

Received: 2006.09.12  
Accepted: 2006.12.12  
Published: 2006.12.28

## STI571 – terapia celowana\*

### STI571: A summary of targeted therapy

Małgorzata Czyż, Justyna Jakubowska

Zakład Biologii Molekularnej Nowotworów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

#### Streszczenie

STI571 (imatinib; Gleevec®) jest przykładem leku stosowanego w terapii celowanej. Swoiście blokuje aktywność kinazy Abl w białku fuzyjnym Bcr-Abl, ale także aktywność receptora c-Kit oraz PDGFR. Jest lekiem doustnym, o niskim profilu toksyczności i jest stosowany w leczeniu chorych na przewlekłą białaczkę szpikową (CML) oraz nowotwór przewodu pokarmowego (GIST). Wydajnie indukuje odpowiedź hematologiczną, cytogenetyczną i molekularną, głównie u pacjentów w przewlekłej fazie CML. Istnieją dowody na pojawianie się oporności, zarówno pierwotnej, jak i wtórnej w progresji białaczki. Coraz więcej wskazuje na to, że monoterapia z zastosowaniem STI571 jest niewystarczająca, aby całkowicie usunąć białaczkowe komórki macierzyste *BCR-ABL*<sup>+</sup>. W ciągu kilku lat stosowania STI571 przeanalizowano wiele strategii, aby poprawić skuteczność leczenia pacjentów z CML, włączając w to hamowanie nie tylko aktywności, ale także ekspresji i stabilności Bcr-Abl, jak również hamowanie dróg sygnałowych aktywowanych przez tę kinazę. Zostały zsyntetyzowane i są aktualnie badane nowe inhibitory Abl. Niniejszy artykuł jest przeglądem najnowszej literatury na temat molekularnych mechanizmów działania STI571, jego efektywności w leczeniu pacjentów z CML, GIST i czerniakiem, oraz nowych podejść, których zadaniem jest poprawa skuteczności terapii przeciwnowotworowej, głównie przez eliminację pojawiającej się oporności na STI571.

Słowa kluczowe:

STI571 • terapia celowana • przewlekła białaczka szpikowa • GIST • czerniak

#### Summary

STI571 (imatinib; Gleevec®) was developed as the first molecularly targeted therapy. It was the result of an extensive search for molecules to block the aberrant activity of Abl kinase in the fusion protein Bcr-Abl. In addition, it can specifically inhibit the activity of c-Kit and PDGF receptors. This orally bioavailable drug has a low toxicity profile. It is approved to treat the patients with chronic myelogenous leukemia (CML) or gastrointestinal stromal tumor (GIST). It produces hematological, cytogenetic, and molecular remission with significant efficacy, particularly in patients with chronic-phase CML. However, there is well-documented proof of primary and secondary resistance to STI571 with progression of leukemia. More evidence indicates that this single drug may not be sufficient to completely eradicate *BCR-ABL*-positive stem cells. A variety of strategies has already been developed to improve the effectiveness of CML treatment, including targeting the expression or stability of the Bcr-Abl kinase itself, targeting signaling pathways activated by this kinase, as well as designing novel Abl inhibitors. In this review the molecular mechanisms of STI571 action, its effectiveness against CML, GIST, and melanoma, as well as new approaches to improve its efficacy, mainly by overcoming STI571 resistance, are discussed.

Key words:

STI571 • target therapy • chronic myeloid leukaemia • GIST • malignant melanoma

\* Artykuł przeglądowy opracowano w ramach prac realizowanych w projekcie badawczym finansowanym przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (nr projektu: N401 116 31/2630).

**Full-text PDF:** [http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol\\_60/9984.pdf](http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_60/9984.pdf)

**Word count:** 8506

**Tables:** 3

**Figures:** 5

**References:** 151

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

#### Wykaz skrótów:

**17-AAG** – związek wpływający na stabilność kinazy Bcr-Abl, pochodna geldanamycyny; **4E-BPI** – białko regulatorowe procesu translacji, efektor kinazy mTOR; **A375SM** – linia komórkowa ludzkiego czerniaka skóry, wariant silnie inwazyjny; **AGP** – kwaśna  $\alpha$ 1-glikoproteina surowicy krwi (alpha-1-acid glycoprotein); **Akt** – kinaza serynowo-treoninowa; **ALL** – ostra białaczka limfoblastyczna (acute lymphoblastic leukemia); **AML** – ostra białaczka szpikowa (acute myeloid leukemia); **AR230** – linia komórkowa ludzkiej przewlekłej białaczki szpikowej; **ARG** – kinaza z rodziny tyrozynowych kinaz Abl; **Bad** – białko o funkcji proapoptotycznej; **Ba/F3** – linia komórkowa mysiej białaczki limfatycznej; **Bcl-X<sub>L</sub>**, **Bcl-2** – białka o funkcji antyapoptotycznej; **Bcr-Abl** – onkogenna kinaza tyrozynowa, produkt genu fuzyjnego *BCR-ABL*; **BV173** – linia komórkowa ludzkiej ostrej białaczki Ph<sup>+</sup>; **c-Kit** – receptor o aktywności kinazy tyrozynowej; **CML** – przewlekła białaczka szpikowa (chronic myelogenous leukemia); **CMML** – przewlekła białaczka mielomonocytoza (chronic myelomonocytic leukemia); **Crkl** – białko o funkcji adaptorowej, substrat kinazy Bcr-Abl; **EGFR** – receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (epidermal growth factor receptor); **Erk1/2** – kinaza aktywowana przez czynniki pozakomórkowe (extracellular signal-regulated kinase 1 and 2); **EVI-1** – białko represorowe transkrypcji (ecotropic viral integration site 1); **FDA** – Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (Food and Drug Administration); **Fes** – cytoplazmatyczna kinaza tyrozynowa; **FGF-R1** – receptor czynnika wzrostu fibroblastów (fibroblast growth factor receptor 1); **FGR** – kinaza z rodziny Src; **FISH** – technika barwienia chromosomów, fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (fluorescent *in situ* hybridization); **KBP12** – białko regulatorowe cyklu komórkowego (FK506 binding protein); **FLT3** – receptor o aktywności kinazy tyrozynowej; **FTI** – inhibitor transferazy farnesyli (farnesyl transferase inhibitor); **GIST** – nowotwór podścieliska przewodu pokarmowego (gastrointestinal stromal tumor); **GIST780**, **GIST882** – linie ludzkich komórek nowotworowych podścieliska przewodu pokarmowego; **GSK3b** – kinaza syntazy glikogenu (glycogen synthase kinase 3 beta); **hOCT1** – białko transportowe (human organic cation transporter 1); **Hsp90** – białko szoku cieplnego (heat shock protein 90); **IAP** – inhibitor apoptozy (inhibitor of apoptosis); **IκB** – inhibitor czynnika transkrypcyjnego NFκB (inhibitor of NF kappa B); **Jak** – niereceptorowa kinaza tyrozynowa Janusa (Janus kinase); **JNK** – kinaza białka c-Jun (c-Jun-N-terminal kinase); **K562** – linia komórkowa ludzkiej przewlekłej białaczki szpikowej; **KCL22** – linia komórkowa ludzkiej przewlekłej białaczki szpikowej; **KU812** – linia komórkowa ludzkiej przewlekłej białaczki szpikowej; **LCK** – kinaza z rodziny Src (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase); **LYN** – kinaza z rodziny Src; **MADD** – gen kodujący białko regulujące szlaki sygnałowe aktywowane mitogenami (MAP-kinase activating protein containing death domain); **MAPK** – kinaza białkowa aktywowana mitogenami (mitogen-activated protein kinase); **MDM2** – onkogen kodujący białko MDM2 regulujące aktywność p53 (murine double minute gene); **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); **MeWo** – linia komórkowa ludzkiego czerniaka skóry; **mTOR** – kinaza serynowo-treoninowa (mammalian target of rapamycin); **NFκB** – czynnik transkrypcyjny κB (nuclear factor of kappa B-cells); **p16** – białko regulatorowe cyklu komórkowego, inhibitor kinaz cyklozależnych (CDK4, CDK6); **p23** – białko opiekuńcze dla Hsp90; **p38** – kinaza z rodziny MAPK; **p53** – czynnik transkrypcyjny o charakterze supresora nowotworów; **p62<sup>POK</sup>** – białko adaptorowe (downstream of tyrosine kinase); **p70S6K** – białko efektorowe kinazy mTOR zaangażowane w regulację syntezy białek; **PARP** – polimeraza poli(ADP-rybozy); **PD184352**, **PD98059** – inhibitory kinazy MEK; **PDGFR α, β** – receptor α, β płytkopochodnego czynnika wzrostu (platelet-derived growth factor receptor α, β); **PKC** – kinaza białkowa (3-phosphoinositide dependent protein kinase-1); **P-gp** – białko transportowe, produkt genu *MDR 1*; **Ph** – chromosom Filadelfia; **PI3K** – kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (phosphatidylinositol 3 kinase); **PKC** – kinaza białkowa C (protein kinase C);

**PTP1B** – fosfataza białkowa (protein tyrosine phosphatase 1B); **Raf** – kinaza serynowo--treoninowa; **Ras** – białko odpowiedzialne za stymulację licznych szlaków przekazywania wewnątrzkomórkowych sygnałów; **S6K1** – kinaza białkowa stymulowana mitogenami (p70 ribosomal protein S6 kinase 1); **SCF** – czynnik komórek pnia, ligand kinazy c-Kit (stem cell factor); **Src** – rodzina niereceptorowych kinaz tyrozynowych; **STAT** – czynniki transkrypcyjne, białka biorące udział w przekazywaniu sygnałów oraz aktywacji transkrypcji genów (signal transducer and activator of transcription); **STI571** – inhibitor kinaz Bcr-Abl, c-Kit i PDGFR (signal transduction inhibitor 571); **Syp** – fosfataza tyrozynowa; **TIE-2** – receptorowa kinaza tyrozynowa (tunica interna endothelial cell kinase); **U0123** – inhibitor kinazy MEK1/2; **U937** – komórki ludzkiej mieloidalnej linii *BCR-ABL*; **VEGF-R1, -R2** – receptory naczyniowego czynnika wzrostu (vascular endothelial growth factor receptor 1 and 2).

## WSTĘP

Poszukiwanie związków, które mogłyby skutecznie i selektywnie eliminować komórki nowotworowe w organizmie pacjenta, nie niszcząc zdrowych tkanek, jest celem wielu badań eksperymentalnych. Większość poszukiwań prowadzonych w ostatnich dziesięcioleciach skierowana była na wykorzystanie różnic w tempie podziałów komórkowych/replikacji DNA między komórkami nowotworowymi i większością komórek prawidłowych. Blokowanie podziałów komórkowych może następować przez zahamowanie syntezy nukleotydów potrzebnych w procesie powielania DNA. Przykładem leków o takim mechanizmie działania są fluorouracyl (Adrucil®) i hydroksymocznik (Hydrea®). Innym mechanizmem jest bezpośrednie oddziaływanie leków z DNA przez tworzenie wiązań kowalencyjnych lub kompleksów interkalacyjnych powodujące zahamowanie replikacji i indukację apoptozy. Do tego rodzaju leków stosowanych w terapii przeciwnowotworowej należą m.in. cisplatyna (Platinol®) oraz antybiotyki: daunorubicyna (Cerubidine®) i doksorubicyna (Adriamycin®) [131]. Zahamowanie prawidłowych podziałów komórkowych może być również spowodowane przez związki blokujące powstawanie wrzeciona mitotycznego np. Vincristine (Oncovin®). W oczywisty sposób skuteczność leków działających przez hamowanie podziałów komórkowych jest ograniczona przez ich toksyczność w stosunku do prawidłowych, ale szybko dzielących się komórek.

W ostatnim dziesięcioleciu wiele uwagi poświęcono przyczynom zwiększonej proliferacji, które byłyby swoiste tylko dla komórek nowotworowych. Znanych jest ponad 50 onkogenów, z których większość to kinazy [12]. W komórkach prawidłowych protoonkogeny kodujące kinazy są ściśle regulowane, co umożliwia prawidłowy wzrost i proliferację komórek. W wyniku onkogennej mutacji następują zmiany w przekazywaniu sygnałów wewnątrzkomórkowych, a to z kolei powoduje transformację nowotworową. Wyraźny postęp w poznaniu mechanizmów odpowiedzialnych za przekazywanie sygnałów w komórce oraz w zrozumieniu udziału zmian w przekazywaniu sygnałów w rozwoju nowotworów umożliwił powstanie nowego podejścia terapeutycznego nazywanego terapią celowaną. W założeniu podejście to polega na eliminowaniu komórek nowotworowych przez zastosowanie związków, które selektywnie blokując podwyższoną aktywność określonego białka regulatorowego, hamują ich niekontrolowaną proliferację. Wzajemne powiązania dróg przekazywania sygnałów w komórce ograniczają wybiórczość działania związków tego rodzaju w blokowaniu pojedynczych dróg sygnałowych. W chwili obecnej, w gru-

pie leków celowanych jest już kilka związków zatwierdzonych do stosowania w określonych programach leczenia pacjentów z nowotworami (tabela 1).

STI571 (signal transduction inhibitor 571) jest jednym z pierwszych osiągnięć terapii celowanej. Badania *in vitro* zmierzające do określenia aktywności oraz swoistości działania STI571 względem kinaz białkowych wykazały, że związek ten charakteryzuje się wąskim zakresem działania. Potwierdzono aktywność hamującą względem wszystkich postaci kinazy tyrozynowej Abl (c-Abl, v-Abl, Bcr-Abl, TEL-ABL) oraz względem dwóch receptorowych kinaz tyrozynowych c-Kit i PDGFR. Związek jest nieaktywny w stosunku do wszystkich kinaz serynowo-treoninowych, nie hamuje EGFR oraz wykazuje minimalną bądź też nie wykazuje żadnej aktywności w stosunku do VEGF-R1 i -R2, FGF-R1, TIE-2, c-MET oraz niereceptorowych kinaz z rodziny Src (FGR, LYN, LCK) [26].

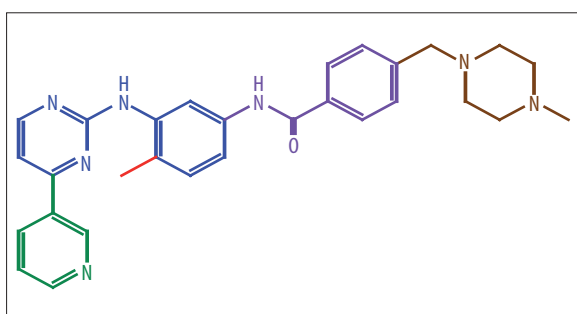
Badano możliwość zastosowania STI571 w leczeniu pacjentów z nowotworami, które charakteryzuje zmieniona aktywność kinaz wrażliwych na działanie tego związku. Należą do nich białaczki, w których występuje podwyższona aktywność kinazy Abl spowodowana ekspresją fuzyjnego genu *BCR-ABL* lub *TEL/ABL*, a więc przewlekła białaczka szpikowa (CML), ostra białaczka limfoblastyczna (ALL), ostra białaczka szpikowa (AML), oraz nowotwory, w których obserwuje się zmienioną aktywność receptorowej kinazy tyrozynowej c-Kit, np. nowotwór podścieliska przewodu pokarmowego (GIST). Mutacje zmieniające aktywność c-Kit obserwuje się również w drobnokomórkowym raku płuc, w guzach piersi, szyjki macicy i jajników, raku stercza i czerniaku. W niektórych białaczkach (głównie CMML) występuje zwiększona aktywność receptora PDGF wynikająca z ekspresji genu fuzyjnego *TEL/PDGFRβ*. Najwięcej doniesień na temat mechanizmów działania i efektów terapeutycznych stosowania STI571 dotyczy przewlekłej białaczki szpikowej. Niniejszy artykuł jest przeglądem najnowszej literatury na ten temat. W mniejszym zakresie omawiane są zagadnienia związane ze stosowaniem STI571 w leczeniu pacjentów, u których stwierdzono czerniaka lub GIST. W kolejnym artykule podejmujemy próbę podsumowania tendencji w poszukiwaniu nowych leków, przy czym rozwój w tym zakresie w dużym stopniu wynika z dotychczasowych, już kilkuletnich doświadczeń z STI571.

