

Received: 2006.05.12
Accepted: 2006.07.05
Published: 2006.09.15

Inhibitory kinaz tyrozynowych w terapii przewlekłej białaczki szpikowej

Tyrosine kinase inhibitors in the therapy of chronic myeloid leukaemia

Olga Grzybowska-Izydorczyk, Joanna Góra-Tybor, Tadeusz Robak

Katedra i Klinika Hematologii UM w Łodzi

Streszczenie

Przewlekła białaczka szpikowa (PBS) to choroba nowotworowa, której istotą jest klonalny rozrost powstający na poziomie wielopotencjalnej komórki krwiotwórczej. W wyniku transformacji nowotworowej macierzystej komórki szpiku dochodzi do niepohamowanego rozrostu układu mieloidalnego zarówno w szpiku, jak i w narządach, które w okresie płodowym pełniły funkcję krwiotwórczą. Przebieg choroby charakteryzuje się trzema następującymi po sobie fazami. Szacowany czas przeżycia chorych w fazie przewlekłej wynosi około 4 lat i ulega skróceniu do 6–9 miesięcy w fazie akceleracji oraz 3–6 miesięcy w fazie kryzy blastycznej. Charakterystyczną cechą stwierdzaną w ponad 95% przypadków jest obecność chromosomu Philadelphia (Ph), który powstaje w wyniku wzajemnej translokacji długich ramion chromosomów 9 i 22 (9q+;22q–). Następstwem tego jest powstanie patologicznego genu BCR-ABL, który koduje białko p210, wykazujące nieprawidłową, zwiększoną aktywność kinazy tyrozynowej. Przyjmuje się, że właśnie ekspresja kinazy BCR-ABL jest podstawowym czynnikiem transformacji nowotworowej w PBS. Przełomowym krokiem w leczeniu chorych z PBS okazało się wprowadzenie imatinibu (Glivec), będącego wybiórczym inhibitorem kinazy tyrozynowej BCR-ABL. Ze względu na dużą skuteczność i dobrą tolerancję stał się on obecnie „złotym standardem” leczenia chorych z PBS. Doświadczenia kliniczne wskazują, że chociaż większość chorych z PBS leczonych imatinibem osiąga trwałą odpowiedź hematologiczną i cytogenetyczną, to jest grupa pacjentów, u których wykształca się oporność na lek. Poznanie głównego mechanizmu oporności na imatinib oraz chęć jego przezwyciężenia doprowadziły do powstania nowej generacji inhibitorów kinaz tyrozynowych, dających obiecujące efekty w badaniach klinicznych. Należą do nich m.in. BMS 354825 (dasatinib) oraz AMN107, inhibitory o większej sile działania w porównaniu z imatinibem oraz o dużej aktywności w stosunku do niemal wszystkich zmutowanych domen kinazy BCR-ABL.

Słowa kluczowe:

przewlekła białaczka szpikowa • BCR-ABL • inhibitory kinaz tyrozynowych • oporność • imatinib • dasatinib • AMN107

Summary

Chronic myeloid leukemia (CML) is a malignant clonal disorder of hematopoietic stem cells resulting in increased myeloid and erythroid cells and platelets, and marked hyperplasia in the bone marrow. The natural history of CML is progression from a benign chronic phase, often through an accelerated phase, to a rapidly fatal blast crisis within 3–5 years. The constitutively activated ABL tyrosine kinase domain of the chimeric BCR-ABL oncoprotein is responsible for the transformation of hematopoietic stem cells and the symptoms of CML. Imatinib mesylate (Glivec), a specific small-molecule inhibitor of BCR-ABL, has become the standard drug therapy in all phases of the disease. Imatinib has greatly improved the outcome for patients with CML. Unfortunately,

mutations causing resistance to imatinib are leading to relapse in some patients. Considerable progress has recently been made in understanding the structural biology of ABL and the molecular basis for resistance, facilitating the discovery and development of second-generation drugs designed to combat mutant forms of BCR-ABL. The first of these compounds to enter clinical development were dasatinib (BMS-354825) and AMN107 and, from phase I results, both of these promise a breakthrough in the treatment of imatinib-resistant CML.

Key words: chronic myeloid leukemia • BCR-ABL • tyrosine kinase inhibitors • resistance • imatinib • dasatinib • AMN107

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_60/9638.pdf

Word count: 2727

Tables: 1

Figures: 5

References: 51

Adres autorki: lek. med. Olga Grzybowska-Izydorczyk, Katedra i Klinika Hematologii UM w Łodzi, Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. M. Kopernika, ul. K. Ciołkowskiego 2, 93-510 Łódź; e-mail: ogrzybowska@o2.pl

Wykaz skrótów: **PBS** – przewlekła białaczka szpikowa; **Ph** – chromosom Philadelphia; **BCR** – miejsce złamań (breakpoint cluster region); **OBL** – ostra białaczka limfoblastyczna; **STI** – inhibitor przewodzenia sygnału (signal transduction inhibitor); **PDGF** – czynnik aktywacji płytek (platelet-derived growth factor); **SCF** – czynnik wielopotencjalnej komórki pnia (stem cell factor); **AUC** – pole pod krzywą stężeń (area under the curve); **INF-α** – interferon alfa; **CHR** – całkowita odpowiedź hematologiczna (complete hematologic response); **MCyR** – większa odpowiedź cytogenetyczna (major cytogenetic response); **CCyR** – całkowita odpowiedź cytogenetyczna (complete cytogenetic response); **Ara-C** – arabinozyd cytozynowy; **PFS** – czas wolny od progresji choroby (progression free survival).

