

Современная Онкология

Экстравыпуск

Шестилетние результаты исследования IRIS: длительная выживаемость и снижение частоты трансформаций у первично диагностированных пациентов с хроническим миелоидным лейкозом в хронической фазе, получающих лечение иматинибом

A.Hochhaus, B.J.Druker, R.A.Larson, S.G.O'Brien, I.Gathmann, F.Guilhot 3

Высокая эффективность и безопасность Нилотиниба у пациентов в хронической фазе хронического миелоидного лейкоза с резистентностью к иматинибу или непереносимостью иматиниба

H.M.Kantarjian, A.Hochhaus, J.Cortes, G.Martinelli, K.N.Bhalla, F.J.Giles, G.Ossenkoppele, N.Gattermann, A.Haque, N.Gallagher, M.Baccarani, Ph. le Coutre 4

Нилотиниб имеет минимальную перекрестную непереносимость с иматинибом у пациентов с Ph⁺-хроническим миелоидным лейкозом в хронической фазе или фазе акселерации

J.Cortes, E.Jabbour, A.Hochhaus, Ph. le Coutre, M.Baccarani, K.N.Bhalla, G.Ossenkoppele, N.Gattermann, A.Haque, N.Gallagher, F.Giles, H.M.Kantarjian 5

Расширенный доступ к Нилотинибу в рамках клинического исследования (ENACT) у взрослых пациентов с хроническим миелоидным лейкозом в фазе бластного криза, акселерации или хронической фазе с резистентностью к иматинибу или непереносимостью иматиниба: предварительный анализ безопасности

F.Nicolini, G.Alimena, Haifa-Kathrin Al-Ali, G.Smith, Maria Luisa Veronese и соавт. 6

Нилотиниб – новый этап успеха в терапии хронического миелолейкоза
Э.Г.Ломаия, А.Ю.Зарицкий 7

Случай успешной терапии нилотинибом пациентки с Ph⁺-хроническим миелолейкозом в хронической фазе с резистентностью к интерферону и иматинибу

Н.А.Афанасьева, Г.А.Гусарова 13

2008



MEDIA MEDICA

Нилотиниб – новый этап успеха в терапии хронического миелолейкоза

Э.Г. Ломаия, А.Ю. Зарицкий

Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии;

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

Успехи в терапии хронического миелолейкоза (ХМЛ) обусловлены появлением патогенетически направленной терапии иматинибом (Гливек; Novartis Pharmaceuticals, Швейцария) – ингибитором Bcr-Abl-тирозинкиназы. Высокая эффективность и низкая токсичность препарата связаны с его избирательным действием на лейкоэмическую клетку. Иматиниб – первый препарат, при приеме которого большинство больных в хронической фазе (ХФ) достигают не только гематологической, но и цитогенетической ремиссии. Более того, у части из них лейкоэмическую популяцию клеток не удается выявить с помощью высокочувствительных методов полимеразной цепной реакции (ПЦР) [1–3].

Несмотря на успехи в лечении иматинибом, часть больных в ХФ, а также большинство пациентов в фазах акселерации (ФА) и бластного криза (БК) или исходно нечувствительны к препарату, или на фоне продолжающейся терапии иматинибом утрачивают достигнутый ответ [4–6]. На фоне терапии иматинибом не достигают полного гематологического (ПГО) и полного цитогенетического ответов (ПЦО) 4 и 5%, 13 и 50–60% больных в ХФ соответственно с впервые установленным диагнозом ХМЛ и с резистентностью или непереносимостью препаратов интерферона- α [7–8]. Первичная и вторичная резистентность встречается у 4 и 7%, 4 и 20%, 24 и 60%, 66 и 93% больных в ранней и поздней ХФ, а также в ФА и БК соответственно [9]. Молекулярная резистентность, т.е. отсутствие полного молекулярного ответа, встречается у большинства и почти у половины больных, получающих терапию иматинибом, в поздней и в ранней ХФ ХМЛ соответственно.

Механизмы как первичной, так и приобретенной резистентности до конца не изучены. Наиболее широко обсуждается роль мутаций гена Bcr-Abl в развитии резистентности к иматинибу. Иматиниб блокирует белок Bcr-Abl в его неактивной конформации путем присоединения к его АТФ-карману. Подавляя ферментативную активность тирозинкиназы, иматиниб предотвращает фосфорилирование субстратов белка и запуск сигнальных путей, активирующих пролиферативную активность лейкоэмической клетки, снижающих ее чувствительность к апоптозу и уменьшающих связь со стромой. Известно, что при возникновении мутации в гене Bcr-Abl тирозинкиназа меняет конформацию таким образом, что для иматиниба в той или иной степени затрудняется доступ к АТФ-карману белка. Как следствие, чувствительность к иматинибу клеток, экспрессирующих мутантные гены Bcr-Abl, снижена или вовсе отсутствует. К настоящему времени описано более 50 видов мутаций Bcr-Abl-тирозинкиназы с локализацией в Р- и А-петле, а также в киназном домене белка. Клиническая значимость возникновения мутаций показана во многих исследованиях. Выявлено, что риск развития мутаций выше у больных в поздней по сравнению с ранней ХФ и крайне высок в ФА и БК [10–13].

