

Kliniczne znaczenie analizy wrażliwości mutacji kinazy ABL1 *in vitro* na inhibitory kinazy tyrozynowej

Clinical significance of ABL1 kinase mutation sensitivity to
tyrosine kinase inhibitors by *in vitro* assessment — case report

Tomasz Sacha, Kajetana Foryciarz

Katedra Hematologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie

*Mutacje kinazy ABL1 stanowią jedną z częstszych przyczyn oporności wtórnej na inhibitory kinazy tyrozynowej (TKI). U chorego z przewlekłą białaczką szpikową (CML), opornego na imatynib (IM) w dawce 400 i 600 mg na dobę i u którego zastosowano dazatynib oraz nie uzyskano większej odpowiedzi molekularnej (MMoLR), wykryto mutację ABL1 o typie L384M. Po analizie wrażliwości mutacji opartej na wartości IC_{50} zastosowano nilotynib. W trakcie leczenia poziom BCR-ABL1 zwiększył się do 2%. W wyniku ponownej analizy, uwzględniającej osiągnięte przez TKI stężenia maksymalne w surowicy krwi, do zastosowania w leczeniu wytypowano dazatynib jako lek potencjalnie najbardziej skuteczny w przełamywaniu oporności. W trakcie leczenia doszło do ponownego spadku poziomu BCR-ABL1 do 0,32%. Przydatność kliniczna oceny wrażliwości mutacji ABL1 na TKI, opartej na testach *in vitro* i parametrze IC_{50} , jest wciąż przedmiotem kontrowersji. Zaproponowany niedawno sposób oceny wrażliwości mutacji ABL1 na TKI, uwzględniający osiągnięte stężenia maksymalne oraz normalizację wyniku względem aktywności IM wobec niezmutowanych komórek, nie zwiększa poprawności interpretacji analiz opartych na IC_{50} . Stężenie TKI osiągnięte w surowicy krwi może być natomiast czynnikiem wykluczającym go jako mało skuteczny. Tabele przedstawiające wrażliwość poszczególnych mutacji ABL1 na TKI *in vitro* dostarczają jedynie informacji o tym, o ile słabszy będzie wpływ danego inhibitora na komórki obciążone konkretną mutacją ABL1, w porównaniu z komórkami niezmutowanymi. Jednak wykorzystanie takiej informacji i porównanie indeksu oporności danej mutacji dla poszczególnych TKI może, mimo ograniczeń, dostarczyć danych ułatwiających wybór potencjalnie najskuteczniejszego klinicznie leku.*

Słowa kluczowe: przewlekła białaczka szpikowa, mutacje ABL1, wrażliwość na TKI

Hematologia 2010; 1, 3: 267–270

Abstract

The presence of ABL1 kinase mutations has been identified as one of the major mechanisms of acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors (TKI). In patient with chronic myeloid leukemia (CML) resistant to imatinib (IM) at dose of 400 and 600 mg/d. subsequently treated with dasatinib, and who did not achieve major molecular response (MMoLR), L384M muta-

tion was detected. After the sensitivity analysis, based on IC_{50} , treatment with nilotinib was introduced. However, the level of BCR-ABL1 transcript rose to 2%. The next analysis of mutation sensitivity consisting with IC_{50} and plasma maximum TKI concentration pointed to dasatinib as a potent drug to overcome the resistance. The level of BCR-ABL1 dropped down to 0,32% upon this treatment. The clinical usefulness of ABL1 kinase mutation sensitivity assessment, based on *in vitro* studies and IC_{50} value, is still a matter of controversies. The method incorporating the evaluation of plasma TKI concentration and correction of TKI activity normalized to activity of IM against wild type BCR-ABL1, as proposed recently, does not improve the interpretation of IC_{50} values for clinical usage. Plasma concentrations of TKI could have however a negative predictive value by excluding the less potent drug. Tables presenting *in vitro* sensitivity of ABL1 mutants to TKI are providing only the information of how much less efficacious the drug will be against a certain ABL1 mutant as compared to unmutated BCR-ABL1. Beyond its limitations, the mutations sensitivity index could provide data and help to choose potentially most effective drug.