PATOMECHANIZM PRZEWLEKŁEJ BIAŁACZKI SZPIKOWEJ

Przewlekła białaczka szpikowa (PBS) jest chorobą nowotworową, w przypadku której po raz pierwszy udowodniono związek z obecnością mutacji chromosomalnej. U ponad 90% chorych na PBS stwierdza się swoiste zaburzenie chromosomalne w postaci translokacji fragmentu długiego ramienia jednego z chromosomów 22 pary na długie ramię chromosomu pary 9 (t(9q+;22q-)). W następstwie przemieszczenia powstaje krótki chromosom 22, tzw. chromosom Philadelphia (Ph) oraz wydłużony chromosom 9 [34,37]. Efektem translokacji jest przeniesienie onkogenu *ABL* (umiejscowionego na chromosomie 9) w ściśle określone miejsce złamań (breakpoint cluster region – BCR) na chromosomie 22 i powstanie fuzyjnego genu *BCR-ABL* [17]. Uważa się, że gen ten pełni główną rolę w transformacji białaczkowej. Stwierdzono, że u myszy, którym przeszczepiono komórki szpiku kostnego transfekowane genem *BCR-ABL*, rozwija się białaczka przypominająca PBS u ludzi [8]. Obserwowano również niezależnie się od czynników wzrostu linii komórkowych, do których wprowadzono gen *BCR-ABL* [30].

CHARAKTERYSTYKA GENU *BCR-ABL*

Gen *BCR-ABL* występuje u 95% chorych na PBS i u około 10-20% dorosłych chorych z ostrą białaczką limfoblastyczną (OBL). Tylko u 2-5% dzieci chorych na OBL stwierdza się obecność tego genu. Wyjątkowo rzadko *BCR-ABL* wykrywa się u chorych z ostrą białaczką szpikową, szpi-

czakiem plazmocytowym i chłoniakami immunoblastycznymi [31].

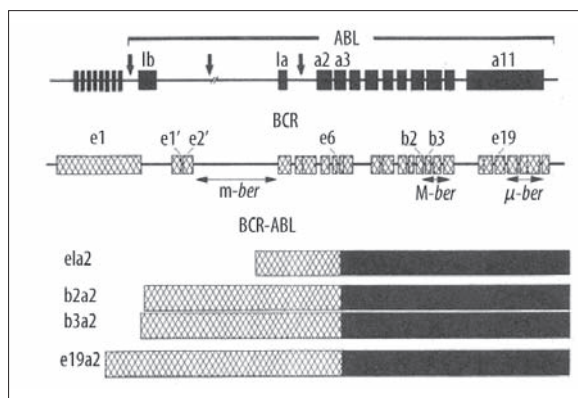
Gen *ABL* nie ma stałego miejsca złamań (breakpoint region). Złamanie to może się pojawić na obszarze obejmującym ponad 300 kb. Natomiast miejsca złamań genu *BCR* są ściśle określone. U większości chorych na PBS i około 30% chorych na OBL miejsce złamania genu *BCR* znajduje się w obszarze obejmującym 5.8 kb znanym jako M-bcr (major breakpoint cluster region). W następstwie złamania genu w tym regionie powstają dwa rodzaje transkryptów b3a2 i/lub b2a2 odpowiedzialne za kodowanie białka p210.

U 70% chorych na OBL i bardzo rzadko u chorych na PBS do złamania genu *BCR* dochodzi w obrębie długiego (54.4 kb) intronu, w tak zwanym m-bcr (minor breakpoint cluster region). W następstwie tego złamania powstaje transkrypt e1a2 kodujący białko p190 [5].

W 1990 roku po raz pierwszy opisano przypadek PBS ze złamaniem genu *BCR* w okolicy między eksonami e19 i e20 (μ-bcr). Następnym takiego złamania jest powstanie dużego transkryptu e19a2 kodującego białko P230 [38].

Schemat prawidłowych genów *ABL* i *BCR* oraz transkryptów *BCR-ABL* powstałych w wyniku translokacji 9q+22q- przedstawiono na rycinie 1.

Stwierdzono, że gen *BCR-ABL* koduje białko wykazujące nieprawidłową, zwiększoną aktywność receptorowej ki-



Ryc. 1. Schemat prawidłowych genów ABL i BCR oraz transkryptów BCR-ABL powstałych w wyniku translokacji; pionowe strzałki na górnym rysunku wskazują miejsca złamań genu ABL, poniżej zaznaczono miejsca złamań genu BCR: ■ m-bcr (typowe dla ostrej białaczki limfoblastycznej, bardzo rzadko w PBS, wówczas obraz mielomonocytny) transkrypty – b2a2 i b3a2; ■ M-bcr (najczęstsze, typowe dla PBS) transkrypty – b2a2 i b3a2; ■ μ-bcr (bardzo rzadkie, obraz przewlekłej białaczki neutrofilowej) transkrypt – e19a

nazy tyrozynowej [9]. Przyjmuje się, że ekspresja kinazy tyrozynowej *BCR-ABL* jest podstawowym czynnikiem transformacji nowotworowej w PBS. Mechanizm tej transformacji nie jest znany. Stwierdzono, że *BCR-ABL* uczestniczy w licznych szlakach transmisji sygnałów w komórce. Dimeryzacja cząsteczki białka *BCR-ABL* (podstawowa dla jego aktywacji) prowadzi do krzyżowej fosforylacji reszt tyrozynowych, co umożliwia przyłączenie wielu enzymów i cząsteczek adaptorowych, a w następstwie aktywację dróg przekazywania sygnału. Wykazano, że w kompleksie z białkami adaptorowymi, takimi jak Grb-2, SHC, SOS i CRKL aktywuje protoonkogeny z rodziny ras [9]. Stwierdzono również, że *BCR-ABL* ma zdolność zwiększania ekspresji niektórych czynników transkrypcyjnych, m.in. c-myc, STAT i c-Jun, a także zaburza funkcję integrzyn, powodując upośledzenie przylegania białaczkowych krwiotwórczych komórek prekursorowych do elementów podścieliska i ich „ucieczkę” od fizjologicznej regulacji [6,48]. *BCR-ABL* hamuje również proces apoptozy komórek krwiotwórczych prowadząc do ich patologicznej kumulacji.

