

Received: 2006.09.12  
Accepted: 2006.12.12  
Published: 2006.12.28

## Alternatywne dla STI571 inhibitory kinazy Bcr-Abl\*

### Novel inhibitors of Bcr-Abl

Justyna Jakubowska, Małgorzata Czyż

Zakład Biologii Molekularnej Nowotworów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

#### Streszczenie

STI571 (imatinib; Gleevec®) został zaprojektowany jako inhibitor kinazy Bcr-Abl, białka onkogenego odpowiedzialnego za rozwój przewlekłej białaczki szpikowej (CML). Jest również inhibitorem aktywności kinazy c-Kit i PDGFR. Jest lekiem z wyboru dla nowo zdiagnozowanych pacjentów chorych na CML. Charakteryzuje się znakomitą skutecznością w terapii stosowanej u pacjentów w przewlekłej fazie białaczki. Niestety, STI571 podawany pacjentom w fazie przyspieszonej lub kryzy blastycznej daje nawroty choroby, spowodowane głównie rozwojem oporności. STI571 nie usuwa białaczkowych komórek macierzystych i u większości pacjentów poddawanych terapii z zastosowaniem tego leku można wykryć śladowe ilości komórek *BCR-ABL*<sup>+</sup>. Stąd pojawiła się konieczność poszukiwania nowych terapii, w tym alternatywnych terapii celowanych przeciw CML, które mogłyby zastąpić lub uzupełnić leczenie za pomocą STI571 i byłyby skuteczne również w przypadkach wystąpienia oporności. Niniejszy artykuł jest przeglądem najnowszej literatury na ten temat.

#### Słowa kluczowe:

**STI571 • inhibitory kinaz • terapia celowana • kinaza Bcr-Abl • przewlekła białaczka szpikowa**

#### Summary

STI571 (imatinib; Gleevec®) was developed to specifically target the tyrosine kinase activity of the Bcr-Abl protein in Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia (CML). It also inhibits the activity of c-Kit and PDGFR. It is the first-line drug for newly diagnosed CML, with remarkable efficacy to patients in the chronic phase of this cancer. However, CML patients in the accelerated phase or blast crisis often relapse due to drug resistance. STI571 fails to eradicate leukemic stem cells, and *BCR-ABL*<sup>+</sup> cells remain detectable in the majority of patients. The necessity for alternative or additional treatment for STI571-resistant leukemia resulted in the development of a second generation of drugs for targeted therapies. In this review a literature overview of the alternative inhibitors which were designed to override STI571 resistance and decrease the aberrant kinase activity of Bcr-Abl protein with higher efficiency is presented.

#### Key words:

**STI571 • kinase inhibitors • target therapy • Bcr-Abl kinase • chronic myeloid leukemia**

#### Full-text PDF:

[http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol\\_60/9991.pdf](http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_60/9991.pdf)

#### Word count:

4420

#### Tables:

1

#### Figures:

1

#### References:

53

\* Artykuł przeglądowy opracowano w ramach prac realizowanych w projekcie badawczym 502-11-444 finansowanym przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi.

**Adres autorki:** dr hab. Małgorzata Czyż, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Zakład Biologii Molekularnej Nowotworów, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź; e-mail: mczyz@csk.umed.lodz.pl

**Wykaz skrótów:** **32Dcl3** – linia komórkowa mysiej białaczki szpikowej; **Akt** – kinaza serynowo-treoninowa; **ALL** – ostra białaczka limfoblastyczna (acute lymphoblastic leukaemia); **AMN107** – inhibitor kinazy Bcr-Abl, pochodna fenyloaminopirymidyny (nilotinib); **AP23464** – inhibitor kinazy Bcr-Abl; **Ba/F3** – linia komórkowa mysiej białaczki limfatycznej; **BAY 43-9006** – inhibitor kinazy B-raf, (sorafenib); **Bcl-X<sub>L</sub>** – białko o funkcji antyapoptotycznej; **Bcr-Abl** – onkogenna kinaza tyrozynowa, produkt genu fuzyjnego *BCR-ABL*; **Bim** – białko apoptotyczne, należące do rodziny białek Bcl-2; **Birb796** – inhibitor kinazy p38; **Blk** – kinaza tyrozynowa (B lymphoid tyrosine kinase); **BMS-354825** – inhibitor kinaz Bcr-Abl, PDGFR i kinaz z rodziny Src (dasatinib); **CI-1040** – inhibitor kinazy MEK; **c-Kit** – receptor o aktywności kinazy tyrozynowej; **CML** – przewlekła białaczka szpikowa (chronic myelogenous leukaemia); **c-Myc** – czynnik transkrypcyjny; **Crkl** – białko o funkcji adaptorowej, substrat kinazy Bcr-Abl; **EGF** – czynnik wzrostu nabłonka; **FDA** – Amerykańska Agencja do spraw Żywności i Leków (Food and Drug Administration); **FGF** – czynnik wzrostu fibroblastów; **Fyn** – kinaza z rodziny Src; **GIST** – nowotwór podścieliska przewodu pokarmowego (gastrointestinal stromal tumor); **HDAC6** – deacetylaza histonów 6 (histone deacetylase 6); **HL-60** – linia komórek ludzkiej białaczki mieloblastycznej; **hOCT1** – białko transportowe (human organic cation transporter 1); **Hsp90** – białko szoku cieplnego (heat shock protein 90); **K562** – linia komórkowa ludzkiej przewlekłej białaczki szpikowej; **KBM5** – linia komórek ludzkiej przewlekłej białaczki szpikowej, pozbawionych chromosomu 9; **KBM7** – linia komórkowa ludzkiej przewlekłej białaczki szpikowej; **LAMA-84** – linia komórkowa ludzkiej przewlekłej białaczki szpikowej; **LBH589** – inhibitor deacetylazy histonów; **Lyn** – kinaza z rodziny Src; **MDR-1** – gen oporności wielolekowej (multidrug resistance 1); **MEK1/2** – kinaza białkowa aktywowana mitogenami, której aktywność regulują czynniki pozakomórkowe (mitogen-activated protein/extracellular signal regulated kinase); **NS-187** – inhibitor kinaz Bcr-Abl, Fyn i Lyn; **ON012380** – inhibitor kinaz Bcr-Abl, PDGFR i Lyn; **p27** – białkowy inhibitor kinaz cyklinozależnych; **p38 $\alpha$**  – kinaza z rodziny MAPK; **PD98059** – inhibitor kinazy MEK; **PDGFR  $\alpha$ ,  $\beta$**  – receptor  $\alpha$ ,  $\beta$  płytkopochodnego czynnika wzrostu (platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$ ,  $\beta$ ); **Ph** – chromosom Filadelfia; **Raf** – kinaza serynowo-treoninowa; **Src** – rodzina niereceptorowych kinaz tyrozynowych; **STAT** – czynniki transkrypcyjne, grupa białek biorących udział w przekazywaniu informacji oraz aktywacji transkrypcji genów (signal transducer and activator of transcription); **STI571** – inhibitor kinaz tyrozynowych Bcr-Abl, c-Kit oraz PDGFR (signal transduction inhibitor 571); **T-ALL** – ostra białaczka limfoblastyczna T-komórkowa (T-cell acute lymphoblastic leukemia); **U0126** – inhibitor kinazy MEK; **YES** – kinaza z rodziny Src.

## WSTĘP

Terapia celowana jako terapia przeciwnowotworowa ma już swoją kilkuletnią historię stosowania w klinikach. Jest skierowana głównie przeciw nowotworom, w których proces transformacji zależy przede wszystkim od podwyższonej aktywności jednego białka, zwykle będącego elementem dróg przekazywania sygnałów. Do chwili obecnej, kilkadziesiąt niskocząsteczkowych związków lub monoklonalnych przeciwciał zostało zarejestrowanych jako leki albo jest przedmiotem badań klinicznych. Duża swoistość działania leków tego rodzaju w stosunku do określonych celów molekularnych w komórkach nowotworowych oznacza, że są one dużo mniej toksyczne dla pacjentów i mają mniejsze działania niepożądane niż związki stosowane w konwencjonalnej chemioterapii.

