

NOVI PRISTOPI K ZDRAVLJENJU AKUTNE LIMFOBLASTNE LEVKEMIJE PRI OTROCIH NEW APPROACHES IN PEDIATRIC ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA TREATMENT

AVTOR / AUTHOR:

Doc. dr. Nataša Karas Kuželički, mag. farm.

*Katedra za klinično biokemijo, Fakulteta za farmacijo,
Univerza v Ljubljani, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: natasa.karas@ffa.uni-lj.si

POVZETEK

Akutna limfoblastna levkemija (ALL) je najpogostejši rak otrok starih od 1 do 10 let. Predvsem zaradi uporabe visoko standardiziranih randomiziranih protokolov zdravljenja se je preživetje pediatričnih bolnikov z ALL v zadnji 50 letih izredno povečalo. Kljub temu pa 10-20% bolnikov z rezistentno obliko bolezni doživi relaps in večina teh tudi umre. Preživetje dojenčkov in odraslih z ALL pa je še slabše. Ker s stopnjevanjem agresivnosti obstoječih protokolov ni več možno izboljšati stopnje ozdravljivosti, kljub povečanju pojavnosti neželenih učinkov, je potrebno pri bolnikih z rezistentno ALL uporabiti nove terapijske pristope. Dosedanje klinične študije kažejo, da so najbolj obetavna zdravila, ki delujejo na genetskem in epigenetskem nivoju ter terapija s celicami, ki izražajo himerne antigenske receptorje (CAR), usmerjene izključno proti rakavim celicam. Uporaba omenjenih novih terapij pa bo vsaj še nekaj let ali desetletij omejena na bolnike z rezistentno oz. relapsirano obliko bolezni, predvsem zaradi še nejasnega varnostnega profila.

KLJUČNE BESEDE:

akutna limfoblastna levkemija, randomizirani protokoli zdravljenja, novi terapevtski pristopi

POVZETEK

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common cancer in 1 to 10 years old children. The survival rate of pediatric ALL patients has increased over last 50 years due to the application of highly standardized randomization treatment protocols. However, 10-20% of ALL patients will relapse and die in five year period after therapy completion. The survival rate of infants and adults with ALL is even worse. Increasing the cumulative doses of current protocols did not result in the improved survival rate, despite the higher incidence of toxic effects. Therefore, new therapeutic strategies are needed to improve the ALL therapy efficiency. The most promise hold the genetic and epigenetic drugs, as well as therapy with cells expressing chimeric antigen receptors (CAR), directed specifically towards cancer cells. Due to the unclear safety profile of the abovementioned therapeutics, these new approach-

hes will be at first focused only on patients with resistant ALL.

KEYWORDS:

acute lymphoblastic leukemia, randomized treatment protocols, new therapeutic approaches

Levkemija je rak krvnih celic in kostnega mozga. Na svetu odkrijejo letno okrog 350 000 novih primerov različnih tipov levkemij. Gre za heterogeno skupino bolezni, ki jo delimo glede na to katera vrsta celic je prizadeta (mieloidne ali limfoblastne) ter glede na hitrost napredovanja bolezni (akutne ali kronične). Akutna limfoblastna levkemija (ALL) predstavlja 13% primerov levkemij (1). Gre za maligno transformacijo progenitorskih B ali T limfocitnih celic, kar vodi v pretirano proliferacijo in posledično kopičenje malignih celic v kostnem mozgu. Zato pride do zavore normalne hematopoeze, kar pri bolniku povzroči anemijo, nagnjenost h krvavitvam ter zmanjšani imunski odziv (2). Bolezen se lahko pojavi v kateremkoli življenjskem obdobju, vendar je najbolj pogosta pri otrocih starih od 2 do 5 let, ter z incidenco 1: 2 000 predstavlja najpogostejši rak v otroški dobi (3). Drugi vrh pojavnosti ALL je pri starostnikih po 60 letu, vendar imajo ti bolniki veliko slabši izid bolezni kot pediatrični bolniki (1).

Etiologija bolezni je nejasna, vendar najnovejše raziskave kažejo, da vključuje *in utero* iniciacijo ter post-natalno promocijo. Oba procesa lahko sprožijo okoljski (ionizirajoče in ne-ionizirajoče sevanje ter infekcije) ali genetski (mutacije v različnih genih kot so IKZF1, ARID5B, CEBPE, CDKN2A, PAX5, JAK1 in 2, CRLF2, CREBBP,...) dejavniki (3). Do nastanka bolezni pride zaradi neprimerne imunskega odziva na banalne infekcije pri posameznikih z genetsko nagnjenostjo, pri katerih je prisoten *in utero* nastali pre-levkemični klon (3). Genetske spremembe pri ALL pa imajo tudi velik diagnostični in prognostični pomen, na osnovi katerega se odločimo za način zdravljenja. Najbolj pogoste kromosomske spremembe vključujejo hiperploidnost in ETV6-RUNX1 translokacijo, ki sta povezani z dobrim izidom, ter hipoploidnost, BCR-ABL1 translokacijo in preureditve MLL z različnimi geni, ki so povezane s slabim izidom bolezni. MLL preureditve so značilne za ALL v dojenčkovem obdobju, ki ima zelo slab izid (3).

Na preživetje bolnikov z ALL vpliva veliko dejavnikov, kot so starost in število levkocitov v periferni krvi ob diagnozi, spol, imuno-fenotip ter odziv na indukcijsko zdravljenje.

Preživetje se pri otrocih z ALL giblje okrog 90%, pri dojenčkih (starost < 1 leto) okrog 50%, pri odraslih bolnikih pa med 20 in 30% (4). Dodatni dejavniki, ki napovedujejo slab izid bolezni so: visoko število levkocitov ob diagnozi, moški spol, T-celična levkemija ter slabši odziv na indukcijsko zdravljenje (3).

1 KLASIČNI NAČINI ZDRAVLJENJA AKUTNE LIMFOBLASTNE LEVKEMIJE

Zdravljenje ALL, ki pri otrocih vključuje souporabo velikega števila zdravil, po navadi traja 2-3 leta in ima 4 faze: indukcijsko, konsolidacijsko, reindukcijsko in vzdrževalno. V različnih delih sveta se uporabljajo različni protokoli zdravljenja, ki pa so si v osnovi podobni. Gre za randomizirane protokole, katerih uspešnost in varnost se ocenjuje vsakih 5 let. Protokol za novo obdobje se potem oblikuje glede na rezultate predhodnega protokola. Zaradi tovrstnega pristopa velja zdravljenje ALL pri otrocih za enega izmed največjih uspehov medicine, saj se stopnja preživetja iz 5% v 50-ih letih prejšnjega stoletja danes povzpela na skoraj 90% (4).