## STRUKTURA CHEMICZNA STI571 I PROFIL FARMAKOKINETYCZNY

W późnych latach osiemdziesiątych ub.w. w laboratoriach Ciba Geigy (obecnie Novartis Pharmaceuticals) rozpoczę-

Tabela 1. Swoiste inhibitory kinaz stosowane w przeciwnowotworowej terapii celowanej

Nazwy	Cel działania
Bevacizumab (Avastin)	VEGF
Cetuximab (Erbix)	EGFR
Erlotinib (Tarceva; OSI-774/CP358774)	EGFR
Gefitinib (Iressa; ZD-1839)	EGFR
Imatinib (Gleevec; STI571)	Abl, c-Kit, PDGFR
Sorafenib (Nexavar, BAY 43-9006)	B-Raf, c-Kit, FLT3, PDGFR, Raf-1, VEGFR
Sunitinib (Suyent; SU11248)	c-Kit, FLT3, PDGFR, VEGFR
Trastuzumab (Herceptin)	ErbB2 (HER-2/neu)



Ryc.1. Wzór chemiczny STI571. Różnymi kolorami zaznaczono fragmenty cząsteczki wprowadzane jako kolejne modyfikacje do wyjściowej fenyloaminopirymidyny (niebieski). Wprowadzenie pirydyny (zielony) zwiększyło aktywność związku w komórce, benzamidu (fiolet) zwiększyło aktywność hamującą w stosunku do kinaz tyrozynowych, grupy metylowej (czerwony) zniósło hamowanie aktywności PKC. Ostatnia modyfikacja polegająca na przyłączeniu N-metylopiperazy (brąz) zwiększyła rozpuszczalność związku w wodzie

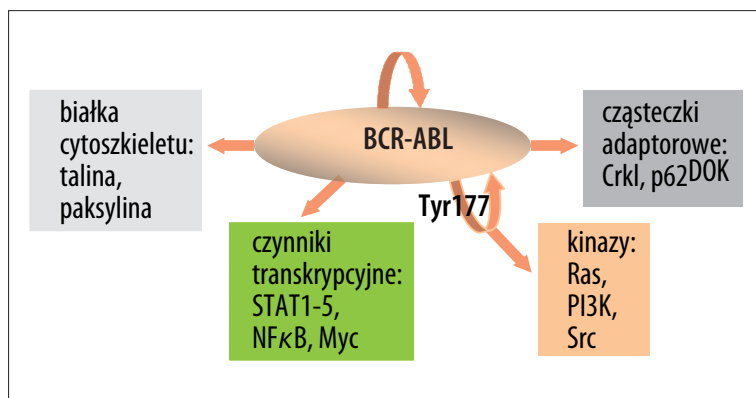
to projekt badawczy mający na celu syntezę wybiórczych inhibitorów kinaz tyrozynowych. Wiodącym związkiem była pochodna fenyloaminowa pirymidyny, która stała się podstawą do syntezy serii dalszych pochodnych. Pierwsza modyfikacja, polegająca na wprowadzeniu pierścienia pirydyny w pozycji 4' pirymidyny, zwiększyła aktywność związku na poziomie komórkowym. Przyłączenie grupy benzamidowej do pierścienia fenyloowego 2-fenyloaminopirymidyny spowodowało wzrost aktywności w stosunku do kinaz tyrozynowych, natomiast hamujący wpływ na PKC został zniesiony przez przyłączenie grupy metylowej. Ważną konsekwencją wprowadzonych modyfikacji był wzrost aktywności związku jako inhibitora onkogennej kinazy Bcr-Abl. Jednak uzyskana w ten sposób pochodna charakteryzowała się słabą rozpuszczalnością w wodzie, co ograniczało jej przyswajalność przez komórki. Przyłączenie silnie polarnej N-metylopiperazy znacząco poprawiło profil farmakokinetyczny związku. W efekcie otrzymano związek o masie cząsteczkowej 589,7 g/mol i wzorze sumarycznym  $C_{30}H_{35}N_7SO_4$  (ryc. 1), który obecnie znany jest pod nazwą STI571 (Gleevec®, Imatinib mesylate; Novartis Pharmaceuticals, Szwajcaria) [26]. STI571 podawany doustnie jest dobrze przyswajalny, niezależnie od postaci w jakiej jest podawany: tabletką,

kapsułką czy roztwór. Dostępność biologiczna leku wynosi 98%. Maksymalne stężenie związku w surowicy pacjentów, którym podaje się lek w dawce dziennej 400 mg, wynosi  $2,6 \pm 0,8 \mu\text{g/ml}$ . STI571 wiąże się głównie z białkami osocza, jest metabolizowany w wątrobie i wydalany z kałem i w nieznacznym stopniu z moczem. Okres półtrwania związku określa się na około 18 h.

#### SWOISTOŚĆ DZIAŁANIA STI571 WZGLĘDEM KINAZ BIAŁKOWYCH

Domena katalityczna eukariotycznych kinaz tyrozynowych jest wysoce konserwatywna zarówno w sekwencji aminokwasowej, jak i w swojej strukturze przestrzennej. Ma strukturę dwupłatową, w której wyróżnia się region N i C. W regionie N znajduje się obszar o strukturze  $\beta$ -harmonijki oraz  $\alpha$ -helisy (helisa C). Region C przyjmuje w dużej części strukturę helikalną. Pomiędzy tymi regionami znajduje się kieszeń wiązania ATP (pętla P) oraz centrum katalityczne. Większość odkrytych dotąd inhibitorów kinaz białkowych współzawodniczy z cząsteczką ATP o miejsce wiązania [99].

Kinazy przeważnie występują w dwóch granicznych odmianach konformacyjnych: nieaktywnej konformacji, tzw. zamkniętej oraz aktywnej, tzw. otwartej. W przypadku kinazy c-Abl, przechodzenie z postaci aktywnej w nieaktywną jest regulowane przez autoinhibicję. Główną rolę w przemianach konformacyjnych kinaz tyrozynowych odgrywa pętla aktywacji (pętla A), która znajduje się na C-końcu cząsteczki. W konformacji zamkniętej pętla aktywacji blokuje centrum katalityczne kinazy. Aktywacja kinazy następuje w wyniku fosforylacji tyrozyny występującej w pętli aktywacji. W aktywnej, ufosforylowanej postaci pętla A przyjmuje konformację, w której kwas asparaginowy znajdujący się w sekwencji Asp-Phe-Gly (DFG) ulega przemieszczeniu w sposób, który umożliwia właściwe oddziaływanie z jonami  $Mg^{2+}$ . Jony magnezu uczestniczą w wiązaniu ATP, a C-końcowy fragment pętli A układa się na kształt platformy umożliwiającej wiązanie substratu. Konformacje aktywnych kinaz białkowych są bardzo podobne. Istnieje jednak duże zróżnicowanie w strukturze ich nieaktywnych postaci. Różnice te wynikają z orientacji obszaru międzypłatowego oraz z pozycji helisy C. Badania krystalograficzne wykazały, że STI571 wiąże się preferencyjnie z nieaktywną, nieufosforylowaną odmianą konformacyjną kinazy Abl, co może tłumaczyć jego dużą swoi-



Ryc. 2. Efekt komórkowy podwyższonej aktywności kinazy Bcr-Abl w CML jest wynikiem wielu reakcji fosforylacji prowadzących do aktywacji dróg sygnałowych komórki odpowiedzialnych za proliferację i apoptozę, interakcje z macierzą zewnątrzkomórkową oraz degradację białek. W interakcjach z kinazą Bcr-Abl uczestniczą cząsteczki adaptorowe, białka cytoszkieletu, czynniki transkrypcyjne oraz kinazy. Kinaza Bcr-Abl katalizuje również reakcję autofosforylacji. Do aktywacji dróg sygnałowych Ras/MAPK i PI3K/Akt jest wymagana autofosforylacja kinazy Bcr-Abl (tyrozyna 177)

stość działania [99]. Wiązanie STI571 z aktywną postacią Abl lub innych kinaz, w tym Bcr-Abl jest niemożliwe ze względu na zawadę przestrzenną, jaka występuje między niektórymi aminokwasami pętli aktywacji i pierścieniem fenylowym i piperazyńskim STI571.

W postaci nieufosforylowanej, w wyniku powstania wiązania wodorowego pomiędzy tyrozyną i kwasem asparaginyńskim, zablokowany jest dostęp substratów do centrum katalitycznego. Ponadto, na stronie miejsca wiążącego ATP skierowana jest fenyloalanina z motywu Asp-Phe-Gly zamiast kwasu asparaginyńskim, obecnego w tym miejscu w konformacji aktywnej. Taka struktura przestrzenna kinazy umożliwia przyłączenie cząsteczki STI571, przy czym tylko pierścienie pirymidynowy i pirydynowy zostają umieszczone w pobliżu miejsca wiązania ATP, natomiast pozostała część cząsteczki STI571 wnika między pętlę aktywacji i  $\alpha$ -helisę C. Towarzyszy temu powstanie wielu wiązań stabilizujących kompleks STI571-kinaza, które to oddziaływania utrwalają kinazę w konformacji nieaktywnej. Jest to 6 wiązań wodorowych oraz wiele oddziaływań typu van der Waalsa między resztami ściśle określonych aminokwasów kinazy i cząsteczką STI571 [23,99,122]. To ściśle dopasowanie sprawia, że nawet niewielka zmiana w sekwencji aminokwasowej kinazy może osłabić oddziaływanie z STI571 [27].

Funkcjonalnie, STI571 hamuje autofosforylację kinazy i fosforylację jej substratów. Poniżej omawiamy tego konsekwencje na przykładzie trzech nowotworów, CML, GIST i czerniaka, w których zmieniona jest ekspresja kinaz będących celem STI571.

### STI571 W LECZENIU PRZEWLEKŁEJ BIAŁACZKI SZPIKOWEJ (CML)

Pierwsze wzmianki o przewlekłej białaczce szpikowej (chronic myelogenous leukemia – CML) odnotowano 160 lat temu [49,103]. Białaczka ta jest u 95% pacjentów związana z translokacją chromosomalną t(9;22)(q34;q11) prowadzącą do powstania chromosomu Filadelfia z genem fuzyjnym *BCR-ABL* [8,55]. Gen fuzyjny *BCR-ABL* pojawia się w komórkach macierzystych. Komórki progenitorowe CML dominują nad prawidłowymi zarówno większą zdolnością do proliferacji, jak i przedłużonym czasem życia, wynikającym z obniżonej zdolności do apoptozy. Ograniczenie zdolności adhezyjnych do elementów szpiku ułatwia uwalnianie komórek progenitorowych CML do krwi obwodowej [143]. Kinaza Bcr-Abl występuje głównie w trzech izoformach:

p210Bcr-Abl, p190Bcr-Abl oraz p230Bcr-Abl, które różnią się długością części Bcr. Między kinazą Abl i kinazą fuzyjną Bcr-Abl istnieją dwie różnice. Aktywność kinazy Abl jest ściśle regulowana w warunkach fizjologicznych [30], podczas gdy fuzja Bcr-Abl znosi te naturalne mechanizmy hamowania. Ponadto, kinaza Abl może występować zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze komórkowym. Natomiast kinaza Bcr-Abl występuje wyłącznie w cytoplazmie, gdzie jest konstytutywnie aktywna [144]. Kinaza Bcr-Abl powoduje aktywację wielu wewnątrzkomórkowych dróg sygnałowych, co z kolei wpływa stymulującą na proliferację komórek, hamującą na apoptozę, zmienia interakcje z macierzą zewnątrzkomórkową oraz wpływa na degradację białek z udziałem kompleksu proteosomalnego [95]. Kinaza Bcr-Abl fosforyluje wiele substratów (ryc. 2). Należą do nich m.in. cząsteczki adaptorowe, np. Crkl [104] i p62<sup>DOK</sup> [15], białka związane z organizacją cytoszkieletu i błony komórkowej np. talina [115] i paksylina [116], białka o funkcji katalitycznej np. kinaza Fes zaangażowana w proces różnicowania [41], czy fosfataza Syp [133] oraz sama kinaza Bcr-Abl. W zależności od rodzaju komórek, substratem Bcr-Abl mogą być różne białka. Na przykład, Crkl jest głównym substratem kinazy w neutrofilach CML [104], podczas gdy białko p62<sup>DOK</sup> jest fosforylowane w komórkach progenitorowych CML [15]. W warunkach fizjologicznych, fosfatazy regulują poziom aktywności kinaz. Defosforylacja Bcr-Abl zachodzi głównie z udziałem dwóch fosfataz tyrozynowych: Syp [133] oraz PTP1B [79].

Bcr-Abl aktywuje wiele dróg sygnałowych, które w prawidłowych komórkach są pod kontrolą hematopoetycznych czynników wzrostu, takich jak SCF, trombopoetyna, czy interleukina 3. Aktywowane są drogi sygnałowe Ras/MAPK oraz PI3K/Akt. W wielu komórkach *BCR-ABL*<sup>+</sup> obserwowana jest aktywacja czynnika transkrypcyjnego NFκB [77], oraz konstytutywna aktywacja czynników transkrypcyjnych STAT [65]. W przypadku obu czynników transkrypcyjnych może to oznaczać ograniczone zdolności do apoptozy. Na przykład, STAT5, czynnik transkrypcyjny o plejotropowej funkcji, w komórkach *BCR-ABL*<sup>+</sup> jest wiązany z działaniem antyapoptotycznym, gdyż jest odpowiedzialny za zwiększoną ekspresję Bcl-X<sub>L</sub> [63,127]. W warunkach fizjologicznych, aktywacja STAT zachodzi z udziałem Jak, podczas gdy Bcr-Abl może bezpośrednio aktywować STAT1 i STAT5 bez uprzedniej fosforylacji białek Jak.

Ekspresja Bcr-Abl zapobiega apoptozie również poprzez aktywację szlaku sygnałowego Ras [21]. Za wysoki poten-

cjał proliferacyjny komórek *BCR-ABL*<sup>+</sup> odpowiada głównie kinaza PI3, z którą Bcr-Abl tworzy multimeryczne kompleksy [117]. Substratem tych kompleksów jest m.in. kinaza Akt [129]. Jest wiele doniesień, że linie komórkowe *BCR-ABL*<sup>+</sup> nie ulegają apoptozie po zastosowaniu czynników uszkadzających DNA [10]. Mechanizm jest nie do końca poznany, chociaż wiele wskazuje na blokadę uwalniania cytochromu C z mitochondriów, hamowanie aktywacji kaspaz [3,37] oraz fosforylację proapoptotycznego białka Bad [101]. Z powyższych rozważań wynika, że sygnały zainicjowane przez Bcr-Abl powodują zaburzenie równowagi pomiędzy proliferacją i apoptozą.

Przewlekła białaczka szpikowa jest zwykle chorobą trójfazową. Po fazie przewlekłej (chronic phase – CP), trwającej przeciętnie 5–6 lat występuje faza przyspieszona (accelerated phase – AP), a następnie ostra faza blastyczna (blast crisis – BC). Do chwili obecnej nie ma dowodów na to, że w początkowym etapie przewlekłej postaci występują inne niż *BCR-ABL* uszkodzenia genetyczne. Nie wiadomo, co jest przyczyną gwałtownych przemian prowadzących do zaostrzenia blastycznego. Delecja genów/inaktywacja białek p16 [126], p53 [43], lub Rb [138] oraz zwiększona ekspresja EVI-1 [105] są brane pod uwagę, ale wydaje się, że indukcja fenotypu zaostrzenia blastycznego może mieć bardzo różne podłoże wynikające z genetycznej niestabilności komórek *BCR-ABL*<sup>+</sup>. Nie wiadomo, jaki jest w tym udział kinazy Bcr-Abl. Obserwowano zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G2 po naświetlaniu komórek *BCR-ABL*<sup>+</sup> poddanych działaniu związków uszkadzających DNA [9]. Takie zahamowanie cyklu komórkowego wywołuje apoptozę w komórkach prawidłowych, natomiast w przypadku komórek nowotworowych może oznaczać przedłużoną, ale nieprawidłową naprawę DNA i z czasem może prowadzić do nagromadzenia mutacji, co przy dużym potencjale proliferacyjnym komórek *BCR-ABL*<sup>+</sup> może być przyczyną zaostrzenia blastycznego. Wiele linii komórkowych wyprowadzonych od pacjentów z CML w fazie zaostrzenia blastycznego proliferuje nawet przy braku czynników wzrostu. W fazie przewlekłej, komórki nie są całkowicie niezależne od czynników wzrostu, ale w porównaniu z komórkami prawidłowymi mogą proliferować przy niższym stężeniu cytokin [70].

Z pierwszych prac opisujących wpływ STI571 na hodowle komórek białczkowych wynika, że wartość  $IC_{50}$  dla hamowania aktywności kinazy Bcr-Abl znajduje się w przedziale 250–500 nM [11,24,35]. Jest to stężenie 10-krotnie wyższe niż  $IC_{50}$  dla hamowania aktywności kinazy w układzie bezkomórkowym. Wartości  $IC_{50}$  dla hamowania proliferacji w poszczególnych liniach komórkowych są z kolei dużo niższe niż stężenie STI571, które może być osiągnięte u pacjentów. STI571 hamuje proliferację i indukuje apoptozę niemal we wszystkich badanych liniach komórkowych *BCR-ABL*<sup>+</sup> [24,29,35,46]. Spośród badanych linii komórkowych bardzo nieliczne, w tym linia KCL22 pochodząca od pacjenta z CML w fazie zaostrzenia blastycznego, były odporne na działanie STI571. Komórki linii K562 również pochodzące od pacjentki z CML w fazie zaostrzenia blastycznego wykazywały pewną wrażliwość na STI571 [150]. W przypadku komórek hodowli pierwotnej CML obserwuje się raczej hamowanie proliferacji niż indukcję apoptozy [54,61].

W mysim modelu ludzkiej, przewlekłej białaczki szpikowej, pierwsze efekty działania STI571 zaobserwowano już

po 48 godzinach od rozpoczęcia podawania leku, a po 8 dniach żadne z leczonych zwierząt nie wykazywało objawów choroby nowotworowej. Stan ten utrzymywał się u 8/12 osobników przez ponad 200 dni nieprzerwanej terapii. Badania potwierdziły, że przeciwnowotworowe działanie STI571 jest ściśle związane z hamowaniem aktywności kinazy Bcr-Abl. U myszy, którym przeszczepiono komórki ludzkiej mieloidalnej linii U937 (*BCR-ABL*<sup>-</sup>) podawanie STI571 nie hamowało wzrostu nowotworu [26].