Początkowo poszukiwania niskocząsteczkowych inhibitorów szlaków sygnałowych, głównie kinaz tyrozynowych, skierowane były na zablokowanie aktywności kinazowej przez współzawodniczenie z cząsteczką ATP o miejsce wiązania. Konformacja miejsca wiązania ATP jest jednak bardzo podobna w wielu kinazach i stąd trudno było zna-

leźć inhibitor wysoce swoisty. W celu osiągnięcia swoistości oddziaływań między ściśle określoną kinazą i niskocząsteczkowym inhibitorem, poszukiwania zostały skierowane na możliwość oddziaływania inhibitora z resztami aminokwasowymi, które znajdują się w bezpośrednim sąsiedztwie miejsca wiązania ATP [16,48]. Do pierwszych inhibitorów kinaz, których działanie nie polegało na współzawodniczeniu z ATP o miejsce wiązania, należały związki PD98059 [9] i U0126 [10]. Te dwa związki oraz kolejny CI-1040, są swoistymi inhibitorami MEK [34]. Wydaje się, że mechanizm ich działania, polega na wiązaniu się w sąsiedztwie miejsca przyłączenia ATP, co wywołuje zmiany konformacyjne w kinazie uniemożliwiające przejście enzymu w ufosforylowaną postać, katalitycznie aktywną. Sekwencja aminokwasowa wiążąca inhibitor jest unikatowa dla kinaz MEK, co gwarantuje dużą swoistość hamowania szlaków sygnałowych uruchamianych przez te kinazy. Kolejne inhibitory, które były projektowane z myślą o hamowaniu aktywności określonych kinaz, Birb796 dla kinazy p38 $\alpha$ , sorafenib (Nexavar<sup>®</sup>, BAY 43-9006) dla kinazy B-raf oraz STI571 (Gleevec<sup>®</sup>, imatinib) dla kinazy Abl, wiążąc się z kinazami wywoływały takie zmiany konformacyjne, które utrwalały stan nieaktywny białka.

W ostatniej dekadzie poszukiwania leków skutecznych w leczeniu pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową (chronic myeloid leukemia – CML) obejmowały głównie trzy obszary: hamowanie ekspresji genu na poziomie translacji przez zastosowanie strategii antysensowych, stymulowanie układu immunologicznego do rozpoznawania i niszczenia komórek białaczkowych oraz modulowanie funkcji kinaz przez zastosowanie swoistych inhibitorów. Strategie antysensowe i rybozomy, mimo interesujących podstaw teoretycznych, okazały się mało skuteczne [47], a terapia interferonem  $\alpha$  była w wielu przypadkach bardzo toksyczna dla pacjentów [12].

STI571 (Gleevec<sup>®</sup>, imatinib) jest niewątpliwie najskuteczniejszym lekiem stosowanym w leczeniu pacjentów chorych na przewlekłą białaczkę szpikową. Najlepsze wyniki leczenia uzyskuje się w przewlekłej fazie tej choroby. STI571 jest również stosowany w leczeniu pacjentów z nowotworem przewodu pokarmowego, GIST. Po 5 latach stosowania leku w terapii przeciwnowotworowej można już odnotować pewne ograniczenia. Jeden z twórców związku, dr Druker na konferencji ASCO w 2006 r. stwierdził, że w grupie pacjentów, którym STI571 zaczęto podawać 5 lat temu, u 18% stwierdzono progresję choroby, która u części z nich zakończyła się śmiercią, a 5% pacjentów musiało przerwać leczenie z powodu działań niepożądanych. Wiele uwagi poświęca się rozwojowi oporności wtórnej jako wynikowi stosowania STI571 w terapii przeciw CML oraz GIST [2,25]. Wykazano również, że białaczkowe komórki macierzyste zawierające chromosom Filadelfia (Ph+), pochodzące z krwi obwodowej pacjentów chorych na CML są niewrażliwe na STI571 [14]. Stosując STI571 nie można całkowicie usunąć komórek *BCR-ABL*<sup>+</sup> [29]. Ponadto, związek ten powoduje obniżenie poziomu prawidłowych, hematopoetycznych komórek progenitorowych [1]. Uważa się, że STI571 jest lekiem dobrze tolerowanym, chociaż u wielu pacjentów stwierdza się efekty niepożądane w postaci wysypki, obrzęków, nudności, wymiotów i biegunki, a także objawy mielosupresji, głównie pod postacią neutropenii i małopłytkowości [15]. Pojawiają się również doniesienia o nowych zagrożeniach stosowania STI571. Opisano 10 przypadków poważnych problemów kardiologicznych [20]. Więcej informacji na temat kinazy Bcr-Abl, przewlekłej białaczki szpikowej (CML), struktury i sposobu działania STI571, oraz molekularnego podłoża oporności na ten lek można znaleźć w naszym artykule opublikowanym w tym samym tomie, natomiast profil farmakokinetyczny leku jest wyczerpująco opisany w artykule Peng i wsp. [35].

Pięcioletnie stosowanie STI571 to także dobra lekcja, która przyniosła wiele pomysłów na „lepsze” leki przeciwnowotworowe, przede wszystkim niskocząsteczkowe związki z grupy terapeutyków celowanych. Wiele cennych informacji dostarczyła analiza struktury krystalicznej kompleksu STI571 z kinazą Abl [37]. Pozwoliła ona na identyfikację aminokwasów istotnych w wiązaniu STI571, których substitucja w wyniku mutacji może osłabić oddziaływanie kinazy z lekiem, nie ograniczając wiązania ATP lub aktywności kinazy. Trwają poszukiwania nowych inhibitorów Bcr-Abl na bazie STI571, ale nie tylko. Wiodącą rolę odgrywa firma Novartis Pharmaceuticals, w której powstał STI571, ale pewne sukcesy można przypisać również innym firmom farmaceutycznym i niezależnym ośrodkom badaw-

czym. Niniejszy artykuł jest przeglądem najnowszej literatury na temat alternatywnych dla STI571 inhibitorów kinazy Bcr-Abl. Wiele spośród nich znajduje się w I lub II fazie badań klinicznych. I chociaż wyniki są obiecujące, oczywiście brak jest danych na temat skuteczności oraz bezpieczeństwa ich stosowania w dłuższej perspektywie.

Poszukiwania związków o wyższej aktywności hamującej w stosunku do kinazy Bcr-Abl zmierzają zasadniczo w trzech kierunkach. W pierwszym, założeniem jest taka modyfikacja struktury STI571, aby nastąpiło zwiększenie powinowactwa związku do kinazy i jej zmutowanych postaci. W drugim przeciwnie, uważa się, że zmniejszenie swoistości działania przez umożliwienie oddziaływania z aktywną postacią Bcr-Abl, pozwoli na wzrost efektywności również w stosunku do postaci zmutowanych. W pierwszym przypadku najbardziej obiecującym jak dotąd okazał się AMN107 (nilotinib), w drugim BMS-354825 (dasatinib). W obu przypadkach głównym celem jest znalezienie leku, który mógłby zostać zastosowany u pacjentów z opornością na STI571 lub nawet całkowicie zastąpić ten lek w leczeniu chorych na CML. Wreszcie całkowicie odmienne podejście mające na celu rozwiązanie problemu oporności na STI571, polega na poszukiwaniu inhibitora Bcr-Abl współzawodniczącego o miejsce wiązania z substratem, a nie z ATP. Ten sposób rozumowania doprowadził do syntezy związku ON012380.

#### **INHIBITORY BCR-ABL BĘDĄCE MODYFIKACJĄ STI571: AMN107 (NILOTINIB) I NS-187**

Wśród ostatnio zsyntetyzowanych związków wyróżnia się AMN107 (nilotinib; Novartis Pharmaceuticals), który pod względem chemicznym, podobnie jak STI571 jest pochodną fenyloaminopirymidyny (ryc. 1; tabela 1). Synteza tego związku została oparta na racjonalnych przesłankach wynikających z analizy struktury krystalicznej kompleksów Abl-STI571. Poszukiwania zostały skierowane na zastąpienie grupy metylopiperydylowej, która korzystnie wpływa na rozpuszczalność STI571, ale nie ma istotnego znaczenia w wiązaniu tego leku z kinazą Bcr-Abl. AMN107, który powstał w wyniku tych modyfikacji, swoiście wiąże się w kieszeni ATP kinazy Bcr-Abl w jej nieaktywnej konformacji i efektywniej niż STI571 hamuje jej aktywność ( $IC_{50}=20-60$  nM dla AMN107,  $IC_{50}=120-470$  nM dla STI571) [49]. Z niższą wydajnością AMN107 wiąże się z receptorami PDGF oraz kinazą c-Kit [38]. Badania krystalograficzne kompleksu AMN107-Abl wykazały, że związek ten jest lepiej dopasowany do struktury kinazy i stąd prawdopodobnie jego wyższe niż STI571 powinowactwo do Bcr-Abl [49]. Podobny do STI571 sposób wiązania AMN107 mógłby wskazywać na brak oddziaływania AMN107 ze zmutowanymi postaciami kinazy Bcr-Abl, które są przyczyną oporności na STI571. Stąd efekt działania AMN107 i STI571 porównano na liniach komórkowych opornych (KBM5-STI571<sup>R1.0</sup> i KBM7-STI571<sup>R1.0</sup>) oraz wrażliwych (KBM5 i KBM7) na działanie STI571. Oporność na STI571, występująca w użytych do badań liniach komórkowych, była konsekwencją zwiększenia puli aktywnej kinazy Bcr-Abl wskutek amplifikacji genu (KBM7-STI571<sup>R1.0</sup>), lub mutacji punktowej T315I w obrębie pętli wiązania ATP (KBM5-STI571<sup>R1.0</sup>). W przypadku wszystkich analizowanych linii komórkowych wykazano, że AMN107 jest silniejszym inhibitorem proliferacji

