

# Inhibice signalizace B buněčným receptorem: první cílená léčba u chronické lymfocytární leukemie a dalších B buněčných lymfomů

## Inhibition of B Cell Receptor Signaling: A First Targeted Therapeutic Approach for Chronic Lymphocytic Leukemia and Other B Cell Lymphomas

Mráz M.<sup>1-3</sup>, Doubek M.<sup>1,2</sup>, Mayer J.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN Brno

<sup>2</sup> CEITEC – Středoevropský technologický institut, MU, Brno

<sup>3</sup> University of California-San Diego, Moores Cancer Center, La Jolla, CA, USA

### Souhrn

Chronická lymfocytární leukemie (CLL) je nejčastější a stále konvenčními metodami nevléčitelnou leukemií dospělé populace v západním světě. Hromadí se poznatky o úloze signalizace zprostředkované B buněčným receptorem (BCR) v biologii maligních CLL B lymfocytů vedly k úvahám o možnosti klinického využití „BCR inhibitorů“. V nedávné době byly publikovány výsledky klinických studií tří různých molekul (fosfatinib, ibrutinib a GS-1101) inhibujících kinázy zapojené v BCR dráze (Syk, Btk, PI3K), které vedly k impresivní klinické odpovědi u CLL. Domníváme se, že výsledky těchto klinických studií mohou výrazně změnit léčbu chronické lymfocytární leukemie a některých dalších B buněčných lymfomů v několika následujících letech a „BCR inhibitory“ možná představují tolik hledanou „cílenou léčbu“. V následujícím textu shrneme poznatky o molekulární podstatě deregulace BCR signalizace u CLL lymfocytů a výsledky klinických studií využívajících jejich inhibitorů.

### Klíčová slova

BCR signalizace – B buněčný receptor – Btk protein – Syk protein – Lyn protein – PI3K – CAL-101 – PCI-32765 – R788

### Summary

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most frequent, yet by conventional therapy still incurable, leukemia in the Western world. Accumulating evidence of the role of B cell receptor (BCR) pathway in CLL B cell biology suggests the possible use of 'BCR inhibitors' for targeted therapy. Recently published results of clinical trials of three different molecules (fosfatinib, ibrutinib and GS-1101) targeting BCR-associated kinases (Syk, Btk, PI3K) showed impressive clinical activity in CLL. These findings will likely modify treatment approaches for chronic lymphocytic leukemia and some other B cell lymphomas in the near future. Herein, we review the data on BCR pathway deregulation in malignant CLL B cells, and the results of clinical trials utilizing fosfatinib, ibrutinib and GS-1101.

### Key words

BCR signaling – B cell receptor – Btk protein – Syk protein – Lyn protein – PI3K – CAL-101 – PCI-32765 – R788

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR č. NT11218-6/2010 a Grantovou agenturou ČR.

This study was supported by grant of Integral Grant Agency of the Czech ministry of Health No. NT11218-6/2010 and Grant Agency of CR.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



MUDr. Mgr. Marek Mráz, Ph.D.  
Moores Cancer Center, University of California-San Diego  
3855 Health Sciences Dr. #0820  
La Jolla, CA, 92093, USA  
e-mail: marek.mraz@email.cz