V indukcijski fazi z uporabo glukokortikoidov (prednizon ali deksametazon), vinkristina, citarabina (ARA-C), antraciklinov, ciklofosfamida in asparaginaze poskušamo uničiti čim več levkemičnih celic ter vzpostaviti normalno hematopoezo (3, 5). Sledi konsolidacijska terapija, ki uniči preostale maligne celice, vključuje pa metoreksat (MTX) v visokih odmerkih in 6-merkaptopurin (6-MP), z ali brez pulzov vinkristina in glukokortikoidov (3). V reindukcijski fazi apliciramo enaka zdravila kot med indukcijo, vendar z dodatkom visokih ali srednjih doz MTX (5). Vzdrževalna faza je najdaljša (traja 2 ali več let) ter vključuje dnevne per os aplikacije 6-MP ter tedenske aplikacije MTX v nizkih odmerkih (3, 5). Za uspešnost terapije je zelo pomembno, da preprečimo preživetje levkemičnih celic v centralnem živčnem sistemu, ki bi lahko pozneje povzročile ponovitev bolezni. To dosežemo z obsevanjem centralnega živčnega sistema (CŽS) (12-18 Gy), vendar so zaradi resnih dolgoročnih neželenih učinkov v večini novejših protokolov le-to omejili na bolnike z zelo tveganimi oblikami ALL, pri ostalih bolnikih pa so ga nadomestili z intratekalnimi aplikacijami MTX (3, 6).

V primerjavi z otroci imajo odrasli bolniki z ALL veliko nižjo stopnjo preživetja. Nedavne raziskave kažejo, da imajo



odrasli, ki so bili zdravljeni po protokolih za otroke veliko večjo stopnjo ozdravitve kot tisti zdravljeni s protokoli za odrasle. Iz tega lahko sklepamo, da je glavni vzrok za slabši izid odraslih bolnikov razlika v protokolih zdravljenja, ne pa toliko v naravi bolezni med odraslimi in otroci. V primerjavi s protokoli za odrasle imajo pediatrični protokoli bolj intenzivno reindukcijsko fazo, višje kumulativne doze citostatikov ter daljšo vzdrževalno fazo (7).

2 PRESADITEV KOSTNEGA MOZGA ALI MATIČNIH CELIC IZ POPKOVNE KRVI

Za bolnike z zelo tvegano ali na citostatike neobčutljivo obliko bolezni, je najbolj primerna alogena transplantacija kostnega mozga. Na žalost pa pri dveh tretjinah bolnikov ne najdemo ustreznega sorodnega darovalca, iskanje nesorodnega pa lahko traja predolgo (3, 8).

Presaditev matičnih celic iz popkovne krvi lahko predvsem pri otrocih predstavlja učinkovito alternativo presaditvi kostnega mozga. Glavna prednost celic iz popkovne krvi je, da zaradi njihove nezrelosti, ni potrebno popolno ujemanje med darovalcem in prejemnikom. Novejše raziskave kažejo, da je manjše neujemanje lahko celo koristno, saj včasih presajene celice napadejo in uničijo maligne celice prejemnika (»graft-versus-leukemia« efekt). Presajanje lastnih celic iz popkovne krvi je vprašljivo, saj je pri večini otrok z ALL pre-levkemični klon prisoten že *in utero*. Glavna slabost popkovnih celic je, da v primerjavi z zrejšimi celicami kostnega mozga potrebujejo več časa za naselitev v kostni mozeg, kar podaljša čas ko je bolnik zelo dovzeten za infekcije. Tako imajo bolniki, ki so jim presadili celice iz popkovne krvi 2-3 krat večje tveganje, da bodo umrli zaradi infekcije kot tisti, ki so jim presadili kostni mozeg. Poleg tega popkovna kri vsebuje majhno število matičnih celic, zato celice enega darovalca zadostujejo kvečjemu za zdravljenje otroka (8). Pri odraslih od leta 2001 poskušajo s kombiniranjem popkovnih celic dveh nesorodnih darovalcev. Analiza 128 bolnikov, ki so jim presadili celice dveh različnih darovalcev kaže, da imajo manjšo pojavnost ponovitev bolezni in zavrnitvenih reakcij, ter podobno stopnjo preživetja kot bolniki s transplantiranim kostnim mozgom (9).

3 NOVE TERAPIJE AKUTNE LIMFOBLASTNE LEVKEMIJE

Kljub neverjetnemu napredku v terapiji ALL, imajo nekateri tipi te bolezni še vedno zelo slabo prognozo (npr. ALL dojenčkov z MLL translokacijami in BCR-ABL ALL). Čeprav kar 99% otrok z ALL doseže remisijo bolezni po indukcijskem zdravljenju, pa jih je trajno ozdravljenih le 70-80% (4). Nadaljnje povečanje intenzitete obstoječih protokolov zdravljenja verjetno ne bo izboljšalo njihove učinkovitosti, ampak bo povečalo pojavnost nevarnih kratkoročnih in dolgoročnih neželenih učinkov, kot se je izkazalo na primeru protokola BFM IC 2002, ki vključuje povečano kumulativno dozo deksametazona. Kljub večji agresivnosti kemoterapije, BFM IC 2002 ni znižal pojavnosti relapsov v primerjavi s predhodnim protokolom, povečalo pa se je število neželenih učinkov, ki vplivajo na preživetje (zavora kostnega mozga, sepsa) in kvaliteto življenja (osteonekroza kolka) bolnikov (osebna korespondenca prof. dr. Janez Jazbec, Oddelek za onkologijo in hematologijo, Pediatrična klinika Ljubljana). Zato so potrebna nova zdravila in dostavni sistemi učinkovin ter novi pristopi k zdravljenju ALL. Trenutno potekajo raziskave na sledečih področjih:

- Novi dostavni sistemi obstoječih učinkovin
- Novi antimetaboliti
- Novi nukleozidni analogi
- Monoklonska protitelesa proti ALL površinskim antigenom
- Učinkovine katerih tarča so genetske spremembe v levkemičnih celicah
- Učinkovine, ki delujejo na epigenetskem nivoju
- Terapija CAR (chimeric antigen receptor)

3.1 NOVI DOSTAVNI SISTEMI OBSTOJEČIH ZDRAVIL

Z vključevanjem standardnih kemoterapevtikov v liposome lahko izboljšamo njihov terapevtski indeks. Trenutno se v različnih fazah testiranja nahaja več zdravil.

Najbolj obetavna je **PEG-asparaginaza**, ki nastane s kovalentno vezavo *E.coli* asparaginaze na monometoksi polietilenglikol. V primerjavi z nativnim encimom je za PEG-asparaginazo značilna manjša alergičnost ter petkrat daljši razpolovni čas, kar omogoča manj pogosto aplikacijo zdravila. V Sloveniji se PEG-asparaginaza trenutno uporablja le pri bolnikih z alergijo na nativni *E.coli* encim, v ZDA pa je

FDA odobrila njeno uporabo pri vseh na novo diagnosticiranih bolnikih z ALL. V redkih primerih alergije na PEG-asparaginazo uporabimo nativno *Erwinia* asparaginazo, ki pa je veliko manj učinkovita kot *E.coli* encim (2, 5).

