

Lösemiye Karşı Yeni İlaçlar

Rasyonel tasarımılanan inhibitörlerle Bruton Tirozin Kinazı ve Janus Kinaz 3'ün ikisinin birden hedeflenmesi Graft-Versus-Host hastalığını (GVHD) önlemektedir

Dr. Fatih M. Uçkun, Dr. Marina Cetkovic-Cvrlje

Parker Hughes Cancer Center, St. Paul, USA

Özet

Bu çalışmanın amacı (a) T-hücre kompartmanı dışındaki Bruton Tirozin Kinazı (BTK)'nin inhibisyonunun farede allogenik kemik iliği transplantasyonu (BMT) sonrası oluşan graft-versus-host hastalığının (GVHD) oluşumunun üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi ve (b) rasyonel tasarımlarla belirlenen inhibitörlerle BTK ve Janus Kinaz 3 (JAK3)'ün ikisinin birden hedeflenmesinin allogenik BMT sonrasında yaşam süresinin uzatılması üzerindeki etkisinin incelenmesi idi. Allogenik BALB/c vericilerden kemik iliği / splenosit graftlı, taşıyıcı solvent-uygulanmış kontrol C57BL/6 fareleri yaygın multi-organ tutulumlu akut GVHD gelişimine bağımlı olarak 40 günlük bir medyan yaşam süresi (MYS) sonunda öldüler. BMT alıcılarının LFM-A13 ile tedavisi (25 mg/kg/gün) MYSni anlamlı düzeyde uzatarak 47 güne ulaştırdı. BMT'yi takip eden iki ayda ihtimali yaşam süresi taşıyıcı solvent ile tedavi edilen kontrol grubu farelerde 2 ± 2 iken LFM-A13 ile tedavi edilen farelerde 22 ± 6 ($P=0.0008$) bulunmuştur. Özellikle BTK inhibitörü LFM-A13 ve standart anti-GVHD tedavisinde kullanılan methotrexat (MTX) (10 mg/m²/gün) ile kombine tedavisi LFM-A13 ile tekli tedaviden daha etkin bulunmuştur. Bununla beraber LFM-A13 ve JAK3'ü hedefleyen yeni anti-GVHD ilacı JANEX-1 (60 mg/kg/gün) kombinasyonu LFM-A13, JANEX-1 veya MTX ile tek ilaçlı tedavilerinden daha etkili olmuştur. En etkili GVHD profilaksisini (LFM-A13+JANEX-1) alan alıcıların %70'inden fazlası >80 gün MYS değeri ile 80-günlük gözlem süresi

içerisinde hayatta kalmıştır. Sonuçlarımız allojenik BMT uygulanan farelerde BTK inhibitörü LFM-A13 ve JAK3 inhibitörü JANEX-1 kombinasyonunun yaşam süresi düzeyinde önemli avantaj sağladığının ve standart anti-GVHD ilacı MTX'i kullanan GVHD profilaksisinden çok daha üstün olduğunun deneysel bir delilini oluşturmaktadır.

Takdim

Allogenik kemik iliği transplantasyonu (BMT) sonrası gelişen graft-versus-host hastalığı (GVHD) hala morbitite ve mortalitenin önemli bir bölümünü oluşturan faktörlerdendir (Ferrara 2003). Alloreaktif verici T-hücrelerinin alıcıya duyarlı hala gelmeleri, çoğalmaları ve alıcı dokusunun tahribine aracı olmaları GVHD'nin temelini oluşturmaktadır. Günümüze kadar yapılan deneysel ve klinik araştırmalar verici T-hücrelerinin GVHD'nin temel aracı ve efektörleri olduğunu belirlemiştir. Allogenik BMT'nin en ideal sıçan modellerinden biri ile daha önce yapmış olduğumuz çalışmalar (Cetkovic-Cvrlje, et al 2002, Cetkovic-Cvrlje, et al 2001) T-hücrelerinde yoğun bir şekilde ifade edilen Janus kinase 3 (JAK3 kinase) un akut GVHD'nin patogeneğinde önemli roller oynadığını vurgulamıştır. Özgün tirozin kinaz inhibitörü JANEX-1 ile JAK3'nin hedeflenmesi majör MHC bariyerlerine rağmen allogenik BMT alan farelerde yaygın GVHD'yi önlemiştir (Cetkovic-Cvrlje, et al 2001, Uckun, et al 2002a).

