) Dual inhibition of canonical and noncanonical NF-kappaB pathways demonstrates significant antitumor activities in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 18:4669–4681
- Morelli MB, Offidani M, Alesiani F et al (2014) The effects of cannabidiol and its synergism with bortezomib in multiple myeloma cell lines. A role for transient receptor potential vanilloid type-2. *Int J Cancer* 134:2534–2546
- Salem K, Brown CO, Schibler J, Goel A (2013) Combination chemotherapy increases cytotoxicity of multiple myeloma cells by modification of nuclear factor (NF)-kappaB activity. *Exp Hematol* 41:209–218
- Arastu-Kapur S, Anderl JL, Kraus M et al (2011) Nonproteasomal targets of the proteasome inhibitors bortezomib and carfilzomib: a link to clinical adverse events. *Clin Cancer Res* 17:2734–2743
- Kraus M, Bader J, Overkleeft H, Driessen C (2013) Nelfinavir augments proteasome inhibition by bortezomib in myeloma cells and overcomes bortezomib and carfilzomib resistance. *Blood Cancer J* 3:e103
- Chou TC (2006) Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* 58:621–681
- Genevier HC, Hinshelwood S, Gaspar HB et al (1994) Expression of Bruton's tyrosine kinase protein within the B cell lineage. *Eur J Immunol* 24:3100–3105
- Tai YT, Chang BY, Kong SY et al (2012) Bruton tyrosine kinase inhibition is a novel therapeutic strategy targeting tumor in the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Blood* 120:1877–1887
- Liu N, Hoogendoorn S, van de Kar B et al (2015) Direct and two-step bioorthogonal probes for Bruton's tyrosine kinase based on ibrutinib: a comparative study. *Org Biomol Chem* 13:5147–5157
- Lee KH, Jeong J, Yoo CG (2013) Long-term incubation with proteasome inhibitors (PIs) induces I-kappaB degradation via the lysosomal pathway in an I-kappaB kinase (IKK)-dependent and IKK-independent manner. *J Biol Chem* 288:32777–32786
- Jia L, Gopinathan G, Sukumar JT, Gribben JG (2012) Blocking autophagy prevents bortezomib-induced NF-kappaB activation by reducing I-kappaB degradation in lymphoma cells. *PLoS ONE* 7:e32584
- Rushworth SA, Bowles KM, Barrera LN, Murray MY, Zaitseva L, Macewan DJ (2013) BTK inhibitor ibrutinib is cytotoxic to myeloma and potentially enhances bortezomib and lenalidomide activities through NF-kappaB. *Cell Signal* 25:106–112
- Axelrod M, Ou Z, Brett LK et al (2014) Combinatorial drug screening identifies synergistic co-targeting of Bruton's tyrosine kinase and the proteasome in mantle cell lymphoma. *Leukemia* 28:407–410
- Driessen C, Lennon-Dumenil AM, Ploegh HL (2001) Individual cathepsins degrade immune complexes internalized by antigen-presenting cells via Fc gamma receptors. *Eur J Immunol* 31:1592–1601

33. Murray MY, Zaitseva L, Auger MJ, Craig JIO, MacEwan DJ, Rushworth SA, Bowles KM (2015) Ibrutinib inhibits BTK-driven NF- κ B p65 activity to overcome bortezomib-resistance in multiple myeloma. *Cell Cycle*. doi:[10.1080/15384101.2014.998067](https://doi.org/10.1080/15384101.2014.998067)
34. Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M et al (2010) The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:13075–13080

4 DARSTELLUNG DES EIGENEN ANTEILS

Die Versuche zu den Figures 1, 2, 3, 4 A und 5 wurden eigenständig durchgeführt.

Die Figures 1 - 5 wurden eigenständig ausgewertet und formatiert.

Der gesamte Inhalt des Papers wurde eigenständig formuliert.