komórek w porównaniu do STI571. Praktycznie nie odnotowano żadnej aktywności obu związków w stosunku do komórek KBM5-STI571<sup>R1.0</sup>. Wyniki sugerują, że AMN107 ma silniejsze właściwości antyproliferacyjne w stosunku do komórek, w których oporność na STI571 wynika ze zmian ilościowych, a nie jakościowych [13]. W badaniach z zastosowaniem linii komórkowych transfekowanych BCR-ABL wykazano, że AMN107 jest 10–25 razy bardziej aktywnym inhibitorem proliferacji w porównaniu do STI571. Zahamowanie wzrostu komórek w hodowli korelowało z indukcją procesu apoptozy. Ponadto, badania dowiodły wysokiej aktywności AMN107 w hamowaniu autofosforylacji kinazy Bcr-Abl [32,47,49]. Analiza Western-blot wykazała znaczącą redukcję autofosforylacji tyrozyny w pozycji 117 i 412 po zastosowaniu 50 nM stężenia AMN107. Nie odnotowano zmian w poziomie fosforylacji Tyr735. Dla porównania, zastosowanie STI571 nawet w stężeniu 200 nM, nie powodowało zmian w poziomie fosforylacji Tyr117 i Tyr412. Właściwość ta wydaje się szczególnie ważna w świetle ostatnich odkryć, które wskazują na istotną rolę Tyr177 w patogenezie CML, ze względu na zależną od stanu jej ufosforylowania aktywację wielu dróg sygnałowych [27]. Badania z wykorzystaniem linii komórkowych opornych na STI571 posłużyły do określenia wrażliwości poszczególnych mutantów na działanie AMN107. Oceniając poziom autofosforylacji kinazy oraz fosforylacji jej białek efektorowych, wykazano zróżnicowaną aktywność AMN107 w stosunku do analizowanych mutantów. Dużą wrażliwość ( $IC_{50} \leq 70$  nM;  $IC_{90} \leq 165$  nM) odnotowano u 10 z 16 mutantów (M244V, G250E, Q252H, F311L, F317L, M351T, V379I, L387M, H396P, H396R), umiarkowaną wrażliwość ( $IC_{50} \leq 200$  nM;  $IC_{90} \leq 485$  nM) odnotowano u 3 z 16 (Y253F, E255K, F359V) oraz małą wrażliwość ( $IC_{50} \leq 450$  nM;  $IC_{90} \leq 2$   $\mu$ M) zaobserwowano u 2 mutantów (Y253H, E255V) [32,49]. Podobnie, jak w przypadku STI571 oraz wielu innych inhibitorów Bcr-Abl, AMN107 okazał się nieaktywny względem kinazy, w której tyrozyna w pozycji 315 została zastąpiona izoleucyną, Bcr-Abl<sup>T315I</sup>. Komórki z mutacją T315I pozostawały odporne na działanie AMN107 nawet po zastosowaniu stężenia 10  $\mu$ M [49]. Przy stężeniu niższym niż 100 nM, AMN107 nie wpływał na prawidłowe komórki progenitorowe hodowane *in vitro*, co wskazywało na potencjalnie małą toksyczność związku.

Niestety stwierdzono, że 100 nM AMN107 także może wywołać oporność [26]. Interesujące wyniki uzyskano badając aktywność AMN107 w indukowaniu mutacji w Bcr-Abl [44]. Pojawienie się klonów niewrażliwych na związek stosowany w stężeniu 400 nM badano w hodowlach mysich komórek Ba/F3. AMN107 indukował mniej mutacji niż STI571. Niektóre z nich były takie same dla obu związków, np. Q252H, Y253H, E255K(V), F311I, T315I, S349L i F359I(V). Z wyjątkiem mutacji T315I, wszystkie pojawiające się mutacje ulegały supresji po zastosowaniu stężenia 2  $\mu$ M, co odpowiada dawce 400 mg dziennie. Wyniki te wskazują na możliwość pojawienia się mutacji w trakcie leczenia z zastosowaniem AMN107, chociaż tylko mutacja T315I wydaje się przeszkodą w kontynuowaniu terapii.

Przeprowadzono również badania efektów stosowania AMN107 w kombinacji z LBH589, inhibitorem deacetyazy histonów, w komórkach CML linii K562 i LAMA-84 oraz

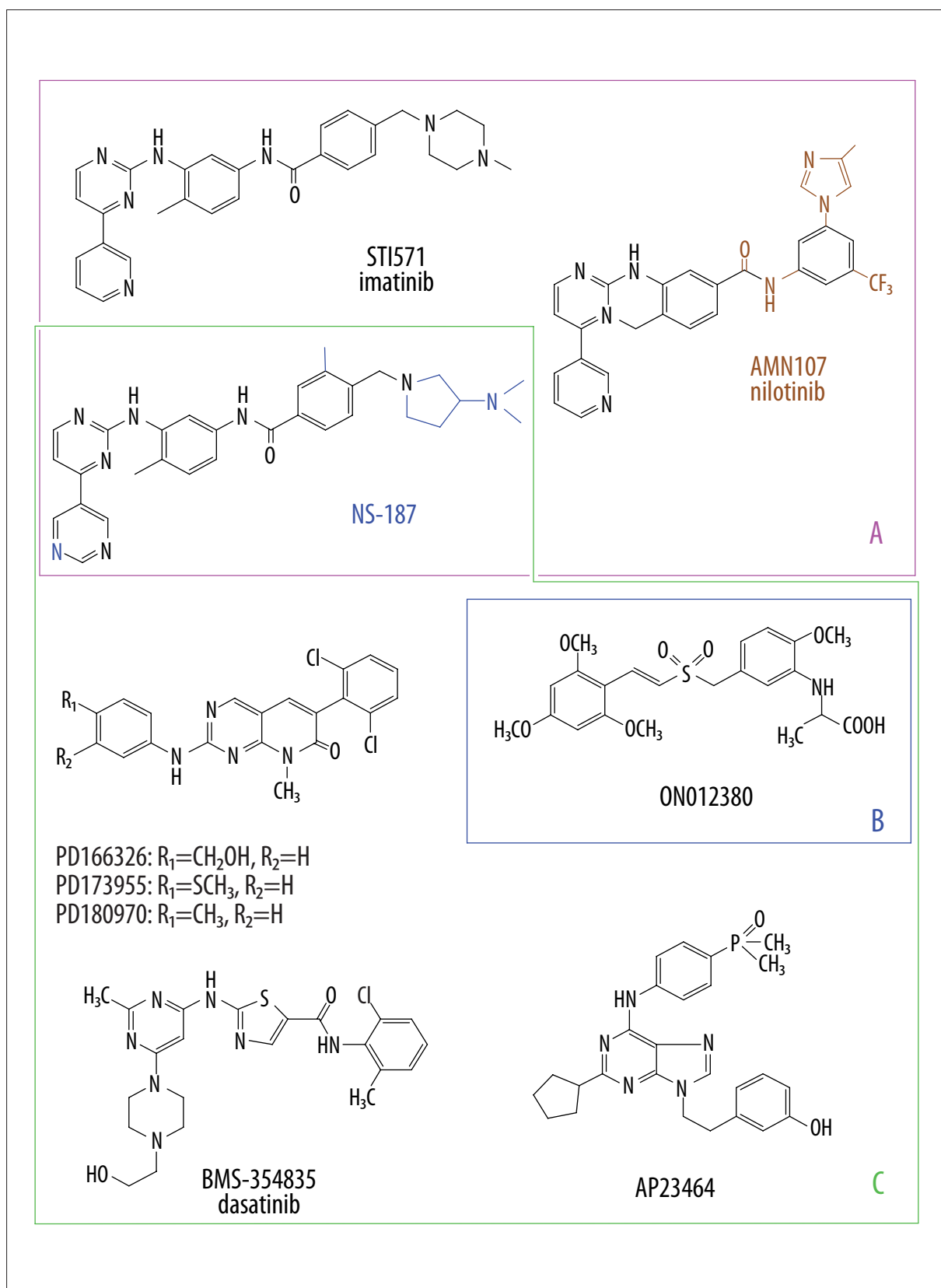
komórkach hodowli pierwotnej CML [11]. Stwierdzono, że AMN107 wydajniej niż STI571 hamował aktywność Bcr-Abl oraz białek, które są aktywowane przez tę kinazę, pośrednio lub bezpośrednio. Obserwowano wyższe niż w przypadku stosowania STI571 obniżenie aktywności STAT-5, Akt, Bcl-X<sub>L</sub> oraz c-Myc. W kombinacji z LBH589, AMN107 działał synergistycznie i poza wcześniej obserwowanymi efektami odnotowano wzrost poziomu p27 i Bim. Obserwowano również obniżenie poziomu Bcr-Abl oraz indukcję apoptozy w hodowlach pierwotnych komórek CML, opornych na STI571, nawet z mutacją T315I. Jednym z proponowanych mechanizmów leżących u podłoża synergistycznego działania obu związków jest hamowanie szlaków antyapoptotycznych. Możliwy jest również udział LBH589 w hamowaniu HDAC6, co prowadzi do acetylacji Hsp90, co z kolei zmniejsza stabilność Bcr-Abl, c-Raf i Akt oraz prowadzi do proteosomalnej degradacji tych białek. W ten sposób można wytłumaczyć wrażliwość komórek CML, w których występują zmutowane postaci Bcr-Abl, takie jak T315 na stosowane w kombinacji AMN107 i LBH589.