Do pierwszej fazy badań klinicznych, mającej na celu określenie maksymalnej, tolerowanej dawki STI571 zakwalifikowano pacjentów w przewlekłej fazie CML, opornych na dotychczasowe leczenie z użyciem interferonu  $\alpha$ . Pacjentom podawano STI571 w dawce 25–1000 mg/dzień. Ustalono, że minimalną, dzienną dawką leku, niezbędną do wywołania odpowiedzi hematologicznej jest 140 mg. Badania farmakokinetyczne wykazały, że po zastosowaniu dawki 300 mg/dzień, stężenie leku osiągnane we krwi jest porównywalne do stężenia efektywnego w badaniach *in vitro* (1  $\mu$ M) [34]. Spośród 54 pacjentów leczonych dawką 300–1000 mg, u 53 pacjentów osiągnięto całkowitą odpowiedź hematologiczną (complete haematologic response – CHR), która zaznaczała się przeciętnie w czwartym tygodniu od rozpoczęcia podawania leku (tabela 2). Większą odpowiedź cytogenetyczną osiągnięto u 17 chorych (major cytogenetic response – MCR), w tym u 7 pacjentów nie stwierdzono obecności chromosomu Ph [34]. Zachęcające wyniki leczenia pacjentów w przewlekłej fazie CML, doprowadziły do rozszerzenia badań na grupę 58 pacjentów z CML w zaawansowanym stadium kryzy blastycznej lub z ALL z kariotypem Ph<sup>+</sup> opornych na standardową chemioterapię lub z nawrotem choroby. Po włączeniu leczenia z zastosowaniem STI571 w dawce 300 mg/dzień uzyskano remisję hematologiczną u większości pacjentów, aczkolwiek po okresie kilku tygodni połowa pacjentów z CML oraz prawie wszyscy z ALL przestali reagować na leczenie. Wyniki sugerowały konieczność włączenia terapii uzupełniającej [33]. Pacjentów z CML w każdym stadium choroby oraz pacjentów z ALL objęto następnie badaniami w kilku ośrodkach (tabela 2) [73,106,119,132]. Efektywność terapii z użyciem STI571 była różna w zależności od stadium zaawansowania choroby, w którym rozpoczęto leczenie. Najlepsze wyniki leczenia osiągnięto w grupie pacjentów w przewlekłej fazie CML, u których uprzednio stosowana terapia interferonem  $\alpha$  zakończyła się niepowodzeniem. U 19% pacjentów wystąpiła częściowa, a u 41% całkowita odpowiedź cytogenetyczna. Całkowitą odpowiedź hematologiczną osiągnięto u 95% pacjentów. Odpowiedź była trwała i wśród 88% pacjentów utrzymywała się średnio przez 18 miesięcy. Tylko u 10% pacjentów nastąpiła progresja choroby [73]. Badania przeprowadzone w grupie pacjentów z CML w późnej fazie przewlekłej przynosiły podobne efekty leczenia. Całkowitą odpowiedź hematologiczną oraz całkowitą odpowiedź cytogenetyczną osiągnięto odpowiednio u 89 i 44% pacjentów [111]. Dla porównania, u pacjentów z CML w przyspieszonej fazie tylko w przypadku 17% uzyskano całkowitą odpowiedź cytogenetyczną, oraz w 53% przypadków osiągnięto całkowitą odpowiedź hematologiczną [132]. Kilku pacjentów z CML w fazie kryzy blastycznej osiągnęło trwałą remisję [119]. W leczeniu pacjentów z ALL nie odnotowano żadnej trwałej odpowiedzi [106]. Wyniki I i II fazy badań klinicznych (tabela 2) doprowadziły do zatwierdzenia STI571 przez FDA (Food and Drug Administration)

Tabela 2. Odpowiedź pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową (CML) na leczenie STI571. Wyniki badań klinicznych

	I faza badań klinicznych				II faza badań klinicznych						
	[34]		[33]		[73]		[119]		[132]		
<b>Charakter uzyskanej odpowiedzi</b>	<b>Odpowiedź hematologiczna<sup>1</sup></b>	53/54	98%	21/38	55%	430/454	95%	119/229	60%	149/181	82%
	<b>Odpowiedź cytogenetyczna<sup>2</sup></b>	29/54	54%	4/38	11%	343/454	76%	142/229	62%	86/181	48%
<b>Stosowane dawki</b>		300–1000 mg		25–1000 mg		400 mg		400 mg lub 600 mg		400 mg lub 600 mg	

Przedstawione wyniki są podsumowaniem badań przeprowadzonych wśród pacjentów w różnych stadiach choroby. Omówienie wyników stosowania STI571 u pacjentów w poszczególnych fazach CML znajduje się w tekście.

<sup>1</sup> Kryteria odpowiedzi hematologicznej – utrzymująca się 4 tygodnie lub dłużej **odpowiedź całkowita** (complete haematologic response – CHR; leukocyty <10 000/mm<sup>3</sup>, płytki <450 000/mm<sup>3</sup>, mieloblasty w szpiku kostnym <5%, brak blastów i promielocytów we krwi, leukocyty obojętnochłonne <1500/mm<sup>3</sup>, brak ognisk hematopoezy pozaszpikowej), **odpowiedź szpikowa** (marrow response; mieloblasty w szpiku kostnym <5%, brak blastów i promielocytów we krwi, płytki <20 000/mm<sup>3</sup>, leukocyty obojętnochłonne <1000/mm<sup>3</sup>), **powrót do fazy przewlekłej** (return to chronic phase; blasty we krwi obwodowej i szpiku kostnym <15%, blasty i promielocytów we krwi obwodowej i szpiku kostnym <30%, leukocyty zasadochłonne we krwi obwodowej <20%)

<sup>2</sup> Kryteria odpowiedzi cytogenetycznej – **całkowita** (complete cytogenetic response – CCR; 0% Ph<sup>+</sup> w metafazie), **częściowa** (partial cytogenetic response; 1–35%), **mała** (minor cytogenetic response; 36–65%) lub **minimalna** (minimal cytogenetic response; powyżej 66–95%), **większa odpowiedź** (major cytogenetic response) to połączenie odpowiedzi całkowitej i częściowej (<35% Ph<sup>+</sup> w metafazie)

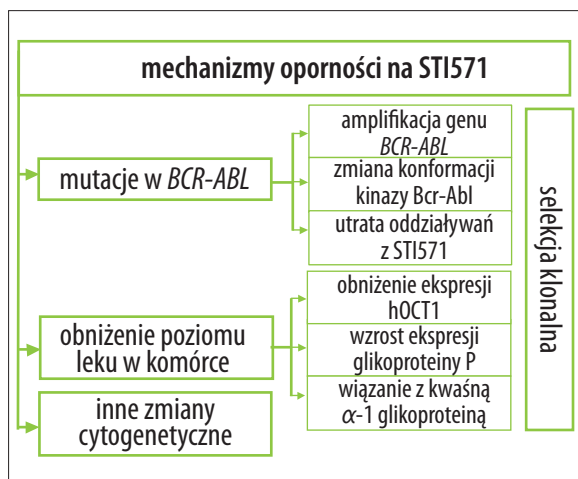
jako leku w terapii przeciw przewlekłej białaczce szpikowej (CML) w grudniu 2002 roku.

Od tego czasu, STI571 stał się standardowym lekiem stosowanym w terapii przeciw CML i ukazało się wiele prac podsumowujących jego działanie. Prace te dotyczą zarówno długości czasu życia pacjentów i przebiegu choroby, jak i metod analizy odpowiedzi na lek. Jedną z nowych metod molekularnego monitorowania jest zastosowanie techniki real-time PCR do oceny poziomu transkryptu dla Bcr-Abl w trakcie terapii [20]. W badaniach zakrojonych na szeroką skalę porównuje się efekty długofalowe stosowania STI571 z efektami uzyskanymi z użyciem innych leków. Jednym z takich programów jest IRIS (International Randomized Study of Interferon versus STI571), do którego zakwalifikowano 1106 pacjentów z 16 krajów, przy czym 553 poddano terapii STI571, drugą połowę interferonem  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) w kombinacji z cytarabiną (Ara-C). Najnowsze dane pochodzące z tych badań, prezentowane podczas 2006 Annual Meeting of ASCO wykazały, że po 5 latach od rozpoczęcia terapii u 69% pacjentów z CML nadal stosowany jest STI571. U 93% pacjentów, którzy rozpoczęli leczenie w przewlekłej fazie nie stwierdzono progresji choroby. Tylko 4,6% leczonych pacjentów zmarło wskutek białaczki. Trudno porównać otrzymane wyniki z wynikami uzyskanymi u pacjentów leczonych IFN- $\alpha$ /Ara-C, gdyż tylko 3% pacjentów pozostawiono przy tym schemacie leczenia. Z tego powodu, zaczęto stosować inne podejście. Porównuje się efekty stosowania STI571 u nowo zdiagnozowanych pacjentów z CML (od początku STI571 jest jedynym lekiem) z efektami uzyskanymi w leczeniu interferonem  $\alpha$ , w tym samym ośrodku wiele lat wcześniej [74]. Przeprowadzono w ten sposób badania porównawcze efektów leczenia za pomocą STI571 u 279 pacjentów (lata 2000–2004) z efektami leczenia interferonem  $\alpha$  u 650 pacjentów (lata 1982–1997). Całkowitą odpowiedź cytogenetyczną uzyskano u 87% pacjentów leczonych STI571 i tylko u 28% pacjentów leczonych interferonem  $\alpha$ . Przynajmniej 3-letni okres przeżycia odnotowano u 96% pacjentów leczonych STI571, natomiast

interferonem  $\alpha$  u 81%. Uważa się, że właśnie lepsza odpowiedź cytogenetyczna leży u podstaw dłuższego czasu przeżycia pacjentów leczonych STI571. Podobne badania przeprowadzono porównując 551 pacjentów z CML leczonych STI571 w ramach programu IRIS z 325 pacjentami, którzy otrzymywali terapię skojarzoną IFN/Ara-C w latach 1991–1996 (program CML91), a więc w okresie, kiedy STI571 był niedostępny [113]. Z zestawienia wyników leczenia w obu programach wynika, że oba testowane parametry: całkowita odpowiedź cytogenetyczna oraz okres przeżycia bez choroby zdecydowanie wskazują na wyższą skuteczność STI571.

Obecnie większość pacjentów w przewlekłej fazie CML otrzymuje standardową dawkę STI571 (400 mg/dzień). Są jednak przypadki, gdy ta rekomendowana dawka jest niewystarczająca i należy zastosować inną terapię, np. przeszczep allograftyczny. Niemniej jednak uważa się, że STI571 w dawce 400 mg/dzień powinien być stosowany w pierwszej kolejności i dopiero brak odpowiedzi, monitorowany m.in. przez pomiar poziomu transkryptu dla Bcr-Abl, upoważnia do zwiększenia dawki lub zastosowania bardziej agresywnej terapii. Natomiast pacjenci w fazie przyspieszonej lub kryzy blastycznej powinni otrzymać przeszczep allograftyczny oraz STI571 jako terapię wspomagającą [91].

Kilkuletnie stosowanie STI571 w klinikach przyniosło też niepokojące sygnały. W połowie 2006 roku ukazały się doniesienia, że STI571 stosowany u pacjentów z CML, może spowodować poważne uszkodzenie serca [75]. Stwierdzono to u 10 pacjentów leczonych STI571. Badania *in vitro* wykazały, że w kardiomiocytach hodowanych w obecności STI571 występuje zmiana potencjału błonowego mitochondriów, uwolnienie cytochromu C do cytosolu, a następnie śmierć komórek. Wprowadzenie opornego na STI571 wariantu kinazy Abl do kardiomiocytów zapobiegało ich śmierci powodowanej przez STI571. Kardiotoksyczność została zaliczona do potencjalnych działań niepożądanych stosowania STI571 w terapii przeciwnowotworowej.



Ryc. 3. Mechanizmy oporności na STI571. Dominującym mechanizmem są mutacje w *BCR-ABL* powodujące utratę zdolności kinazy do wiązania STI571. Odnotowano również amplifikację genu *BCR-ABL* powodującą wzrost poziomu kinazy oraz inne mutacje powodujące wzrost jej aktywności. Ważnym mechanizmem oporności jest obniżenie poziomu STI571 w komórce wskutek zwiększonej ekspresji glikoproteiny P lub wiązania leku z kwaśną glikoproteiną  $\alpha$ -1. W rozwoju oporności na STI571 mogą uczestniczyć również różne zmiany cytogenetyczne. Selekcja klonów opornych na STI571 może spowodować wznowę choroby lub jej progresję

### MECHANIZMY OPORNOŚCI NA STI571

Mimo niewątpliwej skuteczności w leczeniu pacjentów z CML, głównym problemem terapii z zastosowaniem STI571, który pojawił się w literaturze znacznie wcześniej niż skutki uboczne jest rozwój oporności na lek. Oporność pierwotna na STI571 jest rzadko spotykana i niewiele wiadomo na temat jej molekularnego podłoża [44]. Dotyczy to zarówno pierwotnej oporności hematologicznej, definiowanej jako całkowity brak odpowiedzi hematologicznej pomimo zastosowania terapeutycznych dawek leku przez 3 miesiące, jak i częściej spotykanej pierwotnej oporności cytogenetycznej, która określana jest jako brak odpowiedzi cytogenetycznej w ciągu 12 miesięcy trwania terapii. Odporność nabyta, nazywana również wtórną, jest wytworzona w reakcji na podawany lek. Wiąże się z osłabieniem początkowo uzyskiwanej chemiowrażliwości i utratą osiągniętej w trakcie leczenia odpowiedzi hematologicznej (ponowne pojawienie się komórek *BCR-ABL*<sup>+</sup>), cytogenetycznej (obecność chromosomu Ph) lub molekularnej (amplifikacja genu *BCR-ABL*). Etiologia wtórnej oporności w następstwie stosowania STI571 jest wieloczynnikowa (ryc. 3). Do najważniejszych mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój oporności wtórnej należą: mutacje punktowe w *BCR-ABL* powodujące powstanie białka niezdolnego do wiązania STI571, wzrost ekspresji kinazy wynikający z amplifikacji genu *BCR-ABL*, obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu leku w wyniku zwiększonej ekspresji glikoproteiny P (multidrug resistance 1 – *MDR-1*) lub w wyniku wiązania z kwaśną glikoproteiną  $\alpha$ -1, kompensacyjna aktywacja innych kinaz np. z rodziny SRC oraz wiele innych mechanizmów, których rola jest mniej udokumentowana [86].

Progresja choroby z fazy przewlekłej do zaostrzenia blastycznego często koreluje ze wzmożoną ekspresją kinazy Bcr-Abl, która jest następstwem amplifikacji genu *BCR-ABL* [83,146], bądź też z pojawieniem się dodatkowej kopii chromosomu Filadelfia. Stosując metodę FISH wykazano obecność dodatkowej kopii genu *BCR-ABL* w 3 na 9 przypadków wystąpienia oporności na STI571 [53]. Ustalono również związek między poziomem kinazy Bcr-Abl, oznaczonym przed rozpoczęciem terapii, a czasem wystąpienia oporności na STI571. Badania polegały na wyselekcjonowaniu w hodowlach komórkowych opornej na STI571 subpopulacji komórek zdolnej do proliferacji w obecności 1  $\mu$ M STI571, w których poziom ekspresji kinazy Bcr-Abl był porównywalny do poziomu obserwowanego u pacjentów w przewlekłej fazie lub w fazie zaostrzenia blastycznego. Wykazano, że komórki z ekspresją kinazy Bcr-Abl zbliżoną do obserwowanej w fazie zaostrzenia blastycznego są znacznie mniej podatne na leczenie STI571, a selekcja i szybki rozwój klonów lekoopornych zachodzi w czasie 32–42 dni po rozpoczęciu stymulacji lekiem. W przypadku komórek ze stosunkowo niskim poziomem aktywnej kinazy Bcr-Abl, porównywalnym do poziomu w pierwotnych hodowlach komórek z fazy przewlekłej, STI571 w stężeniu 1  $\mu$ M indukował rozwój oporności średnio dopiero po 97 dniach [6].

Najczęstszą przyczyną oporności wtórnej pojawiającej się w następstwie stosowania STI571 (50–90% przypadków wystąpienia lekooporności) są mutacje punktowe, które obniżają wrażliwość kinazy na STI571 3–100 razy [134]. Część z nich utrzymuje białko w konformacji aktywnej, przez co uniemożliwia przyjęcie przez kinazę Bcr-Abl konformacji nieaktywnej, rozpoznawanej przez lek, ale są i takie, które dotyczą aminokwasów zaangażowanych w bezpośredni kontakt z STI571. Dotąd stwierdzono wystąpienie ponad 40 różnych mutacji punktowych u pacjentów z CML. Mutacje punktowe w *BCR-ABL* zmieniające powinowactwo białka do STI571 można przyporządkować do jednej z pięciu grup [26,145]. Do pierwszej należą mutacje w pętli P (244–255 aminokwasu), wysoce konserwatywnym regionie odpowiedzialnym za wiązanie nukleotydów. Do najczęstszych należą: Y253F, G250E, E255K oraz Q252H. Mutacje prowadzące do substytucji tych aminokwasów powodują około 100-krotne obniżenie wrażliwości na STI571 i 10-krotne obniżenie wydajności hamowania proliferacji komórek *in vitro*. Żaden z wymienionych aminokwasów nie tworzy bezpośrednio wiązania z STI571 i nie do końca wiadomo, w jaki sposób mutacje te powodują pojawienie się oporności na STI571, ale wydaje się, że mogą one wywoływać zmiany konformacyjne w cząsteczce białka, które przesuwają równowagę w kierunku jego postaci aktywnej, która nie jest wiązana przez STI571 [22]. Przykładem może być mutacja Y253F, która powoduje utratę wiązania wodorowego z N322, co powoduje przesunięcie równowagi w kierunku postaci aktywnej. Kolejną grupą to mutacje w regionie, który wprawdzie nie jest wysoce konserwatywny ewolucyjnie i nie ma wpływu na wiązanie ATP, ale jest istotny dla powstawania wiązań stabilizujących z STI571. Wymienić tu należy T315I i F317L. Tyrozyna w pozycji 315 tworzy wiązanie wodorowe z lekiem. Zastąpienie tyrozyny izoleucyną, która ma rodnik apolarny uniemożliwia powstanie tego stabilizującego wiązania, co w konsekwencji obniża reakcję na lek. Substytucja F317L powoduje utratę oddziaływania hydrofobowego pomiędzy STI571 i kinazą. Trzecia grupa mutacji występuje w regionie katalitycznym kinazy (aminokwa-



sy 351-359), np. M351T, E355G i F359V. M351 uczestniczy w powstawaniu interakcji stabilizującej autoinhibicję w białku chimerycznym Abl z Bcr-Abl, które występuje w niewielkiej ilości w komórkach *BCR-ABL*<sup>+</sup>. Z tego powodu mutacja M351T powoduje nie tylko obniżenie powinowactwa do STI571, ale również obniżenie aktywności kinazy, niestety niewystarczające. Kilka mutacji odnotowanych jako wywołujące oporność na STI571, znaleziono w pętli aktywacji (aminokwasy 381-402) lub jej sąsiedztwie. Należą do nich: H396R, V379I oraz L387M. Wystąpienie tych mutacji powoduje powstanie nierozpoznawanej przez STI571 konformacji Bcr-Abl. Ostatnia grupa mutacji, to rozproszone w całej cząsteczce białka substytucje aminokwasów, dla których mechanizm rozwoju oporności jest nieznan.

