

Nouvelle approche thérapeutique du cancer. Interruption des voies de signalisation dérégulées par inhibition des interactions inter-protéiques : exemple de la protéine Grb2 dans la signalisation induite par les protéines à activité tyrosine kinase

par Michel Vidal, Wang Qing Liu, Brunile Gril, Franck Assayag*, Marie-France Poupon*
& Christiane Garbay

*UFR Biomédicale des Saints Pères, Laboratoire de Pharmacochimie Moléculaire et Cellulaire, FRE 2718 CNRS, U648 INSERM, 45, rue des Saints-Pères, 75270 Paris Cedex 06 ; * Institut Curie, section de recherche, 26, rue d'Ulm, 75231, Paris Cedex05. E-mail : christiane.garbay@univ-paris5.fr*

Reçu le 22 décembre 2003

RÉSUMÉ

Les voies de signalisation induites par les récepteurs des facteurs de croissance sont dérégulées dans la plupart des cancers et constituent des cibles pour la recherche de nouveaux agents pharmacologiques. L'obtention d'agents anti-tumoraux, inhibiteurs de leur activité tyrosine kinase, actifs en thérapeutique humaine, a conforté cette approche. Dans le but de concevoir des agents anti-tumoraux, capables d'interrompre les voies de signalisation induites par des protéines oncogéniques ou surexprimées, nous avons entrepris une nouvelle recherche par inhibition des interactions inter-protéiques impliquant ces protéines ou des protéines situées en aval dans la cascade de

signalisation. La protéine choisie Grb2 est une protéine adaptatrice située en aval de HER2/ErbB2, surexprimée dans plusieurs cancers dont les cancers du sein non hormonaux-dépendants associés à un mauvais pronostic. L'approche consiste à concevoir des composés de très forte affinité pour la protéine Grb2, empêchant son interaction avec ses partenaires et servant ainsi d'interrupteur moléculaire. Des inhibiteurs peptidiques ont été conçus de façon rationnelle sur des bases structurales. Leur capacité à inhiber les interactions de Grb2 dans la voie de signalisation Ras dépendante, ainsi que leurs effets anti-prolifératifs et anti-tumoraux potentiels sont décrits.

SUMMARY Design of new anti-tumor agents interrupting deregulated signaling pathways induced by tyrosine kinase proteins. Inhibition of protein-protein interaction involving Grb2

Cellular signaling pathways induced by growth-factor receptors are frequently deregulated in cancer. Anti-tumor agents that inhibit their enzymatic tyrosine kinase activity have been designed and are now used in human chemotherapy. We propose here an alternative way to interrupt over-expressed signaling by inhibiting protein-protein interactions that involve either the over-expressed proteins or proteins located

downstream. The adaptor protein Grb2 over-expressed in connection with HER2/ErbB2/neu in Ras signaling pathway was chosen as a target. Peptides with very high affinity for Grb2 were rationally designed from structural data. Their capacity to interrupt the signaling pathway, their anti-proliferative activity as well as their potential anti-tumor properties are described.

SIGNALISATION INDUITE PAR LES PROTÉINES À ACTIVITÉ TYROSINE KINASE ET CANCER

La mise en évidence des altérations moléculaires impliquées dans la croissance tumorale a permis d'identifier les protéines à activité tyrosine kinase (PTK) comme des protéines-clés pour la formation, la crois-

sance et la dissémination des tumeurs. L'activité catalytique de ces protéines, stimulée en réponse à un signal cellulaire, induit des cascades d'événements moléculaires, essentielles en particulier à la division cellulaire et à la différenciation. Une dérégulation de l'activité kinase est observée dans un grand nombre de cancers hématopoïétiques ou solides. Ainsi la protéine cytosolique BCR-

ABL, codée par l'oncogène *BCR-ABL*, situé sur le chromosome Philadelphie est à l'origine des Leucémies Myéloïdes Chroniques ou LMC (Gishizky *et al.*, 1993). C-Kit, récepteur membranaire, est surexprimé dans les cancers gastro-intestinaux (ou GIST) et le récepteur à l'EGF et HER2/ErbB2/neu sont, quant à eux, surexprimés dans les cancers du sein ou de la prostate non hormonaux-dépendants, en relation avec un mauvais pronostic (Klapper *et al.*, 2000).