Obdrženo/Submitted: 16. 1. 2013

Přijato/Accepted: 24. 3. 2013

## Úvod

Chronická lymfocytární leukemie (chronic lymphocytic leukemia – CLL) představuje nejčastější leukemii dospělé populace v západním světě. Jedná se o onemocnění s velmi variabilním klinickým průběhem, u něž bylo popsáno množství klinicko-biologických faktorů přispívajících k patogenezi a prognóze (shrnuto v [1,2]). Přesto, že se jedná o jednu z nejčastěji studovaných B buněčných malignit, dosud se nepodařilo navrhnout vhodnou cílenou léčbu vycházející z identifikace kauzálních molekulárních aberací. Nedávno byly publikovány výsledky celogenomového a exomového sekvenování mnoha genomů CLL pacientů (shrnuto v [3]), které překvapivě ukázaly, že u CLL neexistuje žádná jednotlicí genová aberace a i ty nejčastější mutace se vyskytují u méně než 15 % případů. Pozornost výzkumníků se tedy opět obrátila k úloze deregulace BCR (B cell receptor – BCR) signalizace, která byla u CLL opakovaně popsána z mnoha úhlů a je možná tím základním patogenetickým mechanismem. Tyto domněnky podpořila recentní publikace v časopise Nature [4], která ukázala, že u CLL dochází ke konstitutivní signalizaci přes B buněčný receptor bez přítomnosti antigenu, což je zřejmá paralela k deregulaci aktivčních kináz u mnoha jiných nádorových onemocnění. Hromadí se poznatky o úloze BCR signalizace vedly k úvahám o terapeutickém využití její inhibice. V nedávné době byly publikovány výsledky klinických studií tří různých inhibitorů BCR dráhy (fostamatinib, ibrutinib a GS-1101), které vedly k léčebné odpovědi u výrazné části pacientů. Domníváme se, že výsledky těchto klinických studií jsou natolik zásadní, že mohou výrazně změnit terapii CLL v několika následujících letech a možná i představují onu tolik hledanou „cílenou léčbu“. Inhibice BCR signalizace je podstatný krok také v léčbě dalších B buněčných lymfomů, u nichž byla popsána dependence na BCR dráze (např. ABC subtyp DLBCL). V následujícím textu shrneme poznatky o molekulární podstatě deregulace BCR signalizace u maligních CLL lymfocytů a výsledky klinických studií využívajících jejich inhibitorů.

## BCR signalizace u normálních a CLL B lymfocytů

První poznatky o důležitosti BCR pro posání CLL patogeneze pocházejí ze studia struktury těžkého řetězce imunoglobulinu, který tvoří základní povrchovou komponentu BCR. Ve většině případů exprimují CLL buňky na membráně IgM a IgD imunoglobulin a na základě přítomnosti či absence somatických hypermutací v jeho těžkém řetězci je lze přiřadit k jednomu ze dvou klinicko-biologických subtypů onemocnění [5,6]. Pacienti, u nichž došlo k hypermutacím ve variabilní části těžkého řetězce imunoglobulinu (IgHV), mají lepší prognózu a předpokládá se, že tyto buňky prošly germinálním centrem lymfatické uzliny, kde došlo k aktivaci AID enzymu zodpovědného za tento proces [1]. Druhá polovina CLL pacientů nemá mutace v IgHV (nebo jen minimální množství) a u těchto buněk se předpokládá, že došlo k maligní transformaci B lymfocytu před vstupem do germinálního centra. Důležitost struktury imunoglobulinové komponenty BCR je také zřejmá z preferenčního zastoupení některých variabilních subgenů IgHV (např. V3–21, V1–69) nebo vzniku tzn. stereotypních receptorů, které jsou přítomny u cca 1/3 případů CLL [7]. Stereotypní IgHV receptory mají identickou strukturu oblasti CDR3 u nepřibuzných CLL pacientů. Oblast CDR3 vzniká při přeskupení imunoglobulinových subgenů (V-D-J-C) a představuje hlavní místo vazby antigenu na imunoglobulin. Tyto poznatky vedly k všeobecně akceptovanému názoru, že se na patogenezi CLL podílí stimulace antigenem, pravděpodobně auto-antigenem [6,8,9]. U CLL buněk také dochází k endocytóze povrchových IgM molekul, což je známou reakcí B lymfocytů na perzistentní kontakt s antigenem vedoucí k částečné anergii [6,10]. Bylo identifikováno několik antigenů, které se mohou vázat na Ig z CLL lymfocytů, a například představují produkty apoptických buněk [11–13]. Stimulace BCR receptoru antigenem vede k expresi genů pro-proliferčních a anti-apoptických drah, což chrání buňky před spontánní i indukovanou apoptózou [14–16]. Další důkaz významu BCR signalizace pro CLL pochází ze studie srovnáva-