Analizowano udział poszczególnych mutacji w rozwoju oporności na STI571 (tabela 3). W obszernych badaniach indukcji mutacji w kinazie Bcr-Abl u pacjentów leczonych STI571, analizie poddano materiał pochodzący od 144 pacjentów: 40 w fazie przyspieszonej, 64 w późnej fazie przewlekłej i 40 we wczesnej fazie przewlekłej [13]. U 27 pacjentów odnotowano mutacje w 17 różnych pozycjach już po ośmiu miesiącach terapii. W tej grupie 24 pacjentów (89%) nabyło oporność na STI571, przy czym u 13 (7 w fazie przyspieszonej i 6 w późnej fazie przewlekłej) oporność związana była z wystąpieniem mutacji w pętli P kinazy. Badania wykazały ponadto, że mutacje w tym regionie wiążą się ze złymi rokowaniami. Dwunastu (92%) z 13 pacjentów zmarło średnio w przeciągu 4,5 miesiąca od wykrycia mutacji. Dla porównania, tylko 3 (21%) z 14 pacjentów, u których odnotowano mutacje poza pętlą P, zmarło w przeciągu 11 miesięcy. Mutacja T315I, która leży u podstaw najsilniej znaczącej się oporności *in vitro*, została odnotowana jedynie w dwóch przypadkach wystąpienia klinicznej lekooporności podczas, gdy wcześniejsze badania wskazywały na częstsze jej występowanie u pacjentów z nabytą opornością na STI571 [123]. Badania te zostały również potwierdzone przez doniesienia na temat rozwoju oporności w następstwie stosowania STI571 w wyniku substytucji Y253F, będącej w efekcie przyczyną podwyższonej aktywności katalitycznej kinazy [112]. U niektórych pacjentów odnotowano obecność mutacji punktowych w *BCR-ABL*, zanim rozpoczęto terapię z zastosowaniem STI571 [59], co potwierdza hipotezę, że presja wywierana na komórki przez STI571 powoduje selekcję klonów zawierających mutacje ograniczające interakcje z tym lekiem.

Badania wykazały, że w rozwoju oporności na STI571 mogą mieć znaczenie zmiany cytogenetyczne, które tylko pośrednio są związane z obecnością *BCR-ABL*. Zmiany te mogą być konsekwencją genetycznej niestabilności, która towarzyszy obecności *BCR-ABL*, szczególnie przy przechodzeniu z fazy przewlekłej do zaostrzenia blastycznego CML. Na przykład, badania cytogenetyczne przeprowadzone u 36 pacjentów wykazały, że u 19 z nich obecne są aberracje chromosomalne, takie jak aneuploidia, zmiany w chromosomie 17 prowadzące do utraty genu p53 oraz translokacje lub też kilka zmian cytogenetycznych jednocześnie [58].

Oporność na STI571 wynika także z podwyższonej ekspresji genów dla transporterów błonowych. Wewnątrzkomórkowe stężenie STI571 jest wypadkową działających jednocześnie dwóch procesów, eksportu i importu leku. Szeroko badanym białkiem w aspekcie oporności na STI571 jest gliko-

proteina P (P-gp), produkt genu *MDR 1*. Ekspresja *MDR 1* ulega zwiększeniu w komórkach blastycznych w zaawansowanych stadiach CML. Wysunięto hipotezę, że to właśnie P-gp powoduje aktywny wyrzut leku z komórek nowotworowych, obniżając jego stężenie poniżej krytycznej wartości niezbędnej do wywołania efektu przeciwnowotworowego. Badania przeprowadzone na ludzkich komórkach linii K562 oraz AR230 wykazały, że indukowana ekspresja P-gp wpływa znacząco na obniżenie wrażliwości na STI571. Zaobserwowano wzrost przeżywalności komórek i szybkości ich proliferacji, a także obniżenie aktywności kaspazy 3, podwyższoną aktywność czynnika transkrypcyjnego STAT5 przy niezmiennym jednocześnie poziomie ufosforylowania kinazy Bcr-Abl. Przywrócenie wrażliwości na lek odnotowano po zastosowaniu PSC833, inhibitora P-gp [88]. Udział P-gp w rozwoju oporności na STI571 został potwierdzony przez dwa inne zespoły badawcze [66,135]. W indukcji oporności na STI571 nie wyklucza się również udziału białka hOCT1 (human organic cation transporter 1). Obniżona ekspresja *hOCT1* może wpływać na odpowiedź komórek na chemioterapię [135]. Powyższą hipotezę potwierdziły badania, w których wykazano, że hOCT1 jest podstawowym białkiem odpowiadającym za transport dokomórkowy STI571. Ponadto zaobserwowano, że obniżona aktywność hOCT1 koreluje z osłabioną wrażliwością komórek na działanie STI571 *in vitro* [147]. Innym mechanizmem, który może odpowiadać za rozwój oporności na STI571 jest wiązanie leku przez kwaśną glikoproteinę  $\alpha$ -1 (AGP), obecną w osoczu [45]. Podobnie jak w przypadku podwyższonej ekspresji *MDR 1*, wiązanie z AGP powoduje obniżenie efektywnego poziomu STI571 w komórkach.

Z klinicznego punktu widzenia, określenie przyczyny oporności na STI571 wydaje się niezbędnym etapem poprzedzającym ustalenie schematu leczenia pacjentów z CML [64]. Podczas gdy niektóre mutacje kinazy Bcr-Abl (np. T315I) powodują pełną oporność na STI571, inne (np. E255V, H396P, Y253H) indukują rozwój tylko częściowej oporności, którą można znieść przez podwyższenie dawki leku. Taki sam schemat postępowania można zastosować, gdy dotychczasowe dawki leku stają się niewystarczające do zahamowania wzrastającej aktywności kinazy Bcr-Abl z powodu pojawienia się dodatkowych kopii *BCR-ABL*. U pacjentów z nabytą opornością na STI571 zwykle zwiększa się dwukrotnie dawkę leku, z 300–400 mg dziennie do 600–800 mg dziennie. Jednakże, w sytuacji podwyższonej ekspresji genu *MDR 1*, przejawiającej się wzrostem ilości P-gp i w efekcie obniżeniem wewnątrzkomórkowego stężenia STI571, wzrost dawki leku nie skompensuje stałego ubytku STI571. Zastosowanie technologii mikromacierzy w diagnostyce i ocenie efektów leczenia może zdecydowanie poprawić i bardziej zindywidualizować terapię. Ostatnio metoda ta została wykorzystana w poszukiwaniu charakterystycznych zmian w ekspresji genów, które towarzyszyły rozwojowi oporności na STI571 i były wywołane różnymi stężeniami leku (od 200 do 800 nM) [19].

#### **STI571 W SKOJARZENIU Z WYBRANYMI ZWIĄZKAMI CYTOSTATYCZNYMI W LECZENIU CML**

Rośnie liczba laboratoriów i klinik zainteresowanych badaniem mechanizmów działania STI571 w kombinacji ze związkami cytostatycznymi. Przesłankami do rozpoczęcia tych badań była chęć poznania molekularnych mecha-

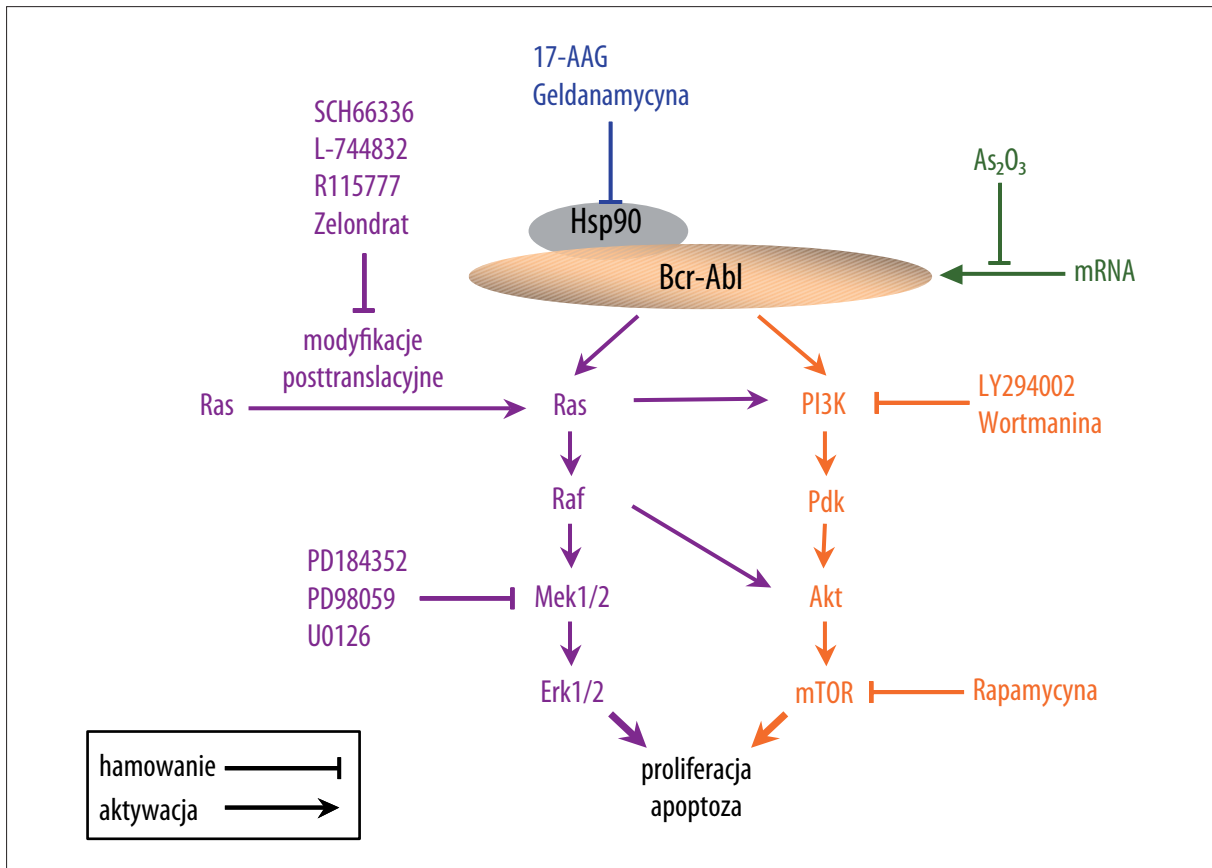
Tabela 3. Mutacje punktowe związane z rozwojem oporności na STI571 u pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową (CML) oraz ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL)

Zmiana w sekwencji nukleotydów	Zmiana w sekwencji aminokwasów <sup>1</sup>		Lokalizacja w Bcr-Abl Proponowany mechanizm oporności	Liczba przypadków wystąpienia oporności	Piśmiennictwo
	Kinaza Abl typ 1a	Kinaza Abl typ 1b			
A1094G	M244V	M263V	pętla P ograniczenie zmian konformacyjnych	1/32 1/27	[123] [13]
C1106G	L248V	L267V		1/27	[13]
G1113A	G250E	G269E		2/32 2/27	[123] [13]
A1119G	Q252R	Q271R		1/32	[123]
G1120C/T	Q252H	Q271H		6/32 5/27	[123] [13]
T1121C	Y253H	Y272H		1/28 2/32	[123] [13]
A1122T	Y253F	Y272F		3/32 2/27	[123] [13]
G1127A	E255K	E272F		10/32 2/27	[123] [13]
A1128T	E255V	E274V		1/27	[13]
C1308T	T315I	T334I		10/32 2/27	[123] [13]
C1315G	F317L	F336L	miejsce kontaktu z STI571 wpływ na wiązanie STI571	3/32	[123]
T1439G	F359V	F378V		2/32 2/27	[123] [13]
T1392C	M343T	M362T	SH2 nieznany	1/32	[123]
T1416C	M351T	M370T	SH2 ograniczenie zmian konformacyjnych	10/32 7/27	[123] [13]
A1428G	E355G	E374G	ograniczenie zmian konformacyjnych	1/32 2/27	[123] [13]
G1499A	V379I	V398I	pętla aktywacji ograniczenie zmian konformacyjnych	1/32	[123]
T1508C	F382L	F401L	pętla aktywacji nieznany	1/32	[123]
T1523A	L387M	L406M	pętla aktywacji ograniczenie zmian konformacyjnych	1/32	[123]
A1551G	H396R	H415R		3/32 1/27	[123] [13]
C1614A	S417Y	S436Y	region C-końcowy nieznany	1/27	[13]
G1739A	E459K	E478K		1/27	[13]
T1821C	F486S	F505S		1/27	[13]

<sup>1</sup> Kinaza Abl występuje w dwóch postaciach: 1a i 1b różniących się 19 aminokwasami. Stąd pojawiają się różnice w numeracji aminokwasów, które ulegają substytucji w zmutowanych wariantach kinazy.

nizmów działania tych związków w kombinacji z STI571 oraz poszukiwanie skutecznej terapii skojarzonej, która mogłaby być zastosowana w leczeniu pacjentów z CML,

głównie tych, u których stwierdza się oporność na STI571. Związki badane w kombinacji z STI571 można podzielić na trzy grupy: (i) związki, które oddziałują z elementami



Ryc. 4. Związki badane w kombinacji z STI571. Poszukiwana jest skuteczna terapia skojarzona. Wśród badanych związków należy wyróżnić cząsteczki, które wpływają na aktywność różnych elementów komórkowych dróg przekazywania sygnałów, w tym szlaku Ras/MAPK (kolor fioletowy) lub PI3K/Akt (kolor pomarańczowy). Kolorem niebieskim zaznaczono związki wpływające na stabilność kinazy Bcr-Abl. W kombinacji z STI571 stosowane są związki, które hamują ekspresję kinazy (kolor zielony)

komórkowych dróg przekazywania sygnałów, aktywowanych przez Bcr-Abl; (ii) związki wpływające na stabilność/ekspresję białka Bcr-Abl; oraz (iii) związki cytostaticzne, których mechanizm działania jest inny niż ww. (ryc. 4).

#### ZWIĄZKI, KTÓRE ODDZIAŁUJĄ Z ELEMENTAMI DRÓG SYGNAŁOWYCH AKTYWOWANYCH PRZEZ Bcr-ABL

Do szlaków sygnałowych aktywowanych przez onkogeną kinazę Bcr-Abl należą m.in. kaskady kinaz zależne od białka Ras, w tym szlaki Raf/MEK/Erk oraz PI3K/Akt. Ze względu na dużą podatność genu RAS na mutacje, które są obecne w 30% przypadków ludzkich nowotworów, oraz ze względu na udział białka Ras w kontroli licznych szlaków sygnałowych, białko Ras jest ważnym celem poszukiwań czynników przeciwnowotworowych. Białko Ras musi zostać poddane licznym modyfikacjom potranslacyjnym, aby mogło osiągnąć pełną aktywność. Wśród nich można wymienić m.in. farnezylację i geranylogeranylację. Przemiana, którą katalizuje transferaza farnezyli, polega na przyłączeniu do reszty cysteiny jednostki prenylu (C15) w C-końcowym rejonie białka, przy sekwencji CAAX (C – cysteina; A – dowolny aminokwas alifatyczny; X – zazwyczaj seryna lub metionina). W efekcie utworzony zostaje silnie hydrofobowy koniec C, niezbędny do wiązania białka Ras z błoną komórkową, co z kolei warunkuje jego pełną aktywność [80]. Udział białka Ras

w indukowanej przez kinazę Bcr-Abl transformacji nowotworowej stał się podstawą poszukiwań możliwości zastosowania inhibitorów transferazy farnezyli (farnesyl transferase inhibitors – FTI) w leczeniu pacjentów chorych na białaczkę. Wśród FTI można wymienić trzy związki, które wydają się obiecujące w terapii przeciwnowotworowej, tj. SCH66336 (lonafarnib, Sarasar™; Schering-Plough Co.), L-744832 (Merck & Co.) oraz R115777 (tipifarnib, Zarnestra™; Ortho Biotech Products). Obszernym badaniom poddano jak dotąd inhibitor SCH66336. Testy przeprowadzono na myszach transgenicznym p190<sup>BCL-ABL</sup>, oraz na liniach komórkowych opornych (Baf/BCR-ABL-r, AR230-r, LAMA-84-r) i wrażliwych (Baf/BCR-ABL-s) na STI571. W układach zwierzęcych i w hodowlach komórkowych, SCH66336 efektywnie hamował proliferację komórek BCR-ABL<sup>+</sup>, nie wpływając jednocześnie na ich przeżywalność. W przypadku hodowli komórek linii Baf/BCR-ABL-s, efekt korelował z blokadą komórek w fazie G<sub>2</sub>/M cyklu komórkowego, ale nie z indukcją procesu apoptozy. Apoptozę zaobserwowano dopiero po zastosowaniu FTI w skojarzeniu z STI571. Obserwowany efekt został określony jako synergistyczny. Wyjątek stanowiły mysie komórki Baf3 z ekspresją zmutowanej kinazy Bcr-Abl<sup>T315I</sup>, w których zastosowanie związków w skojarzeniu nie wywołało synergistycznego efektu w indukowaniu procesu apoptozy. Prawdopodobnie ze względu na mutację punktową (T315I) w kinazie Bcr-Abl, niemożliwe było oddzia-

tywanie z STI571 i brak było wystarczającej blokady aktywności kinazy. Natomiast wydaje się, że zastosowanie SCH66336 w skojarzeniu z STI571 stanowi obiecujący schemat w leczeniu pacjentów z CML w przypadkach występowania oporności na STI571 będącej wynikiem amplifikacji *BCR-ABL* [62,96]. Podobny efekt współdziałania obu związków oczekiwany jest u pacjentów, u których stwierdzono mutacje w kinazie Bcr-Abl, które ograniczają, ale nie uniemożliwiają wiązanie STI571 [62].

W pewnych przypadkach zastosowanie inhibitorów transferazy farnesyly jest niewystarczające. Białko Ras może być bowiem potranslacyjnie aktywowane za pośrednictwem geranylogeranylation [5]. Bardzo aktywnym inhibitorem obu procesów, farnesylation i geranylogeranylation białek, jest związek o nazwie zoledronat. Pierwotnie stosowany w schorzeniach układu kostnego, okazał się skutecznym lekiem również w terapii przeciwnowotworowej. W badaniach *in vitro* zoledronat wykazywał zblizoną aktywność w stosunku do komórek wrażliwych, jak i opornych na STI571. Zastosowanie zoledronatu w kombinacji z STI571 powodowało obniżenie potencjału proliferacyjnego komórek w hodowli. Jednocześnie odnotowano nieznaczne hamowanie proliferacji prawidłowych komórek hematopoetycznych. Leki synergistycznie indukowały apoptozę komórek *BCR-ABL*<sup>+</sup> oraz wydłużały czas przeżycia myszy z przeszczepioną białaczką. Niekorzystną właściwością zoledronatu jest jego wysokie powinowactwo do kości i związany z tym problem uzyskania terapeutycznego stężenia leku we krwi. Jednak znacznie wyższe stężenie leku w szpiku kostnym niż w innych narządach, może stymulować komórki nowotworowe szpiku do apoptotycznej śmierci [76,78].