Afin d'inhiber la signalisation dérégulée induite par ces protéines, des inhibiteurs de leur activité tyrosine kinase ont été développés. C'est le cas du Glivec[®], utilisé avec succès en thérapeutique humaine pour le traitement de la LMC et des GIST, qui agit comme inhibiteur compétitif au niveau du site ATP de la protéine (O'Dwyer *et al.*, 2003).

INHIBITION DES INTERACTIONS INTER-PROTÉIQUES : EX DE GRB2

Une voie de recherche thérapeutique alternative et originale consiste à inhiber la signalisation induite par les PTK et/ou RTK (récepteurs à activité tyrosine kinase) surexprimés, plus en aval dans la cascade d'événements. Dans ce but, une approche nouvelle par inhibition des interactions inter-protéiques a été développée au cours

des dernières années (Toogood *et al.*, 2002). En effet, certaines protéines sans activité enzymatique propre et dénommées adaptateurs ont comme rôle de permettre le contact entre des protéines fonctionnelles cytosoliques. Parmi ces adaptateurs, Grb2 (Growth factor receptor binding protein 2) paraît le plus prometteur (Chardin *et al.*, 1995). Il est constitué de trois domaines capables de reconnaître et recruter des protéines cibles : un domaine SH2 (Src homology 2), encadré par deux domaines SH3 (Birge *et al.*, 1996). Par l'intermédiaire de son domaine SH2, Grb2 interagit avec des RTK, au niveau de sites comportant un résidu tyrosine phosphorylé. Par ses domaines SH3, Grb2 se complexe à de courtes régions riches en prolines de ses cibles (8 à 10 amino acides possédant la séquence consensus PXXP), dont la principale, Sos, est le facteur d'échange nucléotidique de la protéine Ras.

Ainsi, lors d'une stimulation par un facteur de croissance (EGF par exemple), le récepteur se dimérise permettant la phosphorylation des résidus tyrosine de son extrémité C-terminale, un changement conformationnel et le recrutement de ses cibles. Grb2 complexée à Sos est ainsi recrutée sous la membrane, là où est ancrée Ras. Sos peut alors activer Ras sous sa forme liant le GTP, qui est alors capable, comme le montre la figure 1, de stimuler en aval la cascade des MAP (mitogen activating protein) kinases, ERK1 et ERK2 (Buday *et al.*, 1993).

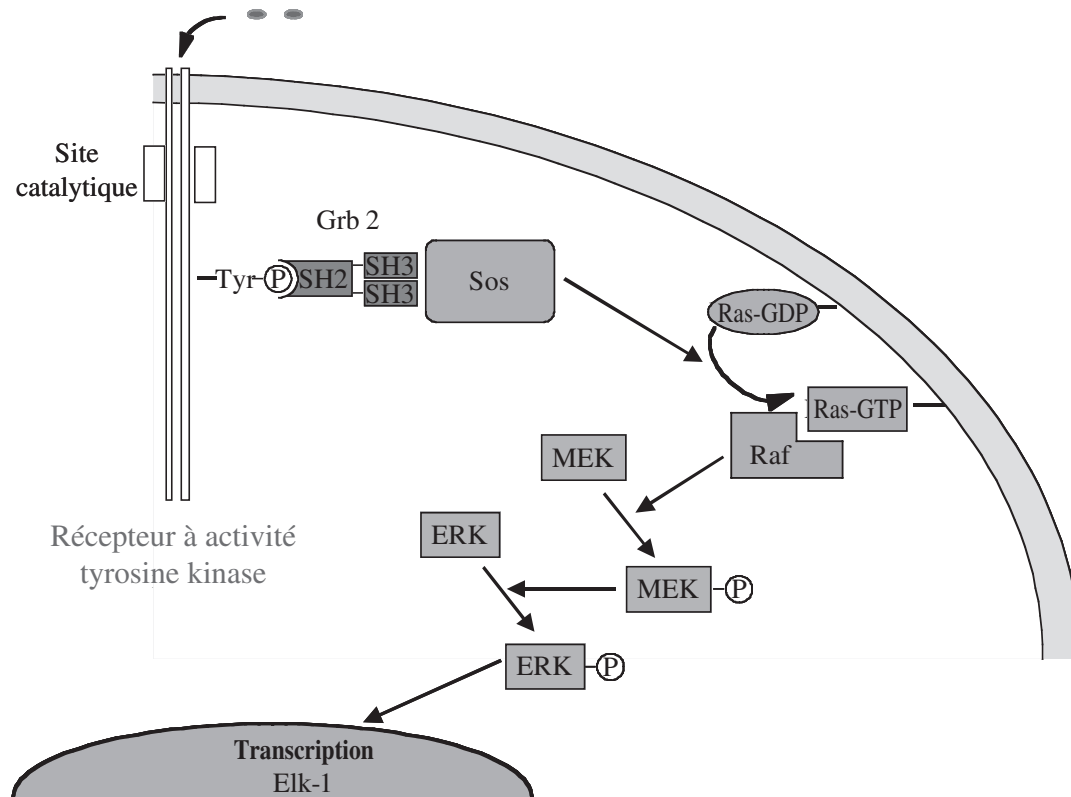


FIG. 1. – Voie de signalisation de la protéine Ras induite par les récepteurs à activité TK.