Проблема резистентности к иматинибу и изучение ее механизмов стали толчком для разработки новых молекул. Исследование кристаллической структуры иматиниба показало, что к АТФ-карману белка Bcr-Abl препарат присоединяется в основном с помощью своего анилинпи-

римидинового кольца, тогда как метилпиперазиниловый группа молекулы иматиниба располагается поверхностно и практически не проникает в АТФ-карман тирозинкиназы. Изменение структуры данного метилпиперазинилового кольца в молекуле AMN107 (Нилотиниб; Тасигна; Novartis Pharmaceuticals, Швейцария) привело к увеличению сродства с белком Bcr-Abl и в этом участке препарата. Благодаря увеличению точек соединения и образованию более прочной связи с АТФ-карманом белка усилилась блокирующая активность препарата в отношении Bcr-Abl-тирозинкиназы, что подтверждено не только в экспериментах на культурах клеток, но и в клинических исследованиях [14, 15].

Исследования *in vitro* показали существенно более высокую чувствительность лейкоэмических клеток, экспрессирующих как дикий, так и мутантный ген Bcr-Abl, к нилотинибу по сравнению с иматинибом. Ингибирующая концентрация нилотиниба, необходимая для подавления 50% лейкоэмических клеток (IC_{50}), была значительно ниже таковой иматиниба. Так, IC_{50} , необходимая для подавления фосфорилирования субстратов белка в культурах клеток, экспрессирующих дикий тип Bcr-Abl, составила 15 и 280 нмоль у нилотиниба и иматиниба соответственно. Увеличение активности в 20 и более раз у нилотиниба по сравнению с иматинибом сохранялось и в отношении подавляющего большинства иматинибрезистентных клеток, экспрессирующих разные виды мутантных генов Bcr-Abl. Исключение составили только клеточные линии, экспрессирующие мутантный ген T315I. IC_{50} для подавления фосфорилирования субстратов Bcr-Abl^{T315I}-тирозинкиназы как для иматиниба, так и для нилотиниба составила более 5000 нмоль. Более высокая активность нилотиниба в подавлении как клеточной пролиферации, так и фосфорилирования субстратов по сравнению с иматинибом была показана также в исследовании E.Weisberg и соавт. [15]. Так, в культурах клеток, экспрессирующих дикий тип Bcr-Abl, IC_{50} нилотиниба для подавления пролиферации и аутофосфорилирования была в 10 и 30 раз соответственно ниже по сравнению с IC_{50} иматиниба. При этом для нилотиниба этот показатель не превышал 1000 нмоль в линиях клеток, мутантных по Bcr-Abl (кроме Bcr-Abl^{T315I}; IC_{50} > 10 000 нмоль) – это ниже концентрации препарата, создаваемой при терапии ХМЛ в стандартной дозе [16]. Если ингибирующая активность нилотиниба в отношении пролиферации и фосфорилирования субстратов белка существенно выше, чем у иматиниба, то активность обоих препаратов в отношении индукции апоптоза существенно не различалась. В данном исследовании была подтверждена высокая эффективность нилотиниба в экспериментах на животных: выживаемость мышей, трансплантированных Bcr-Abl + клетками, имеющими клинику ХМЛ, была достоверно выше по сравнению с таковой в контрольной группе [17].

Нилотиниб, как и иматиниб, показал ингибирующую активность в отношении как диких, так и некоторых мутантных видов тирозинкиназ c-kit и PDGFR. При этом активность препарата в клеточных линиях, экспрессирующих данные гены, была сопоставима с активностью има-

тиниба. Нилотиниб существенно не влиял на пролиферацию клеток, экспрессирующих другие тирозинкиназы (VEGFR, Jak-2, EGFR, Ras, Akt и др.). Таким образом, данное исследование показало, что нилотиниб является более селективным ингибитором Vcr-Abl-тирозинкиназы по сравнению с иматинибом [15].

Нилотиниб подавлял пролиферативную активность как клеток, экспрессирующих ген TEL-PDGFR β (TEL-platelet derived growth factor receptor β), так и клеток, экспрессирующих ген FIP1L1-PDGFR α (FIP1-Like1-platelet derived growth factor receptor α), являющихся пусковым механизмом хронического миеломоноцитарного лейкоза и гиперэозинофильного синдрома соответственно. IC₅₀ нилотиниба и иматиниба для подавления пролиферации клеток, экспрессирующих дикие типы данных генов, была сравнимой и составила менее 50 и 25 нмоль соответственно. При этом если иматинибрезистентные клетки, экспрессирующие мутантный TEL-PDGFR β – T681I, сохраняли чувствительность к нилотинибу (IC₅₀ 22,2 нмоль), то клетки, экспрессирующие мутантный FIP1L1-PDGFR α – T674I, оставались резистентными и к нилотинибу (IC₅₀ не была достигнута). Эффективность препарата была подтверждена в экспериментах на животных, трансплантированных клетками, экспрессирующими дикие гены TEL-PDGFR β и FIP1L1-PDGFR α : отмечалось резкое уменьшение опухолевой массы под воздействием нилотиниба по сравнению с таковой в контрольной группе [18].