TecI, TecII, Itk, Bmx/Etk ve DSrc28C kinazlarında kapsayan BTK/Tec ailesine ait bir üye

olan Bruton tirozin kinazı (BTK) (Steller 1995) regülatör sinyal iletişim yollarında önemli bir rol oynayan T-hücre soyu dışındaki hematopoietik hücrelere ait sitoplazmik bir protein tirozin kinazdır (Uçkun 1998). BTK B-dizisi lenfoid hücrelerde büyüme, farklılaşma ve yaşamda kalmayı kontrol eden sinyal iletişim yollarında rol oynamaktadır (Kurosaki 2000, Rawlings and Witte 1994, Uçkun 1998). Yakın zamanda yapılan çalışmalar BTK nin makrofaj efektor fonksiyonlarının oluşumunda rolü olduğunu göstermiştir (Mukhopadhyay, et al 1999, Mukhopadhyay, et al 2002). Bununla beraber monositlerde lipopolisakkarit-uyarımlı tumor nekrozis factor oluşumunda BTK nin anahtar bir faktör olduğu bulunmuştur (Horwood, et al 2003).

Son zamanlarda kimyasal yapıya bağımlı olarak tasarımılanan BTK ye özgün inhibitörler rapor edilmiştir (Mahajan, et al 1999). LFM analoglarının rasyonel tasarımlarında BTK nin kinaz domainindeki katalitik bölümüne tercihi ve seçici olarak bağlanmaları için ileri "docking" yöntemleri kullanılmıştır. Ana bileşik α -cyano- β -hidroksi- β -metil-N-(2,5-dibromofenil)-propenamid (LFM-A13) rekombinant BTK yi 2.5 μ M lük bir IC_{50} değeri ile inhibe etmiştir (Mahajan, et al 1999). BTK kinaz deneylerindeki üstün etkinliğinin yanı sıra LFM-A13 ün BTK inhibisyonu önemli derecede seçici ve özgündür. LFM-A13 300 μ M kadar yüksek konsantrasyonlarda dahi diğer protein kinazlardan Janus ailesi tirozin kinazları JAK1 ve JAK3 ün, SYK in, Src ailesi tirozin kinazları HCK ve LYN in, reseptör ailesi tirozin kinazlardan EGF-reseptör kinazın (EGFR) ve İnsülin Reseptör Kinazın (IRK) enzimatik aktivitelerini etkilememiştir (Mahajan, et al 1999).

Verici T-hücrelerinin yanı sıra T-hücre soyu dışı kompatimanının elementlerinin GVHD patogenezisinde yeri bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı (a) T-hücre kompartmanı dışındaki Bruton Tirozin Kinazı (BTK) nin inhibisyonunun farede allogenik kemik iliği transplantasyonu (BMT) sonrası oluşan graft-versus-host hastalığının (GVHD) oluşumunun üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi ve (b) rasyonel tasarımlarla belirlenen inhibitörlerle BTK ve Janus Kinaz 3 (JAK3) ün ikisinin birden hedeflenmesinin allogenik BMT sonrasında yaşam süresinin uzatılması üzerindeki etkisinin incelenmesidir.

Materyal ve metod

8-10 hafta yaşlarında C57BL/6 (H-2^b) erkek fareler (alıcılar) and 6-8 hafta yaşlarında BALB/c (H-2^d) erkek fareler (vericiler) Taconic (Germantown, NY) firmasından temin edilmiştir. Hayvan çalışmaları Parker Hughes Enstitüsü Hayvan Çalışmaları Bakım ve Kullanım Kurulu tarafından onaylanmış ve tüm hayvan bakımı Laboratuvar Hayvan Bakım Kuralları (NIH yayınları #85-23, 1985 tarihli tashihi) na uymaktadır. Alıcı C57BL/6 farelerin transplant öncesi tüm vücut irradiasyonları (TBI) ve kemik iliği transplantasyonu tarafımızca yayınlanmış metodlar çerçevesinde yapılmıştır (Cetkovic-Cvrlje, et al 2002, Cetkovic-Cvrlje, et al 2001, Uçkun, et al 2002a). Standart graft inoculumu 0.5 ml of RPMI 1640 içerisinde 25 x 10⁶ kemik iliği hücresi and 25 x 10⁶ splenositden karışımından ibarettir. 85 günlük gözlemleme süresi içerisinde BMT alıcıları günlük olarak GVHD nin her hangi bir klinik belirtisi (kilo kaybı, deride eritema, alopecia, kamburlaşma, diare) ve yaşam süresi temelinde takip edilmişlerdir (Cetkovic-Cvrlje, et al 2002, Cetkovic-Cvrlje, et al 2001, Uçkun, et al 2002a). Yaşam süresi BMT gününden (gün 0) başlayarak hesaplanmıştır. Allo-engraftment BALB/c hücrelerini belirleyen periferik mononükleer hücrelerin FITC-işaretli anti-H-2D^d antikoruna (klon 34-2-12, Pharmingen, San Diego, CA) kullanılarak flow sitometrik H-2D^d tiplenmesi ile gözlenmiştir.