5 LITERATURVERZEICHNIS

1. Alexander DD, Mink PJ, Adami H, et al. Multiple myeloma: a review of the epidemiologic literature. *Int. J. Cancer.* 2007;120 Suppl 12:40-61. doi:10.1002/ijc.22718.
2. Moreau P, Richardson PG, Cavo M, et al. Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later. *Blood.* 2012;120(5):947-959. doi:10.1182/blood-2012-04-403733.
3. Rajkumar SV, Kumar S. Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin. Proc.* 2016;91(1):101-119. doi:10.1016/j.mayocp.2015.11.007.
4. Alexanian R, Delasalle K, Wang M, Thomas S, Weber D. Curability of multiple myeloma. *Bone Marrow Res.* 2012;2012:916479. doi:10.1155/2012/916479.
5. Leung-Hagesteijn C, Erdmann N, Cheung G, et al. Xbp1s-negative tumor B cells and pre-plasmablasts mediate therapeutic proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma. *Cancer Cell.* 2013;24(3):289-304. doi:10.1016/j.ccr.2013.08.009.
6. O'Brien S, Furman RR, Coutre SE, et al. Ibrutinib as initial therapy for elderly patients with chronic lymphocytic leukaemia or small lymphocytic lymphoma: an open-label, multicentre, phase 1b/2 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(1):48-58. doi:10.1016/S1470-2045(13)70513-8.
7. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2013;369(1):32-42. doi:10.1056/NEJMoa1215637.
8. Wang ML, Rule S, Martin P, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 2013;369(6):507-516. doi:10.1056/NEJMoa1306220.
9. Advani RH, Buggy JJ, Sharman JP, et al. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *J. Clin. Oncol.* 2013;31(1):88-94. doi:10.1200/JCO.2012.42.7906.

10. Maas A, Hendriks RW. Role of Bruton's Tyrosine Kinase in B Cell Development. *Developmental Immunology*. 2001;8(3-4):171-181. doi:10.1155/2001/28962.
11. Corneth, Odilia B J, Klein Wolterink, Roel G J, Hendriks RW. BTK Signaling in B Cell Differentiation and Autoimmunity. *Current topics in microbiology and immunology*. 2016;393:67-105. doi:10.1007/82_2015_478.
12. Tai Y, Chang BY, Kong S, et al. Bruton tyrosine kinase inhibition is a novel therapeutic strategy targeting tumor in the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Blood*. 2012;120(9):1877-1887. doi:10.1182/blood-2011-12-396853.
13. Rushworth SA, Bowles KM, Barrera LN, Murray MY, Zaitseva L, MacEwan DJ. BTK inhibitor ibrutinib is cytotoxic to myeloma and potently enhances bortezomib and lenalidomide activities through NF- κ B. *Cell. Signal*. 2013;25(1):106-112. doi:10.1016/j.cellsig.2012.09.008.
14. Pharmacyclics. Study of the Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor in Combination With Carfilzomib (Kyprolis™), in Subjects With Relapsed or Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US)*. [NLM Identifier: NCT01962792]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01962792>. Accessed January 11, 2016.
15. Swiss Group for Clinical Cancer Research. Combination of Ibrutinib and Bortezomib to Treat Patients With Mantle Cell Lymphoma. [NLM Identifier: NCT02356458]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02356458>. Accessed January 11, 2016.
16. M.D. Anderson Cancer Center. A Phase I/II Trial of PCI-32765 (BTK Inhibitor) in Combination With Carfilzomib in Relapse/Refractory Mantle Cell Lymphoma. [NLM Identifier: NCT02269085]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02269085>. Accessed January 11, 2016.
17. Besche HC, Peth A, Goldberg AL. Getting to first base in proteasome assembly. *Cell*. 2009;138(1):25-28. doi:10.1016/j.cell.2009.06.035.
18. Rivett AJ, Savory PJ, Djaballah H. Multicatalytic endopeptidase complex: proteasome. *Meth. Enzymol*. 1994;244:331-350.

19. Williamson MJ, Blank JL, Bruzzese FJ, et al. Comparison of biochemical and biological effects of ML858 (salinosporamide A) and bortezomib. *Mol. Cancer Ther.* 2006;5(12):3052-3061. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0185.
20. Siegel DS, Martin T, Wang M, et al. A phase 2 study of single-agent carfilzomib (PX-171-003-A1) in patients with relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood.* 2012;120(14):2817-2825. doi:10.1182/blood-2012-05-425934.
21. Britton M, Lucas MM, Downey SL, et al. Selective inhibitor of proteasome's caspase-like sites sensitizes cells to specific inhibition of chymotrypsin-like sites. *Chem. Biol.* 2009;16(12):1278-1289. doi:10.1016/j.chembiol.2009.11.015.
22. Geurink PP, van der Linden, Wouter A, Mirabella AC, et al. Incorporation of non-natural amino acids improves cell permeability and potency of specific inhibitors of proteasome trypsin-like sites. *J. Med. Chem.* 2013;56(3):1262-1275. doi:10.1021/jm3016987.
23. Mirabella AC, Pletnev AA, Downey SL, et al. Specific cell-permeable inhibitor of proteasome trypsin-like sites selectively sensitizes myeloma cells to bortezomib and carfilzomib. *Chem. Biol.* 2011;18(5):608-618. doi:10.1016/j.chembiol.2011.02.015.
24. Rückrich T, Kraus M, Gogel J, et al. Characterization of the ubiquitin–proteasome system in bortezomib-adapted cells. *Leukemia.* 2009;23(6):1098-1105. doi:10.1038/leu.2009.8.
25. Gilmore TD. Multiple myeloma: lusting for NF-kappaB. *Cancer Cell.* 2007;12(2):95-97. doi:10.1016/j.ccr.2007.07.010.
26. Pharmacyclics. Study of the Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor in Subjects With Relapsed or Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. [NLM Identifier: NCT01478581]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01478581>. Accessed January 11, 2016.
27. Wu Z, Shi Y. When ubiquitin meets NF-κB: a trove for anti-cancer drug development. *Current pharmaceutical design.* 2013;19(18):3263-3275.