Key words: chronic myeloid leukemia, ABL1 mutations, sensitivity to TKI

Hematologia 2010; 1, 3: 267–270

Wprowadzenie

Leczenie imatynibem (IM, *imatinib*) przewlekłej białaczki szpikowej (CML, *chronic myeloid leukemia*) charakteryzuje się bardzo dobrą skutecznością i stało się standardem postępowania w fazie przewlekłej (CP, *chronic phase*). Jednak wkrótce po rejestracji tego leku pojawiły się raporty o oporności wywołanej mutacją kinazy ABL1, obecną jeszcze przed wdrożeniem IM [1].

Mutacje kinazy ABL1 powstają w przebiegu CML niezależnie od stosowanego leczenia inhibitorami kinazy tyrozynowej (TKI, *tyrosine kinase inhibitors*) i w wielu przypadkach odpowiadają za powstanie oporności pierwotnej i wtórnej na leki z tej grupy [2, 3]. Badanie mutacji ABL1 u chorych na CML leczonych IM, uzyskujących tylko odpowiedź suboptymalną lub bez odpowiedzi na terapię, ujęto w rekomendacjach Europejskiej Sieci Białaczkowej (ELN, *European LeukemiaNet*) [4]. Identyfikacja typu mutacji i określenie wrażliwości komórek białaczkowych nią obciążonych na TKI może ułatwić podjęcie decyzji o możliwości kontynuacji leczenia którymkolwiek z nich lub zdecydować o kwalifikacji chorego do allogenicznego przeszczepienie macierzystych komórek krwiotwórczych (allo-HSCT, *allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*).

Mimo wieloletnich badań w tym zakresie, wciąż istnieją kontrowersje dotyczące klinicznej przydatności określania wrażliwości linii komórkowych obciążonych różnymi typami mutacji ABL1 na TKI, badanej w warunkach *in vitro*. Prezentowany niżej

przypadek stanowi przykład trudności interpretacyjnych takich badań i ukazuje ograniczoną możliwość jednoznacznego wykorzystania ich rezultatów w konkretnej sytuacji klinicznej.

Opis przypadku

U 25-letniego chorego rozpoznano CML w CP na podstawie badań morfologicznych krwi i szpiku, badania cytogenetycznego (46,XY,t(9;22)(q34;q11)[20]) i za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*) — jakościowej (RT-PCR, *reverse transcriptase polymerase chain reaction*) oraz ilościowej w czasie rzeczywistym (RQ-PCR, *real-time quantitative polymerase chain reaction*). Obliczone w chwili rozpoznania wskaźniki rokownicze Sokala i Hasforda umiejscawiały chorego w grupie niskiego ryzyka. Wykonane badanie HLA nie ujawniło zgodnych rodzinnych dawców do allo-HSCT.

Wdrożone leczenie cytoredukcją hydroksymocznikiem (HU, *hydroxyurea*) spowodowało całkowitą odpowiedź hematologiczną (CHR, *complete hematologic response*). Leczenie IM w dawce 400 mg na dobę rozpoczęto po 3 latach terapii za pomocą HU, w wyniku którego uzyskano częściową odpowiedź cytogenetyczną (PCyR, *partial cytogenetic response*) po 24 miesiącach terapii. Wobec braku uzyskania całkowitej odpowiedzi cytogenetycznej (CCyR, *complete cytogenetic response*) po 30 miesiącach terapii dawkę IM zwiększono do 600 mg na dobę. Po 6 miesiącach leczenia nadal nie osiągnięto CCyR, a poziom transkrypty BCR-ABL1 w badaniu RQ-PCR wynosił 1,52%. Stężenie IM w surowicy krwi

wynoszące 1392 ng/ml sugerowało występowanie mechanizmu oporności niezależnego od sposobu przyjmowania leku [5].