Ces dernières, après translocation dans le noyau, vont à leur tour activer certains facteurs de transcription conduisant à la division et/ou à la différenciation cellulaire.

Grb2 a été impliquée dans différentes pathologies dont plusieurs types de cancer (Sastry *et al.*, 1997). Le choix de Grb2 dans la cascade complexe de signalisation induite par les RTK, et dont une seule partie est représentée sur la figure 1, est justifié par plusieurs observations. Ainsi, la protéine est surexprimée dans des tumeurs du sein induites par erbB-2/HER2, analogue tronqué du récepteur à l'EGF (James *et al.*, 1994). De même, le rôle transformant de l'oncogène BCR-ABL a été corrélé à sa capacité à lier Grb2 et ainsi à activer Ras (Gishizky *et al.*, 1993). Enfin et surtout, des mutants de délétion de Grb2, en particulier un mutant délété de son domaine SH3 N-terminal, transfecté dans des cellules transformées par HER2, induit une réversion du phénotype (Xie *et al.*, 1995). De même un mutant de Sos constitué de sa seule extrémité C-terminale, qui contient les peptides riches en proline, régions de reconnaissance des domaines SH3 de Grb2, est capable d'empêcher la formation des complexes Grb2-Sos (Van Biesen *et al.*, 1995).

La difficulté pour inhiber l'interaction entre Grb2 et Sos est venue de la faible affinité des peptides riches en proline pour les domaines SH3 ($K_d \sim 10^{-5}M$) vis-à-vis de la forte affinité de Sos pour Grb2. La présence de plusieurs régions riches en prolines dans la séquence de Sos et la proximité spatiale des domaines SH3 de Grb2,

comme l'a montré la structure cristalline publiée dans le groupe d'A. Ducruix (Maignan *et al.*, 1995), nous ont conduits à concevoir des peptides dimériques. En effet, l'affinité attendue d'un composé dimérique se liant à deux sites est théoriquement de l'ordre du produit des affinités de chaque monomère. Ces peptides dimères ont été conçus en utilisant également les données RMN sur la structure des complexes formés entre ce peptide et les domaines SH3 (Goudreau *et al.*, 1994). La modélisation moléculaire (Fig. 2) a permis de constater que les peptides riches en prolines, placés sur les deux domaines SH3, adoptaient des positions rapprochant leurs extrémités carboxyl-terminales. En reliant les peptides riches en prolines, issus de Sos par leur extrémité COOH-terminale avec des connecteurs diamminés, en particulier un résidu lysine, nous avons obtenu des composés que nous avons dénommés peptidimères. Ces composés ont présenté de fortes affinités pour Grb2 mesurées par fluorescence. Le meilleur (VPPPVPPIRRR)₂K a une affinité caractérisée par un K_d de l'ordre de $10^{-8}M$, alors que le K_d est de $10^{-5}M$ pour le monomère (Cussac *et al.*, 1999).

Ce peptidimère inhibe l'interaction entre Grb2 et Sos sur un homogénat de cellules ER22 (fibroblastes surexprimant l'EGF-R), stimulées par l'EGF. Sa spécificité vis-à-vis des domaines SH3 de Grb2, qui provient de l'arrangement spatial de ces derniers, a été vérifiée et il ne lie pas les protéines PI3K, Nck et Crk, Mona qui possèdent un ou plusieurs domaines SH3.