28. Robak T, Robak E. Tyrosine kinase inhibitors as potential drugs for B-cell lymphoid malignancies and autoimmune disorders. *Expert Opin. Investig. Drugs*. 2012;21(7):921-947. doi:10.1517/13543784.2012.685650.
29. Hideshima T, Ikeda H, Chauhan D, et al. Bortezomib induces canonical nuclear factor-kappaB activation in multiple myeloma cells. *Blood*. 2009;114(5):1046-1052. doi:10.1182/blood-2009-01-199604.
30. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, et al. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*. 1994;78(5):761-771.
31. Fenteany G, Standaert RF, Lane WS, Choi S, Corey EJ, Schreiber SL. Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science*. 1995;268(5211):726-731.
32. Gupta SV, Hertlein E, Lu Y, et al. The proteasome inhibitor carfilzomib functions independently of p53 to induce cytotoxicity and an atypical NF- κ B response in chronic lymphocytic leukemia cells. *Clin. Cancer Res*. 2013;19(9):2406-2419. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2754.
33. Demo SD, Kirk CJ, Aujay MA, et al. Antitumor activity of PR-171, a novel irreversible inhibitor of the proteasome. *Cancer Res*. 2007;67(13):6383-6391. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4086.
34. Lee K, Jeong J, Yoo C. Long-term incubation with proteasome inhibitors (PIs) induces I κ B α degradation via the lysosomal pathway in an I κ B kinase (IKK)-dependent and IKK-independent manner. *J. Biol. Chem*. 2013;288(45):32777-32786. doi:10.1074/jbc.M113.480921.
35. Axelrod M, Ou Z, Brett LK, et al. Combinatorial drug screening identifies synergistic co-targeting of Bruton's tyrosine kinase and the proteasome in mantle cell lymphoma. *Leukemia*. 2014;28(2):407-410. doi:10.1038/leu.2013.249.
36. Franke NE, Niewerth D, Assaraf YG, et al. Impaired bortezomib binding to mutant β 5 subunit of the proteasome is the underlying basis for bortezomib resistance in leukemia cells. *Leukemia*. 2012;26(4):757-768. doi:10.1038/leu.2011.256.

37. de Wilt, Leonie H A M, Jansen G, Assaraf YG, et al. Proteasome-based mechanisms of intrinsic and acquired bortezomib resistance in non-small cell lung cancer. *Biochem. Pharmacol.* 2012;83(2):207-217. doi:10.1016/j.bcp.2011.10.009.
38. Lichter DI, Danaee H, Pickard MD, et al. Sequence analysis of β -subunit genes of the 20S proteasome in patients with relapsed multiple myeloma treated with bortezomib or dexamethasone. *Blood.* 2012;120(23):4513-4516. doi:10.1182/blood-2012-05-426924.
39. Politou M, Karadimitris A, Terpos E, Kotsianidis I, Apperley JF, Rahemtulla A. No evidence of mutations of the PSMB5 (beta-5 subunit of proteasome) in a case of myeloma with clinical resistance to Bortezomib. *Leuk. Res.* 2006;30(2):240-241. doi:10.1016/j.leukres.2005.06.014.
40. Reimold AM, Iwakoshi NN, Manis J, et al. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature.* 2001;412(6844):300-307. doi:10.1038/35085509.
41. Stessman, Holly A F, Mansoor A, Zhan F, Linden MA, van Ness B, Baughn LB. Bortezomib resistance can be reversed by induced expression of plasma cell maturation markers in a mouse in vitro model of multiple myeloma. *PLoS ONE.* 2013;8(10):e77608. doi:10.1371/journal.pone.0077608.
42. Dasmahapatra G, Patel H, Dent P, Fisher RI, Friedberg J, Grant S. The Bruton tyrosine kinase (BTK) inhibitor PCI-32765 synergistically increases proteasome inhibitor activity in diffuse large-B cell lymphoma (DLBCL) and mantle cell lymphoma (MCL) cells sensitive or resistant to bortezomib. *Br. J. Haematol.* 2013;161(1):43-56. doi:10.1111/bjh.12206.
43. Cinar M, Hamedani F, Mo Z, Cinar B, Amin HM, Alkan S. Bruton tyrosine kinase is commonly overexpressed in mantle cell lymphoma and its attenuation by Ibrutinib induces apoptosis. *Leuk. Res.* 2013;37(10):1271-1277. doi:10.1016/j.leukres.2013.07.028.

44. Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(29):13075-13080. doi:10.1073/pnas.1004594107.

6 ANHANG

Wirkung der einzelnen Proteasominhibitoren auf die Zellproliferation der resistenten MM Zellen

Die Zelllinie AMO-1 wurde an steigende Bortezomib Konzentrationen (AMO-BTZ) und Carfilzomib Konzentrationen (AMO-CFZ) adaptiert und als Modell für Bortezomib-resistentes und Carfilzomib-resistentes MM verwendet; als Kontrolle diente die ursprüngliche Zelllinie AMO-1 (Wildtyp). Abb. 6.1, Abb. 6.2 und Abb. 6.3 stellen die Wirkung der drei Proteasominhibitoren Bortezomib, Carfilzomib und LU-102 als Einzelsubstanz auf die an Bortezomib (AMO-BTZ) oder Carfilzomib (AMO-CFZ) adaptierten Zelllinien mit Hilfe von *MTT* assays dar.

Abb. 6.1: Zellproliferation von resistenten MM-Zelllinien unter Bortezomib

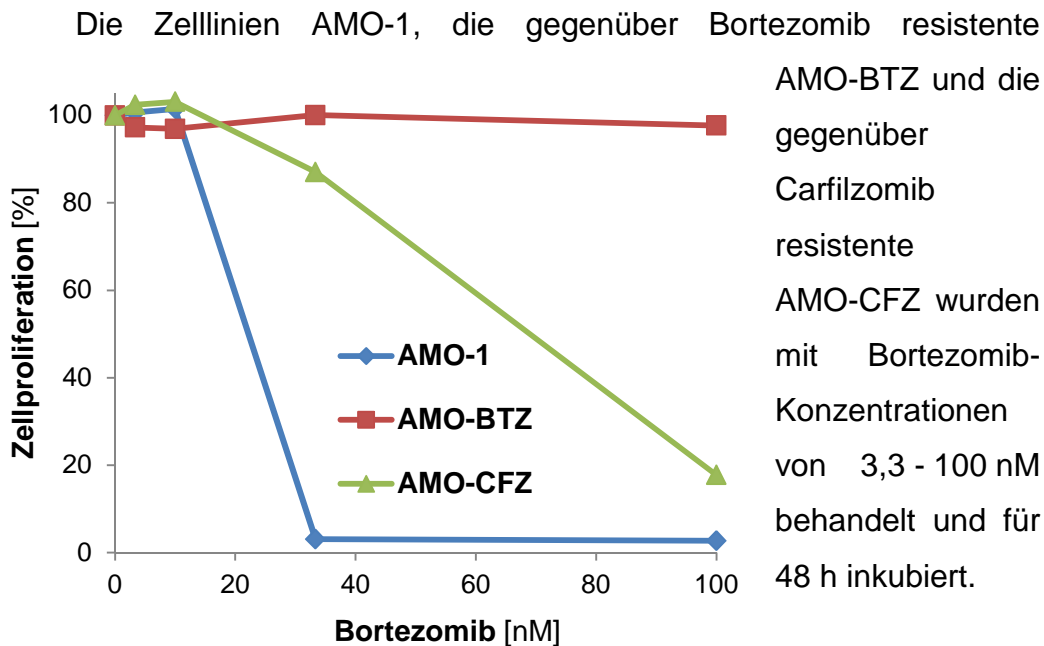
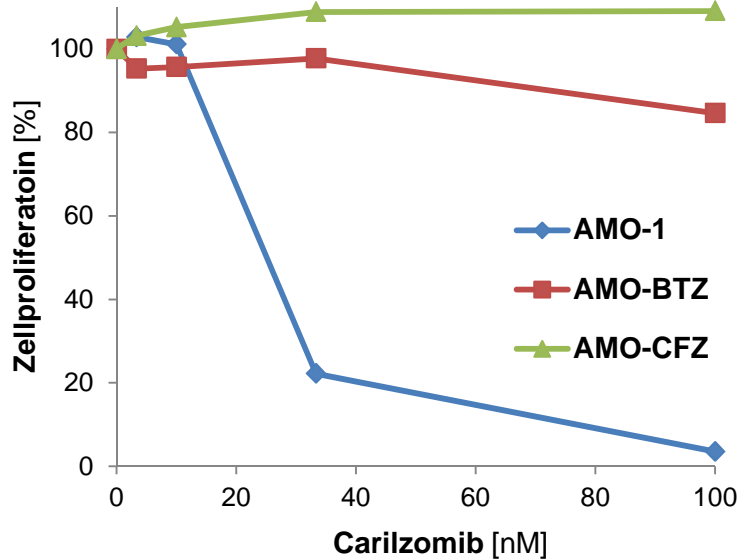