GVHD profilaksisi için alıcı farelere LFM-A13, JANEX-1, Methotrexat (MTX) (Immunex Corporation, Seattle, Washington) veya taşıyıcı solvent kontrol uygulanmıştır. BTK-inhibitörü LFM-A13 (25 mg/kg/gün) ve JAK3-inhibitörü JANEX-1 (60 mg/kg/day) günlük olarak BMT nin '0' ıncı gününden başlayarak verilmiştir. Bu bileşiklerin sentezleri ve karakterizasyonları daha önceki yayınlarda detaylanmıştır (Mahajan, et al 1999, Sudbeck, et al 1999). Standart anti-GVHD ilacı MTX (10 mg/m²/gün) karşılaştırma kriteri olarak kullanılmıştır. MTX BMT sonrası intraperitoneal (i.p.) yolla 1, 3, 6 ve 11 inci günlerde verilmiştir. Tüm ilaçlar i.p. yolla 200 μ L hacimde tatbik edilmiştir. Alıcı fareler elektif olarak belirli sürelerle nekropsi için öldürülmüştür. Alınan dokular histopatolojik GVHD değerlendirilmesinde kullanılmıştır. Yaşam süresi verileri yaşam-tablosu metodu ile analiz edilmiştir. 0.05 den küçük P-değerleri (log-rank testi) istatistiksel açıdan önemli olarak değerlendirilmiştir.

Sonuçlar

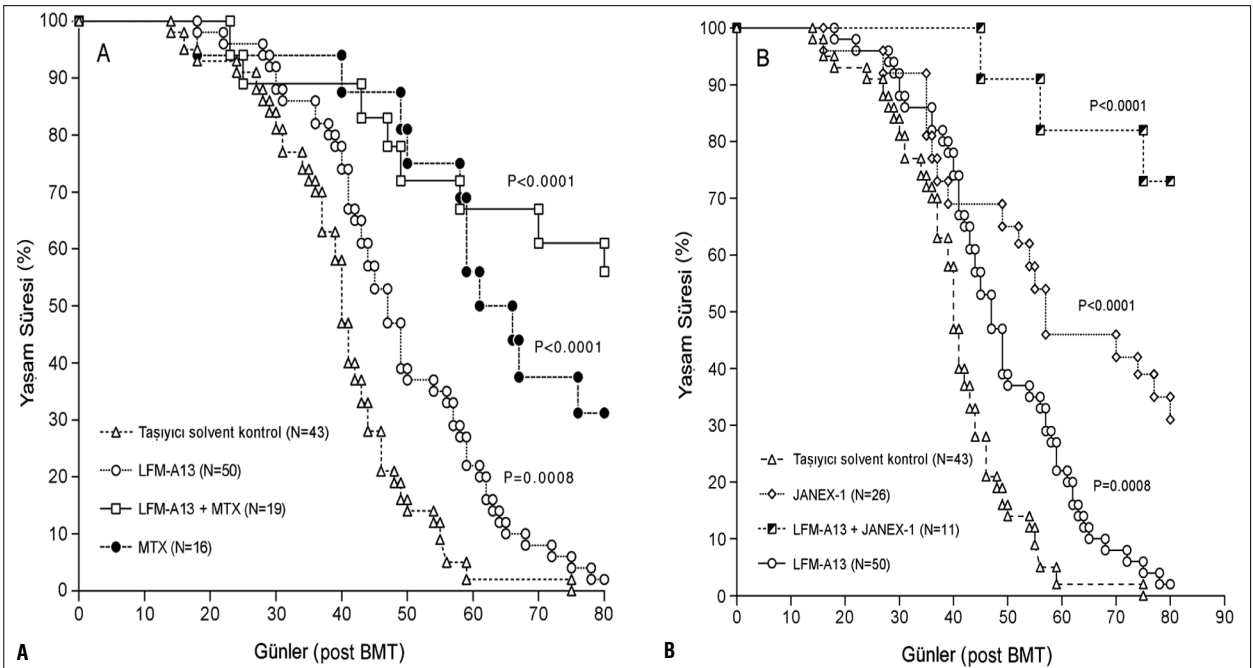
LFM-A13 Farelerde Majör Histokompatibilite Engeline Rağmen Fetal Akut Graft-Versus-Host Hastalığını Hafifletmektedir