Антипролиферативная активность нилотиниба и иматиниба в культурах клеток, экспрессирующих дикий и некоторые мутантные виды c-kit, была сопоставимой. Известно, что клетки с мутантным c-kit^{D816V}, обнаруживаемым у большинства больных с системным мастоцитозом, резистентны к иматинибу. Исследование von N.Bubnoff и соавт. [19] показало, что в отличие от иматиниба AMN107 индуцирует апоптоз в клетках, экспрессирующих c-kit^{D816V}. Предполагается, что препарат может быть активен при системном мастоцитозе [19].

Проведение серии экспериментов *in vitro* и на животных позволило определить спектр заболеваний, при которых нилотиниб может быть активен – Ph⁺/Vcr-Abl+ ХМЛ в разных фазах, Ph⁺ острый лимфобластный лейкоз, FIP1L1-PDGFR α + гиперэозинофильный синдром, TEL-PDGFR β + хронический миеломоноцитарный лейкоз, c-kit+ опухоли желудочно-кишечного тракта и c-kit^{D816V} +

системный мастоцитоз.

В I фазу клинических исследований по определению оптимальной дозы и безопасности терапии ХМЛ и Ph⁺ острого лимфолейкоза нилотинибом были включены 119 пациентов с резистентностью или непереносимостью к ранее проводимой терапии иматинибом, из них 17 – в ХФ ХМЛ, 56 – в ФА ХМЛ, 24 – с миелоидным БК ХМЛ и 22 – с лимфоидным БК ХМЛ и Ph⁺ острым лимфолейкозом. Доза нилотиниба варьировала от 50 мг 1 раз в день до 600 мг 2 раза в день. Средняя концентрация препарата в сыворотке крови при его применении в дозах 400 мг в день, 400 мг 2 раза в день и 600 мг 2 раза в день составила 1, 1,7 и 2,3 мкмоль соответственно. Эти концентрации препарата были существенно выше IC₅₀ нилотиниба, необходимой для подавления пролиферативной активности клеток, экспрессирующих как дикий, так и мутантные виды гена Vcr-Abl, за исключением Vcr-Abl^{T315I}. При применении препарата в дозе 600 мг и менее дозолимитирующая токсичность не была выявлена. Наиболее частыми осложнениями были цитопении. Тяжелая негематологическая токсичность встречалась крайне редко и быстро регрессировала после кратковременной отмены нилотиниба. Интересно, что была выявлена корреляция между повышением уровня непрямого билирубина и наличием у больных полиморфизма (TA)₇/(TA)₇ гена, кодирующего фермент уридиндифосфоглюкуронацетилтрансферазу 1A1, ассоциированного с синдромом Жильбера. Повышение уровня билирубина отмечалось у 7 (50%) из 14 больных с наличием и всего у 10 (10%) из 97 пациентов с отсутствием данного полиморфизма. В табл. 1 указаны осложнения III–IV степени, возникавшие в этом исследовании на фоне терапии нилотинибом. Наряду с низкой токсичностью была выявлена достаточно высокая активность препарата. Так, частота ПГО и большого цитогенетического ответа (БЦО) у больных в ХФ, ФА и БК составила 92 и 35%, 74 и 27%, 39 и 18% соответственно. С учетом фармакокинетических данных, а также эффективности и токсичности препарата была определена оптимальная лечебная доза нилотиниба – 400 мг 2 раза в день. Данные дозы были рекомендованы для II фазы клинических исследований [20].

Высокая эффективность нилотиниба была подтверждена во II фазе клинических исследований. В исследование были включены 280 больных в ХФ ХМЛ с резистентностью или непереносимостью иматиниба. Частота достижения ПГО, БЦО и ПЦО была высокой и почти не различалась в группах больных с резистентностью и непереносимостью к иматинибу. Мутации гена Vcr-Abl (28 видов) были выявлены у 42% больных, резистентных к иматинибу. Эффективность терапии была выше при отсутствии мутантного гена Vcr-Abl (табл. 2). В данной работе были подтверждены результаты исследований *in vitro*, свидетельствующие о разной чувствительности к нилотинибу клеток, экспрессирующих разные виды мутаций. Больные были подразделены на 4 группы в зависимости от уровня IC₅₀ нилотиниба (1-я группа – IC₅₀ менее 100 нмоль, 2-я – IC₅₀ 101–200 нмоль, 3-я – IC₅₀ 201–800 нмоль, 4-я – IC₅₀ более 800 нмоль), требуемого для подавления клеток с данной мутацией в исследованиях *in vitro*. Частота ПГО и ПЦО оставалась достаточно высокой в 1-й и во 2-й группах и была очень низкой в 3-й. Ни один из пациентов 4-й группы, включающей только носителей мутантного гена Vcr-Abl^{T315I}, не достиг БЦО и ПГО (табл. 3). В исследовании наряду с высокой эффективностью терапии была отмечена и низкая частота токсических реакций. Наиболее частыми осложнениями были нейтропения (29%) и тром-

Таблица 1. Частота осложнений III–IV степени (в %) на фоне терапии нилотинибом в разных дозах больных в ХФ ХМЛ с резистентностью или непереносимостью иматиниба [20]