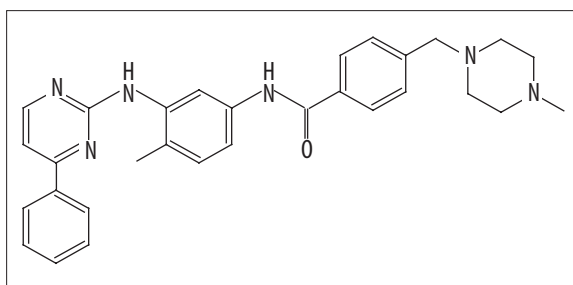
INHIBITORY KINAZY TYROZYNOWEJ BCR-ABL

Główna rola kinazy tyrozynowej *BCR-ABL* w transformacji białaczkowej powoduje, że zahamowanie aktywności tego enzymu jest atrakcyjnym celem terapii u chorych na PBS. Leki, które mają zdolność hamowania kinazy *BCR-ABL* należą do nowej grupy leków przeciwnowotworowych, tzw. inhibitorów przewodzenia sygnału (STI – signal transduction inhibitors).

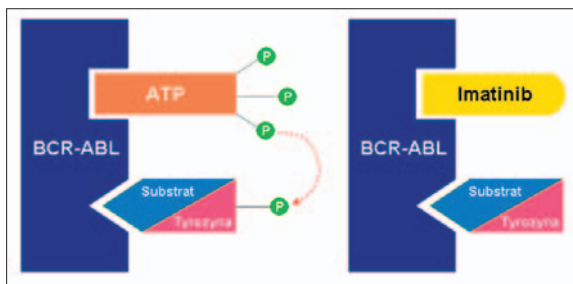
1. Imatinib (Glivec)

Mechanizm działania

Imatinib (Glivec, firmy Novartis) jest wybiórczym inhibitorem kinazy tyrozynowej *BCR-ABL* (ryc. 2). Lek ten blokuje konkurencyjnie miejsce wiązania ATP kinazy, zapo-



Ryc. 2. Budowa chemiczna IMATINIBU (Glivec)



Ryc. 3. Mechanizm działania imatinibu

biegając w ten sposób fosforylacji reszty tyrozynowej, co w konsekwencji doprowadza do zahamowania aktywacji sygnału komórkowego [4,13,24,33,41,47] (ryc. 3). Imatinib jest również inhibitorem receptorów kinaz tyrozynowych czynnika aktywacji płytek (PDGF – platelet-derived growth factor), PDGF-R i czynnika komórek pnia (SCF – stem cell factor), c-KIT oraz hamuje procesy komórkowe aktywowane przez PDGF i SCF [40,39].

Farmakokinetyka, dawkowanie i toksyczność

Imatinib jest stosowany doustnie w dawce 400 mg/dobę w fazie przewlekłej PBS i 600–800 mg w bardziej zaawansowanych fazach choroby. Średnia bezwzględna dostępność biologiczna leku w postaci kapsułek wynosi 98%. Po podaniu doustnym stwierdzono dużą międzynosobniczą zmienność wartości AUC (area under the curve – pole pod krzywą stężeń, miara ilości leku, jaka dociera do krążenia ogólnego w postaci niezmienionej) imatinibu w osoczu pacjentów. Lek w 95% wiąże się z białkami osocza, przede wszystkim z albuminami i kwaśną alfa-glikoproteiną oraz w niewielkim stopniu z lipoproteiną. Imatinib jest metabolizowany w wątrobie, a enzymem z grupy ludzkiego cytochromu P450 biorącym udział w procesie biotransformacji jest CYP3A4. Głównym metabolitem imatinibu jest pochodna N-demetylowa piperazyny, która charakteryzuje się *in vitro* podobną siłą działania jak związek macierzysty. Lek jest wydalany głównie z kałem (68%), w nieznacznym stopniu z moczem (13%), a jego biologiczny okres półtrwania ($T_{1/2}$) wynosi około 18 godzin.

Imatinib jest lekiem dobrze tolerowanym. Najczęstsze objawy niepożądane to obrzęki, głównie wokół oczu, wysypka, nudności, wymioty i biegunka. Objawy mielosupresji, głównie pod postacią neutropenii i małopłytkowości, dotyczą przede wszystkim chorych w zaawansowanych fazach PBS. W fazie przewlekłej obserwowano neutropenię i małopłytkowość 3 i 4 stopnia odpowiednio u 14 i 7%

Tabela 1. Podział mechanizmów oporności na imatinib

Oporność pierwotna	Oporność wtórna
• brak CHR po 3 miesiącach • brak CyR po 6 miesiącach • brak MCyR po 1 roku	• utrata CHR lub CyR (nabyta hematologiczna i/lub cytogenetyczna oporność na imatinib w odniesieniu do utraty wcześniej uzyskanej odpowiedzi)

pacjentów. Natomiast u chorych w fazie akceleracji i kryzy blastycznej objawy te występowały u około 60% chorych [46].

Robak i wsp. opisali przypadek wystąpienia aplazji szpiku po włączeniu imatinibu u chorej z wieloletnim PBS w wywiadzie, będącej w fazie akceleracji choroby. Na podstawie własnych obserwacji wysunięto również hipotezę, że długi przebieg PBS i zaawansowanie procesu chorobowego oraz wcześniejsza terapia, szczególnie busulfanem, mogą zwiększać ryzyko wystąpienia aplazji szpiku jako objawu niepożądanego podczas terapii imatinibem [36].

Badania kliniczne

Wieloośrodkowym, randomizowanym badaniem CSTI 0110 objęto 532 pacjentów w fazie przewlekłej PBS, opornych na interferon alfa (INF- α) lub nietolerujących terapii tym preparatem. Imatinib stosowano w dawce 400 mg/dobę. U 93% pacjentów obserwowano całkowitą remisję hematologiczną (CHR), u 60% większą remisję cytogenetyczną (MCyR) i u 42% całkowitą remisję cytogenetyczną (CCyR). Po 48 miesiącach obserwacji u 52% chorych nie obserwowano progresji choroby [45].