W tej grupie związków znajdują się inhibitory szlaku Raf/MEK/Erk odpowiedzialnego m.in. za stymulację proliferacji oraz hamowanie apoptozy komórek linii hematopoetycznych. Wykazano, że zastosowanie STI571 w skojarzeniu z inhibitorami kinazy MEK1/2 (PD184352, PD98059, U0126) powoduje gwałtowny spadek potencjału transbłonowego mitochondrium ( $\Delta\Psi_m$ ), uwolnienie cytochromu c do cytoplazmy, aktywację prokaspaz 3 i 8, degradację PARP, obniżenie poziomu białek antyapoptotycznych Bcl-2 i Bcl-X<sub>L</sub> oraz aktywację kinaz JNK i p38 MAPK. W efekcie odnotowano zmiany morfologiczne, charakterystyczne dla komórek apoptotycznych. Współdziałanie STI571 i PD184352 w hamowaniu proliferacji oraz w indukcji apoptozy, odnotowano także w komórkach opornych na STI571, z amplifikacją *BCR-ABL*. Podczas gdy związki stosowane osobno wywierały nieznaczny wpływ na indukcję apoptozy, użyte w kombinacji gwałtownie ją indukowały [151]. Synergistyczny efekt obserwowano również po zastosowaniu STI571 w skojarzeniu z PD98050 [71] oraz z U0126 [148].

Innym białkiem sygnałowym aktywowanym przez kinazę Bcr-Abl jest kinaza fosfatydyloinozytolu – PI3K. Jest ona heterodimerem zbudowanym z podjednostki katalitycznej (p110) oraz podjednostki regulatorowej (p85), poprzez którą oddziałuje z Bcr-Abl. W postaci aktywnej kinaza PI3 przeprowadza 4,5-bisfosforan fosfatydyloinozytolu do 3,4,5-trifosforanu fosfatydyloinozytolu, który pełni rolę przekazywnika drugorzędowego i odpowiada pośrednio za fosforylację kinazy Akt. Zsyntetyzowano wie-

le inhibitorów PI3K. Badania wykazały, iż wortmanina oraz inhibitor LY294002 (Lilly) synergistycznie współdziałają z STI571, powodując silne zahamowanie proliferacji komórek linii *BCR-ABL*<sup>+</sup>. Ze względu jednak na swą niestabilność w roztworze wortmanina nie znalazła zastosowania klinicznego. Kolejno syntetyzowane związki charakteryzował wzrost trwałości, ale jednocześnie niekorzystne obniżenie aktywności w porównaniu do wyjściowej wortmaniny.

Alternatywnym rozwiązaniem jest synteza inhibitorów białek będących substratami kinazy PI3, tj. mTOR, Fkhr, NF- $\kappa$ B, GSK3b i MDM2, których aktywność jest związana z zależną od Bcr-Abl transformacją nowotworową. Związkiem będącym obecnie w III fazie badań klinicznych jest rapamycyna, inhibitor kinazy mTOR [96]. W wyniku długotrwałych badań mechanizmu hamowania proliferacji komórek nowotworowych przez rapamycynę zaproponowano dwustopniowy model zależnej od rapamycyny inhibicji wzrostu komórek. Zakłada on, że powstały w pierwszym etapie kompleks rapamycyny i wewnątrzkomórkowego białka akceptorowego, FKBP12, hamuje w drugim etapie aktywność serynowo-treoninowej kinazy mTOR. Następstwem tego jest obniżenie aktywności białek efektorowych kinazy mTOR, tj. p70S6K oraz 4E-BP1, co przejawia się z kolei akumulacją komórek w fazie G<sub>1</sub> cyklu komórkowego [50] oraz indukcją procesu apoptozy [110]. Ponadto, rapamycyna w skojarzeniu z STI571 synergistycznie hamuje proliferację opornych na STI571 komórek linii K562, Ba/F3 typu dzikiego oraz komórek Ba/F3<sup>T3151</sup> [92]. Dodatkowym uzasadnieniem stosowania inhibitorów kinaz drogi PI3K/mTOR w kombinacji z STI571 są wyniki, które wskazują na możliwość aktywacji przez STI571 drogi Akt/mTOR. Powstająca oporność na STI571 jest w tym wypadku wynikiem aktywacji Akt, która utrzymuje proliferację komórek *BCR-ABL*<sup>+</sup> na wysokim poziomie nawet po zahamowaniu aktywności kinazy Bcr-Abl przez STI571 [14]. Ponadto wykazano że, rapamycyna selektywnie eliminuje białaczkowe komórki macierzyste nie wpływając na poziom prawidłowych, hematopoetycznych komórek macierzystych.

#### ZWIĄZKI WPŁYWAJĄCE NA STABILNOŚĆ LUB EKSPRESJĘ BIAŁKA *BCR-ABL*

Wśród związków, które wpływają na stabilność kinazy Bcr-Abl należy wymienić geldanamycynę i jej mniej toksyczne pochodne, m.in. 17-AAG (17-allyloamino-17-demetoksygeldanamycyna). Stabilność kinazy Bcr-Abl uwarunkowana jest powstaniem wieloskładnikowego kompleksu z białkami Hsp90 i p23. Zastosowanie swoistych inhibitorów Hsp90, powoduje dysocjację kompleksu Bcr-Abl/Hsp90/p23 oraz formowanie nowego kompleksu z białkami Hsp70 i p60. Jak wykazały badania, kompleks Bcr-Abl/Hsp70/p60 jest mniej stabilny, co skutkuje zwiększoną podatnością kinazy Bcr-Abl na ubikwitynozależną proteosomalną degradację. Geldanamycyna i 17-AAG wpływają na degradację nie tylko izoformy typu dzikiego kinazy Bcr-Abl (210<sup>Bcr-Abl</sup>), ale również jej dwóch form zmutowanych (T315I, E255K), występujących u pacjentów opornych na STI571. Co ciekawe, geldanamycyna i jej pochodna wykazują większą aktywność właśnie w stosunku do zmutowanych form kinazy. Proteosomalną degradację zmutowanych kinaz Bcr-Abl<sup>T315I</sup> oraz Bcr-Abl<sup>E255K</sup> zaobserwowano

już po zastosowaniu o połowę mniejszej dawki geldanamycyny. Badania dowiodły ponadto, że geldanamycyna charakteryzuje się dużą swoistością w stosunku do innych zmutowanych form kinazy. Zastosowanie jej pochodnej, 17-AAG także powodowało obniżenie poziomu onkogennej kinazy typu dzikiego i jej zmutowanych form. Proces ten zachodził efektywniej w komórkach z ekspresją zmutowanych form Bcr-Abl. Prawdopodobnie badane mutanty kinazy Bcr-Abl charakteryzowały się znacznie mniejszą stabilnością w porównaniu do kinazy typu dzikiego i przez to były bardziej zależne od białek opiekuńczych Hsp90. Nie wykazano znaczących różnic w poziomie kontrolnego białka Raf-1, niezależnie od dawki związku czy też typu badanych komórek (Ba/F3p210<sup>wt</sup>, Ba/F3p210<sup>T3151</sup>, Ba/F3p210<sup>E255K</sup>) [52]. Zastosowanie 17-AAG w skojarzeniu z STI571 prowadziło do uzyskania efektu synergistycznego w hamowaniu aktywności Bcr-Abl [109]. Stosowanie 17-AAG w komórkach ze zwiększoną ekspresją *BCR-ABL* było nieskuteczne [136].

STI571 hamuje aktywność kinazy Bcr-Abl, geldanamycyna i jej pochodne wpływają na jej stabilność, a zatem poziom w komórce. Innym sposobem obniżania poziomu kinazy w komórce jest hamowanie powstawania nowych cząsteczek, a więc hamowanie ekspresji genu. Jednym ze sposobów jest stosowanie antysensowych oligonukleotydów. Pomimo zachęcających wyników w hamowaniu ekspresji *BCR-ABL* uzyskanych w mysim modelu CML [130], metoda ta nie znalazła zastosowania w klinikach. Uważa się, że duże ilości oligonukleotydów, konieczne do uzyskania efektywnego stężenia są zbyt toksyczne. Stosując technikę siRNA udało się dotychczas znacząco zahamować ekspresję *BCR-ABL*, ale tylko w hodowlach komórkowych [121]. Jak dotąd nie ma skutecznej metody hamowania ekspresji *BCR-ABL*, która mogłaby być zastosowana w klinikach jako terapia uzupełniająca lub alternatywna w leczeniu pacjentów chorych na CML.

Wśród rozważanych chemicznych modulatorów ekspresji kinazy Bcr-Abl należy wymienić związki arsenu [85,108,150]. Wykazano, że arsenik, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (arsenic trioxide – AT) hamuje transformację nowotworową komórek linii białaczkowych, wpływając na ekspresję *BCR-ABL* na poziomie translacji. Jednocześnie wykluczono udział arsenu w stymulowaniu proteosomalnej degradacji kinazy Bcr-Abl oraz jego wpływ na poziom mRNA. Zastosowanie arsenu w hodowlach ludzkich komórek białaczkowych linii K562 skutkowało gwałtownym obniżeniem aktywności kinazy PDK1 i S6K1. Kinaza S6K1 jest znana jako pozytywny regulator translacji pewnej grupy cząsteczek mRNA, które w regionie UTR (untranslated region) zawierają sekwencję oligopirymidynową TOP (tract of oligopyrimidines). Badania potwierdziły obecność takiej sekwencji na 5' końcu mRNA BcrAbl i zależne od jej występowania hamowanie ekspresji *BCR-ABL* po inkubacji z arsenikiem. Hamowaniu syntezy nowej puli kinazy Bcr-Abl, towarzyszyło obniżenie poziomu białka Bcl-2 oraz zwiększenie populacji komórek apoptotycznych [102]. Stosowanie arsenu w kombinacji z STI571 wywoływało efekt synergistyczny w hamowaniu proliferacji oraz indukcji apoptozy komórek linii K562 [36]. Wykorzystując technikę mikromacierzy wykazano, że oba leki uczetniczą w hamowaniu ekspresji wielu genów kodujących białka regulatorowe cyklu komórkowego (np. *CCND2*, *GSPT1*, *YWHAG*, *CTNNB1*) oraz współdziałają w indukcji ekspresji genów

proapoptotycznych (np. *CASP7*, *CASP9*, *BCL2L14*, *CASP8*, *TNFR1*, *MADD*, *DEDD2*).

#### ZWIĄZKI CYTOSTATYCZNE, KTÓRYCH MECHANIZM DZIAŁANIA JEST INNY NIŻ WYŻEJ WYMIENIONYCH

Do tej grupy związków, stosowanych w kombinacji z STI571, należą m.in. NSC860410 (Adaphostin) [16, 17], bortezomib [32, 48], etopozyd oraz cytarabina [87].

Pierwsze doniesienia dotyczące działania NSC860410 w komórkach linii białaczkowych, wskazały na zależne od NSC860410 hamowanie aktywności kinazy tyrozynowej Bcr-Abl. W badaniach *in vivo* STI571 okazał się jednak bardziej efektywnym inhibitorem fosforylacji kinazy w porównaniu do NSC860410. Paradoksalnie, komórki traktowane NSC860410 umierały znacznie szybciej od tych poddanych działaniu STI571 [98]. Te obserwacje, jak i inne wyniki badań wskazujące na aktywność NSC860410 również w stosunku do komórek Bcr-Abl-negatywnych, zasugerowały istnienie alternatywnego mechanizmu działania NSC860410 [16,17,124,141]. Badania Chandra i wsp. ostatecznie potwierdziły, że mechanizm, za pomocą którego NSC860410 indukuje śmierć komórek, polega głównie na generowaniu reaktywnych form tlenu (reactive oxygen species – ROS), które w efekcie indukują liczne uszkodzenia DNA oraz zmiany biochemiczne typowe dla apoptozy. Ostatnie badania tych autorów dowodzą wysokiej aktywności NSC860410 również w stosunku do komórek opornych na działanie STI571, nawet tych z ekspresją zmutowanej kinazy Bcr-Abl<sup>T3151</sup>. Wydaje się, że NSC860410, który podlega obecnie przedklinicznej ocenie, może się okazać cennym lekiem, uzupełniającym terapię stosowaną u pacjentów z opornością na STI571.

Bortezomib (VELCADE; PS-341) jest silnym i odwracalnym inhibitorem proteosomu. Proteosom jest wieloskładnikowym kompleksem białkowym, który odgrywa istotną rolę w degradacji białek komórkowych. Wiele dowodów wskazuje na udział inhibitorów proteosomu w pokonywaniu oporności na leki. *In vitro* bortezomib indukuje apoptozę w komórkach nowotworowych oraz uwalnia je na chemio- i radioterapię. Indukcję apoptozy z udziałem bortezomibu zaobserwowano również w komórkach CML [32,48]. Mechanizm, według którego bortezomib indukuje apoptozę komórek, polega głównie na hamowaniu degradacji IκB, inhibitora czynnika transkrypcyjnego NFκB. Funkcją białek z rodziny IκB jest blokowanie translokacji czynnika NFκB z cytoplazmy do jądra komórki. Aktywny czynnik transkrypcyjny odpowiada w jądrze za aktywację transkrypcji genów antyapoptotycznych (m.in. *Bcl-2*, *Bcl-X<sub>L</sub>*, *IEX-1L*, *IAP*). Innym mechanizmem jest pokonywanie oporności związanej z komórkowym transporterem, glikoproteiną P. Proteosom jest niezbędny w „dojrzywaniu” tego białka, a więc uważa się, że inhibitory kompleksu proteosomalnego wywołują gromadzenie się transportera, niezdolnego do wydajnego usuwania z komórki związków dla niej toksycznych, w tym również STI571. W przypadku przewlekłej białaczki szpikowej nie wyklucza się wpływu bortezomibu na proces degradacji zarówno kinazy Bcr-Abl, jak i jej substratów [66].

Etopozyd jest półsyntetyczną pochodną podofilotoksyny o działaniu cytostatycznym. Jest inhibitorem topoisome-

razy II (TopoII) i stabilizuje połączenie TopoII z DNA, co indukuje powstawanie licznych aberracji chromosomalnych oraz podwójnych pęknięć nici DNA. Badania *in vitro* w opornych na apoptozę komórkach linii K562 i KU812, a także w komórkach hodowli pierwotnych CML wykazały, że jednoczesne stosowanie STI571 i etopozynu powoduje większe zahamowanie wzrostu hodowli oraz obniżenie przeżywalności komórek w porównaniu do efektu, jakie wywołują oba związki stosowane oddzielnie. Efekt współdziałania związków w kombinacji został oceniony od addytywnego [72] po synergistyczny [87,137]. Równocześnie prowadzone badania efektu stosowania cytarabiny w kombinacji z STI571 dały podobne rezultaty. W zależności od stosowanej metody oceny wzrostu i przeżywalności komórek po jednoczesnym zastosowaniu obu związków odnotowano sumowanie efektów [72] bądź synergizm [87,137].

Badano STI571 w kombinacji z lekami antyangiogennymi np. 2-metoksyestradiolem [145]. Związek ten destabilizuje mikrotubule. Zastosowanie 2-metoksyestradiolu w kombinacji z STI571 powodowało hamowanie proliferacji komórek transfekowanych *BCR-ABL*. Z kolei niektóre inhibitory deacetylazy histonowej np. SAHA, stosowane w kombinacji z STI571 obniżały poziom kinazy Bcr-Abl oraz indukowały apoptozę w komórkach ludzkiej białaczki BV173 [149]. Inhibitor metylacji DNA, 5-aza-2-deoksycydydyna (decytabina) stosowany w kombinacji z STI571 powodował synergistyczne hamowanie proliferacji komórek opornych na STI571 pod warunkiem, że oporność ta nie była całkowita, tak jak w przypadku komórek, w których ekspresji ulega mutant Bcr-Abl<sup>T315I</sup> [81].

Badano również możliwość zastosowania STI571 w kombinacji z cytostatykami, na które w komórkach rozwinęła się oporność. Celem było zbadanie możliwości przywrócenia komórkom wrażliwości na cytostatyki przez zastosowanie STI571. Stwierdzono na przykład, że STI571 w skojarzeniu z winkrystyną, dimerycznym alkaloidem indolowym, hamuje wzrost nowotworu u myszy, którym wstrzyknięto komórki K562 zarówno wrażliwe, jak i odporne na winkrystynę [47]. Są doniesienia, że kinaza Bcr-Abl stymuluje naprawę DNA, przez co wpływa na wrażliwość komórek nowotworowych na cytostatyki [90]. Na przykładzie ludzkich komórek linii K562 opornych na dokсорubicynę dowiedziono, że STI571 może częściowo znosić oporność na leki przeciwnowotworowe przez blokowanie naprawy DNA [89].

#### **ZASTOSOWANIE STI571 W TERAPII PRZECIW NOWOTWOROM Z AKTYWACJĄ RECEPTORÓW C-KIT I PDGFR**

##### **Czerniak**

Czerniak (melanoma) jest jednym z najgroźniejszych nowotworów. Niewiele wiadomo na temat molekularnych mechanizmów rozwoju czerniaka. Poza wczesną interwencją chirurgiczną, brak jest skutecznych metod leczenia pacjentów z tym nowotworem. Istnieją dowody na zaangażowanie kinaz białkowych w progresję czerniaka [18]. Wszystkie kinazy, których aktywność jest hamowana przez STI571, a więc c-Kit, Abl oraz receptory PDGF są obecne w komórkach czerniaka, chociaż poziom ekspresji c-Kit i PDGFR-β ulega obniżeniu w trakcie rozwoju nowotworu [7,82,97,100,125]. Badania retrospektywne przepro-

wadzone na materiale pochodzącym z biopsji od 261 pacjentów z czerniakiem skóry wykazały, że kinaza c-Kit jest obecna w ponad 50% przypadków czerniaka wczesnej fazy [68]. Z kolei, *c-ABL* ulega ekspresji na każdym etapie rozwoju czerniaka, przy czym niższy poziom białka zaobserwowano we wczesnych fazach rozwoju nowotworu oraz w komórkach z miejsc przerzutów [125]. Inne białko, ARG (*Abl-related gene*), należące do rodziny kinaz tyrozynowych Abl, jest obecne we wczesnych fazach rozwoju czerniaka, ale brak go w komórkach z niektórymi miejsc przerzutów [125].