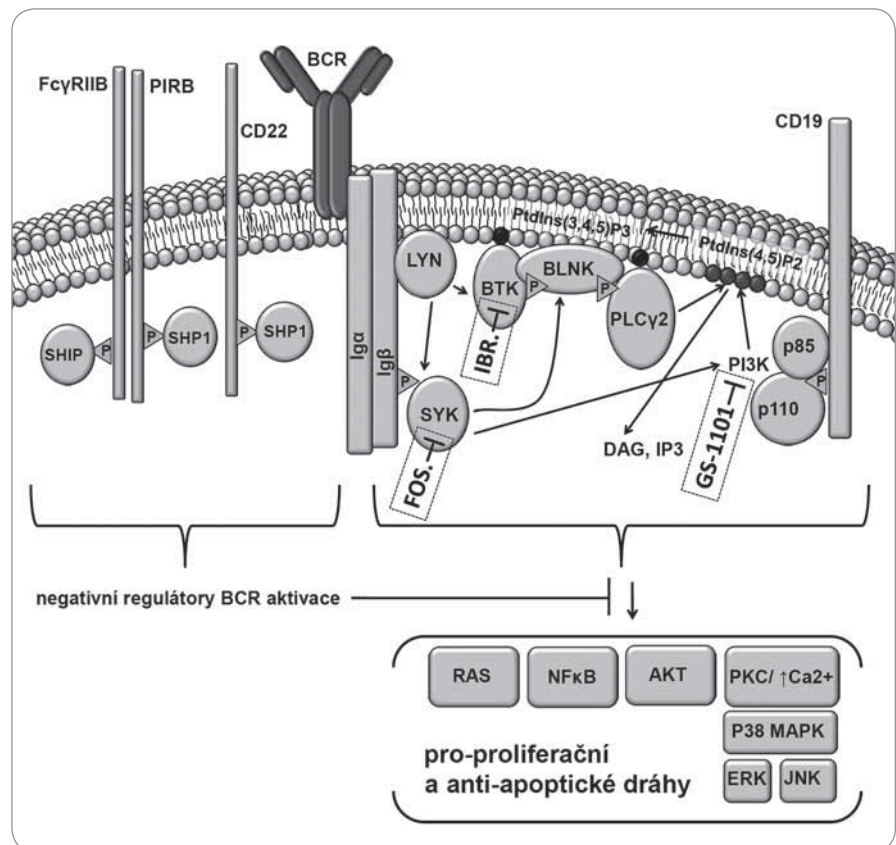
ající genovou expresi CLL buněk izolovaných z různých kompartmentů (periferní krev, lymfatická uzlina, kostní dřeň) [17]. Tato studie ukázala, že právě v lymfatických uzlinách, kde probíhá nejvýraznější proliferace CLL buněk, dochází k prominentní aktivaci BCR dráhy. Důležitost BCR signalizace byla také popsána u difuzního velkobuněčného lymfomu (DLBCL) a lymfomu z plášťových buněk (MCL). U MCL jsou v maligních B lymfocytech konstitutivně aktivní kinázy Syk nebo PKC $\beta$ II a u DLBCL se u agresivnějšího subtypu onemocnění, označovaného jako ABC (activated B cell-like), vyskytují mutace v BCR-modulujících proteinech CARD11, CD79b a CD79a [18,19].

Základní subtypy CLL definované přítomností/absencí mutací v IgHV se výrazně liší nejenom v prognóze [1], ale především v některých funkčních aspektech BCR signalizace. Buňky s nemutovaným IgHV odpovídají na stimulaci BCR *in vitro* výraznější aktivací signálních molekul a fosforylací kináz zodpovědných za aktivaci genů anti-apoptické odpovědi [1,20]. Na druhé straně CLL buňky s mutovaným IgHV exprimují menší množství IgM na svém povrchu a jsou více anergní vůči BCR stimulaci [6]. Je třeba zdůraznit, že tyto poznatky vycházejí ze studia CLL buněk získaných z periferní krve a pravděpodobně neodrážejí charakteristiky klíčové populace dělících se CLL buněk v lymfatických uzlinách a kostní dřeni. Zároveň bylo nedávno překvapivě popsáno, že specifická struktura BCR receptoru derivovaného z CLL buněk způsobuje konstitutivní signalizaci bez přítomnosti antigenu [4]. Tyto poznatky zatím nejsou zcela vysvětleny na molekulární úrovni, ale je pravděpodobné, že antigen-dependentní signalizace se u CLL buněk často kombinuje také s konstitutivní aktivací BCR dráhy.