Liposomalni citarabin se je izkazal za učinkovitega predvsem pri zdravljenju neoplastičnega meningitisa pri otrocih z različnimi vrstami raka (2). V različnih fazah kliničnih študij se nahajajo tudi **liposomalni antraciklini in vinkristin**, vendar so tu rezultati nekoliko manj obetavni (2).

Zanimivi so tudi **dostavni sistemi klasičnih citostatikov z nanodelci**, ki pa večinoma še niso bili testirani na ljudeh. Nedavno so razvili mezoporozne silikatne nanodelce z amino in tiolnimi skupinami, na katere so vezali MTX in 6-MP, ki se skupaj uporabljata pri vzdrževalni terapiji ALL. Največja prednost opisanega sistema je, da prepreči razgradnjo MTX in 6-MP preden zdravili dosežeta terapevtsko mesto, kar močno poveča biološko uporabnost obeh učinkovin in omogoča manj pogosto administracijo citostatikov. Omenjeni učinek nastane zaradi lastnosti disulfidne in amidne vezi, ki se zaradi razlik v ekstra in intracelularnem GSH in pH, cepita le znotraj celic. Omenjeni nanodelci so v študiji na podganah dali obetajoče rezultate (10).

3.2 NOVI ANTIMETABOLITI

Metotreksat, ki je inhibitor dihidrofolat reduktaze (DHFR), se uporablja v terapiji že več desetletij. Zaradi relativno ugodnega varnostnega profila ima centralno vlogo v terapiji ALL. Novejši antimetaboliti imajo boljšo sposobnost transporta v celico ter izboljšan poliglutamacijski profil, kar preprečuje njihov izstop iz celic. Večino so preučevali v povezavi s solidnimi tumorji, **talotreksin** (inhibitor multiplih tarč) in **pemetreksed** (inhibitor sinteze purinov) pa sta v fazi kliničnega testiranja pri bolnikih z relapsom ALL (2).

3.3 NOVI NUKLEOZIDNI ANALOGI

Ozko terapevtsko območje dveh adenozijskih analogov kladribina in fludarabina je močno omejilo njuno uporabnost. Predvsem zaradi problemov z nevrotoksičnostjo so razvili nove nukleozidne analoge **klofarabin, nelarabin in forodezin**.

Klofarabin je strukturno podoben kladribinu, vendar ima zaradi modifikacij osnovne molekule večjo biološko uporabnost. Poleg tega pa je iz njegove strukture onemogočeno sproščanje halogeniranega adenina, ki je odgovoren za nastanek nevrotoksičnosti pri kladribinu. Klofarabin se

je izkazal za učinkovitega in varnega tako pri odraslih kot otrocih z relapsirano ALL: popolno remisijo je doseglo 15-17% odraslih ter 20-24% pediatričnih bolnikov, nihče izmed bolnikov pa ni razvil nevrotoksičnosti. Na osnovi tega je bil klofarabin odobren po pospešenem postopku v ZDA in Evropi za zdravljenje relapsirane ALL pri pediatričnih bolnikih (2).

Nelarabin se je izkazal za učinkovitega predvsem pri zdravljenju neodzivne ali relapsirane T-celične ALL, za kar je tudi prejel odobritev leta 2005 tako v ZDA kot v Evropi, čeprav se je v visokih odmerkih izkazal za nevrotoksičnega (2).

Forodezin izkazuje selektivno toksičnost do T-limfocitov in je trenutno v klinični fazi testiranja za T-ALL (11). Preliminarni rezultati kažejo, da ima podobno delovanje kot nelarabin, vendar je manj nevrotoksičen (2).

Mehanizmi delovanja klasičnih načinov zdravljenja ALL ter novih antimetabolitov in nukleozidnih analogov so prikazani na Sliki 1.

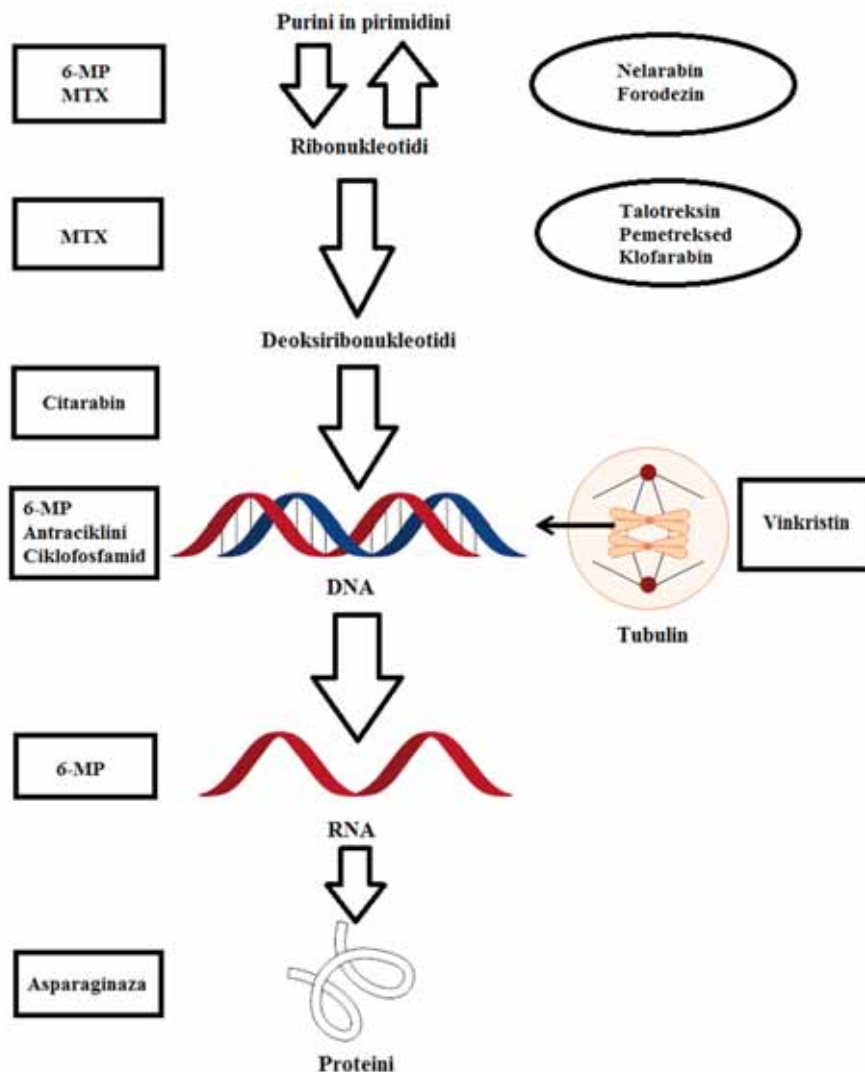
3.4 MONOKLONSKA PROTITELESA PROTI POVRŠINSKIM ANTIGENOM

Površinski antigeni, ki ji izražajo posamezne vrste levkemičnih celic, so se izkazali za dobre tarče za terapijo z monoklonskimi protitelesi (mPt), ki so lahko prosta ali pa konjugirana s citostatiki oz. radioaktivnimi molekulami. Bispesifična mPt omogočajo terapijo z antigen specifičnimi citotoksičnimi T-limfociti, kar predstavlja nadgradnjo klasične terapije z mPt. Glavna omejitev mPt je, da se tarčni površinski antigeni izražajo tudi v normalnih celicah, kar zmanjšuje njihovo terapevtsko specifičnost (2).