Antyproliferacyjną aktywność STI571 w komórkach czerniaka określono zarówno w liniach komórkowych, jak również w biopsjach pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem. Zastosowanie STI571 w 4 liniach komórkowych czerniaka skóry w fazie początkowej oraz w 15 liniach pochodzących z miejsc przerzutów spowodowało zahamowanie proliferacji, zarówno w hodowlach czerniaka z ognisk pierwotnych, jak i pochodzących z miejsc przerzutów. STI571 hamował proliferację w 8 spośród 19 linii komórkowych [93]. Badania określające poziom czterech kinaz wiążących STI571, przeprowadzone w tych hodowlach wykazały, że odsetek komórek pozytywnych dla badanych kinaz wahał się w granicach od 41 do prawie 100% dla Abl i PDGFR oraz 8-7% dla c-Kit. Nie znaleziono jednak związku między ekspresją kinaz białkowych: c-Kit, Abl oraz PDGFR oraz zahamowaniem proliferacji komórek w odpowiedzi na STI571. Z kolei badania, którymi objęta była grupa 12 pacjentów w zaawansowanych stadiach czerniaka skóry wykazały brak antyproliferacyjnej aktywności STI571 w hodowlach *in vitro* niezależnie od poziomu kinaz [140].

Zastosowanie STI571 w hodowlach komórek czerniaka gałki ocznej, w których poziom ekspresji c-Kit oraz poziom autofosforylacji tego białka jest wyższy niż w czerniaku skóry [2] powodowało zahamowanie fosforylacji c-Kit i śmierć komórek. Potwierdziły to badania, w których wykazano, że wydajność hamowania proliferacji *in vitro* zależy od poziomu kinazy c-Kit w komórkach czerniaka gałki ocznej [84]. Ponadto wykazano, że STI571 hamuje inwazyjność komórek czerniaka [107]. W pracach tych nie określano poziomu pozostałych kinaz, które mogą być celem STI571.

W badaniach przeprowadzonych na modelu mysim z wszczepionymi ludzkimi komórkami czerniaka skóry stwierdzono, że STI571 hamuje fosforylację PDGFR w komórkach czerniaka, ale nie ma wpływu na rozwój nowotworu *in vivo* [94]. Zastosowanie STI571 powodowało znaczną redukcję stopnia ufosforylowania PDGFRα i PDGFRβ, zarówno w komórkach o niskim (linia komórkowa MeWo – wysoka ekspresja PDGFRβ i c-Kit) jak i o wysokim (linia komórkowa A375SM – wysoka ekspresja PDGFRα, brak ekspresji c-Kit) potencjale inwazyjnym. Zmiana ta nie korelowała z zahamowaniem wzrostu nowotworu u myszy, u których indukowano rozwój nowotworu przez podskórną iniekcję komórek.

Immunohistochemiczne badania porównawcze przeprowadzone w komórkach czerniaka z biopsji od pacjentów z przerzutami, przed i po dwutygodniowym podawaniu STI571 (II faza badań klinicznych) wykazały, że pod

wplywem leku zachodzi redukcja poziomu wszystkich kinaz swoiscie wiązanych przez STI571 [67]. Pomimo wniosku autorów, że wyniki ich badań wskazują na możliwość zastosowania STI571 w terapii przeciw czerniakowi, tylko w przypadku 2 spośród 13 pacjentów uzyskano poprawę, w pozostałych przypadkach wystąpiła progresja nowotworu, a nawet zgon. Jak dotąd żadne badania kliniczne fazy II z zastosowaniem STI571 w czerniaku skóry nie dały pożądaných wyników [1,42]. Przyczyn może być wiele. Ekspresja kinaz wiązających STI571 nie musi być istotnym elementem rozwoju nowotworu [128]. Tymczasem, obiektem badań klinicznych są pacjenci z bardzo zaawansowanym nowotworem, w których mogło wystąpić wiele innych mutacji. Wiadomo, że ekspresja kinaz jest różna w różnych nowotworach, a nawet różna w różnych liniach komórkowych pochodzących z tego samego nowotworu. Podobnie może być u pacjentów. Na terapeutyczne właściwości STI571 mogą również wpływać różnice w metabolizmie i transporcie leku. Ponadto, nie bez znaczenia może być droga podania leku. Podczas gdy iniekcja dootrzewnowa gwarantuje dobre przenikanie komórek nowotworowych przez lek, o tyle doustne podawanie STI571 nie pozwala na uzyskanie we krwi stężenia, które powodowałoby skuteczne działanie leku na komórki czerniaka. Co więcej, nie można wykluczyć korzystnego udziału układu immunologicznego w procesie zwalczania nowotworu [120].

#### **GIST, nowotwór podścieliska przewodu pokarmowego**

GIST (gastrointestinal stromal tumor) jest najczęściej występującym nowotworem tkanki łącznej żrebu przewodu pokarmowego, wywodzącym się prawdopodobnie z komórek Cajala (intestinal Cajal cells – ICCs). Charakteryzuje się złośliwością i opornością na standardową chemioterapię. Konstitutywna aktywność receptorowej kinazy tyrozynowej c-Kit odgrywa istotną rolę w patogenezie większości przypadków GIST. Do najczęstszych przyczyn aktywacji c-Kit w komórkach nowotworowych należą mutacje [57]. Występują one głównie w obrębie eksonu 11 (57-71%) kodującego transbłonowy fragment białka. Z mniejszą częstotliwością identyfikuje się mutacje w eksonach 9 (4–13%) i 13 (2–4%) kodujących odpowiednio domenę zewnątrzkomórkową i cytoplazmatyczną kinazy [114]. U 5% pacjentów z GIST stwierdza się mutacje w *PDGFRα*, zwykle w eksonie 12 lub 18 [4]. Konsekwencją mutacji w *c-KIT* jest niezależna od obecności SCF oligomeryzacja receptora c-Kit i związana z tym aktywacja wielu dróg sygnałowych z udziałem kinaz PI3 i MAP [39]. W efekcie odnotowuje się niekontrolowane podziały komórkowe oraz oporność komórek na apoptozę [38,40,69].

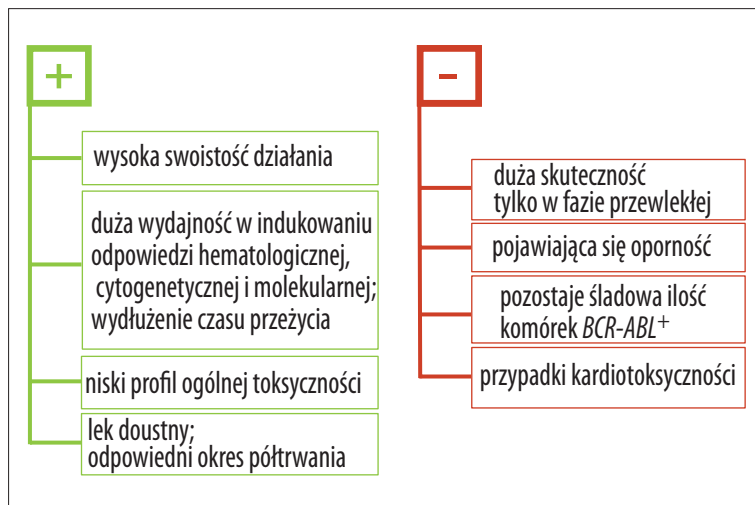
Do niedawna najskuteczniejszą metodą leczenia pacjentów z GIST było leczenie operacyjne. Ta metoda jest nadal stosowana z dużą skutecznością w leczeniu pacjentów w początkowych stadiach choroby. 10-letnie przeżycie odnotowuje się w 30–50% przypadków zachorowań na operacyjnej postaci GIST. Rokowanie u chorych z zmianami nieoperacyjnymi lub przerzutami jest bardzo złe. Średni czas przeżycia wynosi 12 miesięcy [60].

Dużym przełomem w terapii przeciw GIST było wprowadzenie do praktyki klinicznej STI571. Zastosowanie kliniczne poprzedziły liczne badania *in vitro*. IC<sub>50</sub> hamowa-

nia proliferacji było niższe przy blokowaniu aktywności receptora c-Kit (tylko 100 nM) niż dla kinazy Bcr-Abl [56]. Analizie poddano linie komórkowe GIST882 i GIST780, wyprowadzone od pacjentów w zaawansowanym stadium choroby. W komórkach tych występowała ekspresja zmutowanej kinazy c-Kit. Zastosowanie STI571 w stężeniu 1 μM powodowało całkowite zahamowanie fosforylacji kinazy c-Kit. Brak aktywności onkogenego białka skutkowało zahamowaniem proliferacji komórek oraz indukcją procesu apoptozy [139].

Pierwszy raport na temat zastosowania STI571 przeciw GIST dotyczył pacjentki z licznymi zmianami nieoperacyjnymi [69]. W omawianym przypadku, wielonarządowe przerzuty uniemożliwiały interwencję chirurgiczną, a leczenie z zastosowaniem m.in. doksorubicyny i ifosfamidu nie przyniosło żadnych rezultatów. Po miesięcznym stosowaniu STI571 w dawce 400 mg/dzień odnotowano zmniejszenie całkowitej objętości rozszianych ognisk nowotworowych o 52%, a po 8 miesiącach o 75%. Odpowiedź na STI571 utrzymywała się przez co najmniej 11 miesięcy trwania terapii. Duża skuteczność STI571 w leczeniu GIST została potwierdzona rozległymi badaniami prowadzonymi równoległe w USA i w Europie. Zastosowanie STI571 w dawce 400–1000 mg/dzień w grupie 36 pacjentów, u których rozsziany charakter choroby wykluczał możliwość zastosowania zabiegu chirurgicznego, wywołało częściową odpowiedź u 69% osób. Dodatkowo, 20% pacjentów osiągnęło stabilną fazę choroby. Dawki leku poniżej 1000 mg/dzień były dobrze tolerowane [142]. W innych badaniach, w których stosowano dawki 400 lub 600 mg/dzień w zdecydowanej większości pacjentów w 9 miesiącu trwania terapii nie odnotowano całkowitej odpowiedzi (complete response – CR). Najczęściej występowała odpowiedź częściowa (partial response – PR) obserwowana w ponad połowie analizowanych przypadków. Przejście do stabilnej fazy choroby (stable disease – SD) odnotowano u ¼ pacjentów, a progresję choroby (progressive disease – PD) stwierdzono u ponad 10% pacjentów. Jedynie u części pacjentów (5%) obserwowano rozwój oporności [31]. Z najnowszych danych prezentowanych na 2006 Annual Meeting of ASCO wynika, że pacjenci leczeni STI571 przeżywiają średnio 58 miesięcy, podczas gdy wcześniej stosowane terapie skutkowały przeciętnie 15-miesięcznym okresem przeżycia.

Pomimo dużej skuteczności STI571 w leczeniu pacjentów w zaawansowanych stadiach GIST, monoterapia niesie ryzyko rozwoju lekooporności. Długotrwałe podawanie leku indukuje powstawanie wtórnych mutacji w genie *C-KIT* lub *PDGFRα*, co sprawia, że komórki nowotworowe przestają reagować na dotychczas stosowane leczenie. Stopień oporności na STI571 oraz czas przeżycia pacjentów zależy od rodzaju mutacji [4,25]. Inną, prawdopodobną przyczyną nabytej oporności jest wzrost poziomu P-gp w surowicy na skutek podwyższonej ekspresji genu oporności wielolekowej [4]. Selekcji opornych na działanie leku klonów komórek można zapobiec stosując kombinację leków. Obecnie, w skojarzeniu z STI571 testowanych jest kilka związków, m.in. RAD001, inhibitor kinazy mTOR, a także PCK412, inhibitor kinazy białkowej C. Ponadto, w przypadkach GIST z rozwiniętą już lekoopornością badana jest skuteczność działania SU11248, inhibitora VEGFR, PDGFR, oraz receptorowych kinaz tyrozynowych c-Kit i FLT3 [118].



Ryc. 5. Plusy i minusy stosowania STI571

w terapii przeciwnowotworowej. 5 lat stosowania STI571 w leczeniu pacjentów z CML i niewiele mniej z GIST pozwala na wstępne podsumowanie. Niewątpliwym sukcesem STI571 opiera się na dużej swoistości działania i dużej wydajności w indukowaniu odpowiedzi na ten lek oraz przedłużeniu czasu przeżycia pacjentów w porównaniu z wcześniej stosowanymi terapiami. Dużymi zaletami STI571 jest możliwość aplikacji doustnej oraz odpowiedni okres półtrwania. 5 lat to zbyt mało, aby oszacować negatywne konsekwencje ciągłego stosowania leku. Uważa się, że lek ma niski profil toksyczności, aczkolwiek pojawiają się doniesienia na temat możliwości pojawienia się poważnych skutków ubocznych np. kardiotoxyczności. Hamując aktywność kinazy Bcr-Abl, STI571 nie eliminuje wszystkich komórek *BCR-ABL*<sup>+</sup>, szczególnie komórek macierzystych CML. Lek jest dużo mniej skuteczny w późnych fazach CML, szczególnie w zaostreniu blastycznym. Niewątpliwie największym problemem jest pojawiająca się oporność na STI571

## ZAKOŃCZENIE

Większość nowotworów jest wynikiem kilku mutacji. Należy więc oczekiwać, że stosując kombinacje inhibitorów można zwiększyć wydajność terapii przeciwnowotworowej. Stąd też, terapia złożona z kilku leków jest obecnie normą w leczeniu pacjentów z nowotworami. Wyzwaniem współczesnej nauki jest zaprojektowanie takiej kombinacji leków, w której każdy składnik charakteryzowałby się dużą swoistością względem białek docelowych o zmienionej w trakcie rozwoju nowotworu aktywności.

5 lat to zbyt mało, aby oszacować wszystkie pozytywne i negatywne konsekwencje stosowania leku (ryc. 5). Wiele wskazuje na to, że STI571 – chociaż najskuteczniejszy jak dotąd w leczeniu pacjentów z CML, nie eliminuje całkowicie komórek *BCR-ABL*<sup>+</sup>. Śladowe ilości transkryptu mierzonego techniką real-time PCR są obecne w komórkach, nawet u pacjentów, u których leczenie rozpoczęto w fa-

zie przewlekłej. Jest to spowodowane dużą niestabilnością genetyczną komórek *BCR-ABL*<sup>+</sup> i jest wynikiem selekcji klonów opornych na STI571. Doświadczenia pięciu lat stosowania leku skłaniają do poszukiwania nowych rozwiązań. Prowadzone są zarówno badania efektywności STI571 w terapii skojarzonej, jak i poszukiwania nowych, bardziej skutecznych inhibitorów. Inhibitory te mogłyby znaleźć zastosowanie w terapii uzupełniającej u pacjentów z rozwiniętą opornością wtórną na STI571 lub całkowicie go zastąpić w terapii przeciwnowotworowej. Kolejny artykuł jest poświęcony nowym, alternatywnym inhibitorom Bcr-Abl.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Alexis J.B., Martinez A.E., Lutzky J.: An immunohistochemical evaluation of c-kit (CD-117) expression in malignant melanoma, and results of imatinib mesylate (Gleevec) therapy in three patients. *Melanoma Res.*, 2005; 15: 283–285
- [2] All-Ericsson C., Girnita L., Muller-Brunotte A., Brodin B., Seregard S., Ostman A., Larsson O.: c-Kit-dependent growth of uveal melanoma cells: a potential therapeutic target? *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2004; 45: 2075–2082
- [3] Amarante-Mendes G.P., Naekyung Kim C., Liu L., Huang Y., Perkins C.L., Green D.R., Bhalla K.: Bcr-Abl exerts its antiapoptotic effect against diverse apoptotic stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome C and activation of caspase-3. *Blood*, 1998; 91: 1700–1705
- [4] 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
- [5] Appels N.M., Beijnen J.H., Schellens J.H.: Development of farnesyl transferase inhibitors: a review. *Oncologist*, 2005; 10: 565–578
- [6] Barnes D.J., Palaiologou D., Panousopoulou E., Schultheis B., Yong A.S., Wong A., Pattacini L., Goldman J.M., Melo J.V.: Bcr-Abl expression levels determine the rate of development of resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res.*, 2001; 65: 8912–8919
- [7] Barnhill R.L., Xiao M., Graves D., Antoniadis H.N.: Expression of platelet-derived growth factor (PDGF)-A, PDGF-B and the PDGF-alpha receptor, but not the PDGF-beta receptor, in human malignant melanoma *in vivo*. *Br. J. Dermatol.*, 1996; 135: 898–904
- [8] Bartram C. R., de Klein A., Hagemeijer A., van Agthoven T., Geurts van Kessel A., Bootsma D., Grosveld G., Ferguson-Smith M.A., Davies T., Stone M., Heisterkamp N., Stephenson J.R., Groffen J.: Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*, 1983; 306: 277–280
- [9] Bedi A., Barber J.P., Bedi G.C., el-Deiry W.S., Sidransky D., Vala M.S., Akhtar A.J., Hilton J., Jones R.J.: BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. *Blood*, 1995; 86: 1148–1158
- [10] Bedi A., Zehnauer B.A., Barber J.P., Sharkis S.J., Jones R.J.: Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 1994; 83: 2038–2044
- [11] Beran M., Cao X., Estrov Z., Jeha S., Jin G., O'Brien S., Talpaz M., Arlinghaus R.B., Lydon N.B., Kantarjian H.: Selective inhibition of cell proliferation and BCR-ABL phosphorylation in acute lymphoblastic leukemia cells expressing Mr 190,000 BCR-ABL protein by a tyrosine kinase inhibitor (CGP-57148). *Clin. Cancer Res.*, 1998; 4: 1661–1672
- [12] Blume-Jensen P., Hunter T.: Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 2001; 411: 355–365