W innym wieloośrodkowym, randomizowanym badaniu IRIS (International Randomized Interferon versus STI571), do którego włączono 1106 chorych, porównywano skuteczność leczenia INF- α w połączeniu z arabinozydem cytozyny (Ara-C) (553 pacjentów) ze skutecznością terapii imatinibem u pacjentów we wczesnej (6 miesięcy od rozpoznania) fazie przewlekłej PBS (również 553 pacjentów). Po 42 miesiącach obserwacji wykazano, że spośród leczonych imatinibem 98% osiągnęło CHR, 91% MCyR, a 84% CCyR. Tylko u kilku procent pacjentów obserwowano całkowitą remisję na poziomie molekularnym. W grupie chorych leczonych INF+AraC odsetki remisji były istotnie niższe i wynosiły odpowiednio 55, 20 i 7,5%. Należy podkreślić, że z powodu złej tolerancji INF lub braku odpowiedzi na leczenie tylko u 4% badanych kontynuowano terapię INF+AraC, a pozostałe 96% chorych zostało przeniesionych do ramienia z imatinibem lub przerwało leczenie. Odsetek chorych leczonych imatinibem wolnych od progresji choroby (PFS – progression free survival) po 42 miesiącach obserwacji wynosił 84% [45].

Kantarijan i wsp. wykazali natomiast niezwykle wysoki odsetek remisji molekularnych (28%) u pacjentów w fazie przewlekłej PBS leczonych zwiększoną do 800 mg na dobę dawką imatinibu (114 chorych włączonych do badania) [25].

Imatinib stosowany w zaawansowanych fazach choroby jest znacznie mniej skuteczny, a uzyskiwane odpowiedzi

na ogół trwają krótko. W fazie akceleracji choroby spośród 235 badanych, CHR obserwowano u około 40% pacjentów, a MCyR i CCyR odpowiednio u 22 i 16%. W kryzysie blastycznej, w grupie 260 chorych uzyskano zaledwie 8% CHR i tylko u nielicznych obserwowano poprawę cytogenetyczną (badanie CSTI 0109 i 0102) [45].

Warto podkreślić, że utrzymanie remisji wymaga stałego podawania imatinibu, a próby odstawienia leku powodują zazwyczaj regresję molekularną i cytogenetyczną.

Oporność na imatinib

Wyróżnia się dwa podstawowe mechanizmy oporności na terapię imatinibem: pierwotną i wtórna (nabytą).

O pierwotnej oporności mówimy wówczas, gdy po 3 miesiącach leczenia nie uzyskujemy CHR, lub po 6 miesiącach nie udaje się osiągnąć jakiegokolwiek odpowiedzi cytogenetycznej (CyR), bądź też po 1 roku leczenia nie ma MCyR (tabela 1).

O nabytej oporności świadczy utrata uzyskanej wcześniej CHR lub odpowiedzi cytogenetycznej.

Oporność na imatinib obserwuje się znacznie częściej u chorych w zaawansowanych stadiach PBS, zwłaszcza w fazie przełomu blastycznego (70% chorych opornych) [22]. Znacznie rzadziej zjawisko to występuje u pacjentów z PBS w fazie przewlekłej (w badaniu IRIS po 42 miesiącach obserwacji wtórna oporność albo regresję choroby stwierdzono u 16% pacjentów [19]).

Biologiczne mechanizmy oporności

Mutacje punktowe

Mutacje punktowe są najczęstszym mechanizmem oporności nabytej, obserwowanym w 50–90% przypadków [3,10,15,18,21]. Na skutek punktowych mutacji w obrębie *BCR-ABL* może dochodzić do zmiany krytycznych aminokwasów bezpośrednio uczestniczących w kontakcie z imatinibem lub też zmian w konformacji kinazy tyrozynowej. Imatinib wiąże się bowiem z domeną kinazy *ABL* w jej nieaktywnej konformacji i indukuje różnego typu zmiany „ułożeniowe” podczas przyłączania substratu białkowego [41]. Mutacja w pozycji aminokwasowej bezpośrednio wchodzącej w kontakt z lekiem zapobiega adaptacji domeny kinazy do uzyskania takiej konformacji, która pozwoliłaby na przyłączenie leku [43].

Zidentyfikowano co najmniej 40 różnych mutacji punktowych mających związek z kliniczną opornością na imatinib [1,7].

Obszary, w obrębie których najczęściej dochodzi do mutacji to: E255K (p-loop), F 317LM, 388L (centrum aktywności), E 450G (poza domeną katalityczną).

Najczęściej obserwowanymi punktowymi mutacjami okazały się T315, E255 i M351 [10].

Amplifikacja genów w obrębie *BCR-ABL*

Amplifikacja genów w obrębie *BCR-ABL* obejmuje około 10% przypadków oporności na imatinib [49]. Pozwala ona utrzymać klonowi białaczkowemu wystarczająco wysoki poziom tzw. przekazu komórkowego, co umożliwia przeżycie tych komórek nawet w obecności leku. Zwiększenie dawki leku jest zazwyczaj skuteczne w przełamaniu tego typu oporności.

Ewolucja klonalna

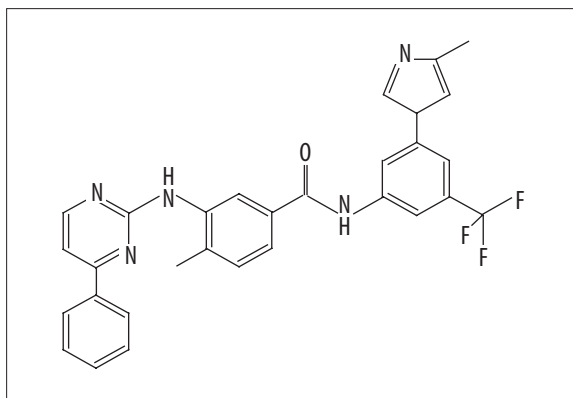
Ewolucja klonalna polega na pojawieniu się nowych zmian genetycznych [51]. Proces ten prowadzi do uaktywnienia się nowych dróg przewodzenia sygnału w komórkach i uniknięcia przez nie hamującego działania imatinibu.

Oporność farmakologiczna

O farmakologicznym mechanizmie oporności mówimy w sytuacjach, w których dochodzi do redukcji wewnątrzkomórkowej koncentracji imatinibu np. przez ekspresję alfa-1-glikoproteiny, a w konsekwencji zmniejszenia napływu leku do komórki lub ekspresję MDR/P, co z kolei zwiększa wypływ leku z komórki.