Rituksimab je humanizirano anti-CD20 protitelo, ki je tudi prvo mPt, ki je bilo odobreno za terapevtsko uporabo. CD20 izražajo skoraj vse normalne in rakave B-celice ter 40-50% B-ALL blastov. Najbolj pogosto se uporablja pri zdravljenju B-celičnega ne-Hodgkinovega limfoma (NHL) pri odraslih in otrocih. Ker pa CD20 nima prognostične vrednosti pri ALL, je njegova uporaba na tem področju omejena na relapsirano B-ALL (2, 12).

Epratuzumab je humanizirano mPt proti CD22, ki se izraža pri > 95% primerov B-ALL pri otrocih. Rezultati preliminarnih študij na mlajših odraslih in pediatričnih bolnikih z zgodnjim relapsom ALL so bili obetavni (12). Obstajajo tudi konjugirane oblike epratuzumaba: **Inotuzumab ozogami-**





Slika 1: Konvencionalna zdravila za zdravljenje ALL in njihove novejšje oblike delujejo v vseh fazah celičnega cikla. Presnovki 6-MP inhibirajo de novo sintezo purinov ali sprožijo apoptozo z vgrajevanjem v DNA in RNA. MTX, talotreksin in pemetreksed inhibirajo različne encime folatnega cikla, kar vodi v pomanjkanje tetrahidrofolata in posledično zmanjšano sintezo purinov in s tem tudi DNA. Klofarabin inhibira ribonukleotidno reduktazo, nelarabin in forodezin pa purinsko nukleozidno fosforilazo, kar vodi v moteno presnovo nukleotidov. Citarabin prekine podaljševanje DNA verige z vgrajevanjem v DNA in inhibicijo DNA polimeraze. Antraciklini se vežejo na topoizomerozo II in preprečujejo njeno odcepitev od DNA, kar vodi v prelome dvojne vijačnice. Ciklofosamid povzroči fragmentacijo DNA s premreženjem znotraj in med verigami DNA. Asparaginaza povzroči pomanjkanje asparagina v levkemičnih celicah, kar moti sintezo proteinov. Vinkristin inhibira mitozo z vezavo na tubulin (2).

Figure 1: Conventional drugs used in ALL therapy and their novel modifications act in all phases of cell cycle. Metabolites of 6-MP inhibit de novo purine synthesis or induce apoptosis due to the incorporation into DNA and RNA. MTX, talotrexin and pemetrexed inhibit several enzymes of the folate cycle, which leads to the tetrahydrofolate depletion and decreased purine and DNA synthesis. Clofarabine inhibits ribonucleotide reductase and nelarabine and forodesine purine nucleoside phosphorilase, thus disturbing nucleotide metabolism. Cytarabine inhibits DNA polymerase and incorporates into DNA, thus terminating strand elongation. Anthracyclines bind to topoisomerase II, leading to double-stranded DNA breaks. Cyclophosphamide cross-links with DNA and thereby induces DNA fragmentation. Asparaginase deprives leukemic cells of asparagine, thus disrupting protein synthesis. Vincristine inhibits mitosis by binding to tubulin (2).

cin, kjer je na mPt vezan citotoksični antibiotik kalikeamcin, ter **CAT-3888** in **moksetumomab pasudotox**, ki sta konjugata z eksotoksični *Pseudomonasa*. **Radioaktivni konjugat epratuzumaba z itrijem 90**, so študirali pri odraslih bolnikih z relapsom ALL, medtem ko se pri otrocih uporablja le za pripravo na transplantacijo kostnega mozga (12). **Alemtuzumab** je humanizirano mPt proti CD52, ki je bolj učinkovit pri medularni kot ekstramedularni ALL (2).

Anti CD19 mPt so se izkazala za neučinkovita, kljub temu, da se izražajo skoraj pri vseh bolnikih z B-ALL. Boljše rezultate dosega anti-CD19 konjugat z močnim inhibitorjem tubulina DM4 (**SAR3419**), ki je dal obetavne rezultate v predkliničnih študijah (12). **Blinatumomab** je novo bi-specifično protitelo, ki se veže tako na CD19, ki ga izražajo tumorske celice, kot na CD3, ki ga izražajo T-limfociti. Na ta način usmerimo citotoksične T-limfocite k uničevanju levkemičnih blastnih celic (12). Prvi rezultati multicentrične študije na odraslih bolnikih z relapsom ALL in v manjši skupini pediatričnih bolnikov z ALL so zelo obetavni (13, 14), zato bodo zdravilo testirali tudi na večji skupini otrok z neodzivno ali relapsirano obliko bolezni (NCT 01471782) (12).

3.5 UČINKOVINE KATERIH TARČA SO GENETSKE SPREMEMBE V LEVKEMIČNIH CELICAH

Večina zgoraj opisanih terapevtskih pristopov pa je omejena z večjo ali manjšo stopnjo nespecifičnosti, kar pomeni, da terapija poleg malignih uniči tudi določeno število zdravih celic, to pa posledično vodi v pojav neželenih učinkov zdravila. Z napredkom znanja na področju genomike, transkriptomike in proteomike je prišlo do razvoja bolj specifično delujočih zdravil, katerih delovanje je usmerjeno na genetske in druge spremembe, ki so prisotne izključno v rakavih celicah. Na ta način se je zelo izboljšala varnost in učinkovitost terapije, vendar pa pri tej skupini zdravil glavni izziv predstavlja rezistenca nekaterih tipov levkemij oz. subpopulacij malignih celic na omenjeno terapijo. V nadaljevanju je opisanih nekaj najbolj obetavnih predstavnikov omenjene skupine zdravil.

