

Terapia przewlekłej białaczki szpikowej – terażniejszość i wyzwania na przyszłość

Treatment of chronic myelogenous leukemia – current status and future prospects

Eliza Głodkowska-Mrówka, Tomasz Stokłosa

STRESZCZENIE

Wprowadzenie imatynibu do terapii przewlekłej białaczki szpikowej (PBSz) można już z perspektywy ponad dekady ocenić jako jedno z przełomowych wydarzeń w leczeniu nowotworów i w historii onkologii. Drobnocząsteczkowy inhibitor swoiście hamujący aktywność onkogennej kinazy tyrozynowej BCR/ABL, odpowiedzialnej za transformację nowotworową komórki macierzystej krwiotworzenia, okazał się zaskakująco skuteczny u większości chorych i zrewolucjonizował terapię PBSz. Niestety znacząca grupa chorych z powodu wystąpienia oporności lub nietolerancji nie odnosi spodziewanych korzyści terapeutycznych, co powoduje, że jednym z głównych celów badań stało się poszukiwanie nowych, jeszcze skuteczniejszych leków. W ostatnich 5 latach do terapii wprowadzono inhibitory drugiej generacji (dasatynib, nilotinib, bosutinib), trwają badania kliniczne nad inhibitorami trzeciej generacji (np. ponatinib hamujący zmutowaną kinazę BCR/ABL z mutacją T315I) oraz inhibitorami allosterycznymi, które hamują kinazę w innym mechanizmie, nie wiążąc się z jej centrum aktywnym. Żaden z dotychczas badanych leków nie eliminuje macierzystych komórek białaczkowych będących źródłem choroby, dlatego obecnie uważa się, że leczenie musi być kontynuowane dożywotnio. Ponieważ celem dla terapii powinno być całkowite wyleczenie chorego i możliwość przerwania leczenia, trwają badania nad możliwością całkowitej eradykacji białaczki, przez zastosowanie terapii łączonych. Można mieć nadzieję, że tak jak sukces imatynibu w terapii PBSz wyznaczył nowy kierunek w onkologii, tak samo osiągnięcie celu w postaci całkowitego wyleczenia pomoże w znalezieniu skutecznej terapii w innych nowotworach.

Słowa kluczowe: przewlekła białaczka szpikowa, BCR/ABL, inhibitory kinaz tyrozynowych

ABSTRACT

Introduction of imatinib to the treatment of chronic myelogenous leukemia (CML) more than a decade ago may be considered as one of the milestones in the history of cancer treatment and oncology. Small molecule inhibitor, which specifically inhibits BCR/ABL oncogenic tyrosine kinase, responsible for malignant transformation of hematopoietic stem cell proved to be unexpectedly effective in the majority of patients and has revolutionized CML therapy. Unfortunately, a significant group of patients develops resistance or is intolerant to the drug which necessitate search for new better drugs. In the last 5 years 2nd generation inhibitors have been approved (dasatinib, nilotinib and bosutinib), clinical trials are ongoing with 3rd generation inhibitors (among them ponatinib, active against BCR/ABL with T315I mutation) and allosteric inhibitors. None of the available drugs eliminates leukemia stem cells, which are the roots of the disease, therefore therapy must be continued indefinitely. Since ultimate goal is to cure the disease there are number of trials to eradicate the disease with combination therapies. We may expect that such like imatinib opened new therapeutic horizons in oncology, complete eradication of CML will help to find cure other cancers.

Key words: Chronic myelogenous leukemia, BCR/ABL, Tyrosine kinase inhibitors

© by Polskie Towarzystwo Hematologów
i Transfuzjologów
i Instytut Hematologii i Transfuzjologii

Otrzymano: 29.08.2012
Zaakceptowano: 12.09.2012

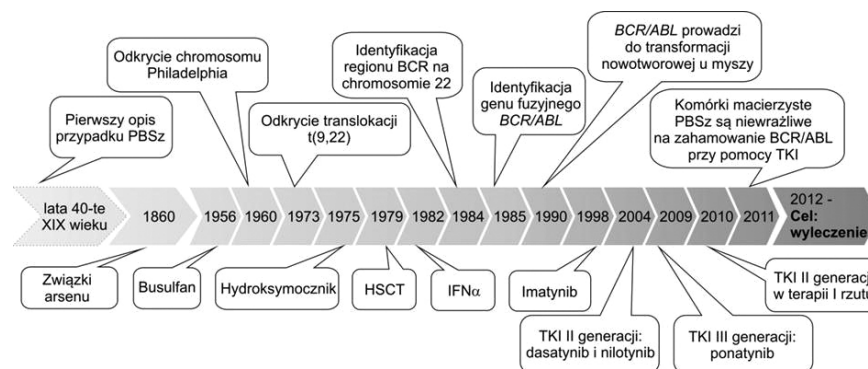
Zakład Immunologii Centrum Biostruktury, Warszawski
Uniwersytet Medyczny, Polska

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesu

Autor do korespondencji:
Eliza Głodkowska-Mrówka, Tomasz Stokłosa
Zakład Immunologii Centrum Biostruktury,
Warszawski Uniwersytet Medyczny,
ul. Banacha 1A, Blok F,
02-097 Warszawa, Polska,
tel.: +48 22 599 21 99,
fax: +48 22 599 21 94
e-mail: eliza.glodkowska@wum.edu.pl,
tomasz.stoklosa@wum.edu.pl

Finansowanie:
Praca powstała częściowo dzięki wsparciu finansowemu
Narodowego Centrum Nauki w postaci grantu N N401
594740 dla E. G-M

Acta
Haematologica
Polonica;
43 (3): 249–257



Ryc. 1. Najważniejsze odkrycia w badaniach nad patogenezą i terapią przewlekłej białaczki szpikowej
 Fig. 1. Timeline of the major discoveries on CML pathogenesis and therapy

Przewlekła białaczka szpikowa (PBSz) jest wprawdzie chorobą rzadką, jednak od momentu, kiedy to przed ponad 50 laty po raz pierwszy powiązano zmianę genetyczną (w tej chorobie zwaną chromosomem Filadelfia) z procesem nowotworowym, często bywa ona określana jako modelowa choroba nowotworowa [1, 2]. Również w tej chorobie nowotworowej po raz pierwszy zastosowano skuteczną terapię celowaną, wprowadzając do leczenia drobnocząsteczkowy inhibitor swoisty wobec onkogennej kinazy BCR/ABL – imatynib. Historię najważniejszych odkryć związanych z PBSz i terapią tej choroby przedstawia rycina 1.