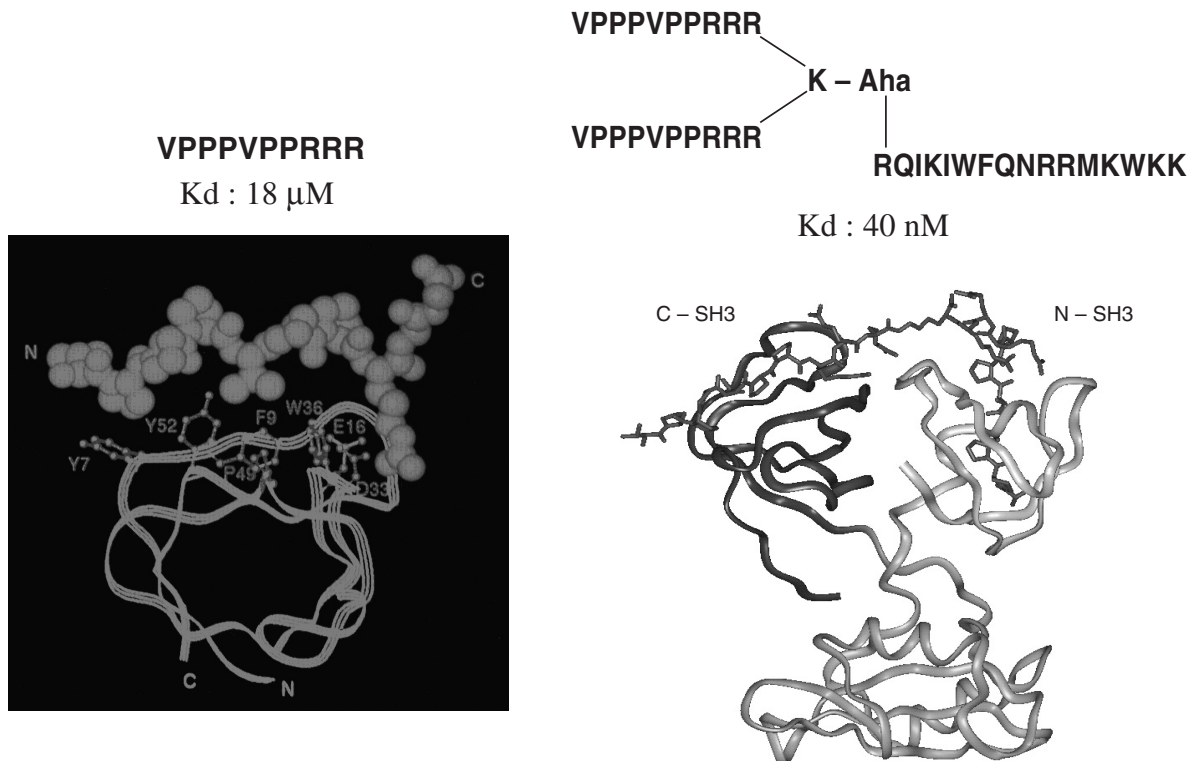


FIG. 2. – Structure du monomère VPPPVPPIRRR complexé au domaine N-terminal de Grb2, résolue par RMN et structure tridimensionnelle « modélisée » du peptidimère placé à la surface de la protéine Grb2 (dérivée de la structure RX).