Choroba reszkowa a oporność na imatinib

Stwierdzono, że u pacjentów z całkowitą remisją molekularną przerwanie terapii Glivecem prowadzi zazwyczaj do progresji molekularnej i cytogenetycznej. Bardzo istotną rolę w tym procesie odgrywa tzw. choroba reszkowa. Badania *ex vivo* sugerują, że hematopoetyczne komórki progenitorowe *BCR-ABL+* (CD34+/CD38+) wykazują oporność na imatinib [16]. Jednym z mechanizmów może być pojawienie się mutacji punktowych w obrębie domeny kinazy tyrozynowej w komórkach CD34+. Mutacje takie obserwowano u 5 spośród 13 chorych z CCR [10]. Wysłano hipotezę, iż zmutowany klon komórkowy zachowuje zdolność przetrwania w obecności leku, nie ma jednak możliwości dalszej ekspansji (namnażania). Inne badanie sugeruje, że poziom transkryptu *BCR-ABL* mRNA jest znacznie wyższy w progenitorowych komórkach hematopoetycznych w porównaniu z ich bardziej zróżnicowanymi postaciami [10]. Obserwacja ta może wyjaśniać brak efektu działania imatinibu w stosunku do białaczkowych komórek pnia przy zachowaniu jego dużej skuteczności w przypadku komórek o wyższym stopniu zróżnicowania. Wykazano również, że wewnątrzkomórkowe stężenie imatinibu w komórkach pnia jest znacznie mniejsze niż sugerowałby oznaczony poziom leku w osoczu. Prawdopodobnie ma to związek ze zmienną ekspresją transporterów białkowych, takich jak PGP i ABCG2 na komórkach progenitorowych. Ponadto stwierdzono, że duża aktywność białka NF-κB w progenitorowych komórkach hematopoetycznych, chroni je przed procesem apoptozy, wzbogacając w ten sposób ogólną pulę komórek pnia, odpowiedzialnych za rozwój choroby reszkowej.



Ryc. 4. Wzór strukturalny AMN107

2. Nowe inhibitory kinaz tyrozynowych

Różnorodność mechanizmów oporności na imatinib stwarza możliwości rozwoju nowych strategii terapeutycznych, które pozwoliłyby zapobiegać wytworzeniu lub przezwyciężać istniejącą już oporność u chorych z PBS. W fazie badań klinicznych znajdują się leki należące do nowej generacji inhibitorów *BCR-ABL*. Należą do nich m.in. AMN107 (Novartis) oraz BMS 354825 (Dasatinib, firmy Bristol-Myers Squibb), inhibitory o większej sile działania w porównaniu z imatinibem oraz o dużej aktywności w stosunku do niemal wszystkich zmutowanych domen kinazy *BCR-ABL*.

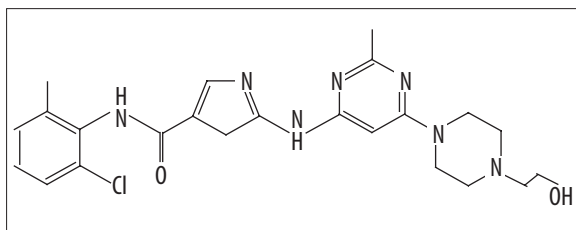
AMN-107 – selektywny inhibitor *BCR-ABL* drugiej generacji

AMN-107 jest aminopirymidyną, będącą strukturalną pochodną imatinibu (ryc. 4). Podobnie zresztą jak imatinib przyłącza się do nieaktywnej konformacji kinazy *BCR-ABL*, w miejscu wiązania ATP. Analizy wykazały jednak, że związek ten nie powoduje przyłączenia wodoru do grupy węglowej reszty aminokwasowej (360/361), ale uczestniczy w lipofilnej interakcji z tym miejscem, co wymaga mniej dokładnego dopasowania przestrzennego [50].

Mutacje w obrębie *BCR-ABL*, które zmieniają kształt miejsca przyłączenia mają więc mniejszy wpływ na wiązanie AMN-107 w porównaniu z imatinibem.

Badania *in vitro* wykazały, że AMN-107 ma większą selektywność i około 25 razy silniejsze działanie hamujące kinazę *BCR-ABL* od imatinibu [50]. W mniejszym stopniu AMN-107 hamuje również kinazę PDGFR i c-kit, nie wpływa natomiast na rodzinę kinaz SRC. Badania Manleya i wsp. prowadzone na liniach komórkowych wykazały skuteczność AMN-107 w większości mutacji punktowych *BCR-ABL* (wyjątkiem jest mutacja) T315I [28,50].

Pierwsza faza badań klinicznych z AMN-107 objęła chorych z PBS w okresie akceleracji i kryzy blastycznej opornych na imatinib oraz chorych z nawrotem OBL Ph+ lub też opornych na standardowe leczenie [12,14]. Spośród 50 chorych z PBS w fazie akceleracji 50% uzyskało CHR, zaś 14% CCyR. Chorzy będący w przełomie mieloidalnym (24 badanych) osiągnęli CHR w 17%, MCyR w 25%, a CCyR w 8%. Dla porównania u 9 pacjentów w okresie przełomu



Ryc. 5. Budowa chemiczna DASATINIBU (BMS 354825)

limfoidalnego wyniku przedstawiały się następująco: CHR u 11%, MCyR i CCyR u 22%. Wśród chorych z OBL Ph+ tylko 10% uzyskało CHR, nie zaobserwowano natomiast odpowiedzi cytogenetycznej.

W późniejszym czasie zmodyfikowano protokół badania dopuszczając możliwość włączenia chorych z PBS w fazie przewlekłej. Stwierdzono, że 80% spośród 15 badanych osiągnęło CHR, 40% MCyR, a 13% CCyR. Większość chorych ze znanymi mutacjami w obrębie domeny *BCR-ABL* odpowiedziała na leczenie. Wyjątek stanowili pacjenci z mutacją T315I, którzy byli oporni na działanie tego leku.