Różnice między STI571 i AMN107 obserwowano nie tylko w skuteczności hamowania aktywności mutantów Bcr-Abl, ale także w sposobie ich transportu do komórek. Transport STI571 zależy od hOCT1, podczas gdy AMN107 wydaje się niezależny od tego transportera [51]. Również podwyższona ekspresja *MDR 1* wydaje się w mniejszym stopniu wpływać na poziom AMN107 niż na poziom STI571. Komórki z podwyższoną ekspresją *MDR 1*, pozyskane od 3,5-rocznego pacjenta z T-ALL, hodowano w obecności STI571 lub AMN107 i zaobserwowano prawie 4-krotnie wyższy poziom AMN107 w porównaniu z STI571 [24].

Obiecujące wyniki uzyskano w badaniach *in vivo*. Wstępne badania przeprowadzone na zwierzętach wykazały, że AMN107 jest związkiem o korzystnym profilu farmakokinetycznym, dobrze wchłanianym po podaniu doustnym oraz dobrze tolerowanym przez organizm. Zastosowanie AMN107 powodowało wydłużenie okresu przeżycia u myszy, którym wprowadzono komórki linii mysiej białaczki 32D, transfekowane genem *BCR-ABL*. Dodatkowym efektem działania AMN107 była znaczne obniżenie akumulacji komórek białaczkowych w szpiku kostnym, śledzionie, wątrobie oraz w węzłach chłonnych. Ten sam efekt osiągnięto w mysim modelu białaczki CML odpornej na STI571. Zastosowanie dawki w wysokości 400 mg było wystarczające do uzyskania w surowicy stężenia leku odpowiedniego do zahamowania autofosforylacji kinazy Bcr-Abl, oraz proliferacji komórek Bcr-Abl-pozytywnych, w przypadku większości analizowanych mutantów [49].

Niedawno opublikowane badania kliniczne wskazują, że AMN107 jest skuteczny w leczeniu pacjentów z CML opornych na STI571 [19]. Do badań zakwalifikowano 119 pacjentów chorych na CML opornych na STI571 lub pacjentów chorych na ALL i podawano im AMN107 w dawce 50–1200 mg raz dziennie lub 400 i 600 mg dwa razy dziennie. Z 33 pacjentów w fazie zaostrożenia blastycznego, u 13 stwierdzono odpowiedź hematologiczną, a u 9 odpowiedź cytogenetyczną. Spośród 46 pacjentów w fazie przyspieszonej CML, u 33 uzyskano odpowiedź hematologiczną, a u 22 cytogenetyczną. U prawie wszystkich pacjentów (11/12) w fazie przewlekłej choroby CML





Ryc. 1. Wzory chemiczne alternatywnych dla STI571 inhibitorów kinazy Bcr-Abl. W ramce A (kolor różowy) znajdują się pochodne fenyloaminopiryminy, nieznacznie różniące się od STI571. Te różnice w strukturze zostały zaznaczone dla AMN107 kolorem brązowym, a dla NS-187 kolorem niebieskim. Ramka C (kolor zielony) obejmuje związki, które są podwójnymi inhibitorami. Poza kinazą Bcr-Abl inhibitory te hamują również aktywność innych kinaz, głównie z rodziny Src. Poza ON012380, który wiąże się w miejscu rozpoznawanym przez substrat (ramka B, niebieska) wszystkie pozostałe inhibitory Bcr-Abl przyłączane są w kieszeni wiążącej ATP

Tabela 1. Porównanie niektórych alternatywnych inhibitorów kinazy Bcr-Abl z STI571

	<b>STI571 Imatinib; Gleevec</b>	<b>AMN107 Nilotinib</b>	<b>NS-187</b>	<b>PD166326</b>	<b>BMS-354825 Dasatinib Sprycel</b>	<b>ON012380</b>
Produkt firmy	Novartis Pharmaceuticals	Novartis Pharmaceuticals	Innovive Pharmaceuticals	Sloan-Kettering	Bristol-Myers Squibb	Onconova Therapeutics
Struktura chemiczna	pochodna fenylo-aminopirymidyny	pochodna fenylo-aminopirymidyny	pochodna fenylo-aminopirymidyny	pochodna pirydyl-pirymidyny	pochodna aminopirymidyny	całkowicie odmienna
Swoistość wiązania	konformacja nieaktywna Bcr-Abl	konformacja nieaktywna Bcr-Abl	Bcr-Abl, Lyn i Fyn	Bcr-Abl, kinazy Src, receptory PDGF, EGF, FGF	Bcr-Abl, kinazy Src, receptory PDGF	Bcr-Abl, PDGFR, Lyn
Miejsce wiązania inhibitora	kieszień ATP	kieszień ATP	kieszień ATP	kieszień ATP	kieszień ATP	miejsce wiązania substratu
Hamowanie proliferacji (IC <sub>50</sub> )	200–300 nM	<30 nM	<10 nM	<10 nM	<1 nM	<10 nM
Indukuje mutacje punktowe	tak	tak	brak danych	tak		brak danych
Aktywny w stosunku do mutantów Bcr-Abl <sup>1</sup>	nie	tak, z wyjątkiem T315 i przy wyższych stężeniach	tak, z wyjątkiem T315I	tak, z wyjątkiem T315I	tak, z wyjątkiem T315I	tak, nawet T315I
Badania kliniczne/status leku	lek	badania kliniczne II faza	brak danych	brak danych	lek	brak danych
Usuwa całkowicie komórki BCR-ABL <sup>+</sup>	nie	brak danych	brak danych	nie	brak danych	brak danych
Potencjalne problemy	kardiotoksyczność	brak danych	brak danych	brak danych	brak danych	brak danych

<sup>1</sup> Zmutowane postaci kinazy Bcr-Abl pojawiły się wskutek selekcji w obecności STI571.

uzyskano pełną remisję hematologiczną. Badania farmakokinetyczne przeprowadzone u pacjentów otrzymujących dawkę 400 mg dziennie wykazały, że maksymalny poziom AMN107 w osoczu wynosi 1,7–3,6 µM, a okres połowicznego rozpadu wynosi 15 godzin.

Badania kliniczne sugerują, że AMN107 może zastąpić STI571 w przypadkach pojawiającej się oporności, z wyjątkiem oporności wynikającej z mutacji punktowej prowadzącej do substytucji T315I lub amplifikacji genu *BCR-ABL*. Może stać się też lekiem z wyboru, z tym że podobnie jak w przypadku STI571 należy oczekiwać, że jego dłuższe stosowanie może spowodować rozwój oporności [50].

NS-187 (CNS-9; Novartis Pharmaceuticals), podobnie jak AMN107, powstał w wyniku modyfikacji cząsteczki STI571 (ryc. 1; tabela 1) [21]. Jest efektywnym inhibitorem nie tylko kinazy Bcr-Abl, ale hamuje również 12 spośród 13 zmutowanych postaci kinazy Bcr-Abl. Wyjątek stanowi kinaza z mutacją T315I. Również w badaniach *in vivo* NS-187 przedłużał życie myszom z wszczepionymi komórkami nowotworowymi, w których występowały mutacje w Bcr-Abl, z wyjątkiem mutacji prowadzącej do substytucji T315I [31]. NS-187 jest także inhibitorem kinaz Lyn i Fyn, ale nie wpływa na aktywność PDGFR, c-Src, Blk i YES. Ograniczona zdolność hamowania aktywności kinaz Src jest zaletą NS-187, gdyż należy oczekiwać

mniej skutków ubocznych. Jednocześnie hamujące działanie w stosunku do kinazy Lyn pozwala przypuszczać, że NS-187 może się okazać skuteczny w przypadkach oporności na STI571, wynikającej z podwyższonego poziomu białka Lyn [6]. Można więc ten związek zaliczyć do tzw. podwójnych inhibitorów.