Imatinib je bil prvo zdravilo s specifičnim delovanjem na malignim celicam lastno spremembo. Je inhibitor tirozinske kinaze BCR-ABL, ki je prisotna samo v maligno spremenjenih celicah. Nastane s kromosomsko translokacijo med kromosomoma 9 in 22, kar vodi v nastanek fuzijskega gena *BCR-ABL*. Le-ta kodira encim, ki promovira celično signalizacijo in rast. Imatinib se uporablja predvsem v te-

rapiji CML, učinkovit pa je tudi pri BCR-ABL pozitivni ALL, T-ALL z NUP214-ABL1 translokacijo ter ALL z ekstrakromosomsko amplifikacijo *ABL1* (2, 15). Glavni problem pri terapiji z imatinibom predstavlja nastanek rezistence pri eni tretjini bolnikov s CML (15). Do rezistence pride v večini primerov zaradi točkovnih mutacij (npr. T315I) v kinazni domeni *ABL*, kar preprečuje vezavo imatiniba na proteinski produkt BCR-ABL. Omenjene mutacije so velikokrat prisotne v subpopulacijah blastnih celic že pred začetkom terapije (16). Ker je pri akutnih levkemijah (ALL in AML) hitrost nastanka mutacij v blastnih celicah veliko večja v primerjavi s CML, je problem rezistence na imatinib pri ALL bolnikih še večji (15). Zato pri bolnikih z ALL imatinib ponavadi uporabljamo v kombinaciji z drugimi citostatiki, razvili pa so že celo vrsto **inhibitorjev tirozinske kinaze druge generacije**, ki učinkujejo tudi na imatinib rezistene celice (2). Eno izmed najbolj obetavnih inhibitorjev druge generacije je **ponatinib**, ki je bil konec leta 2012 odobren s strani FDA za zdravljenje CML in ALL. Le-ta deluje na celice z *BCR-ABL* mutacijo T315I, ki predstavlja 20% mutacij odgovornih za rezistenca na imatinib (15). V oktobru 2013 je FDA začasno ustavila prodajo omenjenega zdravila zaradi povečanega tveganja za nastanek življenja ogrožajočih krvnih strdkov (17).

Uspeh imatiniba je spodbudil razvoj inhibitorjev drugih tirozinskih kinaz. Najbolj obetavne rezultate dajejo **inhibitorji FLT3 (Fms-like tyrosine kinase-3)**, ki so najbolj učinkoviti proti AML, pa tudi proti ALL z MLL translokacijo (ALL dojenčkov), KIT(CD117) pozitivni ALL ter hiperploidni ALL (2). Aktivirajoče mutacije *FLT3* spodbujajo proliferacijo in preživetje malignih celic in so prisotne pri 25% bolnikov z AML (2, 15). Do sedaj najbolj uspešen predstavnik te skupine zdravil je **kvizartinib**, ki se nahaja v fazi II kliničnega testiranja (15). Tudi v tej skupini zdravil obstaja problem rezistence, ki pa ga rešujejo s kombinirano terapijo s klasičnimi citostatiki. Nedavna identifikacija mutacijskega repertoarja FLT3 pa omogoča sintezo mutacijsko specifičnih inhibitorjev FLT3 (18).

V različnih fazah testiranja za terapijo ALL pa so tudi sledeče skupine zdravil, ki pa za enkrat kažejo manj obetavne rezultate: **inhibitorji mTOR** (rapamicin, temsirolimus, everolimus), **inhibitorji γ -sekretaze**, **inhibitorji CDK** (flavopiridol), **anti-BCL2 terapija** (oblimersen) in **antagonisti HSP90** (geldanamycin, 17-AAG) (2).



3.6 UČINKOVINE, KI DELUJEJO NA EPIGENETSKEM NIVOJU

Kljub relativni uspešnosti citostatikov usmerjenih na genetske tarče, pa se v zadnjih letih vedno bolj raziskujejo tudi epigenetski mehanizmi onkogeneze in z njimi povezane epigenetske tarče, ki so lahko osnova za učinkovito terapijo ALL in drugih vrst raka. Epigenetske modifikacije DNA (metilacija) in histonov (deacetilacija, metilacija, ...) lahko z utišanjem ali ojačenjem izražanja določenih genov pomembno prispevajo k procesu onkogeneze (19). Ker so omenjene epigenetske modifikacije reverzibilne, so molekule z vplivom na njihovo dodajanje in odstranjevanje potencialna zdravila proti raku. Prva tovrstna zdravila predstavljajo **inhibitorji DNA metiltransferaz (5-azacitidin in decitabin)** ter **inhibitorji histonskih deacetilaz (butirat in njegovi derivati, depsiptid, valprojska kislina in vorinostat)** (2). Kljub prvotnemu navdušenju, pa se je izkazalo, da omenjene skupine učinkovin sicer dobro delujejo na celičnih in živalskih modelih, so pa manj učinkovite pri zdravljenju bolnikov z levkemijo. Dodatni problem pa je predstavljala določena stopnja nespecifičnosti teh zdravil, kar je imelo za posledico pojav neželenih učinkov (15).

Zaradi navedenih omejitev, so se raziskovalci usmerili v razvoj zdravil, katerih tarče so molekule z vplivom na epigenetske modifikacije, ki pa se nahajajo izključno v maligno transformiranih celicah. Gre za proteinske produkte spremenjenih genov, bodisi zaradi točkovnih mutacij, bodisi zaradi translokacij in drugih kromosomskih preureditev. Prvo učinkovito in specifično epigenetsko zdravilo za ALL, ki se trenutno nahaja v fazi I testiranja, je **inhibitor DOT1L (EPZ5676)**. DOT1L je histonska H3 metiltransferaza, ki metilira le histone, ki se nahajajo v nukleosomih. Pretirana aktivnost DOT1L vodi v aktivacijo normalno utišanih genov, kar lahko povzroči maligno transformacijo (19). Že leta 2005 so ugotovili, da spremenjen oz. mutiran MLL gen pospešuje metilacijo histonov s strani DOT1L. Translokacije, ki vključujejo MLL so pogoste pri različnih vrstah levkemij in so prisotne pri večini primerov ALL v dobi dojenčka. Fuzijski gen MLL-AF10 veže DOT1L (AF10 domena) in DNA (MLL domena) in tako omogoči povečano metilacijo histonov (20). Z inhibitorji DOT1L, ki se vežejo na MLL-AF10-DOT1L kompleks lahko preprečimo pretirano metilacijo histonov, hkrati pa delovanje zdravila omejimo le na celice s prisotno MLL-AF10 translokacijo (rakave celice) (21).

Primer inhibitorjev DOT1L kaže, da so epigenetska zdravila proti raku perspektivno raziskovalno področje, hkrati pa

nakazuje, da bodo za razvoj visoko učinkovitih in specifičnih citostatikov potrebne raziskave na večplastnih modelih z visoko stopnjo kompleksnosti.

3.7 TERAPIJA S CELICAMI, KI IZRAŽAJO HIMERNE ANTIGENSKRE RECEPTORJE

Eno izmed novejših in zelo obetavnih terapij ALL (in drugih hematoloških rakov) predstavlja terapija z gensko spremenjenimi T-limfociti, ki izražajo himerne antigenske receptorje (CART). CAR se lahko vežejo na širok spekter tumor-specifičnih antigenov, ki jih izražajo maligno spremenjene celice na svoji površini. Prednost CART pred drugimi vrstami celične terapije raka je, da se izognemo toleranci proti lastnim antigenom ter da vezava CAR na tumorske celice ne zahteva predstavitve tumorskih antigenov preko MHC molekul. Veliko rakavih celic namreč ne izraža MHC, s čemer se izogonej prepoznani in uničenju s strani imunskega sistema (22).