Signalizace přes BCR zprostředkovává u CLL buněk nezbytné signály pro přežití, proliferaci, migraci a rezistenci k terapii [21,22]. Není překvapivé, že inhibice BCR dráhy má pro maligní lymfocyt fatální důsledky, uvědomíme-li si její důležitou úlohu pro osud vyvíjejícího se normálního B lymfocytu a klonální proliferaci maturovaného B lymfocytu. Dovo-

líme si zde stručně rekapitulovat klíčové proteiny a dráhy aktivované antigenem po vazbě na povrchový Ig. Imunoglobulinová komponenta BCR sama o sobě nemá kinázovou aktivitu a první kinázou odpovídající na jeho stimulaci je Lyn, která fosforyluje cytoplazmatické části BCR-asociovaných Iga a Igβ (ITAM), které následně slouží jako místa organizace „signalosomu“ (obr. 1, shrnuto v [23]). BCR signalizace je dále propagována kinázou Lyn rekrutující PI3K, kinázou Syk pomocí asociace s adaptorovou molekulou BLNK a kinázou Btk aktivující fosfolipázu PLCγ2. Pořadí, v kterém jsou jednotlivé kinázy a adaptorové molekuly sdruženy a aktivovány, bylo doposud studováno především na normálních B lymfocytech a v myších modelech, které prokázaly nezbytnost proteinů Syk, Btk, PI3K a fosfolipázy PLCγ2 pro funkce BCR [23]. Je zajímavé, že první responsivní kináza Lyn není nezbytně nutná pro BCR signalizaci a její inhibice může paradoxně vést k posílení BCR dráhy, neboť Lyn zastává klíčové funkce také v její inhibici a „ukončení“ BCR aktivity. Tyto inhibiční funkce, na rozdíl od jejich úloh v aktivaci BCR, nejsou redundantní a u myši s delecí genu pro Lyn dochází k hyperaktivaci B lymfocytů a vzniku těžké autoimunity [23].

Funkcí výše zmíněných kináz je aktivovat proteiny PLCγ2 a PI3K zodpovědné za integraci signálu a produkci tzv. druhých posílů. PLCγ2 produkuje inositol-1,4,5-trifosfát (IP3) a diacylglycerol (DAG), které vedou k vylití intracelulárních zásob kalcia a aktivaci proteinkinázy C, MAPK, ERK1/2, p38, transkripční aktivaci NFκB a dalších. PI3K je na membráně vázána k intracelulární části CD19 a dává vznik fosfatidylinositol 3,4,5-trifosfátu a posiluje BCR signalizaci přes další aktivaci Btk a Akt dráhu [23]. U CLL byla kromě výše zmíněných proteinů popsána důležitá úloha tyrosinkinázy ZAP-70, která zde ale pravděpodobně funguje spíše jako adaptorová molekula některé z kináz [24]. Rozdíly v expresi ZAP-70 jsou silně asociované s odpovědí CLL buněk na stimulaci BCR *in vitro* a jsou dobře známým prognostickým faktorem spojeným s nemutovaným IgHV [25]. Podobně také CD38 a C49d, obě asociované s prognózou CLL, napomáhají svými funkcemi v iniciaci BCR signalizace a možná tak in-



**Obr. 1. Schéma BCR signalizační dráhy (dle [23]).** BCR-signalizační dráha obsahuje množství vzájemně interagujících kináz (např. SYK, LYN, BTK, PI3K), fosfatáz (SHP-1, SHIP) a adaptorových molekul (BLNK). Výsledkem aktivace BCR dráhy je produkce druhých posílů např. IP3, DAG a aktivace pro-proliferačních/anti-apoptických drah jako NFκB, RAS, AKT, PKC, p38 MAPK, JNK, ERK apod. V současné době jsou klinicky testovány inhibitory BCR-signalizace působící na BTK (ibrutinib – IBR.) a SYK (fosfamatiniib – FOS.) a PI3K (GS-1101).

tegrují více signálů v mikroprostředí lymfatických orgánů, kde zprostředkovávají adhezi a migraci [26–28].