#### PODWÓJNE INHIBITORY

STI571 wiąże się wyłącznie z nieaktywną konformacją kinazy Bcr-Abl. Nieaktywna konformacja Bcr-Abl jest unikatowa i stąd duża swoistość wiązania STI571, natomiast aktywna konformacja tej kinazy jest podobna do aktywnych konformacji wielu innych kinaz np. Src. W toku badań okazało się, że niektóre inhibitory kinaz Src wykazują aktywność hamującą w stosunku do kinazy Bcr-Abl. Wśród nich należy wymienić analogi pirydyl[2,3-d]pirymidyny np. związki PD166326, PD173955, PD180970. PD166326 (Sloan-Kettering) został początkowo opisany jako inhibitor receptorów czynnika wzrostu fibroblastów (FGF), nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF), płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGF) oraz jako inhibitor kinaz Src [22]. Natomiast spokrewnione z nim strukturalnie pochodne PD180970 i PD173955 zostały zidentyfikowane w badaniach *in vitro* jako inhibitory kinazy Abl i Bcr-Abl [8,52]. W porównaniu z STI571, związki te silniej hamują fosforylację, a przez to aktywność kinazy Bcr-Abl. Wykazują bowiem

powinowactwo zarówno do aktywnej, jak i do nieaktywnej postaci kinazy. Badania wykazały, że PD173955 wiąże się z kinazą Bcr-Abl niezależnie od stanu jej fosforylacji i konformacji, jaką przyjmuje pętla aktywacji A [30]. Ponadto, utrata regionu regulacyjnego, która jest przyczyną konstytutywnej aktywności kinazy Bcr-Abl, dodatkowo sprzyja oddziaływaniu z PD173955. Pomimo słabszych oddziaływań PD173955 z kieszenią katalityczną kinazy Bcr-Abl w porównaniu do STI571 (tylko 2 wiązania wodorowe zamiast 6 oraz mniej oddziaływań typu van der Waalsa), PD173955 hamował jej aktywność już przy stężeniu niższym niż 100 nM [4]. Profil farmakokinetyczny związku był jednak niesatisfakcjonujący i rozpoczęto poszukiwania inhibitora o lepszej rozpuszczalności, wybiórczości i aktywności.

Wśród nowo zsyntetyzowanych związków na uwagę zasługuje PD166326 (ryc. 1; tabela 1). Wykazuje on czterokrotnie wyższą aktywność hamującą w stosunku do kinazy Bcr-Abl w porównaniu do PD173955. Ponadto, związek ten wydajniej niż STI571 hamuje kinazę c-Kit i Lyn [53]. 50% zahamowanie proliferacji komórek linii K562 było osiągnięte już przy stężeniu 300 pM [18]. Modyfikacja polegająca na przyłączeniu do pierścienia fenylowego podstawnika metylohydroksylowego w miejsce metylotioeterowego umożliwiła powstanie dodatkowego wiązania wodorowego z tyrozyną w pozycji 319 i przez to silniejsze oddziaływanie PD166326 z kinazą Bcr-Abl [52]. Jednak modelowanie krystalograficzne wykazało, że pomimo tego dodatkowego wiązania wodorowego, w oddziaływaniu PD166326 z kinazą uczestniczy o połowę mniej aminokwasów, w porównaniu z liczbą aminokwasów tworzących wiązania z STI571. Prawdopodobnie to właśnie jest przyczyną, że PD166326 wykazuje aktywność hamującą w stosunku do mutantów, wobec których STI571 traci swoje właściwości [53]. W hodowlach komórkowych przeprowadzono również analizę mutacji, które pojawiają się w obecności PD166326 [46]. Liczba pojawiających się klonów niewrażliwych na PD166326 była mniejsza niż dla STI571. Ponadto, nie wszystkie mutacje były identyczne z tymi otrzymanymi w wyniku selekcji w obecności STI571. Te, które były wspólne dla obu związków można było wyciszyć przez zastosowanie większego stężenia PD166326 w hodowlach komórkowych. Tylko trzy mutacje powodujące substytucje fenyloalaniny w pozycji 317 były całkowicie odporne na działanie PD166326, ale z kolei mogły zostać wyciszone przez STI571. Wynika z tego, że PD166326 i STI571 można stosować w kombinacji, aby wyeliminować przypadki oporności spowodowane różnymi mutacjami.

W badaniach *in vivo* przeprowadzonych na modelach mysich stwierdzono, że podawany doustnie PD166326 był dobrze tolerowany i szybko osiągał stężenie konieczne do hamowania aktywności Bcr-Abl [53]. Niestety klony *BCR-ABL*<sup>+</sup> były ciągle obecne po 4-tygodniowej terapii.

Inny związek z tej grupy, PD180970, wykazuje powinowactwo do kinazy Bcr-Abl z mutacjami w pętlach A i P, które są odpowiedzialne za rozwój oporności na STI571 u pacjentów w zaawansowanych stadiach CML. Substytucja histydyny proliną w pozycji 396 kinazy stabilizuje jej „otwartą”, aktywną konformację. Mutacja ta zaburza oddziaływanie kinazy z STI571, który może wiązać się tylko z kinazą w konformacji nieaktywnej, natomiast nie zmienia powinowactwa do PD180970. W efekcie obserwuje się

jednakową wrażliwość komórek typu dzikiego oraz komórek z mutacją H396P na działanie PD180970. Ponadto, PD180970 pozostaje aktywny w stosunku do innych mutacji w obrębie pętli P, odnotowanych u pacjentów opornych na STI571, tj. E255K, E255V, Y253F, Q252H [45]. Prawdopodobnie obniżenie wrażliwości komórek na działanie STI571, spowodowany wystąpieniem opisanych mutacji, wiąże się z niezdolnością zmutowanej pętli P do przyjęcia ściśle określonej konformacji wymaganej do związania STI571. Mutacje te w mniejszym stopniu wpływają na efektywność wiązania PD180970, który oddziałuje z kinazą Bcr-Abl niezależnie od jej konformacji [23].

Wszystkie z opisanych pochodnych pirydylopirymidyny, podobnie jak STI571, pozostają nieaktywne w stosunku do zmutowanej kinazy Bcr-Abl<sup>T315I</sup>. Wynika z tego, że treonina w pozycji 315 jest istotna zarówno w oddziaływaniu z STI571, jak i z pochodnymi pirydylopirymidyny. Aminokwas ten umożliwia powstanie wiązania wodorowego stabilizującego oddziaływanie między kinazą Bcr-Abl a STI571, a w przypadku pochodnych pirydylopirymidyny uczestniczy w oddziaływaniach typu van der Waalsa [23]. Dodatkowym efektem substytucji treoniny izoleucyną jest zawada steryczna uniemożliwiająca właściwe przestrzenne oddziaływanie pochodnych pirydylopirymidyny z onkogenym białkiem [45].

Szczególnie obiecującym związkiem w grupie „podwójnych” inhibitorów jest BMS-354825 (dasatinib; Bristol-Myers Squibb). Jest to związek o strukturze chemicznej całkowicie różnej od struktury STI571 (ryc. 1). Podobnie jak pochodne pirydylopirymidynowe, BMS-354825 wiąże obie formy Abl, nieaktywną i aktywną [42,43]. Stąd możliwość oddziaływania z niektórymi kinazami Src, które mają podobne konformacje form aktywnych. Oczekiwano zatem wyższej aktywności, ale i mniejszej swoistości działania, w tym również wzrostu aktywności w stosunku do zmutowanych postaci kinazy Bcr-Abl. Odnotowano stukrotnie wyższą aktywność hamującą BMS-354825 w porównaniu do aktywności STI571 w stosunku do kinazy Bcr-Abl (tabela 1). Ponadto, związek ten okazał się skutecznym inhibitorem 14 z 15 analizowanych mutantów kinazy. Wyjątek stanowiła ponownie mutacja T315I, która powodowała powstanie kinazy odpornej na działanie BMS-354825, nawet po zastosowaniu mikromolowych stężeń związku [33,47]. Istotną cechą BMS-354825 jest zdolność do eliminacji komórek *BCR-ABL*<sup>+</sup> na wcześniejszych etapach ich rozwoju. Wykazano, że pod tym względem związek ten jest bardziej skuteczny niż STI571, ale podobnie jak STI571 nie usuwa komórek macierzystych CML [5,29]. Stosowanie BMS-354825 w kombinacji z STI571 w mysich liniach komórkowych Ba/F3 z ekspresją natywnej lub zmutowanej kinazy Bcr-Abl dawało efekt addytywny [33]. Nawet, jeżeli stężenie STI571 było wysokie, nie obserwowano efektu antagonistycznego działania obu związków w kombinacji. Skojarzona terapia może się okazać bardziej skuteczna w usuwaniu komórek białaczkowych. Zastosowanie BMS-354825 oraz innych pochodnych pirydylopirymidyny, może być korzystne, gdy rozwój oporności na STI571 wiąże się z podwyższoną aktywnością kinazy Src. Jednak zahamowanie aktywności kinazy Src może być przyczyną wystąpienia działań niepożądanych [7].