AMN-107 jest lekiem przyjmowanym doustnie, a czas jego połowicznego rozpadu ($T_{1/2}$) szacuje się na 15 godzin i na ogół jest dobrze tolerowany. Spośród najczęstszych objawów niepożądanych wymienia się wysypkę oraz objawy mielosupresji, przede wszystkim małopłytkowość i neutropenię.

Dasatinib (BMS 354825) – podwójny inhibitor *abl-src*

Pod względem chemicznym dasatinib jest tiazolekarboksamidem (N-(2-chloro-6-metylfenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazyl]-2-metyl-4-pyrimidyl]-5-thiazolecarboxamide monohydrate, C₂₂H₂₆ClN₇O₂S H₂O). Związek ten różni się całkowicie budową strukturalną od imatinibu [29] (ryc. 5). Jest inhibitorem 5 rodzin kinaz tyrozynowych, do których należą *BCR-ABL*, *SRC*, *c-KIT*, *PDGFR* i *EPH*.

Badania *in vitro* wykazały, że siła działania dasatinibu jest około 300 razy większa w porównaniu z imatinibem. Związek ten hamuje aktywność prawie wszystkich zmutowanych domen *BCR-ABL* [11,35,44]. Podobnie jak w przypadku AMN-107, wyjątek stanowi jedynie mutacja T315I [20]. Wykazano, że dasatinib ma zdolność przyłączania się zarówno do aktywnej, jak i nieaktywnej konformacji ABL, podczas gdy imatinib przyłącza się tylko w tak zwanym centrum nieaktywnym. Przypuszcza się, że właśnie ta różnica w sposobie łączenia może być odpowiedzialna za zwiększenie siły działania leku.

Pierwsze próby kliniczne z zastosowaniem dasatinibu objęły 39 chorych z PBS w fazie przewlekłej opornych lub nietolerujących imatinibu, u których za główną przyczynę

oporności uznano mutacje domeny *BCR-ABL*. Całkowitą odpowiedź hematologiczną uzyskano u 84% chorych opornych i u 100% pacjentów nietolerujących imatinibu. Większą i całkowitą odpowiedź cytogenetyczną uzyskano odpowiednio u 35 i 52% chorych opornych oraz 50 i 63% chorych nietolerujących imatinibu. Po wstępnych wynikach badania rozszerzono protokół umożliwiając leczenie dasatinibem chorych z PBS w fazie akceleracji i kryzy blastycznej oraz pacjentów z OBL Ph+. W tym przypadku CHR obserwowano u 50% chorych z PBS w fazie akceleracji oraz łącznie u 28% z OBL i PBS w fazie kryzy blastycznej, a CCyR odpowiednio u 30 i 20% [42].

Dasatinib po podaniu doustnym wiąże się głównie z białkami osocza, jest metabolizowany w wątrobie, a wydalany z moczem i żółcią. Najczęstszym objawem niepożądanym jest neutropenia i małopłytkowość. Jednymi z częściej występujących powikłań niehematologicznych są obecność płynu w jamie opłucnej, biegunka oraz nudności i wymioty.

Do grupy podwójnych inhibitorów ABL-SRC, poza dasatinibem, należą jeszcze związki, takie jak AZD0530, SKI-606, PD166326, PD173955, PD180970 czy AP234664, których zastosowanie zarówno w leczeniu zespołów mieloproliferacyjnych, jak i innych chorób nowotworowych (guzy lite) jest dotychczas w fazie pierwszych badań klinicznych [29].

PODSUMOWANIE

Wprowadzenie do terapii imatinibu, inhibitora kinazy tyrozynowej *BCR-ABL*, okazało się przełomowym krokiem w terapii PBS. Pacjenci otrzymali możliwość leczenia doustnym, dobrze tolerowanym i mało toksycznym preparatem o znacznej skuteczności. Możliwość wykorzystania tak odmiennego w stosunku do standardowych cytostatyków leczenia zmieniła również spojrzenie na problem dokonywania allogenicznego przeszczepu szpiku, których liczba od czasu pojawienia się imatinibu zmniejszyła się. Obecnie uważa się, że każdy pacjent z PBS powinien być leczony imatinibem i dopiero przy braku odpowiedzi po 6 miesiącach terapii należy rozważyć możliwość allotransplantacji szpiku kostnego. Głównym problemem, pojawiającym się podczas terapii imatinibem jest występowanie lekooporności. W tym przypadku pewne nadzieje wiąże się z zastosowaniem inhibitorów kinazy tyrozynowej *BCR-ABL* nowej generacji, takich jak AMN-107 czy dasatinibu. Leki te są obecnie w trakcie badań klinicznych. Podejmowane są również próby łączenia ze sobą klasycznych cytostatyków, takich jak cytarabina zarówno z interferonem- α jak i inhibitorami kinazy tyrozynowej *BCR-ABL*, czy innymi lekami blokującymi przekaz sygnału komórkowego np.: inhibitory RAF, transferazy farnezylowej (lonafarnib), czy mTOR [2,23,27,32]. Prowadzono również badania *in vitro* z wykorzystaniem analogów puryn nukleozydowych (kladribina, fludarabina) w połączeniu z imatinibem [26]. Działania te dają nadzieję na nowoczesną i skuteczną terapię chorych z PBS.