Imatynib

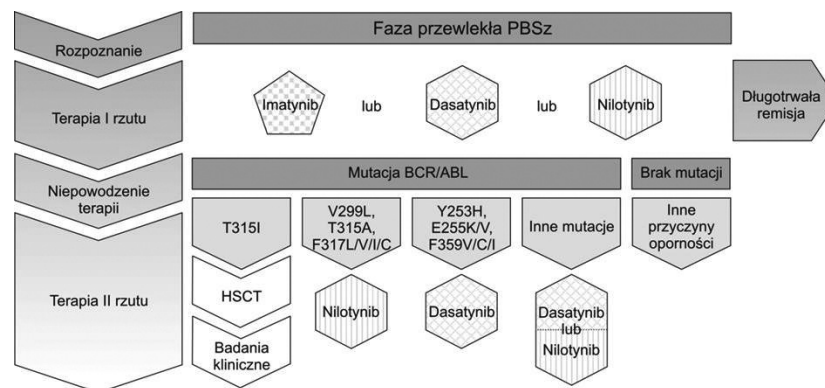
W latach 90. XX wieku Brian Druker we współpracy z naukowcami z firmy Ciba-Geigy rozpoczęli prace nad poszukiwaniem doustnej pochodnej 2-fenylaminopirymidyny, która mogłaby hamować kinazę BCR/ABL. Wyniki badań przedklinicznych związku nazwanego roboczo STI571 zostały po raz pierwszy opublikowane w 1996 roku i były na tyle obiecujące [3, 4], że już dwa lata później rozpoczęto próby kliniczne nowego leku, a w 2001 roku FDA zarejestrowała pierwszy inhibitor kinazy tyrozynowej – imatynib (Ryc.1).

Imatynib nie tylko zrewolucjonizował terapię PBSz, ale zmienił podejście do leczenia innych typów nowotworów, rozpoczynając ekspansję inhibitorów kinaz tyrozynowych jako nowej grupy leków onkologicznych. Przed wprowadzeniem imatynibu skuteczne leczenie PBSz było dostępne tylko dla niewielkiego odsetka pacjentów, u których możliwe było przeprowadzenie przeszczepienia komórek macierzystych krwiotworzenia (HSCT; *hematopoietic stem cell transplantation*) (Ryc. 1). Interferon α (IFN α) pozwalał na uzyskanie trwałych odpowiedzi u 10–30% pacjentów [5], ale korzyści z terapii dotyczyły przede wszystkim pacjentów z grupy niskiego ryzyka, a terapia powodowała znaczące działania niepo-

żądane. Imatynib okazał się wyjątkowo skuteczny w leczeniu przewlekłej fazy PBSz i spowodował, że PBSz z choroby prowadzącej do zgonu w ciągu 3–5 lat od rozpoznania stała się chorobą naprawdę przewlekłą. Jeszcze 15 lat temu pytania, jakie zadajemy sobie dzisiaj o bezpieczeństwo odstawienia imatynibu u chorych z długotrwałą, całkowitą remisją molekularną, wydawałyby się niedorzeczne.

Imatynib jest inhibitorem kompetywnym, który współzawodniczy z ATP o miejsce wiązania w domenie kinazowej BCR/ABL i wiąże się z kinazą w stanie nieaktywnym. Oprócz kinazy BCR/ABL imatynib hamuje również receptor dla płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGFR; *platelet-derived growth factor receptor*) i kinazę receptorową C-KIT, co wykorzystano w leczeniu nowotworów podścieliskowych przewodu pokarmowego (GIST; *gastrointestinal stromal tumors*) [6]. Skuteczność imatynibu w leczeniu I rzutu fazy przewlekłej PBSz u pacjentów wcześniej nieleczonych oceniona w badaniu IRIS (*International Randomized Study of IFN and Imatinib*) okazała się znakomita. Po 8 latach obserwacji prowadzonej w ramach tego badania czas przeżycia wolnego od zdarzeń (EFS; *event free survival*) wynosił 82%, a czas przeżycia wolnego od progresji – 92% [7].

Niestety, dość szybko zauważono, że korzyści ze stosowania imatynibu nie będą udziałem wszystkich pacjentów cierpiących na PBSz. Wyniki niezależnych badań klinicznych z różnych ośrodków wskazują, że około 20% pacjentów otrzymujących imatynib nie uzyskuje remisji cytogenetycznej, a u kolejnych 10% chorych z czasem dochodzi do rozwoju oporności lub nietolerancji na leczenie [8]. Optymistyczne wyniki badania IRIS dotyczą 55% pacjentów, którzy rozpoczęli terapię imatynibem. W ciągu 8 lat trwania badania pozostałe 45% chorych przerwało terapię głównie z powodu nieskuteczności leczenia lub nietolerancji preparatu. Mechanizmy oporności na imatynib można podzielić na dwie grupy: zależne i nie-



Ryc. 2. Alternatywne scenariusze w terapii PBSz
Fig. 2. Various scenarios in CML therapy

zależne od BCR/ABL. Przyczyny zależne od BCR/ABL obejmują przede wszystkim powstanie mutacji prowadzących do obniżenia wrażliwości kinazy na działanie inhibitora poprzez zmiany konformacyjne miejsca wiązania lub uniemożliwienie przejścia kinazy w stan nieaktywny, niezbędny do związania imatinibu [9]. Pierwszą mutacją domeny kinazowej powodującą oporność na imatinib opisano w 2001 roku, jeszcze przed rejestracją leku przez FDA [10]. Była to mutacja T315I warunkująca oporność nie tylko na imatinib, ale, jak się później okazało, również na inhibitory II generacji. Niedawno opublikowane dane wskazują, że oporność na imatinib może być również uwarunkowana mutacjami poza domeną kinazową, znajdującymi się w domenach sąsiednich – SH2 i SH3 [11].