BALB/c farelerinden BM/S grafit alan tüm TBI uygulanmış ve taşıyıcı solvent uygulanmış kontrol C57BL/6 farelerinde (H-2^b) (N=43) 2-3 hafta içerisinde klinik olarak diare, kamburlaşma, kilo kaybı ve buruşuk deri ile takip edilen yaygın multi-organ tutulumlu GVHD gelişti. Bu hayvanlar 40 günlük bir medyan yaşam süresi (MYS) sonunda öldüler (Şekil 1).

LFM-A13 tedavisi BMT alıcılarının yaşama süresini önemli bir şekilde uzatarak (N=50, P=0.0008 taşıyıcı solvent uygulanmış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında) MYS ni 47 güne çıkardı. Post-BMT ihtimali yaşam süresi taşıyıcı solvent uygulanan farelerde %2±2 iken LFM-A13 uygulanan farelerde %22±6 idi (Şekil 1). Bununla beraber, 80 günlük deneysel süre içerisinde LFM-A13 uygulanan farelerin %2±2 si yaşamda kaldı (Şekil 1). Bu verilerin takibinde efektif bir GVHD önleme rejiminde BTK inhibitörü LFM-A13 ile standart bir immunosupressif ajanın kombinasyo-

nunun muhtemel etkisini incelemeye karar verdik. Daha önce de belirtildiği üzere (Cetkovic-Cvrlje, et al 2001, Uckun, et al 2002a) MTX etkili bir anti-GVHD ilaçtır. Akut GVHD nin hafifletilmesinde MTX LFM-A13 den daha fazla tesirlidir (P=0.0004, Şekil 1A). LFM-A13 ile MTX içeren kombinasyon rejimi tek başına LFM-A13 uygulamasından daha efektiftir (P<0.0001, Şekil 1A). LFM-A13+MTX kombinasyonlu GVHD profilaksisinin verildiği C57BL/6 alıcılarının yarısından çoğu bu 80 günlük gözleme süresi içerisinde hayatta kalmış ve sağlıklı görülmüşlerdir. Kümülatif yaşamda kalma ihtimali LFM-A13+MTX grubunda %58±11 iken MTX ile tedavi edilen grupta %31±12 olarak hesaplanmıştır (Şekil 1A).

Bu verilerin temelinde GVHD profilaksisinde allotransplantasyonlu kemik iliği alıcılarının yaşam sürelerinin JAK3 inhibitörü JANEX-1 (60 mg/kg/gün) beraberinde LFM-A13 (25 mg/kg/gün) kombinasyonu ile daha ileriye götürülebilmek ihtimalini değerlendirmeye karar verdik. Şekil 1B de sunulduğu üzere, LFM-A13 ile JANEX-1 kombinasyon uygulaması sadece akut GVHD nin önlenmesinde belirgin bir şekilde etkili kalmamakla beraber LFM-A13 (P<0.0001)



Şekil 1. Akut GVHD nin bir sıcan modelinde Post-BMT yaşamda kalma BTK inhibitoru LFM-A13'ün Methotrexat (MTX) ile [A] ve JANEX-1 ile [B] kombinasyonlarının etkileri. Irradiye edilen (7.5 Gy) C57BL6 (H-2b) alıcılarına BALB/c (H-2d) farelerinden BM ve splenosit (her birinden 25x10⁶) verildi. LFM-A13 0'inci günden 80'inci güne kadar 25 mg/kg/gün dozunda i.p. olarak verildi. Methotrexat (MTX) 10 mg/m2/gün dozunda i.p. yolla BMT sonrası 1, 3, 6 ve 11'inci günlerde uygulandı. JANEX-1 0'inci günden 80'inci güne kadar i.p. olarak 60 mg/kg/gün dozunda tatbik edildi. P değerleri yaşam tablosu analizi (log-rank test) ile kontrol grubu ile karşılaştırarak elde edildi.