Wyniki pierwszych prób klinicznych były jednak bardzo zachęcające i dowiodły wysokiej skuteczności leku.

W badaniach, do których zakwalifikowano 29 pacjentów w przewlekłej fazie choroby, opornych na terapię STI571 lub z nietolerancją na ten lek, zastosowano 9 odmiennych schematów leczenia z dzienną dawką leku 15–180 mg podawaną przez okres do 9 miesięcy [36]. BMS-354825 był dobrze tolerowany przez wszystkich pacjentów. Stężenie leku w surowicy osiągało poziom, który był wymagany do zahamowania proliferacji komórek białaczkowych *in vitro*. Po czterech tygodniach stosowania terapii w grupie 26 pacjentów, którym podawano przynajmniej 35 mg BMS-354825 lub więcej, w 19 przypadkach (73%) uzyskano całkowitą odpowiedź hematologiczną. W grupie 7 pacjentów, którym podawano mniejsze dawki leku, u dwóch nastąpiło gwałtowne pogorszenie stanu zdrowia, u pozostałych 5 zwiększono dawkę BMS-354825. Po okresie dłuższym niż 3 miesiące u 11 z 21 pacjentów uzyskano odpowiedź cytogenetyczną o różnym natężeniu. U jednego pacjenta osiągnięto pełną remisję cytogenetyczną. Podobnym badaniem poddano grupę 17 pacjentów z CML w fazie przyspieszonej (6) lub kryzy blastycznej (11). Odpowiedź hematologiczną uzyskano u 7 pacjentów w fazie zaostrzenia blastycznego oraz u 3 w fazie przyspieszonej. Odpowiedź cytogenetyczną odnotowano u 4 z 8 pacjentów w fazie kryzy blastycznej, oraz u 1 z 3 pacjentów w fazie przyspieszonej. Badania wskazują, że BMS-354825 może przełamać oporność na STI571, często obserwowaną u pacjentów w zaawansowanych stadiach CML [39]. Ostatnio opublikowane badania potwierdziły te obiecujące wyniki. BMS-354825 podawano pacjentom z CML w różnych fazach rozwoju nowotworu oraz pacjentom z ALL (Ph+), w dawce dziennej 15–240 mg [40]. Wszyscy pacjenci zakwalifikowani do badań albo nie tolerowali STI571 lub też byli na ten lek oporni. Całkowitą odpowiedź hematologiczną uzyskano u 37 z 40 pacjentów w fazie przewlekłej CML, tzw. większą odpowiedź hematologiczną uzyskano u 31 z 44 pacjentów w fazie przyspieszonej, zaostrzenia blastycznego lub pacjentów z ALL. Odpowiedź na BMS-354825 uzyskano dla wszystkich mutacji Bcr-Abl, z wyjątkiem T315I.

W czerwcu 2006 r. Komitet Doradczy FDA zarekomendował BMS-354825 do stosowania u dorosłych z opornością na STI571, we wszystkich stadiach rozwoju CML. Zalecana dawka leku wynosi 70 mg dwa razy dziennie [28]. Należy oczekiwać, że podstawowym problemem stosowania BMS-354825 mogą być działania niepożądane przedłużającego się leczenia. Ich podłożem będzie niewielka swoistość związku, który może hamować aktywność wielu kinaz. Ostateczna przydatność tego leku może być oceniona po dłuższym okresie stosowania. Jednak ostatnio opublikowane badania wskazują, że ta mała swoistość BMS-354825 może być zaletą i związek ten ma szanse znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób kardiologicznych np. przez blokowanie restenozy wynikającej z nieprawidłowej migracji i proliferacji komórek mięśni gładkich [3].

#### INHIBITORY NA BAZIE PURYN

STI571 oraz większość nowych inhibitorów Bcr-Abl, których działanie polega na hamowaniu aktywności kinazy przez wiązanie się w miejscu przyłączenia ATP, ma heterocykliczny pierścień pirymidynowy. Biorąc pod uwagę, że ATP zawiera purynową zasadę azotową, poszukuje się również inhibitorów będących zmodyfikowanymi purynami. Najbardziej aktywną pochodną w grupie trójpodstawio-

nych puryn jest AP23464 (ARIAD Pharmaceuticals) (ryc. 1). Wykazano, że związek ten jest szczególnie efektywnym inhibitorem proliferacji ( $IC_{50}=14$  nM) i progresji cyklu komórkowego, a także aktywatorem procesu apoptozy w ludzkich komórkach linii K562 z ekspresją kinazy Bcr-Abl. Podobnego działania nie obserwowano w hodowli komórkowej linii Bcr-Abl-negatywnej – HL-60, co sugeruje, że antyproliferacyjne działanie AP23464 może być związane z hamowaniem aktywności tej kinazy. Zahamowaniu fosforylacji onkogennej kinazy, towarzyszyło obniżenie aktywności głównych białek efektorowych kinazy, w tym białka STAT5 i Crkl. W badaniach aktywności AP23464 względem zmutowanych postaci kinazy Bcr-Abl (Q252H, Y253F, E255K, T315I, M351T, H396P) zastosowano mysie komórki linii Ba/F3. We wszystkich analizowanych przypadkach oporności na STI571, AP23464 wykazał silną aktywność antyproliferacyjną. Badania rentgenostrukturalne dowiodły, że AP23464 oddziałuje z aktywną, „otwartą” konformacją kinazy Bcr-Abl. Właściwe przestrzenne oddziaływanie AP23464 z kinazą nie wymaga przyjęcia przez pętlę P ściśle określonej konformacji, co powoduje, że AP23464 wykazuje zbliżoną aktywność w stosunku do wszystkich postaci kinazy z mutacjami w tym regionie [32]. AP23464 był nieaktywny w hodowli komórek Ba/F3, w których w kinazie Bcr-Abl występuje mutacja T315I.

#### INHIBITORY WSPÓŁZAWODNICZĄCE O MIEJSCE WIĄZANIA SUBSTRATU: ON012380

Ze względu na częste mutacje w kinazie Bcr-Abl indukowane przez STI571 oraz niską aktywność alternatywnych inhibitorów w stosunku do niektórych mutantów kinazy np. T315I, poszukiwane są inhibitory o odmiennym sposobie działania. Najnowszym osiągnięciem laboratorium Onconova Therapeutics jest związek o nazwie ON012380 (ryc. 1; tabela 1). W przeciwieństwie do STI571 i innych opisanych wyżej alternatywnych inhibitorów kinazy Bcr-Abl, związek ten nie współzawodniczy z ATP, lecz blokuje miejsce wiązania substratów kinazy. Badania *in vitro* wykazały dużą skuteczność ON012380 w hamowaniu aktywności kinazy Bcr-Abl, a także w hamowaniu fosforylacji jej białek efektorowych, tj. Crkl i STAT5. Interesujące jest spostrzeżenie, że ON012380 hamuje również aktywność PDGFR oraz kinazy Lyn [16]. Po zastosowaniu ON012380 w kombinacji z STI571 odnotowano synergistyczne współdziałanie leków w hamowaniu autofosforylacji kinazy Bcr-Abl, co wydaje się oczywistym następstwem wiązania się obu związków w różnych miejscach białka. Na poziomie hodowli komórkowych (32Dcl3, K562), efektem działania inhibitora ON012380 było znaczące zahamowanie proliferacji komórek oraz indukcja procesu apoptozy. Podanie ON012380 myszom, którym wprowadzono komórki linii limfoidalnej 32Dcl3 z ekspresją zmutowanej kinazy Bcr-AblT315I, powodowało znaczące obniżenie liczby komórek białaczkowych we krwi. Wysokiemu efektowi terapeutycznemu nie towarzyszył efekt toksyczny, nawet po 21 dniach ciągłego podawania związku. Jak dotąd związek ten nie wszedł do I fazy badań klinicznych, w których należy potwierdzić jego skuteczność i bezpieczeństwo [17,41,47].