Mutacje w genie BCR/ABL nie są odpowiedzialne za wszystkie przypadki oporności na imatinib. Grupa mechanizmów oporności niezwiązanych z BCR/ABL jest bardzo szeroka i obejmuje niestosowanie się pacjenta do zaleceń lekarskich, zaburzenia farmakokinetyki leku, zwiększenie aktywności pomp oporności wielolekowej z rodziny białek ABC (*adenosine triphosphate-binding cassette transporters*, ABCB1 i ABCG2) lub zmniejszenie aktywności białek transportujących lek do komórki (hOCT-1) oraz aktywację alternatywnych szlaków przekazywania sygnału [12].

Imatinib, choć skutecznie eliminuje komórki białaczkowe z krwi i szpiku, to nie prowadzi do eradykacji komórek nowotworowych ze szpiku. Około 0,5% populacji komórek CD34+ u pacjenta z PBSz to

Tabela 1. Charakterystyka wybranych inhibitorów BCR/ABL

Table 1. Main features of the selected BCR/ABL inhibitors

	Nazwa	Typ inhibitora	Hamowane kinazy
I generacja	Imatinib	ATP-kompetytywny, wiąże się z kinazą w konformacji nieaktywnej	ABL, PDGFR, C-KIT, EPH
	Nilotinib	ATP-kompetytywny, wiąże się z kinazą w konformacji nieaktywnej	ABL, PDGFR, C-KIT, EPH
II generacja	Dasatinib	ATP-kompetytywny, wiąże się z kinazą w konformacji aktywnej	ABL, PDGFR, C-KIT, EPH, SRC, BTK
	Bosutinib	ATP-kompetytywny, wiąże się z kinazą w konformacji aktywnej	ABL, SRC, TEC, CAMK2G, PDGFR, C-KIT
III generacja	Ponatinib (AP24534)	ATP-kompetytywny wiąże się z kinazą w konformacji nieaktywnej	ABL1, SRC, VEGFR, FGFR, PDGFR, LYN
	Danusertib (PHA-739358)	ATP-kompetytywny, wiąże się z kinazą w konformacji aktywnej	Aurora A, B i C, ABL, RET, TRK-A, FGFR
	Rebastynib (DCC-2036)	Inhibitor „switch-pocket”	Aurora, ABL1, FLT3, LYN, HCK, TIE2, KDR, TRKA
	Tozasertyb (MK-0457, VX-680)	ATP-kompetytywny	Aurora A, B i C, FLT-3, JAK-2 i ABL
Inhibitory allosteryczne	GNF2	inhibitor allosteryczny, wiążący się z miejscem wiązania kwasu mirystylowego	
	GNF5	inhibitor allosteryczny, wiążący się z miejscem wiązania kwasu mirystylowego	

macierzyste komórki białaczkowe, które są niewrażliwe na imatynib i zahamowanie aktywności kinazy BCR/ABL nie powoduje ich śmierci [13, 14]. Ponieważ komórki te mogą stać się źródłem wznowy, a ich liczba jest na progu lub poniżej czułości dostępnych metod diagnostycznych, trudno jest określić, czy i kiedy można odstawić imatynib u pacjenta w długotrwałej odpowiedzi molekularnej. I choć wyniki badań klinicznych z ostatnich lat, w tym znanego badania STIM, sugerują, że w pewnych sytuacjach odstawienie leczenia może być bezpieczne dla chorego [15], nie zaleca się takiego postępowania poza warunkami badania klinicznego. Na pewno jednak badania mające pomóc w wytypowaniu, u których chorych w wieloletniej remisji można bezpiecznie odstawić terapię, będą kontynuowane. Nie da się pominąć aspektu farmakoekonomicznego możliwości przerwania terapii. Obliczono, iż badanie STIM we Francji pozwoliło zaoszczędzić kilka milionów Euro z kieszeni podatnika.

Druga generacja inhibitorów kinazy BCR/ABL

Cieniem na niewątpliwym sukcesie imatynibu w terapii przewlekłej białaczki szpikowej jest rozwijająca się u stosunkowo dużej grupy pacjentów oporność na leczenie (Ryc. 2). Ponieważ u większości pacjentów, u których dochodzi do nawrotu, przyczyną rozwoju oporności na leczenie jest mutacja BCR/ABL, jedną z możliwości przezwycięzenia takiej oporności jest zaprojektowanie nowych, ATP-kompetytywnych inhibitorów kinazy BCR/ABL, które są zdolne do zahamowania kinazy, odpornej na działanie imatynibu. Warunki te spełniają tzw. inhibitory II generacji, które są zarejestrowane do leczenia pacjentów z PBSz, w kolejności rejestracji: dasatynib, nilotynib i bosutynib (Tab. I). Niestety żaden z inhibitorów II generacji nie jest aktywny wobec mutacji T315I.

Dasatynib

Dasatynib początkowo określany był jako „*dual-kinase inhibitor*”, co miało podkreślić jego działanie nie tylko na kinazę BCR/ABL, ale również wobec kinaz z rodziny SRC. Jak się okazało w dalszych badaniach, bardziej pasuje określenie „*multi-kinase inhibitor*”, gdyż dasatynib ma znacznie szersze spektrum działania i hamuje również kinazę C-KIT, PDGFR, a także kinazę BTK (*Bruton's tyrosine kinase*). Podkreślana jest aktywność dasatynibu wobec rodziny kinaz SRC, ponieważ nadekspresja kinaz z tej grupy, przede wszystkim kinaz HCK i LYN, może być zaangażowana w rozwój oporności na imatynib u pacjentów z PBSz [16]. To dlatego wielospecyficzność dasatynibu może stanowić o jego przewadze

u chorych z opornością na imatynib, a dodatkowo, ze względu na swoje właściwości chemiczne, dasatynib jest mniej wrażliwy na niektóre z mechanizmów warunkujących oporność na imatynib. Podobnie jak imatynib, dasatynib jest inhibitorem ATP-kompetytywnym, ale ma inną strukturę chemiczną i wiąże się z kinazą w sposób, który nie zależy od jej nieaktywnej konformacji [17]. Również, tak jak w przypadku imatynibu, dasatynib jest substratem pomp ABCB1 i ABCG2. Nie jest natomiast substratem dla OCT-1, zatem zmiany ekspresji OCT-1 nie wpływają na jego skuteczność [18]. Ponadto, dasatynib hamuje BCR/ABL ponad 300-razy silniej niż imatynib i jest skuteczny w przypadku większości mutacji warunkujących oporność na imatynib, za wyjątkiem T315I/A, V299L oraz F317L [19].