PIŚMIENICTWO

- [1] Al-Ali H.K., Heinrich M.C., Lange T., Krahel R., Mueller M., Muller C., Niederwieser D., Druker B.J., Deininger M.W.: High incidence of BCR-ABL kinase domain mutations and absence of mutations of the PDGFR and KIT activation loops in CML patients with secondary resistance to imatinib. *Hematol. J.*, 2004; 5: 55-60
- [2] Borthakur G., Kantarjian H., Daley G., Talpaz M., O'Brien S., Garcia-Manero G., Giles F., Faderl S., Sugrue M., Cortes J.: Pilot study of lonafarnib, a farnesyl transferase inhibitor, in patients with chronic myeloid leukemia in the chronic or accelerated phase that is resistant or refractory to imatinib therapy. *Cancer*, 2006; 106: 346-352
- [3] Branford S., Rudzki Z., Walsh S., Grigg A., Arthur C., Taylor K., Herrmann R., Lynch K.P., Hughes T.P.: High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. *Blood*, 2002; 99: 3472-3475
- [4] Brunstein C.G., McGlave P.B.: The biology and treatment of chronic myelogenous leukemia. *Oncology*, 2001; 15: 23-31
- [5] Chisoe S.L., Bodenteich A., Wang Y.F., Wang Y.P., Burian D., Clifton S.W., Crabtree J., Freeman A., Iyer K., Jian L.: Sequence and analysis of the human ABL gene, the BCR gene, and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation. *Genomics*, 1995; 27: 67-82
- [6] Clarkson B.D., Strife A., Wisniewski D., Lambek C., Carpino N.: New understanding of the pathogenesis of CML: a prototype of early neoplasia. *Leukemia*, 1997; 11: 1404-1428
- [7] Corbin A.S., La Rosee P., Stoffregen E.P., Druker B.J., Deininger M.W.: Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib. *Blood*, 2003; 101: 4611-4614
- [8] Daley G.Q., Van Etten R.A., Baltimore D.: Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science*, 1990; 247: 824-830
- [9] Davis R.L., Konopka J.B., Witte O.N.: Activation of the c-abl oncogene by viral transduction or chromosomal translocation generates altered c-abl proteins with similar *in vitro* kinase properties. *Mol. Cell Biol.*, 1985; 5: 204-213
- [10] Deininger M., Buchdunger E., Druker B.J.: The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood*, 2005; 105: 2640-2653
- [11] Doggrell S.A.: BMS-354825: novel drug with potential for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Expert. Opin. Investig. Drugs.*, 2005; 14: 89-91
- [12] Doggrell S.A.: Is AMN-107 a step forward from imatinib in the treatment of chronic myeloid leukaemia? *Expert. Opin. Investig. Drugs.*, 2005; 14: 1063-1066
- [13] Druker B.J., Tamura S., Buchdunger E., Ohno S., Segal G.M., Fanning S., Zimmermann J., Lydon N.B.: Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat. Med.*, 1996; 2: 561-566
- [14] Golemiovic M., Verstovsek S., Giles F., Cortes J., Manshour T., Manley P.W., Mestan J., Dugan M., Alland L., Griffin J.D., Arlinghaus R.B., Sun T., Kantarjian H., Beran M.: AMN107, a novel aminopyrimidine inhibitor of Bcr-Abl, has *in vitro* activity against imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 4941-4947
- [15] Gorre M.E., Mohammed M., Ellwood K., Hsu N., Paquette R., Rao P.N., Sawyers C.L.: Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*, 2001; 293: 876-880
- [16] Graham S.M., Jorgensen H.G., Allan E., Pearson C., Alcorn M.J., Richmond L., Holyoake T.L.: Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 *in vitro*. *Blood*, 2002; 99: 319-325
- [17] Groffen J., Stephenson J.R., Heisterkamp N., de Klein A., Bartram C.R., Grosveld G.: Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*, 1984; 36: 93-99
- [18] Gruber F.X., Lamark T., Anonli A., Sovershaev M.A., Olsen M., Gedde-Dahl T., Hjort-Hansen H., Skogen B.: Selecting and deselecting imatinib-resistant clones: observations made by longitudinal, quantitative monitoring of mutated BCR-ABL. *Leukemia*, 2005; 19: 2159-2165
- [19] Guilhot F.: Sustained durability of response plus high rates of cytogenetic responses results in long-term benefit for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia (Ph+ CML-CP) treated with imatinib (IM) therapy: update from the IRIS study. *Blood*, 2004; 104: abstract 21
- [20] Hayette S., Michallet M., Baille M.L., Magaud J.P., Nicolini F.E.: Assessment and follow-up of the proportion of T315I mutant BCR-ABL transcripts can guide appropriate therapeutic decision making in CML patients. *Leuk. Res.*, 2005; 29: 1073-1077
- [21] Hochhaus A., Kreil S., Corbin A.S., La Rosee P., Muller M.C., Lahaye T., Hanfstein B., Schoch C., Cross N.C., Berger U., Gschaidmeier H., Druker B.J., Hehlmann R.: Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia*, 2002; 16: 2190-2196
- [22] Hochhaus A., La Rosee P.: Imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia: strategies to avoid and overcome resistance. *Leukemia*, 2004; 18: 1321-1331
- [23] Hoover R.R., Mahon F.X., Melo J.V., Daley G.Q.: Overcoming STI571 resistance with the farnesyl transferase inhibitor SCH66336. *Blood*, 2002; 100: 1068-1071
- [24] Kantarjian H., Sawyers C., Hochhaus A., Guilhot F., Schiffer C., Gambacorti-Passerini C., Niederwieser D., Resta D., Capdeville R., Zoellner U., Talpaz M., Druker B., Goldman J., O'Brien S.G., Russell N., Fischer T., Ottmann O., Cony-Makhoul P., Facon T., Stone R., Miller C., Tallman M., Brown R., Schuster M., Loughran T., Gratwohl A., Mandelli F., Saglio G., Lazzarino M., Russo D., Baccarani M., Morra E., International STI571 CML Study Group: Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 2002; 346: 645-652
- [25] Kantarjian H., Talpaz M., O'Brien S., Garcia-Manero G., Verstovsek S., Giles F., Rios M.B., Shan J., Letvak L., Thomas D., Faderl S., Ferrajoli A., Cortes J.: High-dose imatinib mesylate therapy in newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic phase chronic myeloid leukemia. *Blood*, 2004; 103: 2873-2878
- [26] Korycka A., Robak T.: The influence of imatinib mesylate (STI571) used alone or in combination with purine nucleoside analogues on the normal and chronic myelogenous leukaemia progenitor cells *in vitro*. *Leukemia Lymph.*, 2003; 44: 1549-1555
- [27] Ly C., Arechiga A.F., Melo J.V., Walsh C.M., Ong S.T.: Bcr-Abl kinase modulates the translation regulators ribosomal protein S6 and 4E-BP1 in chronic myelogenous leukemia cells via the mammalian target of rapamycin. *Cancer Res.*, 2003; 63: 5716-5722
- [28] Manley P.W.: AMN107: inhibitory profile against non-mutated and mutated forms of the bcr-abl tyrosine kinase. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 2005; 46: 5985
- [29] Manley P.W., Cowan-Jacob S.W., Mestan J.: Advances in the structural biology, design and clinical development of Bcr-Abl kinase inhibitors for the treatment of chronic myeloid leukaemia. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2005; 1754: 3-13
- [30] McLaughlin J., Chianese E., Witte O.N.: Alternative forms of the BCR-ABL oncogene have quantitatively different potencies for stimulation of immature lymphoid cells. *Mol. Cell Biol.*, 1989; 9: 1866-1874
- [31] Melo J.V.: The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood*, 1996; 88: 2375-2384
- [32] Mohi M.G., Boulton C., Gu T.L., Sternberg D.W., Neuberg D., Griffin J.D., Gilliland D.G., Neel B.G.: Combination of rapamycin and protein tyrosine kinase (PTK) inhibitors for the treatment of leukemias caused by oncogenic PTKs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 3130-3135
- [33] Nagar B., Bornmann W.G., Pellicena P., Schindler T., Veach D.R., Miller W.T., Clarkson B., Kuriyan J.: Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res.*, 2002; 62: 4236-4243
- [34] Nowell P.C., Hungerford D.A.: A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, 1960; 132: 1497
- [35] O'Hare T., Walters D.K., Stoffregen E.P., Jia T., Manley P.W., Mestan J., Cowan-Jacob S.W., Lee F.Y., Heinrich M.C., Deininger M.W., Druker B.J.: *In vitro* activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer Res.*, 2005; 65: 4500-4505
- [36] Robak T., Jamrozik K., Janus A., Holub A., Urbańska-Ryś H., Warzyński E., Kupnicka D., Góra-Tybor J.: Imatinib mesylate induced severe bone marrow aplasia in a patient with long duration of chronic myelogenous leukemia treated previously with busulfan and hydroxyurea. *Case Rep. Clin. Pract. Rev.*, 2005; 6: 332-336
- [37] Rowley J.D.: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*, 1973; 243: 290-293