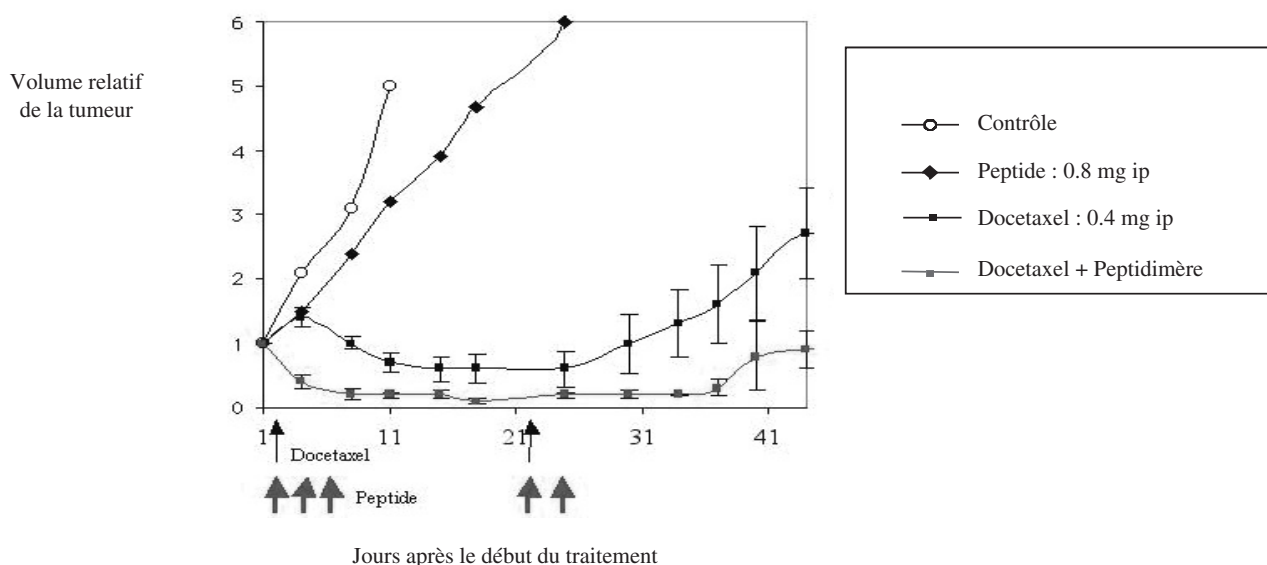


FIG. 3. – Effet anti-tumoral du docétaxel seul ou associé au peptidimère-Ant sur la croissance tumorale de la xénogreffe PAC 120 HID 28 de cancer de prostate humaine. Le docétaxel est injecté à la dose de 20 mg/kg (flèches du haut), le peptidimère est injecté à la dose de 35 mg/kg (flèches grisées en gras, en bas).

Afin de permettre à ce composé de pénétrer dans les cellules, il a été relié chimiquement à la pénétratine, dérivé de la troisième boucle de l'homéodomaine d'Antennapedia, connu pour ses capacités à diffuser dans les cellules (Derossi *et al.*, 1996). Le conjugué obtenu (peptidimère-Ant) est non seulement capable d'inhiber la formation du complexe Grb2-Sos par action directe sur les cellules ER22 stimulées par l'EGF, mais également d'empêcher l'activation des MAP Kinases ERK1 et ERK2, sans pour autant modifier la croissance des cellules. Sur des cellules PC12 (phéochromocytomes dérivés de la crête neurale de rat), le conjugué induit la même réponse cellulaire qu'un anticorps dirigé contre p21Ras et est capable d'inhiber, à des concentrations de l'ordre du micromolaire (Cussac *et al.*, 1999), la différenciation en neurites induite par le NGF (Hagag *et al.*, 1986). Parallèlement, le conjugué inhibe la forte activation des MAP Kinases observée lors de la stimulation par le NGF. En revanche, la division cellulaire, observée lors de la stimulation des PC12 par l'EGF, n'est pas modifiée par le même traitement. L'explication provient probablement de la différence des niveaux d'activation des MAP Kinases selon le récepteur stimulé.

Enfin le conjugué peptidimère-Ant a un effet antiprolifératif important sur la croissance en colonies de cellules tumorales NIH3T3 transfectées par le récepteur tronqué HER2 ($CI_{50} = 1 \mu M$) (Cussac *et al.*, 1999) et n'a pas d'effet significatif sur la croissance des cellules tumorales NIH3T3 transfectées par Ras oncogénique, comme on pouvait s'y attendre, la protéine Ras étant localisée en aval de Grb2 dans la signalisation (voir Fig. 1).

Récemment, le conjugué peptidimère-Ant a été testé *in vivo* sur des xénogreffes d'un cancer humain de prostate

non hormono-dépendant (le modèle PAC120 HID28), transplantées sur souris "nude" (De Pinieux *et al.*, 2001). Cette tumeur surexprime HER2, elle répond à l'Herceptin, un anticorps humanisé dirigé contre HER2 (Zhang *et al.*, 2003), en association avec le docétaxel (Taxotère), un inhibiteur de la dépolymérisation des microtubules, actif dans le cancer de la prostate. Les premiers résultats montrent que le traitement par l'inhibiteur de Grb2 seul est insuffisant (Fig. 3), tout comme l'Herceptin (résultats non publiés) et que la croissance des tumeurs n'est pas significativement modifiée. Néanmoins, lorsque le composé est donné en association avec le docétaxel, un effet synergique statistiquement significatif est observé.

En conclusion, nos résultats montrent clairement qu'en cancérologie, l'inhibition des interactions entre les protéines de signalisation situées en aval de protéines oncogéniques ou surexprimées constitue une approche thérapeutique potentielle (Garbay *et al.*, 2000; Vidal *et al.*, 2001). Plusieurs stratégies sont maintenant nécessaires pour augmenter l'affinité du peptide dimère, parfaire sa bio-disponibilité et mettre au point un test afin de cribler des banques de molécules non peptidiques. Par ailleurs, nous développons, selon la même approche, des inhibiteurs du domaine SH2 qui présentent des effets pharmacologiques voisins.