Prvo generacijo CAR predstavljajo molekule s tremi glavnimi domenami: (i) iz protitelesa izhajajoči fragment (scFv), ki prepozna in se veže na tumorski antigen (po navadi CD19), (ii) transmembranska domena in (iii) intracelularna z domena kompleksa T-celičnega receptorja (CD3z), ki prenaša signal s površine celice v jedro. Čeprav so bili CART prve generacije učinkoviti proti tumorskim celicam, pa je bila njihova življenjska doba *in vivo* zelo kratka, zaradi pomanjkanja različnih ko-stimulatornih signalov, ki zagotavljajo preživetje T-limfocitov *in vivo*. Uvedba ene ali dveh dodatnih intracelularnih ko-stimulatornih signalnih domen (CD28 in/ali 4-1BB) pri CART druge in tretje generacije je povečala preživetje in proliferacijo CART, prišlo pa je tudi do nastanka spominskih CART celic, kar zagotavlja trajno zaščito pred ekspanzijo malignih celic (22). Za vnos CAR genov v celice se uporabljajo različne metode. Tiste, ki temeljijo na ne-virusni transfekciji so dokaj neučinkovite, retrovirusni in lentivirusni vektorji pa so povezani z večjimi stroški proizvodnje (22).

Do sedaj je bilo zaključenih 14 kliničnih študij uporabe CART v terapiji hematoloških rakov. Večina uporabljenih CART je bila usmerjenih proti CD19, ki se izraža na B-celicah (tako zdravih kot maligno transformiranih). Večina bolnikov v omenjenih študijah je imela diagnozo CLL, ostali pa ALL ali različnih vrst limfomov. Presenetljivo so ugotovili, da je bila CART terapija najbolj učinkovita pri bolnikih z ALL, ki so imeli v povprečju 80% odzivnost na terapijo (22). Skupaj je bilo s CART metodo zdravljenih 8 bolnikov z rezii-

stentno oz. relapsirano ALL; od tega jih je ozdravljenih 6, pri dveh pa je prišlo do ponovnega relapsa bolezni, vendar tokrat maligni klon ni izražal CD19 (23). Pri nobenem izmed ALL bolnikov ni prišlo do smrti zaradi CART terapije (22). Zanimivo je, da so po terapiji CART zaznali tudi v cerebrospinalni tekočini pediatričnih ALL bolnikov (23), kar je izredno pomembno s stališča preprečevanja relapsa, saj je CŽS glavni rezervoar na klasično kemoterapijo rezistentnih malignih celic. Trenutno je v teku 11 kliničnih študij (večina v fazi I ali II) za uporabo CART za zdravljenje ALL (22). Omenjene študije potekajo na 7 različnih inštitucijah (5 v ZDA, ena v Veliki Britaniji in ena na Kitajskem) (22). 3 študije so usmerjene izključno na pediatrične ALL bolnike, pri čemer so vključeni le bolniki z rezistentno oz. relapsirano obliko bolezni. Pri pediatričnih bolnikih je obetavna tudi uporaba CART po alogeni transplantaciji kostnega mozga, v smislu preprečevanja relapsa (24).

Pri vseh bolnikih je CART terapija sprožila določeno stopnjo toksičnosti v obliki povišane telesne temperature, pri nekaterih pa je prišlo do reverzibilnih nevroloških motenj. Omenjeni simptomi so posledica t.i. citokinskega sindroma (CS), katerega intenziteta korelira s količino tumorskih celic pred začetkom zdravljenja. Neželeni učinki nastanejo zaradi masivnega sproščanja citokinov (predvsem IL-6) s strani umirajočih tumorskih in normalnih B-celic ter aktiviranih makrofagov, ki fagocitirajo odmrle celice (22). Pri večini bolnikov lahko omenjene simptome ublažimo z anti-citokinsko (tocilizumab) ali imuno-supresivno (kortikosteroidi) terapijo, vendar pa ni še popolnoma jasno ali omenjena zdravila vplivajo tudi na proti-tumorsko učinkovitost CART (22). Drugi pomemben neželeni učinek je aplazija B-celic in posledično hipo-gamaglobulinemija. Le-ta je popolnoma obvladljiva z infuzijami γ -globulinov, kar pa dodatno podraži terapijo (22). Ker je močno anti-tumorsko delovanje CART povezano s potencialno življenje ogrožajočimi akutnimi neželenimi učinki kot je CS, bo za povečanje varnostni tovrstne terapije potrebno v CAR celice vgraditi t.i. samomorilske gene, ki lahko v kratkem času uničijo večino CART v telesu. Primer takega samomorilskega gena je inducibilna kaspaza 9 (iCasp9), ki je fuzijski gen humane kaspaze 9 in modificiranega humanega FK-vezočega proteina (FKBP). FKBP veže drugače inertno molekulo AP1903 in s tem sproži dimerizacijo iCasp9, kar vodi v aktivacijo kaspaze, le-ta pa sproži apoptozo v celicah, ki so nosilke iCasp9 genskega konstrukta. Pri petih pediatričnih bolnikih z relapsirano ALL po presaditvi kostnega mozga, je en odmerek AP1903 povzročila eliminacijo >90% modificiranih T-celic v 30 minutah po aplikaciji (25).

Glavna omejitev CART terapije je, da je visoko individualizirana, saj je potrebno izdelati zdravilo za vsakega bolnika posebej iz njegovih lastnih celic. To je vzrok za izredno visoke stroške. Posledično je terapija dostopna le majhnemu številu bolnikov (26). Če bi lahko CAR celice za vse bolnike izdelali iz istega vira, bi se cena terapije znižala za približno štirikrat (27). Glavni problem aplikacije CART, ki izvirajo iz bolniku nesorodnih darovalcev, bi bilo uničenje omenjenih celic s strani bolnikovega imunskega sistema. Temu se lahko izognemo z eliminacijo imunogenih molekul kot so na primer humani levkocitni antigeni (HLA). Raziskovalcem je že uspelo odstraniti HLA I iz CART s pomočjo nukleaz cinkovih prstov (ZNF), ki so jih v CAR celice vnesli z elektrotransferjem mRNA zapisa za ZNF (28), kar je pomemben korak naprej k množični proizvodnji CART. Potencial CART za prenos iz akademskih inštitucij v farmacevtsko industrijo pa je priznala tudi FDA v nedavnem osnutku Smernic za zgodnje testiranje celičnih in genskih terapij v industriji (29).