#### UWAGI KOŃCOWE

Wtórna oporność na STI571, która rozwija się u niektórych pacjentów chorych na CML stawia nowe wyzwania



terapii celowanej. Wydaje się, że alternatywne lub uzupełniające leczenie w wielu przypadkach jest koniecznością. W oparciu o dane na temat mechanizmów działania STI571 i rozwoju oporności na ten lek trwają poszukiwania nowych, niskocząsteczkowych inhibitorów oraz alternatywnych metod leczenia, np. immunoterapii z zastosowaniem przeciwciał [29]. Do chwili obecnej nie można stwierdzić, że któryś z nowych, testowanych związków będzie bardziej skuteczny niż STI571 w terapii przeciw CML. Wyniki badań *in vitro* są jednak zachęcające. W przypadku niektórych związków przeprowadzono również badania kliniczne, które wskazują na ich duży potencjał jako alternatywnych inhibitorów Bcr-Abl. Brak jest jednak długofalowych badań klinicznych, niezbędnych do oceny bezpieczeństwa ich stosowania. Na pierwszy plan wysuwają się cztery inhibitory: AMN107 (nilotinib), NS-187, BMS-354825 (dasatinib) oraz ON012380. Wszystkie hamują aktywność Bcr-Abl z dużo większą wydajnością niż STI571 (tabela 1). Pierwsze dwa wykazują wyższe niż STI571 powinowactwo do nieaktywnej konformacji kinazy BcrAbl, BMS-354825 jest mniej swoistym inhibitorem wiążącym się zarówno z nieaktywną jak i aktywną konformacją Bcr-Abl oraz z niektórymi kinazami Src, natomiast ON012380 wiąże kinazę Bcr-Abl w miej-

scu przyłączanie substratu, a nie jak wcześniej wymienione w miejscu wiązania ATP. Wszystkie poza ostatnim nie mogą być stosowane u pacjentów, u których oporność na STI571 wynika z obecności mutacji prowadzącej do powstania substytucji T315I. Niestety, szacuje się, że właśnie ta mutacja występuje u 20% pacjentów opornych na leczenie STI571. Innym problemem mogą być trudne do przewidzenia działania niepożądane. Szczególnie dotyczy to inhibitorów kinaz, które charakteryzuje szerszy zakres działania np. BMS-354825. Nie wiadomo również, jakie będą wyniki badań klinicznych dla ON012380, który jest zaprojektowany jako swoisty inhibitor kinazy Bcr-Abl, ale który hamuje również inne kinazy. Otwarte pozostaje pytanie, w jaki sposób swoistość działania inhibitorów kinaz wpływa na efektywność leczenia. Co stanowi większy problem: skutki uboczne będące konsekwencją szerszego zakresu działania, czy szybciej rozwijająca się oporność, będąca wynikiem selekcji klonów, w których brak interakcji z inhibitorem jest konsekwencją mutacji kinazy. Wydaje się również, że do osiągnięcia pełnego sukcesu w terapii przeciw CML brakuje skutecznej metody usuwania śladowych ilości komórek BCR-ABL-pozytywnych, pozostałych po stosowanej obecnie terapii, w tym głównie białaczkowych komórek macierzystych.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Agis H., Jaeger E., Doninger B., Sillaber C., Marosi C., Drach C., Schwarzingler I., Valent P., Oehler L.: *In vivo* effects of imatinib mesylate on human haematopoietic progenitor cells. *Eur. J. Clin. Inv.*, 2006; 36: 402–408
- [2] Antonescu C.R., Besmer P., Guo T., Arkun K., Hom G., Koryotowski B., Leversha M.A., Jeffrey P.D., Desantis D., Singer S., Brennan M.F., Maki R.G., DeMatteo R.P.: Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 4182–4190
- [3] Chen Z., Lee F.Y., Bhalla K.N., Wu J.: Potent inhibition of platelet-derived growth factor-induced responses in vascular smooth muscle cells by BMS-354825 (dasatinib). *Mol. Pharmacol.*, 2006; 69: 1527–1533
- [4] Clarkson B., Strife A., Wisniewski D., Lambek C.L., Liu C.: Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies. *Leukemia*, 2003; 17: 1211–1262
- [5] Copland M., Hamilton A., Elicrk L.J., Baird J.W., Allan E.K., Jordanides N., Barow M., Mountford J.C., Holyoake T.L.: Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction. *Blood*, 2006; 107: 4532–4539
- [6] Dai Y., Rahmani M., Corey S.J., Dent P., Grant S.: A Bcr/Abl independent, Lyn-dependent form of imatinib mesylate (STI-571) resistance is associated with altered expression of Bcl-2. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 34227–34239
- [7] Deininger M.W., Druker B.J.: SRCircumventing imatinib resistance. *Cancer Cell*, 2004; 6: 108–110
- [8] Dorsey J.F., Jove R., Kraker A.J., Wu J.: The pyrido[2,3-d]pyrimidine derivative PD180970 inhibits p210Bcr-Abl tyrosine kinase and induces apoptosis of K562 leukemic cells. *Cancer Res.*, 2000; 60: 3127–3131
- [9] Dudley D.T., Pang L., Decker S.J., Bridges A.J., Saltiel A.R.: A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; 92: 7686–7689
- [10] Favata M.F., Horiuchi K.Y., Manos E.J., Daulerio A.J., Stradley D.A., Feeser W.S., Van Dyk D.E., Pitts W.J., Earl R.A., Hobbs F., Copeland R.A., Magolda R.L., Scherle P.A., Trzaskos J.M.: Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 18623–18632
- [11] Fiskus W., Pranpat M., Bali P., Balasis M., Kumaraswamy S., Boyapalle S., Rocha K., Wu J., Giles F., Manley P.W., Atadja P., Bhalla K.: Combined effects of novel tyrosine kinase inhibitor AMN107 and histone deacetylase inhibitor LBH589 against Bcr-Abl-expressing human leukemia cells. *Blood*, 2006; 108: 645–652
- [12] Goldman J.M., Druker B.J.: Chronic myeloid leukemia: current treatment options. *Blood*, 2001; 98: 2039–2042
- [13] Golemiovic M., Verstovsek S., Giles F., Cortes J., Manshuri 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
- [14] 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
- [15] Grzybowska-Izydorczyk O., Góra-Tybor J., Robak T.: Inhibitory kinaz tyrozynowych w terapii przewlekłej białaczki szpikowej. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2006; 60: 490–497
- [16] Gum R.J., McLaughlin M.M., Kumar S., Wang Z., Bower M.J., Lee J.C., Adams J.L., Livi G.P., Goldsmith E.J., Young P.R.: Acquisition of sensitivity of stress-activated protein kinases to the p38 inhibitor, SB 203580, by alteration of one or more amino acids within the ATP binding pocket. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 15605–15610
- [17] Gumireddy K., Baker S.J., Cosenza S.C., John P., Kang A.D., Robell K.A., Reddy M.V., Reddy E.P.: A non-ATP-competitive inhibitor of BCR-ABL overrides imatinib resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 1992–1997
- [18] Huron D.R., Gorre M.E., Kraker A.J., Sawyers C.L., Rosen N., Moasser M.M.: A novel pyridopyrimidine inhibitor of abl kinase is a picomolar inhibitor of Bcr-abl-driven K562 cells and is effective against STI571-resistant Bcr-abl mutants. *Clin. Cancer Res.*, 2003; 9: 1267–1273
- [19] Kantarjian H., Giles F., Wunderle L., Bhalla K., O'Brien S., Wassmann B., Tanaka C., Manley P., Rae P., Mielowski W., Bochinski K., Hochhaus A., Griffin J.D., Hoelzer D., Albitar M., Dugan M., Cortes J., Alland L., Ottmann O.G.: Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *N. Eng. J. Med.*, 2006; 354: 2542–2551
- [20] Kerkela R., Grazette L., Yacobi R., Yacobi R., Iliescu C., Patten R., Beahm C., Walters B., Shevtsov S., Pesant S., Clubb F.J., Rosenzweig A., Salomon R.N., Van Etten R.A., Alroy J., Durand J.B., Force T.: Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nat. Med.*, 2006; 12: 908–916
- [21] Kimura S., Naito H., Segawa H., Kuroda J., Yuasa T., Sato K., Yokota A., Kamitsuji Y., Kawata E., Ashihara E., Nakaya Y., Naruoka H., Wakayama T., Nasu K., Asaki T., Niwa T., Hirabayashi K., Maekawa T.: NS-187, a potent and selective dual Bcr-Abl/Lyn tyrosine kinase inhibitor, is a novel agent for imatinib-resistant leukemia. *Blood*, 2005; 106: 3948–3954