- [13] Branford S., Rudzki Z., Walsh S., Parkinson I., Grigg A., Szer J., Taylor K., Herrmann R., Seymour J.F., Arthur C., Joske D., Lynch K., Hughes T.: Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood*, 2003; 102: 276–283
- [14] Burchert A., Wang Y., Cai D., von Bubnoff N., Paschka P., Muller-Brusselbach S., Ottmann O.G., Duyster J., Hochhaus A., Neubauer A.: Compensatory PI3-kinase/Akt/mTor activation regulates imatinib resistance development. *Leukemia*, 2005; 19: 1774–1782
- [15] Carpino N., Wisniewski D., Strife A., Marshak D., Kobayashi R., Stillman B., Clarkson B.: p62(dok): a constitutively tyrosine-phosphorylated, GAP-associated protein in chronic myelogenous leukemia progenitor cells. *Cell*, 1997; 88: 197–204
- [16] Chandra J., Hackbarth J., Le S., Loegering D., Bone N., Bruzek L.M., Narayanan V.L., Adjei A.A., Kay N.E., Tefferi A., Karp J.E., Sausville E.A., Kaufmann S.H.: Involvement of reactive oxygen species in adaphostin-induced cytotoxicity in human leukemia cells. *Blood*, 2003; 102: 4512–4519
- [17] Chandra J., Tracy J., Loegering D., Flatten K., Verstovsek S., Beran M., Gorre M., Estrov Z., Donato N., Talpaz M., Sawyers C., Bhalla K., Karp J., Sausville E., Kaufmann S.H.: Adaphostin-induced oxidative stress overcomes BCR/ABL mutation-dependent and -independent imatinib resistance. *Blood*, 2006; 107: 2501–2506
- [18] Chin L., Merlino G., DePinho R.A.: Malignant melanoma: modern black plague and genetic black box. *Genes Dev.*, 1998; 12: 3467–3481
- [19] Chung Y.J., Kim T.M., Kim D.W., Namkoong H., Kim H.K., Ha S.A., Kim S., Shin S.M., Kim J.H., Lee Y.J., Kang H.M., Kim J.W.: Gene expression signatures associated with the resistance to imatinib. *Leukemia*, 2006; 20: 1542–1550
- [20] Cortes J., Talpaz M., O'Brien S., Jones D., Luthra R., Shan J., Giles F., Faderl S., Verstovsek S., Garcia-Manero G., Rios M.B., Kantarjian H.: Molecular responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase treated with imatinib mesylate. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 3425–3432
- [21] Cortez D., Kadlec L., Pendergast A.M.: Structural and signaling requirements for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis. *Mol. Cell. Biol.*, 1995; 15: 5531–5541
- [22] Cowan-Jacob S.W., Guez V., Fendrich G., Griffin J.D., Fabbro D., Furet P., Liebetanz J., Mestan J., Manley P.W.: Imatinib (STI571) resistance in chronic myelogenous leukemia: molecular basis of the underlying mechanisms and potential strategies for treatment. *Mini Rev. Med. Chem.*, 2004; 4: 285–299
- [23] Czechowska A., Błasiak J.: Inhibitory kinaz tyrozynowych – nadzieja na przełom w leczeniu białaczek? *Post. Biochem.*, 2003; 49: 157–167
- [24] Dan S., Naito M., Tsuruo T.: Selective induction of apoptosis in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia cells by an inhibitor of BCR-ABL tyrosine kinase, CGP 57148. *Cell Death Differ.*, 1998; 5: 710–715
- [25] Debiec-Rychter M., Sciot R., Le Cesne A., Schlemmer M., Hohenberger P., van Oosterom A.T., Blay J-Y., Leyvraz S., Stul M., Casali P.G., Zalberg J., Verweij J., Van Glabbeke M., Hagemeyer A., Judson I., EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group, The Italian Sarcoma Group, Australasian Gastrointestinal Trials Group: KIT mutations and dose selection for imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours. *Eur. J. Cancer*, 2006; 42: 1093–1103
- [26] Deininger M., Buchdunger E., Druker B.J.: The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood*, 2005; 105: 2640–2653
- [27] Deininger M.W., Druker B.J.: Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib. *Pharmacol. Rev.*, 2003; 55: 401–423
- [28] Deininger M.W., Druker B.J.: SRCircumventing imatinib resistance. *Cancer Cell*, 2004; 6: 108–110
- [29] Deininger M.W., Goldman J.M., Lydon N., Melo J.V.: The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. *Blood*, 1997; 90: 3691–3698
- [30] Deininger M.W., Goldman J.M., Melo J.V.: The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 2000; 96: 3343–3356
- [31] Demetri G.D., von Mehren M., Blanke C.D., Van den Abbeele A.D., Eisenberg B., Roberts P.J., Heinrich M.C., Tuveson D.A., Singer S., Janicek M., Fletcher J.A., Silverman S.G., Silberman S.L., Capdeville R., Kiese B., Peng B., Dimitrijevic S., Druker B.J., Corless C., Fletcher C.D., Joensuu H.: Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N. Engl. J. Med.*, 2002; 347: 472–480
- [32] Dou Q.P., McGuire T.F., Peng Y., An B.: Proteasome inhibition leads to significant reduction of Bcr-Abl expression and subsequent induction of apoptosis in K562 human chronic myelogenous leukemia cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1999; 289: 781–790
- [33] Druker B.J., Sawyers C.L., Kantarjian H., Resta D.J., Reese S.F., Ford J.M., Capdeville R., Talpaz M.: Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N. Engl. J. Med.*, 2001; 344: 1038–1042
- [34] Druker B.J., Talpaz M., Resta D.J., Peng B., Buchdunger E., Ford J.M., Lydon N.B., Kantarjian H., Capdeville R., Ohno-Jones S., Sawyers C.L.: Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 2001; 344: 1031–1037
- [35] Druker B.J., Tamura S., Buchdunger E., Ohno S., Segal G.M., Fanning S., Zimmermann J., Lydon N.B.: Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat. Med.*, 1996; 2: 561–566
- [36] Du Y., Wang K., Fang H., Li J., Xiao D., Zheng P., Chen Y., Fan H., Pan X., Zhao C., Zhang Q., Imbeaud S., Gaudens E., Eveno E., Auffray C., Chen S., Chen Z., Zhang J.: Coordination of intrinsic, extrinsic, and endoplasmic reticulum-mediated apoptosis by imatinib mesylate combined with arsenic trioxide in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 2006; 107: 1582–1590
- [37] Dubrez L., Eymine B., Sordet O., Droin N., Turhan A.G., Solary E.: BCR-ABL delays apoptosis upstream of procaspase-3 activation. *Blood*, 1998; 91: 2415–2422
- [38] Duensing A., Heinrich M.C., Fletcher C.D., Fletcher J.A.: Biology of gastrointestinal stromal tumors: KIT mutations and beyond. *Cancer Invest.*, 2004; 22: 106–116
- [39] Duensing A., Medeiros F., McConarty B., Joseph N.E., Panigrahy D., Singer S., Fletcher C.D., Demetri G.D., Fletcher J.A.: Mechanisms of oncogenic KIT signal transduction in primary gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Oncogene*, 2004; 23: 3999–4006
- [40] Duffaud F., Blay J.Y.: Gastrointestinal stromal tumors: biology and treatment. *Oncology*, 2003; 65: 187–197
- [41] Ernst T.J., Slattery K.E., Griffin J.D.: p210Bcr/Abl and p160v-Abl induce an increase in the tyrosine phosphorylation of p93c-Fes. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 5764–5769
- [42] Eton O., Billings L., Kim K., Prieto V., Davis D., Frazier M. L., Diwan A. H., McGary E., Papadopoulos N., Bedikian A. Y.: Phase II trial of Imatinib mesylate (STI571) in metastatic melanoma. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 2004; 23: 713
- [43] Feinstein E., Cimino G., Gale R.P., Alimena G., Berthier R., Kishi K., Goldman J., Zaccaria A., Berrebi A., Canaani E.: p53 in chronic myelogenous leukemia in acute phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; 88: 6293–6297
- [44] Frank O., Brors B., Fabarius A., Li L., Haak M., Merk S., Schwindel U., Zheng C., Muller M.C., Gretz N., Hehlmann R., Hochhaus A., Seifarth W.: Gene expression signature of primary imatinib-resistant chronic myeloid leukemia patients. *Leukemia*, 2006; 20: 1400–1407
- [45] Gambacorti-Passerini C., Barni R., le Coutre P., Zucchetti M., Cabrita G., Cleris L., Rossi F., Gianazza E., Brueggen J., Cozens R., Pioltelli P., Pogliani E., Corneo G., Formelli F., D'Incalci M.: Role of alpha acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR-ABL(+) leukemia cells to the abl inhibitor STI571. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000; 92: 1641–1650
- [46] Gambacorti-Passerini C., le Coutre P., Mologni L., Fanelli M., Bertazzoli C., Marchesi E., Di Nicola M., Biondi A., Corneo G.M., Belotti D., Pogliani E., Lydon N.B.: Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis. *Blood Cells Mol. Dis.*, 1997; 23: 380–394
- [47] Gao L., Chen L., Fei X.H., Qiu H.Y., Zhou H., Wang J.M.: STI571 combined with vincristine greatly suppressed the tumor formation of multidrug-resistant K562 cells in a human-nude mice xenograft model. *Chin. Med. J.*, 2006; 119: 911–918
- [48] Gatto S., Scappini B., Pham L., Onida F., Milella M., Ball G., Ricci C., Divoky V., Verstovsek S., Kantarjian H.M., Keating M.J., Cortes-Franco J.E., Beran M.: The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth and induces apoptosis in Bcr/Abl-positive cell lines sensitive and resistant to imatinib mesylate. *Haematologica*, 2003; 88: 853–863
- [49] Geary C.G.: The story of chronic myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.*, 2000; 110: 2–11
- [50] Ghobrial I.M., Witzig T.E., Adjei A.A.: Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J. Clin.*, 2005; 55: 178–194
- [51] Goldman J.M., Druker B.J.: Chronic myeloid leukemia: current treatment options. *Blood*, 2001; 98: 2039–2042

- [52] Gorre M.E., Ellwood-Yen K., Chiosis G., Rosen N., Sawyers C.L.: BCR-ABL point mutants isolated from patients with imatinib mesylate-resistant chronic myeloid leukemia remain sensitive to inhibitors of the BCR-ABL chaperone heat shock protein 90. *Blood*, 2002; 100: 3041–3044
- [53] Gorre M.E., Mohammed M., Ellwood K., Hsu N., Paquette R., Rao P.N., Sawyers C.L.: Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*, 2001; 293: 876–880
- [54] 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
- [55] Groffen J., Stephenson J.R., Heisterkamp N., de Klein A., Bartram C.R., Grosveld G.: Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*, 1984; 36: 93–99
- [56] Heinrich M.C., Griffith D.J., Druker B.J., Wait C.L., Ott K.A., Ziegler A.J.: Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood*, 2000; 96: 925–932
- [57] Hirota S., Nishida T., Isozaki K., Taniguchi M., Nakamura J., Okazaki T., Kitamura Y.: Gain-of-function mutation at the extracellular domain of KIT in gastrointestinal stromal tumours. *J. Pathol.*, 2001; 193: 505–510
- [58] Hochhaus A., Kreil S., Corbin A.S., La Rosee P., Muller M.C., Lahaye T., Hanfstein B., Schoch C., Cross N.C., Berger U., Gschaidmeier H., Druker B.J., Hehlmann R.: Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia*, 2002; 16: 2190–2196
- [59] Hofmann W.K., Komor M., Wassmann B., Jones L.C., Gschaidmeier H., Hoelzer D., Koeffler H.P., Ottmann O.G.: Presence of the BCR-ABL mutation Glu255Lys prior to STI571 (imatinib) treatment in patients with Ph+ acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2003; 102: 659–661
- [60] Hole A., Blake D.: A review of imatinib mesilate in the treatment of patients with gastrointestinal stromal tumors and chronic myeloid leukaemia. *J. Oncol. Pharm. Practice*, 2003; 9: 1–14
- [61] Holtz M.S., Slovak M.L., Zhang F., Sawyers C.L., Forman S.J., Bhatia R.: Imatinib mesylate (STI571) inhibits growth of primitive malignant progenitors in chronic myelogenous leukemia through reversal of abnormally increased proliferation. *Blood*, 2002; 99: 3792–3800
- [62] Hoover R.R., Mahon F.X., Melo J.V., Daley G.Q.: Overcoming STI571 resistance with the farnesyl transferase inhibitor SCH66336. *Blood*, 2002; 100: 1068–1071
- [63] Horita M., Andreu E.J., Benito A., Arbona C., Sanz C., Benet I., Prosper F., Fernandez-Luna J.L.: Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. *J. Exp. Med.*, 2000; 191: 977–984
- [64] Hughes T., Deininger M., Hochhaus A., Branford S., Radich J., Kaeda J., Baccarani M., Cortes J., Cross N.C., Druker B.J., Gabert J., Grimwade D., Hehlmann R., Kamel-Reid S., Lipton J.H., Longtine J., Martinelli G., Saglio G., Soverini S., Stock W., Goldman J.M.: Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood*, 2006; 108: 28–37
- [65] Ilaria R.L.Jr., Van Etten R.A.: P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 31704–31710
- [66] Illmer T., Schaich M., Platzbecker U., Freiberg-Richter J., Oelschlagel U., von Bonin M., Pursche S., Bergemann T., Ehninger G., Schleyer E.: P-glycoprotein-mediated drug efflux is a resistance mechanism of chronic myelogenous leukemia cells to treatment with imatinib mesylate. *Leukemia*, 2004; 18: 401–408
- [67] Ivan D., Niveiro M., Diwan A.H., Eton O., Kim K.B., Lacey C., Gonzalez C., Prieto V.G.: Analysis of protein tyrosine kinases expression in the melanoma metastases of patients treated with Imatinib Mesylate (STI571, Gleevec). *J. Cutan. Pathol.*, 2006; 33: 280–285
- [68] Janku F., Novotny J., Julis I., Julisova I., Pecan L., Tomancova V., Kocmanova G., Krasna L., Kraisova I., Stork J., Petruzela L.: KIT receptor is expressed in more than 50% of early-stage malignant melanoma: a retrospective study of 261 patients. *Melanoma Res.*, 2005; 15: 251–256
- [69] Joensuu H., Roberts P.J., Sarlomo-Rikala M., Andersson L.C., Tervahartiala P., Tuveson D., Silberman S.L., Capdeville R., Dimitrijevic S., Druker B., Demetri G.D.: Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N. Engl. J. Med.*, 2001; 344: 1052–1056
- [70] Jonuleit T., Peschel C., Schwab R., van der Kuip H., Buchdunger E., Fischer T., Huber C., Aulitzky W.E.: Bcr-Abl kinase promotes cell cycle entry of primary myeloid CML cells in the absence of growth factors. *Br. J. Haematol.*, 1998; 100: 295–303
- [71] Kang C.D., Yoo S.D., Hwang B.W., Kim K.W., Kim D.W., Kim C.M., Kim S.H., Chung B.S.: The inhibition of ERK/MAPK not the activation of JNK/SAPK is primarily required to induce apoptosis in chronic myelogenous leukemic K562 cells. *Leuk. Res.*, 2000; 24: 527–534
- [72] Kano Y., Akutsu M., Tsunoda S., Mano H., Sato Y., Honma Y., Furukawa Y.: *In vitro* cytotoxic effects of a tyrosine kinase inhibitor STI571 in combination with commonly used antileukemic agents. *Blood*, 2001; 97: 1999–2007
- [73] Kantarjian H., Sawyers C., Hochhaus A., Guilhot F., Schiffer C., Gambacorti-Passerini C., Niederwieser D., Resta D., Capdeville R., Zoellner U., Talpaz M., Druker B., Goldman J., O'Brien S.G., Russell N., Fischer T., Ottmann O., Cony-Makhoul P., Facon T., Stone R., Miller C., Tallman M., Brown R., Schuster M., Loughran T., Gratwohl A., Mandelli F., Saglio G., Lazzarino M., Russo D., Baccarani M., Morra E., International STI571 CML Study Group: Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 2002; 346: 645–652
- [74] Kantarjian H.M., Talpaz M., O'Brien S., Jones D., Giles F., Garcia-Manero G., Faderl S., Ravandi F., Rios M.B., Shan J., Cortes J.: Survival benefit with imatinib mesylate versus interferon alpha-based regimens in newly diagnosed chronic phase chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 2006; 108: 1835–1840
- [75] Kerkela R., Grazette L., 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
- [76] Kimura S., Kuroda J., Segawa H., Sato K., Nogawa M., Yuasa T., Ottmann O.G., Maekawa T.: Antiproliferative efficacy of the third-generation bisphosphonate, zoledronic acid, combined with other anticancer drugs in leukemic cell lines. *Int. J. Hematol.*, 2004; 79: 37–43
- [77] Kirchner D., Duyster J., Ottmann O., Schmid R.M., Bergmann L., Muzert G.: Mechanisms of Bcr-Abl-mediated NF-kappaB/Rel activation. *Exp. Hematol.*, 2003; 31: 504–511
- [78] Kuroda J., Kimura S., Segawa H., Kobayashi Y., Yoshikawa T., Urasaki Y., Ueda T., Enjo F., Tokuda H., Ottmann O.G., Maekawa T.: The third-generation bisphosphonate zoledronate synergistically augments the anti-Ph+ leukemia activity of imatinib mesylate. *Blood*, 2003; 102: 2229–2235
- [79] LaMontagne K.R., Hannon G., Tonks N.K.: Protein tyrosine phosphatase PTP1B suppresses p210 bcr-abl-induced transformation of rat-1 fibroblasts and promotes differentiation of K562 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 14094–14099
- [80] Lancet J.E., Karp J.E.: Farnesyltransferase inhibitors in hematologic malignancies: new horizons in therapy. *Blood*, 2003; 102: 3880–3889
- [81] La Rosee P., Johnson K., Corbin A.S., Stoffregen E.P., Moseson E.M., Willis S., Mauro M.M., Melo J.V., Deininger M.W., Druker B.J.: *In vitro* efficacy of combined treatment depends on the underlying mechanism of resistance in imatinib-resistant Bcr-Abl-positive cell lines. *Blood*, 2004; 103: 208–215
- [82] Lassam N., Bickford S.: Loss of c-kit expression in cultured melanoma cells. *Oncogene*, 1992; 7: 51–56
- [83] le Coutre P., Tassi E., Varella-Garcia M., Barni R., Mologni L., Cabrita G., Marchesi E., Supino R., Gambacorti-Passerini C.: Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. *Blood*, 2000; 95: 1758–1766
- [84] Lefevre G., Glotin A.L., Calipel A., Mouriaux F., Tran T., Kherrouche Z., Maura C.A., Auclair C., Mascarelli F.: Roles of stem cell factor/c-Kit and effects of Glivec/STI571 in human uveal melanoma cell tumorigenesis. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 31769–31779
- [85] Li J.E., Wu W.L., Wang Z.Y., Sun G.L.: Apoptotic effect of As2S2 on K562 cells and its mechanism. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2002; 23: 991–996
- [86] Litzow M.R.: Imatinib resistance. Obstacles and opportunities. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 2006; 130: 669–679