Inhibice BCR-asociovaných kináz ovlivňuje nejen signalizaci, ale také migraci B lymfocytů, což bylo zřejmé od počátečních aplikací těchto inhibitorů pacientům. Aplikace „BCR inhibitorů“ vyvolává u většiny CLL pacientů během několika dní mobilizaci B lymfocytů z uzlin a kostní dřeně [29]. Tato iniciální lymfocytóza vedla k obavám, zda u pacientů nedochází k progresi choroby při léčbě, neboť vzestup periferní lymfocytózy při chemo-/chemoimunoterapii je uznaným hodnotícím kritériem pro progresi. Transientní lymfocytóza trvající několik měsíců je například přítomna u 70 % pacientů léčených Btk inhibitorem ibrutinibem (viz níže), ale nebývá provázena klinickými příznaky hyperviskozity. V kontextu těchto

poznatků lze níže diskutované inhibitory klíčových enzymů BCR dráhy označit spíše za „BCR inhibitory v širším smyslu“, neboť specificky neinhibují pouze jednu molekulární dráhu. Je pravděpodobné, že právě kombinace inhibice několika drah, které jsou důležité pro přežití maligních B lymfocytů (BCR signalizace, signalizace chemokiny a integriny apod.), stojí za jejich dobrým klinickým efektem. Zároveň „BCR inhibitory“ prakticky postrádají myelotoxicitu, což dovoluje do jejich klinických studií zařazovat pacienty s hlubokou cytopenií, kteří by nebyli vhodní pro agresivní chemo-/chemoimunoterapeutické kombinace.

### „BCR inhibitory“

#### Inhibice Syk pomocí fostamatinibu

Syk (Spleen Tyrosine Kinase) představuje nerekceptorovou tyrosinkinázu, která ve

Tab. 1. Klinicky testované inhibitory BCR dráhy u CLL (dle [21,29,35,37,42,43,54–56]).

	<b>GS-1101 (CAL-101)</b> [37,42]	<b>Ibrutinib (PCI-32765)</b> [29,43]	<b>Fostamatinib(R788; R406)</b> [35]
cílová molekula inhibitoru	<b>PI3Kδ</b>	<b>BTK</b>	<b>SYK</b> (dále FLT3, KIT, LCK, JAK1, JAK3)
hlavní substráty inhibované kinázy	fosfatidyl-inositol PIP2	PLCγ2, PKCβ	substráty SYK: SYK, BLNK, BTK
inhibované (ovlivněné) molekulární dráhy	<b>BCR</b> , CD40, BAFF, TLR, IL-4R, IL-7R, RAS	<b>BCR</b> , CD40, BAFF, TLR, FcR, integriny a chemokiny zprostředkovaná signalizace	<b>BCR</b> , FcR, integriny a chemokiny zprostředkovaná signalizace
testovaná dávka	150 mg p.o. 2krát denně	420 mg nebo 840 mg p.o. 1krát denně	200 mg p.o. 2krát denně
kohorta	<b>54</b> (relabovaní pacienti)	<b>116</b> (3 kohorty: n = 31 nepředléčení pacienti; n = 61 relabovaní a refrakterní pacienti; n = 24 pacienti s vysokým rizikem (relaps do 2 let nebo del17p)	<b>15</b> (relabovaní nebo refrakterní CLL/SLL pacienti)
léčebná odpověď dle iwCLL kritérií (samostatný inhibitor)	uzlinová odpověď u 80 %; <b>PR</b> u 26 %; <b>PFS</b> více než 15 měsíců	<b>OR:</b> nepředléčení pacienti 71%; relabovaní a refrakterní pacienti 67 %; pacienti s vysokým rizikem 50 % <b>PFS po 22 měsících:</b> nepředléčení pacienti: 96 %; relabovaní/refrakterní pacienti + vysoké riziko 76 %	<b>PR</b> u 55 %; medián <b>PFS</b> 6,4 měsíců
nežádoucí účinky (3/4 stupně)	pneumonie 24 %; neutropenie 24 %; trombocytopenie 7 %; anémie 6 %	infekce 26 %; neutropenie a trombocytopenie u < 10 % pacientů	neutropenie 18 %; anémie 7 %; hypertenze 6 %
fáze klinického testování u CLL	ukončena fáze 1, pokračuje fáze 2/3	ukončena fáze 1, pokračuje fáze 2/3	ukončena fáze 2
probíhající testování u CLL v kombinaci	rituximab a/nebo bendamustin (Stanford University); ofatumumab (Cornell University)	rituximab (MD Anderson)	neprobíhá
klinické testování u jiných diagnóz	non-hodgkinské lymfomy	non-hodgkinské lymfomy	non-hodgkinské lymfomy; ukončena 1. studie fáze 3 u revmatoidní artritidy