Nieosiągnięcie CCyR było powodem odstawienia IM i zastosowania dazatynibu, w zalecanej wówczas do leczenia CP dawce 140 mg na dobę. Po miesiącu terapii ilość transkryptu w badaniu RQ-PCR zmniejszyła się do 0,32%, co zwykle może odpowiadać osiągnięciu CCyR [6]. Po 2 miesiącach dalszego leczenia, zgodnie z zaleceniem rejestracyjnym, zmniejszono dawkę dazatynibu do 100 mg na dobę i kontynuowano terapię przez kolejne 6 miesięcy. Ponieważ nie uzyskano dalszej redukcji ilości transkryptu BCR-ABL1, a tym samym większej odpowiedzi molekularnej (MMoIR, *major molecular response*), zdecydowano o badaniu w kierunku mutacji genu *ABL1*. Metodą bezpośredniego sekwencjonowania wykryto mutację kinazy ABL1 o typie L384M. Zdecydowano wówczas o odstawieniu dazatynibu i zastosowaniu nilotynibu. Leczenie dawką 2 × 400 mg na dobę prowadzono przez kolejnych 7 miesięcy, monitorując odpowiedź molekularną za pomocą badania RQ-PCR, wykonywanego w odstępach miesięcznych. W kolejnych analizach odnotowano wzrost ilości transkryptu BCR-ABL1 o 1 log (do 2%), co mogło odpowiadać utracie CCyR. Zdecydowano o ponownym zastosowaniu dazatynibu, jednak w zwiększonej dawce (140 mg/d.). W kolejnych badaniach RQ-PCR stwierdzono spadek poziomu transkryptu BCR-ABL1 do 0,66% po 3 miesiącach, a następnie do 0,32% po 6 miesiącach terapii.

Dyskusja

Występowanie mutacji kinazy ABL1 u chorych z CML podczas terapii TKI stanowi jeden z istotnych mechanizmów oporności na leczenie [7]. Uzyskanie odpowiedzi suboptymalnej, brak odpowiedzi na leczenie lub jej utrata są wskazaniem do badania ich obecności. W opisanym przypadku u chorego po niepowodzeniu terapii za pomocą IM w dawce 400 mg i 600 mg na dobę oraz po wykluczeniu niskiego stężenia leku w surowicy, jako przyczyny oporności, zastosowano dazatynib. Odpowiedź na leczenie monitorowano, mierząc poziom transkryptu BCR-ABL1 metodą RQ-PCR [6]. Niezmiernie się poziomu transkryptu BCR-ABL1 i nieuzyskanie MMoIR były powodami przeprowadzenia sekwencjonowania, w którym wykryto obecność mutacji L384M, umiejscowionej w pętli A.

Wrażliwość komórek białaczkowych na TKI określa się w badaniach *in vitro* hodowli komórkowych linii Ba/F3, transfekowanej poszczególnymi typami mutacji i wyraża się jako wartość IC₅₀, od-

powiadającą stężeniu leku wywołującemu 50-procentowe zahamowanie wzrostu hodowli komórek badanej linii [3]. W dostępnym piśmiennictwie wrażliwość komórek z tą mutacją określano na dużą dla bosutynibu, nieco mniejszą dla IM i średnią dla nilotynibu i dazatynibu [7]. Na podstawie powyższej analizy, zważywszy na brak możliwości zastosowania bosutynibu i biorąc pod uwagę dotychczasową odpowiedź na IM i dazatynib w dawce 100 mg na dobę, zdecydowano o zmianie leczenia na nilotynib.

Brak skuteczności tej terapii wyrażający się wzrostem poziomu transkryptu, który mógł odpowiadać za utratę CCyR, stał się powodem ponownej analizy danych dotyczących wrażliwości komórek z mutacją L384M na poszczególne TKI. Uwzględnienie w ocenie wrażliwości komórek maksymalnych stężeń uzyskiwanych przez TKI w surowicy krwi (C_{max}), w odniesieniu do wartości IC₅₀ [8, 9], spowodowało wytypowanie dazatynibu w dawce 140 mg na dobę jako potencjalnie najbardziej skutecznego leku w przełamaniu oporności związanej z wystąpieniem mutacji L384M. Zastosowanie u chorego dazatynibu w tej dawce spowodowało spadek poziomu transkryptu BCR-ABL1. Należy zaznaczyć, że rezultat oceny wrażliwości komórek z mutacją L384M, uwzględniającej — jak proponują Laneuville i wsp. [10] — współczynnik określony z ilorazu C_{max}/GI₅₀ (GI, *growth inhibition*) i normalizację otrzymanej aktywności TKI względem aktywności IM wobec genu dzikiego, jest odmienny, zatem, teoretycznie, najbardziej aktywnym lekiem w odniesieniu do komórek z mutacją L384M staje się nilotynib.