veya JANEX-1 ($P=0.0006$) ile tekli tedavilere istatistiksel olarak belirgin bir şekilde üstün gelmiştir. Bağımlı olarak LFM-A13 ve JANEX-1 ile tekli tedavi alan alıcıların MYS leri sırası ile 47 ve 57 gün uzarken, taşıyıcı solvent uygulanmış kontrol grubunun MYS i olan 40 gün ile karşılaştırıldığında LFM-A13+JANEX-1 den oluşan kombinasyon tedavisinde MYS ni 80 günün üzerine ulaştırmıştır. Dikkate değer olarak 80 günlük gözlem süresi sonrasında hayatta kalan alıcı oranı LFM-A13 ve JANEX-1 uygulanan gruplarda sırası ile $\%2\pm2$ ve $\%31\pm12$ iken bu iki ilacın kombinasyonu ile tedavi edilen grupta $\%73\pm13$ tur. LFM-A13+JANEX-1 ile tedavi altında uzun süre kalan hayvanların ($N=7$) organlarının histopatolojik incelemeleri orta düzeyde karaciğer, deri, ince ve kalın bağırsak GVHD değerleri göstermekle beraber bu değerler taşıyıcı solvent ile tedavi edilmiş kontrol grubunun değerlerinden anlamlı düzeyde aşağıdadır (veriler sunulmamıştır). LFM-A13+JANEX-1 ile tedavi edilen BMT alıcılarında ortalama GVHD değerleri karaciğer için 0.9 ± 0.2 , deri için 0.3 ± 0.1 , ince bağırsak için 0.6 ± 0.1 ve kalın bağırsak için 0.4 ± 0.1 dir. Bu ikili ilaç kombinasyonu ile tedavi edilerek uzun süre yaşamda kalan 7 H-2D^b-pozitif alıcı farenin splenositlerinin flow sitometrik H-2D^d-tiplendirilmesi $\%95.6\pm1.8$ lik H-2D^d donör hücre engraftmentinin varlığına işaret etmiştir.

Tartışma

Son yıllarda BMT alanında yapılan çalışmalar GVHD nin temel araçları olarak donör T-hücrelerini vurgulamıştır. Halbuki yakın zaman içerisinde hem klinik hem de deneysel transplantasyon gözlemlerinden elde edilen veriler T-hücre dışındaki kompartmanın GVHD nin gelişiminde rolünün varlığına işaret etmiştir. Bu çalışmada rasyonel tasarımlarla belirlenen BTK inhibitörü LFM-A13 ile T-hücre kompartmanı dışındaki BTK nin hedeflenmesinin bir akut fare GVHD modelinde allogenic BMT sonrası gelişen GVHD nin şiddetini baskıladığını gösterdik. Çalışmalarımız BTK inhibitörü LFM-A13 ve JAK3 inhibitörü JANEX-1 in kombinasyonunun allogenic BMT alan farelerde önemli düzeyde yaşamda kalım avantajı sağladığının ve ayrıca GVHD profilaksisinde kullanılan standart anti-GVHD ilaç MTX den çok daha üstün olduğunun benzeri görülmemiş bir deneysel delili ni teşkil etmektedir.

LFM-A13 ilk defa BTK ye özgün bir tirozin kinaz inhibitörü ve BTK yi hedefleyen ilk anti-losemik ilaç olarak tanımlanmıştır (Uçkun and Zheng 2000, Uçkun and Zheng 2001). Lösemik hücrelerin $10 \mu\text{M}$ konsantrasyonunda LFM-A13 ile muamele edilmeleri hücrelerdeki BTK aktivasyonunun yok edilmesi ile sonuçlanmıştır (Mahajan, et al 1999). LFM-A13 BTK-Fas birlesimini engelleyerek rezistan lösemik hücrelerin Fas-aracılı apoptozise duyarlı hale gelmelerini sağlamıştır (Vassilev, et al 1999). BTK nin anti-apoptik fonksiyonuna uygun olarak BTK-pozitif B-dizi lösemi hücrelerinin LFM-A13 ile muamele edilmeleri bu hücrelerin vinkristin- ve ceramid-tesvikli apoptozise duyarlılıklarını arttırmıştır (Mahajan, et al 1999). Bu yüzden LFM-A13 apoptozis promote edici ve kemosenitize edici özellikleri yüzünden potansiyel bir antilösemik ajandır. LFM-A13 ün yüksek derecede etkili BTK-inhibe edici ve apoptozisi tesvik edici plazma konsantrasyonlarına farelerde rahatlıkla bir toksik etki görülmeksizin ulaşılabilir (Uçkun, et al 2002b). Yakın geçmişte LFM-A13 ün in vivo anti-lösemik aktivitesi kemoterapiye-rezistant BCL-1 B-dizi lösemi hücreleri ile BALB/c farelerinde deneysel olarak incelenmiştir (Uçkun, et al 2002b). Böylece LFM-A13 potent anti-lösemik aktiviteli anti-GVHD ajan olarak ikili fonksiyonla kullanışlı olabilir. Allogenic kemik iliğinin graft-versus-lösemi etkisi allogenic BMT nin yararlı bir etkisi olduğu için, LFM-A13 tedavisinin (tek başına ve MTX veya JANEX-1 ile kombine olarak) kemik iliği allograftlarının GVL fonksiyonundaki etkisinin incelenmesi daha ileri çalışmalarımızda değerlendirilecektir.