BIBLIOGRAPHIE

- Buday L. & Downward J., Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell*, 1993, 73, 611-620.

- Birge R. B., Knudsen B. S., Besser D. & Hanafusa H., SH2 and SH3-containing adaptor proteins: redundant or independent mediators of intracellular signal transduction. *Genes to Cells*, 1996, 1, 595-613.
- Chardin P., Cussac D., Maignan S. & Ducruix A., The Grb2 adaptor. *FEBS Lett.*, 1995, 369, 47-51.
- Cussac D., Vidal M., Leprince C., Liu W. Q., Cornille F., Tiraboschi G., Roques B. P. & Garbay C., A Sos-derived peptidimer blocks the Ras signaling pathway by binding both Grb2 SH3 domains and displays antiproliferative activity. *FASEB J.*, 1999, 13, 31-38.
- de Pinieux G., Legrier M. E., Poirson-Bichat F., Courty Y., Bras-Goncalves R., Dutrillaux A. M., Nemati F., Oudard S., Lideureau R., Broqua P., Junien J. L., Dutrillaux B. & Poupon M. F., Clinical and experimental progression of a new model of human prostate cancer and therapeutic approach. *Am. J. Pathol.*, 2001, 159, 753-64.
- Derossi D., Calvet S., Trembleau A., Brunissen A., Chassaing G. & Prochiantz A., Cell internalization of the third helix of the antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 18188-18193.
- Garbay C., Liu W. Q., Vidal M. & Roques B. P., Inhibitors of Ras signal transduction as antitumor agents. *Biochem. Pharmacol.*, 2000, 60, 1165-1169.
- Gishizky M. L., Johnson-White J. & Witte O. N., Evaluating the effect of P210 BCR/ABL on growth of hematopoietic progenitor cells and its role in the pathogenesis of human chronic myelogenous leukemia. *Semin. Hematol.*, 1993, 30, 6-8.
- Goudreau N., Cornille F., Duchesne M., Parker F., Tocqué B., Garbay C. & Roques B. P., NMR structure of the N-terminal SH3 domain of Grb2 and its complex with a proline-rich peptide from Sos. *Nature Struct. Biol.*, 1994, 1, 898-907.
- Hagag N., Haleboua S. & Viola M., Inhibition of growth factor-induced differentiation of PC12 cells by microinjection of antibody to Ras p21. *Nature*, 1986, 319, 680-682.
- Janes P., Daly R., deFazio A. & Sutherland R., Activation of the Ras Signaling Pathway in Human Breast Cancer Cells Overexpressing *erbB-2*. *Oncogene*, 1994, 9, 3601-3609.
- Klapper L. N., Kirschbaum M. H., Sela M. & Yarden Y., Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors. *Adv. Cancer Res.*, 2000, 77, 25-79.
- Maignan S., Guilloteau J. P., Fromage N., Arnoux B., Becquart J. & Ducruix A., Crystal structure of the mammalian Grb2 adaptor. *Science*, 1995, 268, 291-293.
- O'Dwyer M. E., Mauro M. J. & Druker B. J., STI571 as a targeted therapy for CML. *Cancer Invest.*, 2003, 21, 429-438.
- Sastry L., Cao T. & King C. R., Multiple Grb2-protein complexes in human cancer cells. *Int. J. Cancer*, 1997, 70, 208-213.
- Toogood P. L., Inhibition of protein-protein association by small molecules: approaches and progress. *J. Med. Chem.*, 2002, 45, 1543-1558.
- Van Biesen T., Hawes B. E., Luttrell D. K., Krueger K. M., Touthara K., Porfiri E., Sakaue M., Luttrell L. M. & Lefkowitz R. J., Receptor-tyrosine-kinase- and G beta gamma-mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. *Nature*, 1995, 376, 781-784.
- Vidal M., Gigoux V. & Garbay C., SH2 and SH3 domains as targets for anti-proliferative agents. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2001, 40, 175-186.
- Xie Y., Pendergast A. M. & Hung M. C., Dominant-negative mutants of Grb2 induced reversal of the transformed phenotypes caused by the point mutation-activated rat *HER-2/Neu*. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 30717-30724.
- Zhang H., Richter M. & Greene M. I., Therapeutic monoclonal antibodies for the ErbB family of receptor tyrosine kinases. *Cancer Biol. Ther.*, 2003, 2, S122-S126.