- [38] Saglio G., Guerrasio A., Rosso C., Zaccaria A., Tassinari A., Serra A., Rege-Cambrin G., Mazza U., Gavosto F.: New type of Bcr/Abl junction in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 1990; 76: 1819–1824
- [39] Sattler M., Griffin J.D.: Mechanisms of transformation by the BCR/ABL oncogene. *Int. J. Hematol.*, 2001; 73: 278–291
- [40] Sawyers C.L., Hochhaus A., Feldman E., Goldman J.M., Miller C.B., Ottmann O.G., Schiffer C.A., Talpaz M., Guilhot F., Deininger M.W., Fischer T., O'Brien S.G., Stone R.M., Gambacorti-Passerini C.B., Russell N.H., Reiffers J.J., Shea T.C., Chapuis B., Coutre S., Tura S., Morra E., Larson R.A., Saven A., Peschel C., Gratwohl A., Mandelli F., Ben-Am M., Gathmann I., Capdeville R., Paquette R.L., Druker B.J.: Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood*, 2002; 99: 3530–3539
- [41] Schindler T., Bornmann W., Pellicena P., Miller W.T., Clarkson B., Kuriyan J.: Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science*, 2000; 289: 1938–1942
- [42] Shah N.P.: Loss of response to imatinib: mechanisms and management. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.*, 2005: 183–187
- [43] Shah N.P., Nicoll J.M., Nagar B., Gorre M.E., Paquette R.L., Kuriyan J., Sawyers C.L.: Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell.*, 2002; 2: 117–125
- [44] Shah N.P., Tran C., Lee F.Y., Chen P., Norris D., Sawyers C.L.: Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science*, 2004; 305: 399–401
- [45] Silver R.T. et al.: Four years of follow-up of 1027 patients with late chronic phase (L-CP), accelerated phase (AP), or blast crisis (BC) chronic myeloid leukemia (Ph+CML) treated with imatinib in three large phase II trials. *Blood*, 2004; 104: 10a
- [46] Sneed T.B., Kantarjian H.M., Talpaz M., O'Brien S., Rios M.B., Bekele B.N., Zhou X., Resta D., Wierda W., Faderl S., Giles F., Cortes J.E.: The significance of myelosuppression during therapy with imatinib mesylate in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Cancer*, 2004; 100: 116–121
- [47] Talpaz M., Silver R.T., Druker B.J., Goldman J.M., Gambacorti-Passerini C., Guilhot F., Schiffer C., Fischer T., Deininger M.W., Lennard A.L., Hochhaus A., Ottmann O.G., Gratwohl A., Baccarani M., Stone R., Tura S., Mahon F.X., Fernandes-Reese S., Gathmann I., Capdeville R., Kantarjian H.M., Sawyers C.L.: Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood*, 2002; 99: 1928–1937
- [48] Thijsen S., Schuurhuis G., van Oostveen J., Ossenkoppele G.: Chronic myeloid leukemia from basics to bedside. *Leukemia*, 1999; 13: 1646–1674
- [49] von Bubnoff N., Peschel C., Duyster J.: Resistance of Philadelphia-chromosome positive leukemia towards the kinase inhibitor imatinib (STI571, Glivec): a targeted oncoprotein strikes back. *Leukemia*, 2003; 17: 829–838
- [50] Weisberg E., Manley P.W., Breitenstein W., Bruggen J., Cowan-Jacob S.W., Ray A., Huntly B., Fabbro D., Fendrich G., Hall-Meyers E., Kung A.L., Mestan J., Daley G.Q., Callahan L., Catley L., Cavazza C., Azam M., Neuberger D., Wright R.D., Gilliland D.G., Griffin J.D.: Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell*, 2005; 7: 129–141
- [51] Willis S.G., Lange T., Demehri S., Otto S., Crossman L., Niederwieser D., Stoffregen E.P., McWeeney S., Kovacs I., Park B., Druker B.J., Deininger M.W.: High-sensitivity detection of BCR-ABL kinase domain mutations in imatinib-naïve patients: correlation with clonal cytogenetic evolution but not response to therapy. *Blood*, 2005; 106: 2128–2137