Токсичность	Доза нилотиниба, мг/сут		
	50–400	800	1200
<i>Негематологическая</i>			
Сыпь	0	0	6
Кожный зуд	0	3	6
Сухость кожи	0	0	0
Запоры	0	0	0
Тошнота/рвота	0	0	0
Слабость	0	0	0
Гипербилирубинемия	0	3	11
Повышение уровня непрямого билирубина	0	3	11
Алопеция	0	0	0
Увеличение активности липазы	0	9	11
Увеличение активности АЛТ/АСТ	0	3	0
<i>Гематологическая</i>			
Тромбоцитопения	13–20	25	28
Нейтропения	8–10	9	22
Анемия	4–10	6	6

боцитопения (29%). Реже встречались изменения таких лабораторных показателей, как активность АСТ (4%), уровень билирубина (9%) и липазы (14%). Частота других негематологических осложнений, таких как кожная сыпь, головные боли, диарея, панкреатит, миалгии, тошнота, рвота, задержка жидкости, выпот в плевральную полость, колебалась от 1 до 3%. Данные изменения спонтанно регрессировали после кратковременной отмены препарата и, как правило, не возобновлялись. Интересно, что несмотря на структурную схожесть и идентичность механизмов действия у больных с тяжелыми токсическими реакциями, возникавшими при приеме иматиниба, крайне редко наблюдалось повторное их возникновение на фоне терапии нилотинибом [21].

Еще более оптимистичные результаты были получены при лечении нилотинибом первичных больных ХМЛ в ХФ. Эффективность нилотиниба в этой группе пациентов была существенно выше по сравнению с историческим контролем – группой больных, получавших терапию иматинибом в дозе 400, 800 мг/сут (табл. 4). Кроме того, частота осложнений и длительность перерывов в терапии нилотинибом были невысокими. Наиболее частыми осложнениями III–IV степени были тромбоцитопения (7%), нейтропения (7%), повышение уровня липазы (14%), активность АЛТ/АСТ (14%), миалгии/артралгии (14%) [22].

Эпоха иматиниба поставила гематологов всего мира в затруднительное положение при выборе оптимального лечения для пациентов с ХМЛ, особенно в стабильной ХФ с низким риском прогрессии болезни. С одной стороны, иматиниб – препарат направленного действия с очень высокой эффективностью и низкой токсичностью, но с вероятностью персистенции минимального количества стволовых лейкоэмических клеток и, соответственно, с сохранением риска прогрессии болезни. С другой стороны, аллотрансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) дает высокий шанс полной элиминации лейкоэмических клеток и, соответственно, полного выздоровления, но с возможностью фатальных осложнений в основном в течение первых месяцев терапии. Для больных в ХФ ХМЛ на одной чаше весов – вероятность почти 100% 5-летней общей выживаемости на фоне оптимальной консервативной терапии, а на другой – вероятность фатальных осложнений в раннем посттрансплантационном периоде даже у больных с низким риском алло-ТГСК. Для больных в ХФ иматиниб был признан препаратом первой линии терапии, а применение алло-ТГСК было рекомендовано в случае развития резистентности или непереносимости препарата. Появление нового поколения инги-

биторов Vcr-Abl-тирозинкиназы (нилотиниб, дасатиниб), эффективных у резистентных к иматинибу пациентов и характеризующихся невысокой токсичностью, вновь поставило гематологов перед дилеммой – консервативная терапия или алло-ТГСК. Первая попытка разрешения этого вопроса была сделана в работе Н.Кantarjian и соавт. [23], где оценивалась общая выживаемость больных после отмены иматиниба из-за резистентности или непереносимости, получающих разные виды терапии (алло-ТГСК, нилотиниб/дасатиниб, цитостатики, интерферон). Было показано, что для больных в ХФ при всех видах терапии 3-летняя общая выживаемость достигла 72%. При этом данный показатель у пациентов, получивших лечение нилотинибом/дасатинибом, алло-ТГСК и другими препаратами, составил 100, около 75 и 65% соответственно. В ФА и БК преимущество терапии новыми ингибиторами Vcr-FVL-тирозинкиназы над алло-ТГСК или другими видами лечения было не так очевидно. Так, 5-летняя общая выживаемость больных в ФА и БК составила 80 и 40% после алло-ТГСК и на фоне применения второй генерации ингибиторов тирозинкиназ соответственно. Вероятно, нилотиниб и дасатиниб являются препаратами выбора для иматинибрезистентных больных в ХФ и в меньшей степени – в более поздних стадиях болезни [23].