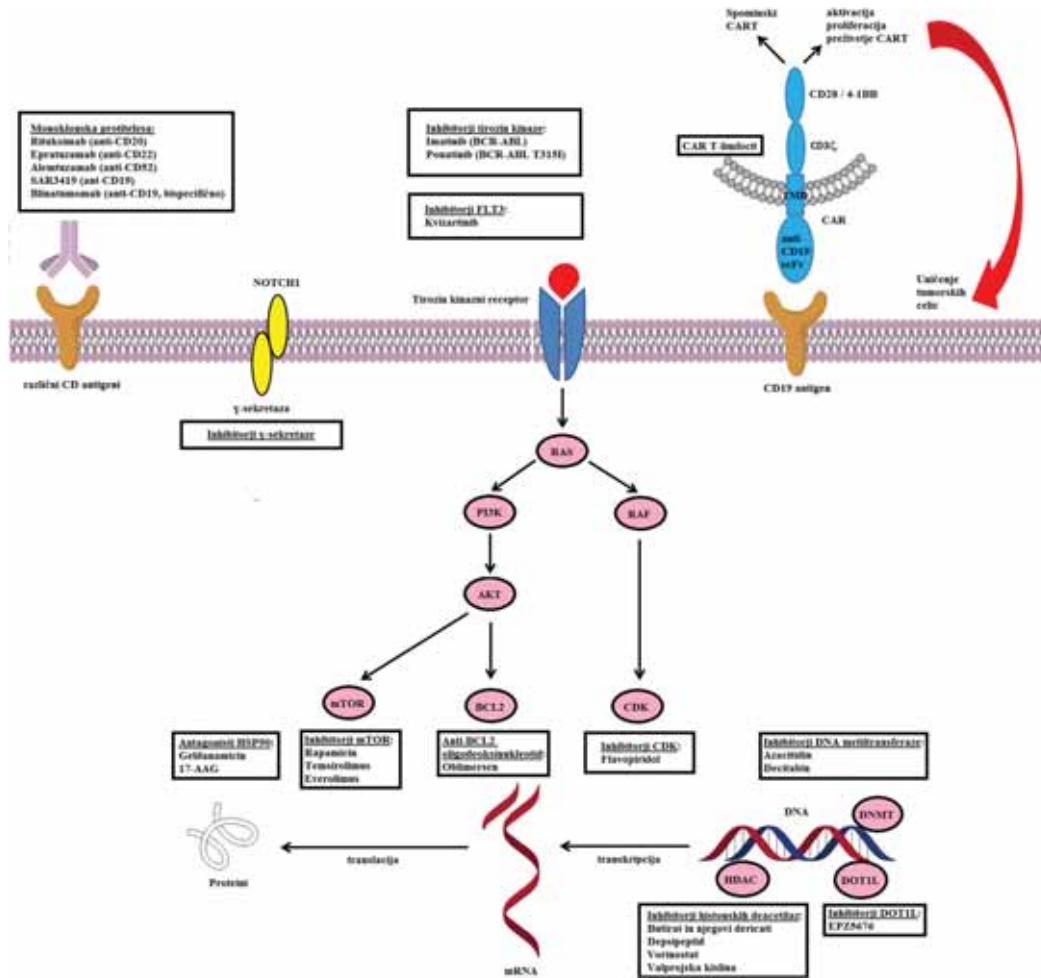
Čeprav so v večini CAR študij kot efektorske celice uporabili T-limfocite, pa novejša raziskava kažejo, da je terapija še bolj učinkovita, če s CAR transformiramo hematopoetske matične celice (30) ali celice naravne ubijalke (NK celice). Prednost NK celic v primerjavi s T-limfociti je manjše tveganje za nastanek CS, slabost pa krajša življenjska doba in odsotnost spominskih celic (24). Trenutno sta dve študiji NK CAR celic (ena v ZDA in ena na Kitajskem) v fazi rekrutiranja bolnikov (24).

Mehanizmi delovanja novih terapij ALL so prikazani na Sliki 2.

4 SKLEP

V Sloveniji je pediatrična populacija bolnikov z ALL zdravljena po klasičnem pristopu z uporabo randomiziranih protokolov. Slovenski pediatri-onkologi sodelujejo v mednarodni skupini, ki kot osnovo uporablja Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) protokol, ki je bil prvotno razvit v Nemčiji. Omenjeni protokoli se pri nas uporabljajo od leta 1983 in se posodablajo približno vsakih 5 let. Pri nas se nova zdravila za zdravljenje otrok z ALL ne uporabljajo, bolniki z rezistentno oz. relapsirano obliko bolezni se zdravijo s presaditvijo kostnega mozga.





Slika 2: Poenostavljena shema tarčnih mest novih terapij ALL. Z ligandi sprožena dimerizacija tirozin kinaznih receptorjev vodi do aktivacije RAS/RAF signalne poti, ki regulira celično preživetje in apoptozo. Učinkovine, ki delujejo na to signalno pot so: inhibitorji tirozin kinaze in FLT3, inhibitor CDK flavopiridol, ki prekine transkripcijo, anti-BCL2 oligodeoksinukleotid oblimersen, ki z vezavo na BCL2 mRNA zmanjša ekspresijo BCL2 ter s tem poveča občutljivost tumorskih celic na radiacijo in kemoterapijo in inhibitorji mTOR, ki vplivajo na translacijo. Antagonisti HSP90 motijo pravilno zvijte proteinskih molekul in s tem povečajo njihovo dovzetnost za proteasomsko razgradnjo. Inhibitorji DNA metiltransferaze, histonskih deacetilaz in histonske metiltransferaze DOT1L preko epigenetskih mehanizmov vplivajo na izražanje genov, katerih produkti sodelujejo pri regulaciji celičnega cikla, preživetja celic in apoptoze. Inhibitorji γ -sekretaze preprečujejo prenos NOTCH1 v jedro in posledično njegov vpliv na izražanje genov. Površinski antigeni tumorskih celic služijo kot trače za monoklonska protitelesa. CART terapija pa temelji na prepoznavi tumorskih celic s strani s himernimi antigenskimi receptorji (CAR) transformiranih T-limfocitov, ki se posledično aktivirajo in uničijo rakave celice.

Figure 2: A simplified diagram of molecular target sites for new ALL therapeutic agents. Signals generated by the ligand-induced dimerization of tyrosine kinase receptors activate the RAS/RAF pathway, which regulates cell survival and apoptosis. Agents targeting this pathway are: tyrosine kinase and FLT3 inhibitors, CDK inhibitor flavopiridol that interrupts transcription, anti-BCL2 oligodeoxynucleotide oblimersen that blocks expression of BCL2 by binding to its mRNA and thus sensitizes cancer cells to radiation and chemotherapy, and mTOR inhibitors that influence translation. HSP90 antagonists disrupt correct protein folding and thus increase their susceptibility to proteasomal degradation. Inhibitors of DNA methyltransferase, histone deacetylase and histone methyltransferase DOT1L regulate expression of genes involved in cell cycle, survival and apoptosis through several epigenetic mechanisms. γ -secretase inhibitors interfere with NOTCH1 transfer to nucleus and thus prevent its influence on gene expression. Surface antigens serve as targets for treatment with monoclonal antibodies. CART therapy is based on the tumor cell recognition by chimeric antigen receptors (CAR) transformed T-lymphocytes. This leads to CAR T-lymphocyte activation and killing of cancer cells.