Brak spójności wyników powyższej analizy *in vitro* z efektami leczenia, między innymi u opisanego chorego, ujawnia ograniczoną przydatność proponowanej metody w zwiększeniu poprawności interpretacji danych pochodzących z analiz opartych na IC₅₀. Obrazuje to także przykład mutacji E255V i Y253F. Osiągane przez nilotynib C_{max} w surowicy krwi znacznie przekracza przypisaną im wartość IC₅₀. Mutacje te — zgodnie z wyżej opisanym sposobem oceny — uznano za odpowiednio, średnio i bardzo wrażliwe [10], natomiast z badań klinicznych znany jest fakt ich oporności na leczenie nilotynibem [8].

Stężenie leku osiągnięte w surowicy krwi może być natomiast czynnikiem wykluczającym go jako mało skuteczny. Jeśli stężenie danego TKI w surowicy krwi nie osiąga wartości IC₅₀, określonej dla danej mutacji, wówczas jego podanie najpewniej nie będzie skutkowało przełamaniem oporności choroby związanej z tą mutacją. Jeśli natomiast dla danego TKI wartość C_{max} przekracza wartość IC₅₀ wobec konkretnej mutacji, wówczas twierdzenie, że lek będzie ak-

tywny, może być obarczone dużym błędem [11]. Przyczyną mogą być czynniki wpływające na stężenie leku w surowicy powodujące, że nie koresponduje ono w pełni ze stężeniem leku wewnątrz komórek. Ponadto, dodatkowe defekty genetyczne w komórkach Ph(+) mogą wpływać na rodzaj ostatecznej odpowiedzi na leczenie.

Można zatem przyjąć, że tabele przedstawiające wrażliwość poszczególnych mutacji ABL1 na TKI dostarczają jedynie informacji o tym, o ile słabszy będzie wpływ danego inhibitora na komórki obciążone konkretną mutacją ABL1, w porównaniu z komórkami niezmutowanymi [11]. Wykorzystanie tej informacji i porównanie indeksu oporności danej mutacji dla poszczególnych TKI może, mimo opisanych wyżej ograniczeń, dostarczyć danych ułatwiających wybór potencjalnie najbardziej skutecznego klinicznie leku. Taką możliwość potwierdziły niedawno opublikowane wyniki badania klinicznego [3].

Piśmiennictwo

1. Roche-Lestienne C., Soenen-Cornu V., Grardel-Duflos N. i wsp. Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to ST157, and they can pre-exist to the onset of treatment. *Blood* 2002; 100: 1014–1018.
2. Ernst T., Erben P., Muller M.C. i wsp. Dynamics of BCR-ABL mutated clones prior to hematologic or cytogenetic resistance to imatinib. *Haematologica* 2008; 93: 186–192.
3. Jabbour E., Jones D., Kantarjian H.M. i wsp. Long-term outcome of patients with chronic myeloid leukemia treated with second-generation tyrosine kinase inhibitors after imatinib failure is predicted by the in vitro sensitivity of BCR-ABL kinase domain mutations. *Blood* 2009; 114: 2037–2043.
4. Baccarani M., Cortes J., Pane F. i wsp. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 6041–6051.
5. Larson R.A., Druker B.J., Guilhot F. i wsp. Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. *Blood* 2008; 111: 4022–4028.
6. Branford S., Cross N.C.P., Hochhaus A. i wsp. Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting *BCR-ABL* transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* 2006; 20: 1925–1930.
7. Redaelli S., Piazza R., Rostagno R. i wsp. Activity of bosutinib, dasatinib, and nilotinib against 18 imatinib-resistant BCR/ABL mutants. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 469–471.
8. Deininger M.W. Nilotinib. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14: 4027–4031.
9. Nicaise C., Wang X., Roy A. i wsp. Dasatinib pharmacokinetics and exposure-response (E-R): relationship to efficacy and safety in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase (CML-CP). *Haematologica* 2008; 93: (abstrakt 0559).
10. Laneuville P., DiLea C., Yin O.Q.P. i wsp. Comparative in vitro cellular data alone are insufficient to predict clinical responses and guide the choice of BCR-ABL inhibitor for treating imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28: 169–171.
11. Gambacorti-Passerini C., Piazza R., Perini P., Rostagno R., Redaelli S. Reply to P. Laneuville i wsp. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28: 172.