Вскоре перед гематологами России возникнет еще одна дилемма в отношении этой группы больных – вид оптимальной консервативной терапии. В скором будущем в нашей стране наряду с нилотинибом будет зарегистрирован дасатиниб (Sprycel; Bristol-Myers Squibb, США) – ингибитор Vcr-Abl- и Src-киназ. Дасатиниб, как и нилотиниб, ингибирует большинство иматинибрезистентных клонов лейкоэмических клеток ХМЛ, кроме экспрессирующих Vcr-Abl^{T315I}. Интересно, что больные, резистентные к иматинибу и нилотинибу, сохраняют чувствительность к дасатинибу, и наоборот, нилотиниб, хотя и в меньшей степени, но может быть эффективным у дасатинибрезистентных больных [24, 25]. По всей вероятности, эффективность этих препаратов сопоставима в отношении как иматинибрезистентных пациентов, так и больных, ранее не леченных иматинибом. Однако, по результатам разных клинических исследований, у данных препаратов различаются частота и профиль токсических осложнений. Цитопения и выпот в плевральную полость существенно чаще возникают у больных, получающих терапию дасатинибом, чем у леченных нилотинибом в стандартных дозах. Так, частота анемии, тромбоцитопении и нейтропении на фоне терапии нилотинибом и дасатинибом, по данным разных исследований, в разных фазах болезни достигает 5,3–30,4 и 9–80%, 19,9–39,4 и 35–83%, 13,1–43,8 и 36,4–81,8% соответственно. Частота выпота в плевральную полость III–IV степени у больных, получающих терапию дасатинибом, достигала 28%. При этом снижение дозы препарата до 100 мг и ниже или изменение режима его приема (однократный вместо двукратного в сутки) сни-

Таблица 2. Эффективность терапии нилотинибом у больных в ХФ ХМЛ с резистентностью или непереносимостью иматиниба [21]

Вид ответа	Частота ответа к 6 мес, %		
	все больные	с мутацией	без мутации
ПГО	74	61	82
БЦО	48	42	51
ПЦО	31	23	35

Таблица 3. Эффективность (в %) терапии нилотинибом у больных с мутантным видом Vcr-Abl [21]

Вид ответа	IC ₅₀ нилотиниба, нмоль			
	<100	101–200	201–800	>800
ПГО	77	50	18	0
БЦО	53	43	15	0

Таблица 4. Эффективность (в %) терапии нилотинибом и иматинибом у больных с впервые диагностированным ХМЛ в ХФ [22]

Ответ	Иматиниб, мг/сут		Нилотиниб 800 мг/сут (n=14)	p
	400 (n=50)	800 (n=206)		
ПЦО				
3 мес	36	61	93	0,0002
6 мес	54	85	100	<0,0001
9 мес	67	92	100	<0,0001
БЦО				
9 мес	18	42	45	0,01

жали частоту возникновения плеврального выпота III–IV степени до 0–23 и 8% соответственно без существенного уменьшения эффективности [26, 27].

Предполагается, что токсические эффекты иматиниба, нилотиниба и дасатиниба могут быть обусловлены подавлением данными препаратами тирозинкиназ c-kit и PDGFR. В различных исследованиях выявлено, что ингибирующая активность дасатиниба при воздействии на данные белки выше по сравнению с таковой иматиниба и нилотиниба. Кроме того, показано, что дасатиниб в отличие от этих препаратов подавляет активность большого количества белков (всего 16), как имеющих, так и не имеющих тирозинкиназную активность [28]. Хотя роль этих белков в развитии токсических эффектов дасатиниба до конца не установлена, можно предположить, что с ними могут быть связаны как более высокий риск осложнений, так и большая эффективность препарата в ФА и БК по сравнению с более селективными ингибиторами Vcr-Abl-тирозинкиназы.

Несмотря на высокий эффект нилотиниба, часть больных остаются резистентными к препарату или утрачивают достигнутый ранее ответ. Механизмы резистентности к нилотинибу еще недостаточно изучены. Как на фоне иматиниба, так и при лечении новыми ингибиторами Vcr-Abl-тирозинкиназы нилотинибом и дасатинибом возможно возникновение мутантных клеток, снижающих чувствительность лейкоэмических клеток к данным препаратам.

При использовании метода случайного мутагенеза для генерации мутации в гене Vcr-Abl *in vitro* было выявлено возникновение 17 мутаций после экспозиции клеток с нилотинибом. IC₅₀ нилотиниба, необходимая для подавления пролиферативной активности мутировавших Vcr-Abl-клеток, была в 2,5 – 800 раз выше данного показателя в культурах клеток, экспрессирующих дикий тип Vcr-Abl. Среди этих мутаций было 6 ранее известных видов, в том числе T315I, выявляемых в иматинибрезистентных клетках. Все остальные мутации были обнаружены впервые. При этом большинство клеточных линий, экспрессирующих новые виды мутаций, резистентные к нилотинибу, были резистентны и к иматинибу. При этом IC₅₀ нилотиниба во всех этих клеточных культурах, кроме экспрессирующих мутантный Vcr-Abl^{T315I}, была существенно ниже концентрации препарата, которая создается при применении его в лечебных дозах. Поэтому в клинической практике можно ожидать, что резистентность к нилотинибу в основном будет ассоциирована с возникновением мутантного по Vcr-Abl^{T315I} клона клеток [29]. Проблема появления уже известных или возникновения новых мутаций существует и для дасатиниба. Возможность образования мутантных клеток продемонстрирована в исследованиях *in vitro* с использованием метода сатурационного мутагенеза. Было отмечено возникновение новых видов (V299L, T315A, F317I, F317S), а также ранее определяемых в резистентных к иматинибу культурах клеток мутаций (всего 6 видов) при экспозиции Vcr-Abl+ клеток с дасатинибом. Интересно, что комбинация иматиниба и дасатиниба снижала частоту возникновения резистентных мутантных клеток [30].