Sonuç

Tüm veriler gözlemlendiğinde, çalışmamız allogenic BMT sonrası yaygın GVHD gelişiminin önlenmesinde LFM-A13 gibi kimyasal bir inhibitörle BTK nin hedeflenmesinin ve özellikle standart bir immünosupresif ilaç MTX veya JAK3 inhibitörü JANEX-1 gibi farklı ve etkili anti-GVHD profilaksisi ile kombine edildiğinde daha yararlı olacağını göstermektedir. JANEX-1 ve LFM-A13 ün ikisi de anti-lösemik özellikli anti-GVHD ajan olarak dual fonksiyona sahip oldukları için özellikle lösemi hastalarında allogenic BMT da GVHD profilaksisinde bu tirozin kinazların kombinasyonlarının kullanılması faydalı olabilir.

Kaynaklar:

1. Cetkovic-Cvrlje, M., Roers, B.A., Schonhoff, D., Waurzyniak, B., Liu, X.P. & Uçkun, F.M. (2002) Treatment of post-bone marrow transplant acute graft-versus-host disease with a rationally designed JAK3 inhibitor. *Leukemia and lymphoma*, 43, 1447-1553.
2. Cetkovic-Cvrlje, M., Roers, B.A., Waurzyniak, B., Liu, X.P. & Uçkun, F.M. (2001) Targeting Janus Kinase 3 to attenuate the severity of acute graft-versus-host disease across the major histocompatibility barrier in mice. *Blood*, 98, 1607-1613.
3. Cetkovic-Cvrlje, M. & Uçkun, F.M. (2004) Targeting Janus kinase 3 in the treatment of leukemia and inflammatory diseases. *Arch Immunol Ther Exp*, 52, 69-82.
4. Mahajan, S., Ghosh, S., Sudbeck, E.A., Zheng, Y., Downs, S., Hupke, M. & Uçkun, F.M. (1999) Rational design and synthesis of a novel anti-leukemic agent targeting Bruton's tyrosine kinase (BTK), LFM-A13 [alpha-cyano-beta-hydroxy-beta-methyl-N-(2, 5-dibromophenyl)propenamide]. *J Biol Chem*, 274, 9587-9599.
5. Sudbeck, E.A., Liu, X.-P., Narla, R.K., Mahajan, S., Ghosh, S., Mao, C. & Uçkun, F.M. (1999) Structure-based design of specific inhibitors of Janus kinase 3 as apoptosis-inducing anti-leukemic agents. *Clin Cancer Res*, 5, 1569-1582.
6. Uçkun, F.M. (1998) Bruton's tyrosine kinase (BTK) as a dual-function regulator of apoptosis. *Biochem Pharmacol*, 56, 683-691.
7. Uçkun, F.M., Roers, B.A., Waurzyniak, B. & Cetkovic-Cvrlje, M. (2002a) Janus kinase 3 inhibitor WHI-P131/JANEX-1 prevents graft-versus-host disease but spares the graft-versus-leukemia function of the bone marrow allografts in a murine bone marrow transplantation model. *Blood*, 99, 4192-4199.
8. Uçkun, F.M., Zheng, Y., Cetkovic-Cvrlje, M., Vassilev, A., Lisowski, E., Waurzyniak, B., Chen, H., Carpenter, R. & Chen, C.L. (2002b) In vivo pharmacokinetic features, toxicity profile, and chemosensitizing activity of alpha-cyano-beta-hydroxy-beta-methyl-N-(2,5-dibromophenyl)propenamide (LFM-A13), a novel antileukemic agent targeting Bruton's tyrosine kinase. *Clin Cancer Res*, 8, 1224-1233.
9. Vassilev, A., Ozer, Z., Navara, C., Mahajan, S. & Uçkun, F.M. (1999) Bruton's tyrosine kinase as an inhibitor of the Fas/CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem*, 274, 1646-1656