Abb. 6.2: Zellproliferation von resistenten MM-Zelllinien unter Carfilzomib

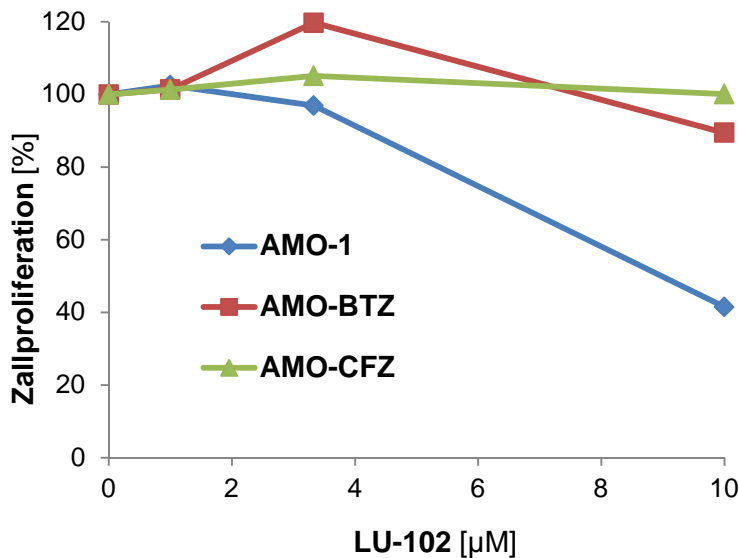
Die Zelllinien AMO-1, die gegenüber Bortezomib resistente



AMO-BTZ und die gegenüber Carfilzomib resistente AMO-CFZ wurden mit Carfilzomib-Konzentrationen von 3,3 - 100 nM behandelt und für 48 h inkubiert.

Abb. 6.3: Zellproliferation von resistenten MM-Zelllinien unter LU-102

Die Zelllinien AMO-1, die gegenüber Bortezomib resistente



AMO-BTZ und die gegenüber Carfilzomib resistente AMO-CFZ wurden mit LU-102-Konzentrationen von 1 - 10 µM behandelt und für 48 h inkubiert.

9 SCHRIFTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Beta-2 selektive Proteasominhibition als Basis einer synergistischen Wirkung von Ibrutinib und Proteasominhibitoren gegen Myelomzellen

in der Universitätsklinik Frankfurt am Main, Zentrum der Innere Medizin, Medizinische Klinik II (Hämatologie, Onkologie, Rheumatologie, Infektiologie) unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Hubert Serve mit Unterstützung durch Prof. Dr. Christoph Driessen ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden (oder werden) in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Johannes Kraus, Marianne Kraus, Nora Liu, Lenka Besse, Jürgen Bader, Paul P. Geurink, Gerjan de Bruin, Alexei F. Kisselev, Herman Overkleeft, Christoph Driessen; The novel β 2-selective proteasome inhibitor LU-102 decreases phosphorylation of I kappa B and induces highly synergistic cytotoxicity in combination with ibrutinib in multiple myeloma cells; Cancer Chemotherapy and Pharmacology; 76; Seite 383-396; 2015

(Ort, Datum)

(Unterschrift)