Еще одной проблемой является низкая чувствительность примитивных CD34⁺-клеток как к иматинибу, так и к нилотинибу. Известно, что после присоединения энергетической молекулы АТФ к Vcr-Abl-тирозинкиназе начинается фосфорилирование разных белков, контролирующей пролиферативную, апоптотическую активность клетки и ее связь со стромой. Лейкемическая клетка становится автономной, активно пролиферирующей в отсут-

ствии цитокинов, таких как интерлейкин-3, гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), в норме запускающих процессы деления клеток путем активации Jak-2/STAT-5 сигнальных белков. Однако, вероятно, ранняя стволовая Vcr-Abl^{CD34+/CD38-}-позитивная лейкоэмическая клетка сохраняет чувствительность к ГМ-КСФ. Более того, в Vcr-Abl^{CD34+/CD38-}-позитивной лейкоэмической клетке выявлена паракринная продукция ГМ-КСФ. Предполагается, что это приводит к сохранению пролиферативной активности у ранних стволовых лейкоэмических клеток ХМЛ даже после блокирования белка Vcr-Abl ингибиторами тирозинкиназы [31].

Известно, что транспорт иматиниба через клеточную мембрану осуществляется с помощью белков, контролирующей проникновение (ОСТ-1) веществ в клетку или их выкачивание (семейство белков ABCG2, MDR-1) из нее. Это ставит внутриклеточную концентрацию иматиниба в зависимость от уровня экспрессии данных белков на лейкоэмических клетках. В исследованиях на клеточных линиях стромальной опухоли желудочно-кишечного тракта (GIST882 и GIST GDG1) было показано, что внутриклеточная концентрация AMN107 по сравнению с иматинибом выше в 7–10 раз. Это может быть следствием или повышенного вкачивания препарата в клетку, или сниженного выкачивания его из клетки. Можно предположить, что нилотиниб в отличие от иматиниба не является субстратом для действия транспортных белков. Если это так, то резистентность к иматинибу, связанная с нарушением его транспорта, может быть легко преодолена нилотинибом [32]. Это предположение нашло подтверждение в исследовании D.White и соавт. [33]. Было показано, что если IC₅₀ иматиниба для подавления фосфорилирования адапторного белка C-kit в клеточных культурах, полученных от больных с впервые установленным диагнозом ХМЛ, коррелировала с внутриклеточным захватом препарата, то такую взаимосвязь между этими показателями в отношении нилотиниба получить не удалось. При этом добавление празозина – ингибитора транспортного белка ОСТ-1, индуцирующего активное вкачивание веществ в клетку, снижало внутриклеточный захват иматиниба, но не нилотиниба. По всех вероятности, нилотиниб в отличие от иматиниба не является субстратом для ОСТ-1 и его вход в клетку не контролируется данным белком. ОСТ-1 является переносчиком внутрь клетки органических катионов. В молекуле иматиниба этим свойством обладает N-метилпиперазиновая группа, которая как раз и заменена у нилотиниба. Как следствие, молекула нилотиниба является более слабым катионом и не распознается белком ОСТ-1 как субстрат для воздействия [33].

Исследование E.Weisberg и соавт. [34] выявило синергизм иматиниба и нилотиниба в Vcr-Abl-позитивных клеточных линиях, экспрессирующих как дикий, так и мутантные гены. Кроме того, взаимное усиление эффективности терапии данными препаратами было подтверждено в экспериментах на животных. При монотерапии иматинибом или нилотинибом как скорость, так и степень редукции опухолевых клеток были ниже по сравнению с таковыми при сочетанном применении данных препаратов у животных. Данное исследование показало, что несмотря на схожесть механизма действия комбинация иматиниба и нилотиниба может существенно улучшить эффективность лечения больных ХМЛ и что сочетанная терапия этими двумя ингибиторами тирозинкиназы может быть рекомендована для начала клинических исследований [34]. В исследовании D.White и соавт. [35] для выяснения механизма синергического действия

иматиниба и nilотиниба были использованы С-меченные аналоги препаратов. При добавлении иматиниба к С-меченному nilотинибу внутриклеточная концентрация последнего достоверно повышалась. В отличие от этого, добавление nilотиниба к С-меченному иматинибу не оказывало влияния на его концентрацию [35]. Ранее проведенные исследования показали, что транспортные белки семейства ABCG2 являются субстратом для иматиниба [36]. Можно предположить, что подавление иматинибом активности белков этого семейства, выкачивающих разнообразные вещества из клетки, в том числе лекарственные препараты, является причиной повышения концентрации nilотиниба при одновременном его использовании с иматинибом. Хотя синергизм действия препаратов может привести к увеличению их эффективности у больных ХМЛ, можно ожидать и увеличения токсических осложнений. Тем не менее у больных группы высокого риска прогрессии такая сочетанная терапия может быть оправдана.