Początkowo dasatynib był zarejestrowany do leczenia pacjentów z PBSz w fazie przewlekłej, przyspieszonej i kryzysie blastycznej, u których doszło do rozwoju oporności na imatynib lub nietolerancji na lek. Jednak wyniki prowadzonych niedawno badań klinicznych wskazują, że pacjenci z noworozpoznaną PBSz leczeni dasatynibem częściej osiągają odpowiedź molekularną niż chorzy otrzymujący imatynib [20]. Wyniki badania DASISION wykazały, że chorzy leczeni dasatynibem, w porównaniu z grupą otrzymującą imatynib, częściej i w krótszym czasie osiągają większą odpowiedź molekularną (46% leczonych dasatynibem w porównaniu z 28% leczonych imatynibem) [21]. Doprowadziło to do zarejestrowania stosowania dasatynibu jako leczenia I rzutu pacjentów w fazie przewlekłej PBSz.

Niestety, choć wyniki leczenia I rzutu dasatynibem są lepsze niż w przypadku imatynibu, część chorych wciąż nie uzyskuje oczekiwanej odpowiedzi na terapię. Ponieważ pacjenci ci mogliby odnieść korzyść z wczesnej zmiany leczenia, poszukuje się metod pozwalających na szybkie wytypowanie chorych wymagających modyfikacji terapii. Zaobserwowano, że u niewielkiego odsetka pacjentów leczonych dasatynibem jako lekiem pierwszego rzutu (8,6%), u których po trzech miesiącach leczenia nie obserwuje się obniżenia poziomu transkryptu BCR/ABL (współczynnik BCR/ABL/ABL >10%), znacznie częściej dochodzi do niepowodzenia terapii [22].

Nilotynib

Nilotynib, podobnie jak imatynib, jest pochodną aminopirymidyny i został opracowany jako ulepszona wersja leku I generacji. Działa silniej i bardziej selektywnie niż imatynib i jest skuteczny wobec większości zmutowanych postaci BCR/ABL, za wyjątkiem T315I, Y253H, E255 K/V i F359 V/C/I [23]. Historia badań i rejestracji nilotynibu jest niejako „lustrzanym odbiciem” badań nad dasatynibem. Ze

względu na skuteczność leku w przypadku niepowodzenia terapii imatynibem [24, 25], nilotynib początkowo zarejestrowano do leczenia pacjentów we wszystkich fazach PBSz, u których doszło do rozwoju oporności lub nietolerancji na imatynib.

Dobre wyniki leczenia chorych opornych na imatynib zachęciły do sprawdzenia skuteczności leku w terapii I rzutu. W tym celu rozpoczęto badanie ENESTnd, analogiczne do badania DIASISION. W tych warunkach klinicznych nilotynib okazał się skuteczniejszy od imatynibu, a częstość uzyskiwania większej odpowiedzi molekularnej po 12 miesiącach terapii wynosiła 44% w grupie otrzymującej nilotynib i 22% w grupie leczonej imatynibem [26]. Obecnie toczy się kolejne badanie skuteczności nilotynibu w leczeniu I rzutu o nazwie ENEST1st, które może okazać się pomocne w opracowaniu metod pozwalających na wytypowanie pacjentów o wysokim ryzyku braku odpowiedzi na leczenie TKI, którzy mogliby odnieść korzyść z wczesnej modyfikacji terapii [27].

Bosutynib

Sukces inhibitorów kinaz tyrozynowych w terapii PBSz spowodował, że wiele firm farmaceutycznych zajęło się poszukiwaniem nowych leków z tej grupy. Jednym z takich leków jest bosutynib, drobnocząsteczkowy inhibitor kinaz tyrozynowych opracowany z myślą o leczeniu nowotworów litych z nadekspresją SRC. Okazało się jednak, że oprócz hamowania kinaz z rodziny SRC bosutynib jest efektywnym inhibitorem BCR/ABL, działającym ponad 100-rzy silniej niż imatynib [28, 29]. W przeciwieństwie do imatynibu i nilotynibu, bosutynib nie hamuje kinaz c-KIT i PDGFR. Jest natomiast aktywny wobec kinaz TEC, STE20 i CAMK2G [30]. Podobnie jak w przypadku innych inhibitorów II generacji bosutynib, choć jest skuteczny wobec większości mutacji warunkujących oporność na imatynib, w stężeniach osiągalnych klinicznie nie hamuje BCR/ABL z mutacją T315I. Jest również nieaktywny w przypadku wystąpienia mutacji V299L, warunkującej oporność na dasatynib, ale nie nilotynib [31].

Niedawno ukazały się wyniki ponad 2-letniej obserwacji skuteczności bosutynibu w terapii III rzutu chorych w fazie przewlekłej PBSz, u których doszło do niepowodzenia leczenia imatynibem i leczenia II rzutu dasatynibem i/lub nilotynibem. U 24% pacjentów (w tym 3 chorych, u których nieskuteczne okazały się wszystkie 3 zarejestrowane dotąd leki) osiągnięto całkowitą odpowiedź cytogenetyczną [32]. Równoległe toczą się również badania służące ocenie skuteczności bosutynibu w terapii I rzutu fazy przewlekłej PBSz oraz w leczeniu bardziej zaawansowanych stadiów PBSz (fazy przy-

spieszonyj i kryzy blastycznej). We wrześniu br. zarejestrowano bosutynib jako lek drugiego rzutu w PBSz.

Inhibitory BCR/ABL aktywne wobec mutacji T315I

Ze względu na to, że mutacja T315I domeny kinazowej BCR/ABL powoduje oporność na wszystkie zarejestrowane dotąd inhibitory BCR/ABL, celem wielu programów badawczych stało się opracowanie leków zdolnych do przezwyciężenia tego typu oporności. Dla odróżnienia od wcześniejszych generacji inhibitorów kinaz tyrozynowych, które okazały się nieskuteczne wobec mutacji T315I, nazywa się je często inhibitorami III generacji (Tab. I).