- [22] Kraker A.J., Hartl B.G., Amar A.M., Barvian M.R., Showalter H.D., Moore C.W.: Biochemical and cellular effects of c-Src kinase-selective pyrido[2, 3-d]pyrimidine tyrosine kinase inhibitors. *Biochem. Pharmacol.*, 2000; 60: 885-898
- [23] La Rosee P., Corbin A.S., Stoffregen E.P., Deininger M.W., Druker B.J.: Activity of the Bcr-Abl kinase inhibitor PD180970 against clinically relevant Bcr-Abl isoforms that cause resistance to imatinib mesylate (Gleevec, STI571). *Cancer Res.*, 2002; 62: 7149-7153
- [24] Le Coutre P., Baskaynak G., Tamm I., Westermann J., Duyster J., v. Bonin M., Pursche S., Mayer P., Manley P., Mestan J., Schleyer E., Dorken B.: Activity and Induction of Apoptosis of the Specific Tyrosine Kinase Inhibitor AMN 107 in bcr-abl + Cell Lines and in Imatinib Resistant Primary Cells from CML Patients. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, 2004; 104: 762
- [25] Litzow M.R.: Imatinib resistance. Obstacles and opportunities. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 2006; 130: 669-679
- [26] Mahon F.X., Lagarde V., Manley P.W., Pasquet J.M., Turcq B., Reiffers J.: Generation of Resistance Cell Lines to AMN107, a New Inhibitor of BCR-ABL and Its Effects on Cell Lines Sensitive and Resistant to Imatinib. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, 2004; 104: 4670
- [27] Martinelli G., Martelli A.M., Grafone T., Mantovani I., Cappellini A., Tazzari P.L., Ottaviani E., Soverini S., Amabile M., Renzulli M., Terragna C., Colarossi S., Iacobucci I., Poerio A., Baccarani M.: A New Abl Kinase Inhibitor (AMN107) Has *In Vitro* Activity on Chronic Myeloid Leukaemia (CML) Ph+ Cells Resistant to Imatinib. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, 2005; 106: 2004
- [28] Mauro M.J.: Defining and managing imatinib resistance. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, 2006; 219-225
- [29] Mauro M.J., Deininger M.W.: Chronic myeloid leukemia in 2006: a perspective. *Haematologica*, 2006; 91: 152-158
- [30] 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
- [31] Naito H., Kimura S., Nakaya Y., Naruoka H., Kimura S., Ito S., Wakayama T., Maekawa T., Hirabayashi K.: *In vivo* antiproliferative effect of NS-187, a dual Bcr-Abl/Lyn tyrosine kinase inhibitor, on leukemic cells harbouring Abl kinase domain mutations. *Leuk Res.* 2006; 30: 1443-1446
- [32] O'Hare T., Pollock R., Stoffregen E.P., Keats J.A., Abdullah O.M., Moseson E.M., Rivera V.M., Tang H., Metcalf C.A. III, Bohacek R.S., Wang Y., Sundaramoorthi R., Shakespeare W.C., Dalgarno D., Clackson T., Sawyer T.K., Deininger M.W., Druker B.J.: Inhibition of wild-type and mutant Bcr-Abl by AP23464, a potent ATP-based oncogenic protein kinase inhibitor: implications for CML. *Blood*, 2004; 104: 2532-2539
- [33] 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
- [34] Ohren J.F., Chen H., Pavlovsky A., Whitehead C., Zhang E., Kuffa P., Yan C., McConnell P., Spessard C., Banotai C., Mueller W.T., Delaney A., Omer C., Sebolt-Leopold J., Dudley D.T., Leung I.K., Flamme C., Warmus J., Kaufman M., Barrett S., Teclé H., Hasemann C.A.: MAP kinase kinase 1 (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2004; 11: 1192-1197
- [35] Peng B., Lloyd P., Schran H.: Clinical pharmacokinetics of imatinib. *Clin. Pharmacokinet.*, 2005; 44: 879-894
- [36] Sawyers C.L., Shah N.P., Kantarjian H.M., Donato N., Nicoll J., Bai S.A., Huang F., Clark E., DeCillis A.P., Talpaz M.: Hematologic and cytogenetic responses in imatinib-resistant chronic phase chronic myeloid leukemia patients treated with the dual SRC/ABL kinase inhibitor BMS-354825: results from a phase I dose escalation study. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, 2004; 104: 1
- [37] 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
- [38] Stover E.H., Chen J., Lee B.H., Cools J., McDowell E., Adelsperger J., Cullen D., Coburn A., Moore S.A., Okabe R., Fabbro D., Manley P.W., Griffin J.D., Gilliland D.G.: The small molecule tyrosine kinase inhibitor AMN107 inhibits TEL-PDGFRbeta and FIP1L1-PDGFRalpha *in vitro* and *in vivo*. *Blood*, 2005; 106: 3206-3213
- [39] Talpaz M., Kantarjian H., Shah N.P., Donato N., Nicoll J., Bai S.A., Huang F., Clark E., DeCillis A.P., Sawyers C.: Hematologic and cytogenetic responses in imatinib-resistant accelerated and blast phase chronic myeloid leukemia (CML) patients treated with the dual SRC/ABL kinase inhibitor BMS-354825: results from a phase I dose escalation study. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, 2004; 104: 20
- [40] Talpaz M., Shah N.P., Kantarjian H., Donato N., Nicoll J., Paquette R., Cortes J., O'Brien S., Nicaise C., Bleickardt E., Blackwood-Chirchir M.A., Iyer V., Chen T.T., Huang F., Decillis A.P., Sawyers C.L.: Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemia. *N. Eng. J. Med.*, 2006; 354: 2531-2541
- [41] Tauchi T., Ohyashiki K.: The second generation of BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors. *Int. J. Hematol.*, 2006; 83: 294-300
- [42] Tokarski J.S., Newitt J.A., Chang C.Y., Cheng J.D., Wittekind M., Kiefer S.E., Kish K., Lee F.Y., Borzilleri R., Lombardo L.J., Xie D., Zhang Y., Klei H.E.: The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants. *Cancer Res.*, 2006; 66: 5790-5797
- [43] Tokarski J.S., Newitt J.A., Lee F.: The crystal structure of ABL kinase with BMS-354825, a dual SRC-ABL kinase inhibitor (abstract 553). *Blood*, 2004; 104: 160a
- [44] von Bubnoff N., Manley P.W., Mestan J., Sanger J., Peschel C., Duyster J.: Bcr-Abl resistance screening predicts a limited spectrum of point mutations to be associated with clinical resistance to the Abl kinase inhibitor nilotinib (AMN107). *Blood*, 2006; 108: 1328-1333
- [45] von Bubnoff N., Veach D.R., Miller W.T., Li W., Sanger J., Peschel C., Bornmann W.G., Clarkson B., Duyster J.: Inhibition of wild-type and mutant Bcr-Abl by pyrido-pyrimidine-type small molecule kinase inhibitors. *Cancer Res.*, 2003; 63: 6395-6404
- [46] von Bubnoff N., Veach D.R., van der Kuip H., Aulitzky W.E., Sanger J., Seipel P., Bornmann W.G., Peschel C., Clarkson B., Duyster J.: A cell-based screen for resistance of Bcr-Abl-positive leukemia identifies the mutation pattern for PD166326, an alternative Abl kinase inhibitor. *Blood*, 2005; 105: 1652-1659
- [47] Walz C., Sattler M.: Novel targeted therapies to overcome imatinib mesylate resistance in chronic myeloid leukemia (CML). *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2006; 57: 145-164
- [48] Wang Z., Canagarajah B.J., Boehm J.C., Kassisa S., Cobb M.H., Young P.R., Abdel-Meguid S., Adams J.L., Goldsmith E.J.: Structural basis of inhibitor selectivity in MAP kinases. *Structure*, 1998; 6: 1117-1128
- [49] Weisberg E., Manley P.W., Breitenstein W., Brugger 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
- [50] Weisberg E., Manley P., Mestan J., Cowan-Jacob S., Ray A., Griffin J.D.: AMN107 (nilotinib): a novel and selective inhibitor of Bcr-Abl. *Br. J. Cancer*, 2006; 94: 1765-1769
- [51] White D.L., Saunders V.A., Dang P., Engler J., Zannettino A.C., Cambareri A.C., Quinn S.R., Manley P.W., Hughes T.P.: Oct-1 mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib (AMN107): reduced OCT-1 activity is the cause of low *in vitro* sensitivity to imatinib. *Blood*, 2006; 108: 697-704
- [52] Wisniewski D., Lambek C.L., Liu C., Strife A., Veach D.R., Nagar B., Young M.A., Schindler T., Bornmann W.G., Bertino J.R., Kuriyan J., Clarkson B.: Characterization of potent inhibitors of the Bcr-Abl and the c-kit receptor tyrosine kinases. *Cancer Res.*, 2002; 62: 4244-4255
- [53] Wolff N.C., Veach D.R., Tong W.P., Bornmann W.G., Clarkson B., Ilaria R.L. Jr.: PD166326, a novel tyrosine kinase inhibitor, has greater antileukemic activity than imatinib mesylate in a murine model of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 2005; 105: 3995-4003