PR (partial response) – parciální odpověď, OR (overall response) – celková odpověď, PFS (progression free survival) – podíl pacientů bez progresu

vývoji B lymfocytů zaujímá částečně redundantní funkce se ZAP-70 (význam ZAP-70 u CLL viz výše). Delece genu Syk v myším modelu způsobuje blok ve vývoji a absenci zralých B lymfocytů. U CLL byla popsána konstitutivní aktivace Syk (fosforylace pY352) u signifikantního množství pacientů a amplituda aktivace Syk v odpovědi na stimulaci BCR je také známkou agresivnějšího fenotypu [24,30,31]. Inhibice Syk kinázy přeruší

stromatem mediovanou rezistenci k apoptóze a inhibuje BCR-, chemokin- a integrin- dependentní signalizaci [16,30,32].

Fostamatinib (R788, FosD) je prvním „inhibitorem BCR signalizace“, který byl u CLL testován a prokázal životaschopnost tohoto terapeutického konceptu (opomineme-li dasatinib, který také částečně inhibuje tuto dráhu přes vazbu na Lyn). Fostamatinib je podáván orálně a konvertován na aktivní metabolit

(R406) [33], který inhibuje preferenčně Syk, ale také Flt3, Jak a Lck [34]. V klinické studii fáze 1/2 byl testován fostamatinib u 68 pacientů s relabujícím non-hodgkinským lymfomem, kteří zahrnovali také 15 CLL/SLL pacientů, z nichž 55 % dosáhlo klinické odpovědi (výsledky klinického testování shrnuty v tab. 1) [35]. U ostatních diagnóz dosáhl fostamatinib výrazně menšího procenta léčebné odpovědi – 22 % (5 z 23) u DLBCL, 10 %

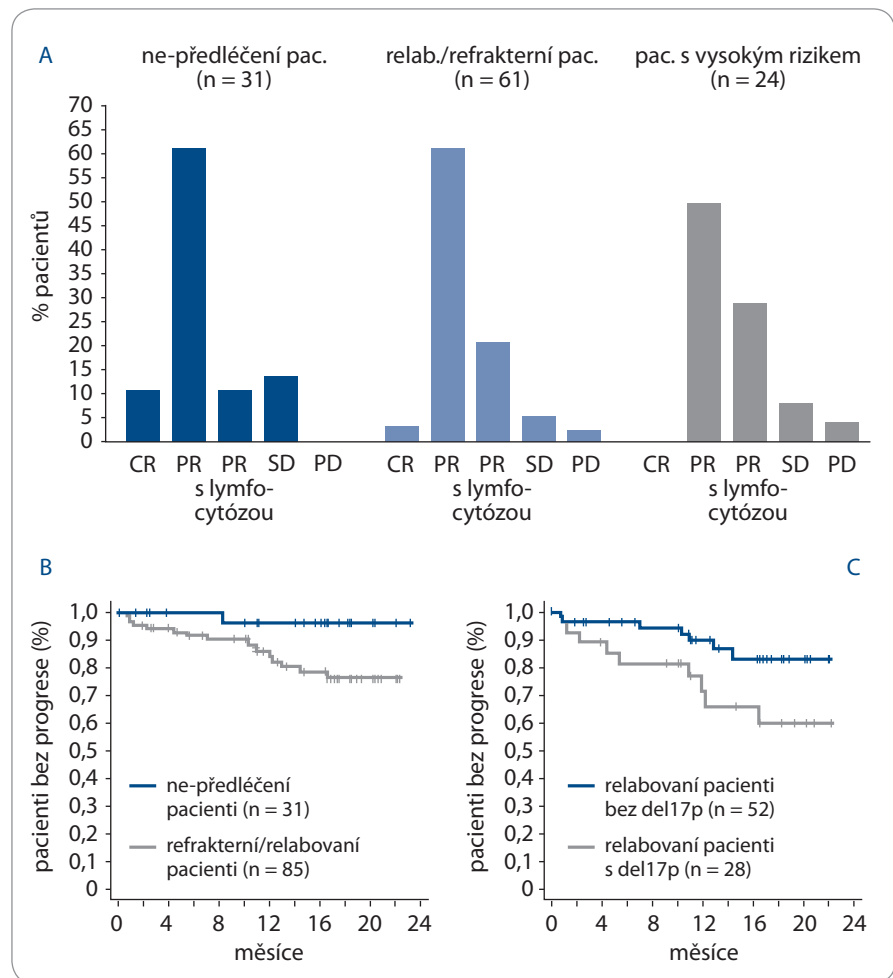
(2 z 21) u FL a 11% (1 z 9) u MCL [35]. V současném okamžiku nepokračuje testování u hematologických diagnóz, neboť výrobce (AstraZeneca) se soustředil na schválení preparátu pro léčbu revmatoidní artritidy. Lze však očekávat, že budou u CLL testovány nové, specifičtější inhibitory Syk.