Ponatinib

Ponatinib (AP24534) został zaprojektowany tak, by unikać interakcji z izoleucyną pojawiającą się w miejscu znacznie mniejszej treoniny w wyniku mutacji T315I BCR/ABL, która warunkuje oporność na wszystkie zarejestrowane dotąd inhibitory BCR/ABL. Ponatinib hamuje również aktywność dzięki i wszystkich zbadanych dotąd zmutowanych postaci BCR/ABL, stąd często nazywany jest pan-inhibitorem BCR/ABL [33]. Poza hamowaniem kinazy ABL i BCR/ABL ponatinib skutecznie hamuje kinazy z rodziny SRC, KIT, VEGFR2, PDGFR α i FGFR1.

Zachęcające wyniki badań prowadzonych w modelach *in vitro* i zwierzęcych doprowadziły do pierwszych prób klinicznych nowego leku [34]. Wyniki badania klinicznego I fazy potwierdziły, że ponatinib jest skuteczny u chorych z mutacją T315I [35]. Do tego badania włączono 74 pacjentów, z których większość przyjmowała dwa lub więcej inhibitorów kinaz tyrozynowych, jak się okazało, nieskuteczne w kontrolowaniu choroby. W podgrupie pacjentów w fazie przewlekłej PBSz 53% uzyskało całkowitą odpowiedź cytogenetyczną. Natomiast w grupie chorych z mutacją T315I wszyscy uzyskali większą odpowiedź cytogenetyczną, a 89% całkowitą odpowiedź cytogenetyczną. Obecnie toczy się badanie II fazy (Ponatinib Ph + ALL and CML Evaluation, PACE) służące dokładniejszej ocenie skuteczności ponatinibu u pacjentów z BCR/ABL-dodatnimi nowotworami hematologicznymi.

Inhibitory wiążące się z tzw. „switch pocket”

Niedawno opracowano inhibitory BCR/ABL o całkowicie nowym mechanizmie działania. Polega on na wiązaniu się z domeną odpowiedzialną za konformacyjne „przełączanie” ABL ze stanu aktywnego do nieaktywnego. Substancje te wiążą się z kinazą zarówno ufosforylowaną (aktywną), jak i nieufosforylowaną (nieaktywną) i nie współzawodniczą z ATP o miejsce wiązania w domenie kinazowej enzymu. Najlepiej opi-

sanym związkiem z tej grupy jest DCC-2036, który w warunkach *in vitro* skutecznie hamował proliferację i indukował apoptozę komórek transformowanych BCR/ABL w postaci niezmutowanej jak i z kilkoma powszechnie występującymi mutacjami (w tym także T315I) [36, 37].

Inhibitory kinaz Aurora

Inhibitory kinaz Aurora wzbudziły ogromne nadzieje na opracowanie skutecznych terapii nowotworów litych. Wyniki kolejnych badań klinicznych są jednak rozczarowujące i nie wydaje się, by leki te mogły być stosowane w monoterapii. Ze względu na podobieństwo strukturalne domeny kinazowej BCR/ABL i kinaz Aurora niektóre z inhibitorów kinaz Aurora mogą również hamować zmutowaną i prawidłową kinazę ABL. Pierwszym lekiem, który okazał się skuteczny u pacjentów z mutacją T315I domeny kinazowej BCR/ABL, był MK-0457 (tozasertib) [38]. Jest to drobnocząsteczkowy inhibitor kinaz Aurora A, B i C, FLT-3, JAK-2 i ABL (Tab. I) W badaniu I fazy, z grupy 18 pacjentów z PBSz w fazie przyspieszonej lub kryzysie blastycznej z mutacją T315I u 8 (44%) zaobserwowano trwałą odpowiedź na leczenie (powrót do fazy przewlekłej) [39].

Innym inhibitorem kinaz Aurora aktywnym wobec BCR/ABL jest danusertib. Wyniki badań *in vitro* wykazały, że danusertib skutecznie hamuje proliferację komórek progenitorowych białaczki o fenotypie CD34+ pobranych od pacjentów z PBSz wrażliwych i opornych na imatynib, w tym od chorych z mutacją T315I. Działanie leku wydaje się zależeć od hamowania jednocześnie BCR/ABL i kinaz Aurora [40, 41]. Obecnie prowadzone jest badanie kliniczne I/II fazy danusertibu w terapii pacjentów z PBSz, obejmujące m.in. chorych z mutacją T315I [42].

Niewątpliwym ograniczeniem terapii MK-0457 i danusertibem jest fakt, że leki te muszą być podawane drogą ciągłego wlewu dożylnego. Biorąc pod uwagę przewlekły charakter PBSz, trudno wyobrazić sobie długotrwałe stosowanie leków podawanych tą drogą. Leki te mogłyby natomiast znaleźć zastosowanie w terapii kryzysu blastycznego PBSz, szczególnie jako leczenie „pomostowe” w oczekiwaniu na przeszczepienie macierzystych komórek krwiotwórczych [39].

Inne inhibitory kinazy Aurora, których potencjalna skuteczność w terapii PBSz analizowana jest w badaniach przedkliczniczych lub badaniach I fazy, obejmują substancje aktywne wobec kinazy Aurora bez zdolności hamowania aktywności BCR/ABL (np. MLN8237 (alisertib) [43]) oraz związki o podwójnym działaniu (np. KW-2449 [44]).

Allosteryczne inhibitory BCR/ABL

Większość dostępnych obecnie inhibitorów kinaz tyrozynowych, w tym wszystkie opisane powy-

żej, to inhibitory kompetytywne, przyłączające się do miejsca wiążącego ATP w cząsteczce enzymu, uniemożliwiając przenoszenie grupy fosforanowej z ATP na reszty tyrozyny w fosforylowanym białku. Wszystkie kompetytywne inhibitory BCR/ABL są inhibitorami odwracalnymi, preferencyjnie wiążącymi się z kinazą w stanie aktywnym (tzw. inhibitory typu I, np. dasatynib, bosutynib) lub nieaktywnym (tzw. inhibitory typu II, np. imatynib, nilotynib) (Tab. I). Ze względu na to, że centrum katalityczne BCR/ABL nie ma reszty cysteiny, która pozwalałaby na utworzenie silnego, kowalencyjnego wiązania kinazy z inhibitorem, niemożliwe jest opracowanie nieodwracalnych inhibitorów kompetytywnych BCR/ABL, jakie dostępne są dla kilku innych, ważnych z klinicznego punktu widzenia kinaz, np. BTK (ibrutynib) [45] czy rodziny EGFR (dacomitynib) [46]. Alternatywą dla inhibitorów kompetytywnych, współzawodniczących z ATP o centrum aktywne enzymu, są inhibitory allosteryczne. Substancje te, choć wiążą się z enzymem w miejscu odległym od centrum aktywnego, są w stanie zahamować aktywność enzymatyczną danej kinazy.