- [87] Liu W.M., Stimson L.A., Joel S.P.: The *in vitro* activity of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in BCR-ABL positive chronic myeloid leukaemia cells: synergistic interactions with anti-leukaemic agents. *Br. J. Cancer.*, 2002; 86: 1472–1478
- [88] Mahon F.X., Belloc F., Lagarde V., Chollet C., Moreau-Gaudry F., Reiffers J., Goldman J.M., Melo J.V.: MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood*, 2003; 101: 2368–2373
- [89] Majsterek I., Sliwinski T., Poplawski T., Pytel D., Kowalski M., Slupianek A., Skorski T., Blasiak J.: Imatinib mesylate (STI571) abrogates the resistance to doxorubicin in human K562 chronic myeloid leukemia cells by inhibition of BCR/ABL kinase-mediated repair. *Mutat. Res.*, 2006; 603: 74–82
- [90] Majsterek I., Slupianek A., Hoser G., Skorski T., Blasiak J.: ABL-fusion oncoproteins activate multi-pathway of DNA repair: role in drug resistance? *Biochimie*, 2004; 86: 53–65
- [91] Mauro M.J., Deininger M.W.: Chronic myeloid leukemia in 2006: a perspective. *Haematologica*, 2006; 91: 152–158
- [92] Mayerhofer M., Aichberger K.J., Florian S., Krauth M.T., Hauswirth A.W., Derdak S., Sperr W.R., Esterbauer H., Wagner O., Marosi C., Pickl W.F., Deininger M., Weisberg E., Druker B.J., Griffin J.D., Sillaber C., Valent P.: Identification of mTOR as a novel bifunctional target in chronic myeloid leukemia: dissection of growth-inhibitory and VEGF-suppressive effects of rapamycin in leukemic cells. *FASEB J.*, 2005; 19: 960–962
- [93] Mayorga M.E., Sanchis D., Perez de Santos A.M., Velasco A., Dolcet X., Casanova J.M., Baradad M., Egido R., Pallares J., Espurz N., Benitez D., Mila J., Malveyh J., Castel T., Comella J.X., Matias-Guiu X., Vilella R., Marti R.M.: Antiproliferative effect of STI571 on cultured human cutaneous melanoma-derived cell lines. *Melanoma Res.*, 2006; 16: 127–135
- [94] McGary E.C., Onn A., Mills L., Heimberger A., Eton O., Thomas G.W., Shtivelband M., Bar-Eli M.: Imatinib mesylate inhibits platelet-derived growth factor receptor phosphorylation of melanoma cells but does not affect tumorigenicity *in vivo*. *J. Invest. Dermatol.*, 2004; 122: 400–405
- [95] Melo J.V., Deininger M.W.: Biology of chronic myelogenous leukemia—signaling pathways of initiation and transformation. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.*, 2004; 18: 545–568
- [96] Melo J.V., Hughes T.P., Apperley J.F.: Chronic myeloid leukemia. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*; 2003: 132–152
- [97] Montone K.T., van Belle P., Elenitsas R., Elder D.E.: Proto-oncogene c-kit expression in malignant melanoma: protein loss with tumor progression. *Mod. Pathol.*, 1997; 10: 939–944
- [98] Mow B.M., Chandra J., Svingen P.A., Hallgren C.G., Weisberg E., Kottke T.J., Narayanan V.L., Litzow M.R., Griffin J.D., Sausville E.A., Tefferi A., Kaufmann S.H.: Effects of the Bcr/abl kinase inhibitors STI571 and adaphostin (NSC 680410) on chronic myelogenous leukemia cells *in vitro*. *Blood*, 2002; 99: 664–671
- [99] 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 PD17955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res.*, 2002; 62: 4236–4243
- [100] Natali P.G., Nicotra M.R., Winkler A.B., Cavaliere R., Bigotti A., Ullrich A.: Progression of human cutaneous melanoma is associated with loss of expression of c-kit proto-oncogene receptor. *Int. J. Cancer.*, 1992; 52: 197–201
- [101] Neshat M.S., Raitano A.B., Wang H.G., Reed J.C., Sawyers C.L.: The survival function of the Bcr-Abl oncogene is mediated by Bad-dependent and -independent pathways: roles for phosphatidylinositol 3-kinase and Raf. *Mol. Cell. Biol.*, 2000; 20: 1179–1186
- [102] Nimmanapalli R., Bali P., O'Bryan E., Fuino L., Guo F., Wu J., Houghton P., Bhalla K.: Arsenic trioxide inhibits translation of mRNA of bcr-abl, resulting in attenuation of Bcr-Abl levels and apoptosis of human leukemia cells. *Cancer Res.*, 2003; 63: 7950–7958
- [103] Nowell P., Hungerford D.: A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, 1960; 132: 1497
- [104] Oda T., Heaney C., Hagopian J.R., Okuda K., Griffin J.D., Druker B.J.: Crkl is the major tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 22925–22928
- [105] Ogawa S., Mitani K., Kurokawa M., Matsuo Y., Minowada J., Inazawa J., Kamada N., Tsubota T., Yazaki Y., Hirai H.: Abnormal expression of Evi-1 gene in human leukemias. *Hum. Cell*, 1996; 9: 323–332
- [106] Ottmann O.G., Druker B.J., Sawyers C.L., Goldman J.M., Reiffers J., Silver R.T., Tura S., Fischer T., Deininger M.W., Schiffer C.A., Baccarani M., Gratwohl A., Hochhaus A., Hoelzer D., Fernandes-Reese S., Gathmann I., Capdeville R., O'Brien S.G.: A phase 2 study of imatinib in patients with relapsed or refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoid leukemias. *Blood*, 2002; 100: 1965–1971
- [107] Pereira P.R., Odashiro A.N., Marshall J.C., Correa Z.M., Belfort R., Burnier M.N.: The role of c-kit and imatinib mesylate in uveal melanoma. *J. Carcinog.*, 2005; 4: 19
- [108] Perkins C., Kim C.N., Fang G., Bhalla K.N.: Arsenic induces apoptosis of multidrug-resistant human myeloid leukemia cells that express Bcr-Abl or overexpress MDR, MRP, Bcl-2, or Bcl-x(L). *Blood*, 2000; 95: 1014–1022
- [109] Radujkovic A., Schad M., Topaly J., Veldwijk M.R., Laufs S., Schultheis B.S., Jauch A., Melo J.V., Fruehauf S., Zeller W.J.: Synergistic activity activity of imatinib and 17-AAG in imatinib-resistant CML cells overexpressing BCR-ABL—Inhibition of P-glycoprotein function by 17-AAG. *Leukemia*, 2005; 19: 1198–1206
- [110] Recher C., Beyne-Rauzy O., Demur C., Chicanne G., Dos Santos C., Mas V.M., Benzaquen D., Laurent G., Huguet F., Payrastre B.: Antileukemic activity of rapamycin in acute myeloid leukemia. *Blood*, 2005; 105: 2527–2534
- [111] Rosti G., Martinelli G., Bassi S., Amabile M., Trabacchi E., Giannini B., Cilloni D., Izzo B., De Vivo A., Testoni N., Cambrin G.R., Bonifazi F., Soverini S., Luatti S., Gottardi E., Alberti D., Pane F., Salvatore F., Saglio G., Baccarani M., Study Committee, Italian Cooperative Study Group for Chronic Myeloid Leukemia; Writing Committee, Italian Cooperative Study Group for Chronic Myeloid Leukemia: Molecular response to imatinib in late chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Blood*, 2004; 103: 2284–2290
- [112] Roumiantsev S., Shah N.P., Gorre M.E., Nicoll J., Brasher B.B., Sawyers C.L., Van Etten R.A.: Clinical resistance to the kinase inhibitor STI-571 in chronic myeloid leukemia by mutation of Tyr-253 in the Abl kinase domain P-loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 10700–10705
- [113] Roy L., Guilhot J., Krahnke T., Guerci-Bresler A., Druker B.J., Larson R.A., O'Brien S., So C., Massimini G., Guilhot F.: Survival advantage from imatinib compared with the combination interferon- $\alpha$  plus cytarabine in chronic-phase chronic myelogenous leukemia: historical comparison between two phase 3 trials. *Blood*, 2006; 108: 1478–1484
- [114] Rubin B.P., Singer S., Tsao C., Duensing A., Lux M.L., Ruiz R., Hibbard M.K., Chen C.J., Xiao S., Tuveson D.A., Demetri G.D., Fletcher C.D., Fletcher J.A.: KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res.*, 2001; 61: 8118–8121
- [115] Salgia R., Brunkhorst B., Pisick E., Li J.L., Lo S.H., Chen L.B., Griffin J.D.: Increased tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins in myeloid cell lines expressing p210BCR/ABL. *Oncogene*, 1995; 11: 1149–1155
- [116] Salgia R., Li J.L., Lo S.H., Brunkhorst B., Kansas G.S., Sobhany E.S., Sun Y., Pisick E., Hallek M., Ernst T., Tantravahi R., Chen L.B., Griffin J.D.: Molecular cloning of human paxillin, a focal adhesion protein phosphorylated by P210BCR/ABL. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 5039–5047
- [117] Sattler M., Salgia R., Okuda K., Uemura N., Durstin M.A., Pisick E., Xu G., Li J.L., Prasad K.V., Griffin J.D.: The proto-oncogene product p120CBL and the adaptor proteins CRKL and c-CRKL link c-ABL, p190BCR/ABL and p210BCR/ABL to the phosphatidylinositol-3' kinase pathway. *Oncogene*, 1996; 12: 839–846
- [118] Sawaki A., Yamoto K.: Imatinib mesylate acts in metastatic or unresectable gastrointestinal stromal tumor by targeting KIT receptors—a review. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2004; 54: S44–S49
- [119] Sawyers C.L., Hochhaus A., Feldman E., Goldman J.M., Miller C.B., Ottmann O.G., Schiffer C.A., Talpaz M., Guilhot F., Deininger M.W., Fischer T., O'Brien S.G., Stone R.M., Gambacorti-Passerini C.B., Russell N.H., Reiffers J.J., Shea T.C., Chapuis B., Coutre S., Tura S., Morra E., Larson R.A., Saven A., Peschel C., Gratwohl A., Mandelli F., Ben-Am M., Gathmann I., Capdeville R., Paquette R.L., Druker B.J.: Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood*, 2002; 99: 3530–3539
- [120] Scheinfeld N.: A comprehensive review of imatinib mesylate (Gleevec) for dermatological diseases. *J. Drugs. Dermatol.*, 2006; 5: 117–122
- [121] Scherr M., Battmer K., Winkler T., Heidenreich O., Ganser A., Eder M.: Specific inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA. *Blood*, 2003; 101: 1566–1569

- [122] 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
- [123] Shah N.P., Nicoll J.M., Nagar B., Gorre M.E., Paquette R.L., Kuriyan J., Sawyers C.L.: Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell*, 2002; 2: 117–125
- [124] Shanafelt T.D., Lee Y.K., Bone N.D., Strega A.K., Narayanan V.L., Sausville E.A., Geyer S.M., Kaufmann S.H., Kay N.E.: Adaphostin-induced apoptosis in CLL B cells is associated with induction of oxidative stress and exhibits synergy with fludarabine. *Blood*, 2005; 105: 2099–2106
- [125] Shen S.S., Zhang P.S., Eton O., Prieto V.G.: Analysis of protein tyrosine kinase expression in melanocytic lesions by tissue array. *J. Cutan. Pathol.*, 2003; 30: 539–547
- [126] Sill H., Goldman J.M., Cross N.C.: Homozygous deletions of the p16 tumor-suppressor gene are associated with lymphoid transformation of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 1995; 85: 2013–2016
- [127] Sillaber C., Gesbert F., Frank D.A., Sattler M., Griffin J.D.: STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells. *Blood*, 2000; 95: 2118–2125
- [128] Singer C.F., Hudelist G., Lamm W., Mueller R., Czerwenka K., Kubista E.: Expression of tyrosine kinases in human malignancies as potential targets for kinase-specific inhibitors. *Endocr. Relat. Cancer*, 2004; 11: 861–869
- [129] Skorski T., Bellacosa A., Nieborowska-Skorska M., Majewski M., Martinez R., Choi J.K., Trotta R., Wlodarski P., Perrotti D., Chan T.O., Wasik M.A., Tsichlis P.N., Calabretta B.: Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J.*, 1997; 16: 6151–6161
- [130] Skorski T., Nieborowska-Skorska M., Nicolaidis N.C., Szczylik C., Iversen P., Iozzo R.V., Zon G., Calabretta B.: Suppression of Philadelphia 1 leukemia cell growth in mice by BCR-ABL antisense oligodeoxynucleotide leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994; 91: 4504–4508
- [131] Szulawska A., Czyż M.: Molekularne mechanizmy działania antracyklin. *Post. Hig. Med. Dosw.*, 2006; 60: 78–100
- [132] Talpaz M., Silver R.T., Druker B.J., Goldman J.M., Gambacorti-Passerini C., Guilhot F., Schiffer C.A., Fischer T., Deininger M.W., Lennard A.L., Hochhaus A., Ottmann O.G., Gratwohl A., Baccarani M., Stone R., Tura S., Mahon F.X., Fernandes-Reese S., Gathmann I., Capdeville R., Kantarjian H.M., Sawyers C.L.: Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood*, 2002; 99: 1928–1937
- [133] Tauchi T., Feng G.S., Shen R., Song H.Y., Donner D., Pawson T., Broxmeyer H.E.: SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp is a target of p210bcr-abl tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 15381–15387
- [134] Tauchi T., Ohyashiki K.: The second generation of BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors. *Int. J. Hematol.*, 2006; 83: 294–300
- [135] Thomas J., Wang L., Clark R.E., Pirmohamed M.: Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood*, 2004; 104: 3739–3745
- [136] Topaly J., Schad M., Laufs S., Melo J.V., Zeller W.J., Fruehauf S.: Cross-resistance of imatinib mesylate and 17-AAG in imatinib-resistant cells that overexpress BCR-ABL. *Br. J. Haematol.*, 2003; 121: 672–673
- [137] Topaly J., Zeller W.J., Fruehauf S.: Synergistic activity of the new ABL-specific tyrosine kinase inhibitor STI571 and chemotherapeutic drugs on BCR-ABL-positive chronic myelogenous leukemia cells. *Leukemia*, 2001; 15: 342–347
- [138] Towatari M., Adachi K., Kato H., Saito H.: Absence of the human retinoblastoma gene product in the megakaryoblastic crisis of chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 1991; 78: 2178–2181
- [139] Tuveson D.A., Willis N.A., Jacks T., Griffin J.D., Singer S., Fletcher C.D., Fletcher J.A., Demetri G.D.: STI571 inactivation of the gastrointestinal stromal tumor c-KIT oncoprotein: biological and clinical implications. *Oncogene*, 2001; 20: 5054–5058
- [140] Ugurel S., Hildenbrand R., Zimpfer A., La Rosee P., Paschka P., Sucker A., Keikavoussi P., Becker J.C., Rittgen W., Hochhaus A., Schaadendorf D.: Lack of clinical efficacy of imatinib in metastatic melanoma. *Br. J. Cancer*, 2005; 92: 1398–1405
- [141] Urbano A., Gorgun G., Foss F.: Mechanisms of apoptosis by the tyrosine kinase inhibitor AG957 in hematopoietic cells. *Biochem. Pharmacol.*, 2002; 63: 689–692
- [142] van Oosterom A.T., Judson I., Verweij J., Stroobants S., Donato di Paola E., Dimitrijevic S., Martens M., Webb A., Scoti R., Van Glabbeke M., Silberman S., Nielsen O.S.: Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study. *Lancet*, 2001; 358: 1421–1423
- [143] Verfaillie C.M., Hurley R., Zhao R.C., Prosper F., Delforge M., Bhatia R.: Pathophysiology of CML: do defects in integrin function contribute to the premature circulation and massive expansion of the BCR/ABL clone? *J. Lab. Clin. Med.*, 1997; 129: 584–591
- [144] Vigneri P., Wang J.Y.: Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL kinase. *Nat. Med.*, 2001; 7: 228–234
- [145] 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
- [146] Weisberg E., Griffin J.D.: Mechanism of resistance to the ABL tyrosine kinase inhibitor STI571 in BCR/ABL-transformed hematopoietic cell lines. *Blood*, 2000; 95: 3498–3505
- [147] White D.L., Saunders V.A., Dang P., Engler J., Zannettino A.C.W., 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
- [148] Woessmann W., Mivechi N.F.: Role of ERK activation in growth and erythroid differentiation of K562 cells. *Exp. Cell Res.*, 2001; 264: 193–200
- [149] Xu Y., Voelter-Mahlknecht S., Mahlkecht U.: The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid down-regulates expression levels of Bcr-Abl, c-Myc, and HDAC3 in chronic myeloid leukemia cell lines. *Int. J. Mol. Med.*, 2005; 15: 169–172
- [150] Yin T., Wu Y.L., Sun H.P., Sun G.L., Du Y.Z., Wang K.K., Zhang J., Chen G.Q., Chen S.J., Chen Z.: Combined effects of As4S4 and imatinib on chronic myeloid leukemia cells and BCR-ABL oncoprotein. *Blood*, 2004; 104: 4219–4225
- [151] Yu C., Krystal G., Varticovski L., McKinstry R., Rahmani M., Dent P., Grant S.: Pharmacologic mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase inhibitors interact synergistically with STI571 to induce apoptosis in Bcr/Abl-expressing human leukemia cells. *Cancer Res.*, 2002; 62: 188–199