Выявлен синергизм также между nilотинибом и ингибитором гистондеацетилазы LBH589 (Novartis Pharmaceuticals, Швейцария). Существенное усиление апоптоза отмечалось при одновременной экспозиции nilотиниба и LBH589 в культурах Bcr-Abl-позитивных клеток, экспрессирующих как дикий, так и мутантный вид тирозинкиназы, включая Bcr-Abl^{T315I} [37].

Несмотря на то что исследования *in vitro* показывают усиление активности nilотиниба при комбинированной терапии, без проведения широкомасштабных клинических исследований она не может быть рекомендована для применения в клинической практике.

Роль иматиниба в качестве препарата первой линии терапии ХМЛ бесспорна. Для небольшой части больных с резистентностью к препарату или его непереносимостью с разработкой второй генерации ингибиторов Bcr-Abl-тирозинкиназы (nilотиниб, дасатиниб) появился еще один шанс на достижение ремиссии, вплоть до молекулярной. Требуется рандомизированные клинические исследования для сравнения эффективности и безопасности этих двух препаратов в качестве второй линии терапии. Однако представляется, что с учетом токсического профиля и эффективности препаратов терапия nilотинибом является оптимальной для больных в стабильной ХФ, а дасатинибом – в ФА и БК.

Опыт применения иматиниба у пациентов с ХМЛ позволяет сформулировать основные положения таргетной терапии ХМЛ.

1. Единственной доказанной мишенью для терапии при Ph⁺ ХМЛ является химерная тирозинкиназа Bcr-Abl.
2. Потеря ответа на терапию или развитие вторичной резистентности к терапии – прямые следствия реактивации Bcr-Abl.
3. Терапия для преодоления резистентности должна быть направлена на ингибирование реактивированного Bcr-Abl.
4. Преимущественное ингибирование Bcr-Abl может вести к уменьшению нежелательных эффектов терапии, т.е. предотвратить воздействие препарата на Ph-негативные гемопоэтические и негемопоэтические клетки.

Исходя из вышесказанного, можно сформулировать основные требования, предъявляемые к препаратам для лечения ХМЛ:

- эффективное подавление Bcr-Abl;
- высокая аффинность к мишени – химерной тирозинкиназе (т.е. связывание с Bcr-Abl независимо от ее конформации);

- максимально высокая специфичность связывания с Bcr-Abl, что является основой предотвращения негематологической токсичности.

Именно такими свойствами обладает nilотиниб.

Литература

1. Druker BJ, Guigot F, O'Brien SG et al. IRIS Investigators. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2006; 355 (23): 2408–17.
2. Matsuo E, Miyazaki Y, Tsutsumi C et al. Imatinib provides durable molecular and cytogenetic responses in a practical setting for both newly diagnosed and previously treated chronic myelogenous leukemia: a study in nagasaki prefecture, Japan. *Int J Hematol* 2007; 85 (2): 132–9.
3. Зарицкий АЮ., Ломатиа ЭГ., Виноградова ОЮ. и др. Результаты многоцентрового исследования терапии глиекам больных хроническим миелолейкозом в хронической фазе. *Гематол. и трансфузиол.* 2007; 2: 13–7.
4. Xu Y, Wabner AE, Nguyen PL. Progression of chronic myeloid leukemia to blast crisis during treatment with imatinib mesylate. *Arch Pathol Lab Med* 2004; 128 (9): 980–5.
5. Labaye T, Riehm B, Berger U et al. Response and resistance in 300 patients with Bcr-Abl-positive leukemias treated with imatinib in a single center: a 4.5-year follow-up. *Cancer* 2005; 103 (8): 1659–69.
6. Alimena G, Breccia M, Latagliata R et al. Sudden blast crisis in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia who achieved complete cytogenetic remission after imatinib therapy. *Cancer* 2006; 107 (5): 1008–13.
7. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA et al. IRIS Investigators. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003; 348 (11): 994–1004.
8. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A et al. International STI571 CML Study Group. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 2002; 346 (9): 645–52.
9. Hochhaus A, La Rosee P. Imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia: strategies to avoid and overcome resistance. *Leukemia* 2004; 18 (8): 1321–31.
10. Hochhaus A, Krells, Corbin AS et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* 2002; 16 (11): 2190–6.
11. Branford S, Hughes T. Detection of Bcr-Abl mutations and resistance to imatinib mesylate. *Methods Mol Med* 2006; 125: 93–106.
12. Jiang X, Zhao Y, Smith C et al. Chronic myeloid leukemia stem cells possess multiple unique features of resistance to Bcr-Abl targeted therapies. *Leukemia* 2007; 21: 926–35.
13. Soverini S, Martinelli G, Rosti G et al. ABL mutations in late chronic phase chronic myeloid leukemia patients with up-front cytogenetic resistance to imatinib are associated with a greater likelihood of progression to blast crisis and shorter survival: a study by the GIMEV Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 2005; 23 (18): 4100–9.
14. Nagar B, Bornmann WG, Pellicena P et al. Crystal structures of the kinase domain of c-abl in complex with the small molecule inhibitors PD 173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res* 2002; 62 (15): 4236–43.
15. Weisberg E, Manley PW, Breitenstein W et al. Characterization of AMN 107, a selective inhibitors of wild-type and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell* 2005; 7: 129–41.
16. O'Hare T, Walters DK, Stoffregent EP et al. In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN-107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant ABL kinase domain mutants. *Cancer Res* 2005; 65 (11): 4500–5.
17. Golemovich M, Verstovsek S, Giles F et al. AMN 107, a novel aminopyrimidine inhibitor of Bcr-Abl, has an in vitro activity against imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2005; 11 (13): 4941–7.
18. Stover EH, Chen J, Lee BH et al. The small molecule tyrosine kinase inhibitor AMN 107 inhibits TEL-PDGFRb AND FIP1L1-PDGFRa in vitro and in vivo. *Blood* 2005; 106 (9): 3206–13.
19. von Bubnoff N, Gorantia SHP, Kanchara RK et al. The systemic mastocytosis-specific activating c-kit mutation D816V can be inhibited by the tyrosine kinase inhibitor AMN 107. *Leukemia* 2005; 19 (9): 1670–1.
20. Kantarjian H, Giles F, Wunderle L et al. Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *N Engl J Med* 2006; 354: 2542–51.
21. Kantarjian HM, Giles F, Gattermann N et al. Nilotinib (formerly AMN 107), a highly selective Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitor, is effective in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance. *Blood* 2007, Aug 22; (Epub ahead of print).
22. Jabbour E, Cortes J et al. Preliminary activity of nilotinib, a novel selective potent oral BCR0ABL tyrosine kinase inhibitor, in newly diag-