Kinaza BCR/ABL jest konstytutywnie aktywna i w przeciwieństwie do prawidłowej kinazy ABL nie podlega regulacji poprzez przyłączenie reszt kwasu mirystylowego, choć zawiera fragment białka odpowiedzialny za mirystylację [47]. Wynika to z faktu, że na skutek translokacji fragment kinazy ABL odpowiedzialny za regulację aktywności ulega fuzji z fragmentem BCR zawierającym m.in. domenę odpowiedzialną za oligomeryzację. Dowiedziono, że występujące w tym miejscu domeny SH2 i SH3 oraz domena oligomeryzacji są odpowiedzialne za indukcję i zachowanie konstytutywnej aktywności kinazy BCR/ABL [47–49]. Miejsce wiązania kwasu mirystylowego może być zatem potencjalnym punktem uchwytu nowej grupy inhibitorów BCR/ABL imitujących działanie tej substancji [47].

Pierwszym opisanym inhibitorem BCR/ABL o nowym mechanizmie działania był związek o nazwie GNF-2 (Tab. I). Co ciekawe, GNF-2 został wytypowany jako potencjalny inhibitor BCR/ABL z grupy ponad 50 tysięcy substancji chemicznych i początkowo nie znano mechanizmu działania tej substancji. GNF-2 selektywnie hamował proliferację komórek transformowanych BCR/ABL z siłą podobną do imatynibu (IC₅₀=138 nM), ale w przeciwieństwie do imatynibu nie wiązał się z kinazą w miejscu wiązania ATP [50]. Dopiero kilka lat później dowiedziono, że GNF-2 jest inhibitorem allosterycznym BCR/ABL wiążącym się w miejscu wiązania kwasu mirystylowego, na skutek czego dochodzi do zmian dynamiki wiązania ATP i zahamowania aktywności kinazowej BCR/ABL [51].

Nowy mechanizm działania GNF-2 zachęcał do sprawdzenia aktywności tej substancji wobec zmutowanych form BCR/ABL warunkujących oporność na stosowane dotąd leczenie. Niestety, choć GNF-2 był skuteczny w przypadku kilku istotnych klinicznie mutacji BCR/ABL, m.in. E225V czy Y253H, nie wpływał on na proliferację komórek wykazujących ekspresję BCR/ABL z mutacją T315I [50].

Dalsze badania nad regulacją ABL i BCR/ABL wykazały, że dla aktywności enzymatycznej tych białek niezbędna jest interakcja pomiędzy domeną SH2 i domeną kinazową [52]. Potencjalne zastosowanie kliniczne tej zależności potwierdziło odkrycie, że u kilku pacjentów opornych na imatynib przyczyną rozwoju oporności była mutacja domeny SH2, a nie jak w większości przypadków mutacja domeny kinazowej [11]. Obserwacje te sugerowały istnienie nowego punktu uchwytu inhibitorów kinazy BCR/ABL. Kolejne prace wykazały, że upośledzenie interakcji pomiędzy domeną SH2 i domeną kinazową za pomocą specyficznego polipeptydu o strukturze podobnej do fibronektyny typu III (tzw. monobody) rzeczywiście powoduje zahamowanie aktywności kinazowej BCR/ABL i prowadzi do śmierci pierwotnych komórek PBSz na drodze apoptozy. Co więcej, interakcja z domeną SH2 uwrażliwia na działanie konwencjonalnych inhibitorów BCR/ABL zarówno w komórkach wrażliwych, jak i opornych [53]. Potwierdzono tym samym istnienie drugiego punktu uchwytu nieallosterycznych inhibitorów kinazy BCR/ABL. Niestety, w badaniu tym wykorzystano polipeptydy, które ze względu na trudności z dostarczeniem ich do wnętrza komórki docelowej, nie mogą być stosowane w praktyce klinicznej. Choć opracowanie drobnocząsteczkowych inhibitorów interakcji pomiędzy domeną SH2 a domeną kinazową BCR/ABL jest możliwe, wydaje się, że ze względu na potrzebę stosowania tych substancji w bardzo wysokich dawkach, nie będą one nigdy stosowane w monoterapii, a jedynie w połączeniu ze „standardowymi” inhibitorami BCR/ABL [54].

Należy podkreślić, że inhibitory allosteryczne BCR/ABL nie są wolne od problemu, jakim jest pojawienie się mutacji warunkujących oporność. Podobnie jak w przypadku inhibitorów kompetywnych, takich jak imatynib czy nilotynib, długotrwałe stosowanie tych leków może prowadzić do pojawienia się oporności [50]. Dlatego też pojawiają się propozycje stosowania inhibitorów allosterycznych w połączeniu z inhibitorami kompetywnymi, wiążącymi się w miejscu wiązania ATP. Przykładem takiej terapii łączonej jest zastosowanie GNF-5 (pochodnej GNF-2 o lepszych właściwościach farmakokinetycznych) w połączeniu z imatynibem lub nilotynibem. Badania *in vitro*

wykazały, że taka kombinacja hamuje pojawianie się mutacji warunkujących oporność na jeden z leków i jest aktywna w komórkach z mutacją T315I [51].

Terapie skojarzone

Jak już wspomniano, ze względu na oporność macierzystych komórek białaczkowych na inhibitory kinazy BCR/ABL stosowane obecnie terapie nie prowadzą do całkowitego wyleczenia pacjenta, a jedynie do utrzymania długotrwałej remisji i zapobiegania wznowie i progresji choroby. Postuluje się zatem wprowadzenie dodatkowych leków, których celem byłoby albo eliminacja macierzystych komórek białaczkowych, albo uwrażliwienie ich na działanie inhibitorów BCR/ABL. Sukces takiego podejścia terapeutycznego wymaga zrozumienia, co różni macierzyste komórki białaczkowe od prawidłowych komórek macierzystych hematopojezy.