Stopnja preživetja bolnikov z ALL (predvsem pediatričnih) se je v zadnjih 50 letih drastično povečala, kar je predvsem posledica uporabe visoko standardiziranih randomiziranih protokolov zdravljenja ter multi-disciplinarnega, multi-centričnega in internacionalnega pristopa k terapiji in raziskavam povezanim z njo. Manjšo vlogo so pri izboljšanju izida zdravljenja imela nova zdravila, vendar strokovnjaki ocenjujejo, da z večanjem agresivnosti obstoječih protokolov zdravljenja, ne bo možno doseči 100% ozdravljivosti ALL in bo potrebno poseči po novih zdravilih in terapevtskih pristopih. Ta potreba je še posebno izražena pri odraslih bolnikih ter dojenčkih z ALL, kjer je stopnja preživetja dvakrat nižja kot pri otrocih. Kljub obetavnim rezultatom kliničnih študij nekaterih novih zdravil za zdravljenje ALL (predvsem tistih, ki delujejo na genetskem in epigenetskem nivoju ter CART), pa bo vsaj še nekaj desetletij uporaba omenjenih terapij omejena na bolnike z rezistentno oz. relapsirano obliko bolezni, predvsem zaradi še nejasnega varnostnega profila (predvsem dolgoročnega) omenjenih terapevtskih pristopov.

5 LITERATURA

1. Elert E. Living with leukaemia. *Nature*. 2013 Jun 27;498(7455):S2-3.
2. Pui CH, Jeha S. New therapeutic strategies for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Drug Discov*. 2007 Feb;6(2):149-65.
3. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2013 Jun 1;381(9881):1943-55.
4. Jazbec JR, V. Karas-Kuzelicki, N. Leukemije otroške dobe. *Zdravniški vestnik*. 2008;77:5.
5. Seibel NL. Treatment of acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: peaks and pitfalls. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008:374-80.
6. Carmichael M. Drug safety: double jeopardy. *Nature*. 2013 Jun 27;498(7455):S14-5.
7. Ram R, Wolach O, Vidal L, Gafter-Gvili A, Shpilberg O, Raanani P. Adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia have a better outcome when treated with pediatric-inspired regimens: systematic review and meta-analysis. *Am J Hematol*. 2012 May;87(5):472-8.
8. Moyer MW. Cell banks: life blood. *Nature*. 2013 Jun 27;498(7455):S16.
9. Brunstein CG, Gutman JA, Weisdorf DJ, Woolfrey AE, Defor TE, Gooley TA, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy: relative risks and benefits of double umbilical cord blood. *Blood*. 2010 Nov 25;116(22):4693-9.
10. Wang W, Fang C, Wang X, Chen Y, Wang Y, Feng W, et al. Modifying mesoporous silica nanoparticles to avoid the metabolic deactivation of 6-mercaptopurine and methotrexate in combinatorial chemotherapy. *Nanoscale*. 2013 Jul 21;5(14):6249-53.
11. Robak P, Robak T. Older and new purine nucleoside analogs for patients with acute leukemias. *Cancer Treat Rev*. 2013 Dec;39(8):851-61.
12. Barth M, Raetz E, Cairo MS. The future role of monoclonal antibody therapy in childhood acute leukaemias. *Br J Haematol*. 2012 Oct;159(1):3-17.
13. Topp MS, Gokbuget N, Zugmaier G, Degenhard E, Goebeler ME, Klingler M, et al. Long-term follow-up of hematologic relapse-free survival in a phase 2 study of blinatumomab in patients with MRD in B-lineage ALL. *Blood*. 2012 Dec 20;120(26):5185-7.
14. Topp MS, Kufer P, Gokbuget N, Goebeler M, Klingler M, Neumann S, et al. Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival. *J Clin Oncol*. 2011 Jun 20;29(18):2493-8.
15. Katsnelson A. Drug development: target practice. *Nature*. 2013 Jun 27;498(7455):S8-9.
16. Roche-Lestienne C, Soenen-Cornu V, Grardel-Duflos N, Lai JL, Philippe N, Facon T, et al. Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to ST1571, and they can pre-exist to the onset of treatment. *Blood*. 2002 Aug 1;100(3):1014-8.
17. Administration USFaD. FDA Drug Safety Communication: FDA asks manufacturer of the leukemia drug Iclusig (ponatinib) to suspend marketing and sales. 2013.
18. Smith CC, Wang Q, Chin CS, Salerno S, Damon LE, Levis MJ, et al. Validation of ITD mutations in FLT3 as a therapeutic target in human acute myeloid leukaemia. *Nature*. 2012 May 10;485(7397):260-3.
19. Wright J. Epigenetics: reversible tags. *Nature*. 2013 Jun 27;498(7455):S10-1.
20. Okada Y, Feng Q, Lin Y, Jiang Q, Li Y, Coffield VM, et al. hDOT1L links histone methylation to leukemogenesis. *Cell*. 2005 Apr 22;121(2):167-78.
21. Bernt KM, Zhu N, Sinha AU, Vempati S, Faber J, Krivtsov AV, et al. MLL-rearranged leukemia is dependent on aberrant H3K79 methylation by DOT1L. *Cancer Cell*. 2011 Jul 12;20(1):66-78.
22. Maus MV, Grupp SA, Porter DL, June CH. Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood*. 2014 Apr 24;123(17):2625-35.
23. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2013 Apr 18;368(16):1509-18.
24. Lankester AC, Locatelli F, Bader P, Rettinger E, Egeler M, Katewa S, et al. Will Post-Transplantation Cell Therapies for Pediatric Patients Become Standard of Care? *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 Jul 23.
25. Di Stasi A, Tey SK, Dotti G, Fujita Y, Kennedy-Nasser A, Martinez C, et al. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med*. 2011 Nov 3;365(18):1673-83.
26. Levine BL, June CH. Perspective: assembly line immunotherapy. *Nature*. 2013 Jun 27;498(7455):S17.
27. Baker M. Companies ponder how truly 'personal' medicines can get. *Nat Med*. 2011 May;17(5):519.
28. Torikai H, Reik A, Soldner F, Warren EH, Yuen C, Zhou Y, et al. Toward eliminating HLA class I expression to generate universal cells from allogeneic donors. *Blood*. 2013 Aug 22;122(8):1341-9.
29. Administration UFaD. Guidance for industry: considerations for the design of early-phase clinical trials of cellular and gene therapy products. July 1 2013.
30. De Oliveira SN, Ryan C, Giannoni F, Hardee CL, Tremcinska I, Katebian B, et al. Modification of hematopoietic stem/progenitor cells with CD19-specific chimeric antigen receptors as a novel approach for cancer immunotherapy. *Hum Gene Ther*. 2013 Oct;24(10):824-39.