- nosed Philadelphia chromosome (Ph)-positive chronic phase chronic myelogenous leukemia (CML-CP). *Blood* 2006; 108 (11): abstr 2172.
23. Kantarjian H, O'Brien S, Talpaz M et al. Outcome of patients with Philadelphia positive chronic myelogenous leukemia post-imatinib mesylate failure. *Cancer* 2007; 109: 1556–60.
24. Giles F, le Coutre P et al. A phase II study of nilotinib, a novel tyrosine kinase inhibitor administered to patients with imatinib resistant or intolerant chronic myelogenous leukemia (CML) in chronic phase (CP), accelerated phase (AP) and blast crisis (BC) who have also failed dasatinib therapy. *Blood* 2006; 108 (11): abstr 2170.
25. Jabbour E, Jones D et al. Dynamics of Bcr-Abl kinase domain mutations in patients with one, two or three tyrosine kinase inhibitors (TKI). *Blood* 2006; 108 (11): abstr 750.
26. Quintas-Cardama A, Kantarjian H et al. Pleural effusion in patients with chronic myelogenous leukemia (CML) treated with dasatinib after imatinib failure. *Blood* 2006; 108 (11): abstr 2164.
27. Quintas-Cardama A, Kantarjian H et al. Cytopenias in patients (pts) with chronic myelogenous leukemia (CML) treated with dasatinib (sprycel): clinical features and management, including outcome after hematopoietic growth factor therapy. *Blood* 2006; 108 (11): abstr 2163.
28. Rix U, Hantschel O, Durnberger G et al. Chemical proteomic profile of the Bcr-Abl inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib revealed novel kinase and nonkinase targets. *Blood* 2007, Aug 24; (Epub ahead of print).
29. Ray A, Cowan-Jacob SW, Mamley PW et al. Identification of Bcr-Abl point mutations conferring resistance to the Abl kinase inhibitor AMN7 (Nilotinib) by a random mutagenesis study. *Blood* 2007; 109 (11): 5011–5.
30. Burges MR, Skaggs BJ, Shab NP et al. Comparative analysis of two clinically active Bcr-Abl kinase inhibitors reveals the role of conformation-specific binding in resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102 (9): 3395–400.
31. Way Y, Cai D, Brendel C et al. Adaptive secretion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) mediates imatinib and nilotinib resistance in Bcr-Abl + progenitors via Jak-2/STAT-5 pathway activation. *Blood* 2007; 109 (5): 2147–55.
32. Prenen H, Guetens G, de Boeck G et al. Cellular uptake of the tyrosine kinase inhibitors imatinib and AMN 107 in gastrointestinal stromal tumor cell lines. *Pharmacology* 2006; 77 (1): 11–6.
33. White DL, Saunders VA, Dang P et al. 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 (2): 697–704.
34. Weisberg E, Catley L, Wright RD et al. Beneficial effects of combining nilotinib and imatinib in preclinical models of Bcr-Abl + leukemias. *Blood* 2007; 109 (5): 2112–20.
35. White DL, Saunders VA, Quinn SR et al. Imatinib increases the intracellular concentration of nilotinib, which may explain the observed synergy between these drugs. *Blood* 2007; 109 (8): 3609–10.
36. Jordanides NE, Jorgensen HG, Holyoake TL, Mountford JC. Functional ABCG2 is overexpressed on primary CML CD34+ cells and is inhibited by imatinib mesylate. *Blood* 2006; 108: 1370–3.
37. Fiskus W, Pranpat M, Bali M et al. Combined effects of novel tyrosine kinase inhibitor AMN 107 and histone deacetylase inhibitor LBH589 against Bcr-Abl-expressing human leukemia cells. *Blood* 2006; 108 (2): 645–52.

— * —