Wydaje się, że w komórkach macierzystych PBSz, w odróżnieniu od komórek prawidłowych, niektóre szlaki komórkowe są nadmiernie aktywowane lub podlegają mniej restrykcyjnej regulacji [55]. Jednym z takich szlaków jest szlak TGF β /FOXO3a, który wydaje się być odpowiedzialny za utrzymywanie macierzystych komórek PBSz w stanie „uśpienia” (*quiescence*). Badania prowadzone w modelu mysim wykazały, że zahamowanie przekazywania sygnału szlaku TGF β za pomocą specyficznego inhibitora LY364947 w połączeniu z imatynibem zmniejszało liczbę „uśpionych” macierzystych komórek białaczkowych [56].

Podobny cel mają próby połączenia imatynibu z IFN α . Wiadomo, że IFN α zwiększa ekspresję genów odpowiedzialnych za wyjście komórki macierzystej ze stanu „uśpienia”. W konsekwencji, pobudzone przez IFN α macierzyste komórki białaczkowe mogą zacząć się dzielić i w ten sposób stać się wrażliwe na działanie inhibitorów kinazy BCR/ABL. Pierwsze, retrospektywne analizy danych klinicznych wykazały, że odpowiedź na łączne podanie IFN α i imatynibu była szybsza niż w przypadku podania imatynibu w monoterapii, choć czas przeżycia wolnego od progresji i całkowity czas przeżycia nie różniły się znacząco między badanymi grupami [57]. Kolejne, prospektywne badanie III fazy wykazało, że podawanie IFN α z imatynibem przez 12 miesięcy pozwalało na osiągnięcie całkowitej odpowiedzi molekularnej u znacznie większego odsetka pacjentów niż monoterapia imatynibem (30% vs 14%) [58]. Nie wiadomo jednak, czy terapia łączona wpływała na macierzyste komórki PBSz u ludzi.

Inna strategia polega na zahamowaniu białek zaangażowanych w regulację odnowy, proliferacji

i apoptozy prawidłowych i macierzystych komórek białaczkowych, np. szlaku WNT/ β -kateniny, Hedgehog czy deacetylazy histonów (HDAC).

Historia PBSz pokazuje, jak wiele współczesna medycyna już skorzystała z badań nad tą chorobą. Dążenie do całkowitego wyleczenia choroby poprzez znalezienie skutecznej terapii uderzającej w macierzyste komórki białaczkowe może nie tylko spełnić ambitny cel pełnego wyleczenia z choroby, ale wyznaczyć szlak w innych chorobach nowotworowych.

Piśmiennictwo

- Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science*, 1960; 132: 1497–1498.
- Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*, 1973; 243(5405): 290–3.
- Druker BJ, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*, 1996; 2(5): 561–6.
- Deininger MW, et al. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. *Blood*, 1997; 90(9): 3691–8.
- Talpaz M, et al. Interferon-alpha produces sustained cytogenetic responses in chronic myelogenous leukemia. Philadelphia chromosome-positive patients. *Ann Intern Med*, 1991; 114(7): 532–8.
- Tuveson DA, et al. STI571 inactivation of the gastrointestinal stromal tumor c-KIT oncoprotein: biological and clinical implications. *Oncogene*, 2001; 20(36): 5054–8.
- Deininger M, et al. International randomized study of interferon vs STI571 (IRIS) 8-year follow-up: sustained survival and low risk for progression or events in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) treated with imatinib [abstract 1126]. *Blood*, 2009; 114: p. 462.
- Saglio G, et al. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 2010; 362(24): 2251–9.
- Shah NP, et al. 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(2): 117–25.
- Gorre ME, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*, 2001; 293(5531): 876–80.
- Sherbenou DW, et al. BCR-ABL SH3-SH2 domain mutations in chronic myeloid leukemia patients on imatinib. *Blood*, 2010; 116(17): 3278–85.
- Apperley JF. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol*, 2007; 8(11): 1018–29.
- Corbin AS, et al. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *J Clin Invest*, 2011; 121(1): 396–409.
- Jorgensen HG, Holyoake TL. Characterization of cancer stem cells in chronic myeloid leukaemia. *Biochem Soc Trans*, 2007; 35(Pt 5): 1347–51.
- Mahon FX, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol*, 2010; 11(11): 1029–35.
- Wilson MB, et al. Selective pyrrolo-pyrimidine inhibitors reveal a necessary role for Src family kinases in Bcr-Abl signal transduction and oncogenesis. *Oncogene*, 2002; 21(53): 8075–88.
- Tokarski JS, et al. 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(11): 5790–7.
- Hiwase DK, et al. Dasatinib cellular uptake and efflux in chronic myeloid leukemia cells: therapeutic implications. *Clin Cancer Res*, 2008; 14(12): 3881–8.
- Shah NP, et al. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science*, 2004; 305(5682): 399–401.
- Kantarjian H, et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 2010; 362(24): 2260–70.
- Kantarjian HM, et al. Dasatinib or imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: 2-year follow-up from a randomized phase 3 trial (DASISION). *Blood*, 2012; 119(5): 1123–9.
- Marin D, et al. Predictive value of early molecular response in patients with chronic myeloid leukemia treated with first-line dasatinib. *Blood*, 2012; 120(2): 291–4.
- Hughes T, et al. Impact of baseline BCR-ABL mutations on response to nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase. *J Clin Oncol*, 2009; 27(25): 4204–10.
- Kantarjian H, et al. Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *N Engl J Med*, 2006; 354(24): 2542–51.
- Kantarjian HM, et al. Nilotinib is effective in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase after imatinib resistance or intolerance: 24-month follow-up results. *Blood*, 2011; 117(4): 1141–5.
- Kantarjian HM, et al. Nilotinib versus imatinib for the treatment of patients with newly diagnosed chronic phase, Philadelphia chromosome-positive, chronic myeloid leukaemia: 24-month minimum follow-up of the phase 3 randomised ENESTnd trial. *Lancet Oncol*, 2011; 12(9): 841–51.
- Giles F, et al. Leczenie przewlekłej białaczki szpikowej w 2011 roku – dokument dotyczący polskich uzgodnień. *Hematologia*, 2011; 2(supl. B): 8–11.
- Golas JM, et al. SKI-606, a 4-anilino-3-quinolinecarbonitrile dual inhibitor of Src and Abl kinases, is a potent anti-proliferative agent against chronic myelogenous leukemia

- cells in culture and causes regression of K562 xenografts in nude mice. *Cancer Res*, 2003; 63(2): 375–81.
29. Puttini M, et al. In vitro and in vivo activity of SKI-606, a novel Src-Abl inhibitor, against imatinib-resistant Bcr-Abl+ neoplastic cells. *Cancer Res*, 2006; 66(23): 11314–22.
 30. Remsing Rix LL, et al. Global target profile of the kinase inhibitor bosutinib in primary chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia*, 2009; 23(3): 477–85.
 31. Redaelli S, et al. Activity of bosutinib, dasatinib, and nilotinib against 18 imatinib-resistant BCR/ABL mutants. *J Clin Oncol*, 2009; 27(3): 469–71.
 32. Khoury HJ, et al. Bosutinib is active in chronic phase chronic myeloid leukemia after imatinib and dasatinib and/or nilotinib therapy failure. *Blood*, 2012; 119(15): 3403–12.
 33. Huang WS, et al. Discovery of 3-[2-(imidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)ethynyl]-4-methyl-N-{4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]-3-(trifluoromethyl)phenyl}benzamide (AP24534), a potent, orally active pan-inhibitor of breakpoint cluster region-abelson (BCR-ABL) kinase including the T315I gatekeeper mutant. *J Med Chem*, 2010; 53(12): 4701–19.
 34. O'Hare T, et al. AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer Cell*, 2009; 16(5): 401–12.
 35. Cortes J, et al. A phase I trial of oral ponatinib (AP24534) in patients with refractory chronic myelogenous leukemia (CML) and other hematologic malignancies: emerging safety and clinical response findings [abstract 210]. *Blood*; 2010. 116(21).
 36. Chan WW, et al. Conformational control inhibition of the BCR-ABL1 tyrosine kinase, including the gatekeeper T315I mutant, by the switch-control inhibitor DCC-2036. *Cancer Cell*, 2011; 19(4): 556–68.
 37. Eide CA, et al. The ABL switch control inhibitor DCC-2036 is active against the chronic myeloid leukemia mutant BCR-ABL T315I and exhibits a narrow resistance profile. *Cancer Res*, 2011; 71(9): 3189–95.
 38. Giles FJ, et al. MK-0457, a novel kinase inhibitor, is active in patients with chronic myeloid leukemia or acute lymphocytic leukemia with the T315I BCR-ABL mutation. *Blood*, 2007; 109(2): 500–2.
 39. Giles FJ, et al. MK-0457, an Aurora kinase and BCR-ABL inhibitor, is active in patients with BCR-ABL T315I leukemia. *Leukemia*, 2012.
 40. Gontarewicz A, et al. PHA-680626 exhibits anti-proliferative and pro-apoptotic activity on Imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cell lines and primary CD34+ cells by inhibition of both Bcr-Abl tyrosine kinase and Aurora kinases. *Leuk Res*, 2008; 32(12): 1857–65.
 41. Gontarewicz A, et al. Simultaneous targeting of Aurora kinases and Bcr-Abl kinase by the small molecule inhibitor PHA-739358 is effective against imatinib-resistant BCR-ABL mutations including T315I. *Blood*, 2008; 111(8): 4355–64.
 42. Meulenbeld HJ, et al. Danusertib, an aurora kinase inhibitor. *Expert Opin Investig Drugs*, 2012; 21(3): 383–93.
 43. Kelly KR, et al. The novel Aurora A kinase inhibitor MLN8237 is active in resistant chronic myeloid leukaemia and significantly increases the efficacy of nilotinib. *J Cell Mol Med*, 2011; 15(10): 2057–70.
 44. Shiotsu Y, et al. KW-2449, a novel multikinase inhibitor, suppresses the growth of leukemia cells with FLT3 mutations or T315I-mutated BCR/ABL translocation. *Blood*, 2009; 114(8): 1607–17.
 45. Honigberg LA, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010; 107(29): 13075–80.
 46. Engelman JA, et al. PF00299804, an irreversible pan-ERBB inhibitor, is effective in lung cancer models with EGFR and ERBB2 mutations that are resistant to gefitinib. *Cancer Res*, 2007; 67(24): 11924–32.
 47. Hantschel O, et al. A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl. *Cell*, 2003; 112(6): 845–57.
 48. Smith KM, Yacobi R, Van Etten RA. Autoinhibition of Bcr-Abl through its SH3 domain. *Mol Cell*, 2003; 12(1): 27–37.
 49. Nagar B, et al. Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell*, 2003; 112(6): 859–71.
 50. Adrian FJ, et al. Allosteric inhibitors of Bcr-abl-dependent cell proliferation. *Nat Chem Biol*, 2006; 2(2): 95–102.
 51. Zhang J, et al. Targeting Bcr-Abl by combining allosteric with ATP-binding-site inhibitors. *Nature*, 2010; 463(7280): 501–6.
 52. Filippakopoulos, P, et al. Structural coupling of SH2-kinase domains links Fes and Abl substrate recognition and kinase activation. *Cell*, 2008; 134(5): 793–803.
 53. Grebien F, et al. Targeting the SH2-kinase interface in Bcr-Abl inhibits leukemogenesis. *Cell*, 2011; 147(2): 306–19.
 54. Hantschel O, Grebien F, Superti-Furga G. Targeting allosteric regulatory modules in oncoproteins: „drugging the undruggable“. *Oncotarget*, 2011; 2(11): 828–9.
 55. Carter BZ, et al. The elusive chronic myeloid leukemia stem cell: does it matter and how do we eliminate it? *Semin Hematol*. 2010; 47(4): 362–70.
 56. Naka K, et al. TGF-beta-FOXO signalling maintains leukaemia-initiating cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature*, 2010; 463(7281): 676–80.
 57. Palandri F, et al. The response to imatinib and interferon-alpha is more rapid than the response to imatinib alone: a retrospective analysis of 495 Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia patients in early chronic phase. *Haematologica*, 2010; 95(8): 1415–9.
 58. Preudhomme C, et al. Imatinib plus peginterferon alfa-2a in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 2010; 363(26): 2511–21.