### Inhibice PI3K pomocí GS-1101

PI3K se skládá z regulační subjednotky p85 a katalytické subjednotky p110, které integrují množství proliferčních a anti-apoptických signálů a dále je přenašejí prostřednictvím rekrutování Btk, PLC $\gamma$ 2 a aktivace Akt (obr. 1). V B lymfocytech se především vyskytuje jedna ze čtyř izoform enzymu označovaná jako PI3K delta ( $\delta$ ). Mutace inaktivující gen pro PI3K $\delta$  způsobuje u myši poruchu vyžívání B lymfocytů (především B1 a MZ) a produkce protilátek [23]. U CLL je PI3K konstitutivně více exprimována ve srovnání s normálními B lymfocyty a je aktivována podobně jako Syk v odpovědi na BCR stimulaci, chemokiny a adhezi přes integriny [36].

GS-1101 (dříve CAL-101, Gilead Sciences) byl vyvinut jako selektivní, orálně podávaný inhibitor PI3K izoformy  $\delta$ , tak aby se odstranilo maximum nežádoucích účinků způsobených inhibicí PI3K mimo hematopoetické buňky. Ve fázi 1/2 byl GS-1101 podán 54 CLL pacientům, z nichž u 80% došlo ke zmenšení lymfatických uzlin alespoň o 50% [37]. Vzhledem k lymfocytóze, která je přičítána inhibicí migrace a adheze maligních buněk (viz výše), byla celková terapeutická odpověď hodnocená dle standardních kritérií relativně nízká (26%) – výsledky klinického testování shrnuty v tab. 1. Tyto výsledky (společně s výsledky při podávání ibrutinibu, viz níže) vedly k zavedení provizorní kategorie hodnocení léčebné odpovědi „parciální odpověď s lymfocytózou“ a pravděpodobně povedou k přepracování hodnotících doporučení v tomto smyslu.

Předpokládaným mechanismem účinku GS-1101 je indukce apoptózy, inhibice BCR signalizace a také vliv na chemotaxi [38–41]. Podávání GS-1101 vede k normalizaci hladin chemokinu CXCL12 a CXCL13 u CLL pacientů, což by mohlo být využitelné jako marker odpovědi na léčbu [38]. Velmi zajímavé výsledky s lé-



**Obr. 2 A.** Klinická odpověď CLL pacientů (n = 116) na ibrutinib dle rizikové skupiny. CR – kompletní odpověď, PR – parciální odpověď, PR s lymfocytózou – parciální odpověď u pacienta, kde přetrvává ibrutinibem vyvolaná mobilizace maligních buněk do periferní krve, SD – stabilní choroba, PD – progresse. **Obr. 2 B, C.** Čas do progresse u pacientů léčených ibrutinibem. Převzato a upraveno z [29].

čebnou odpovědí u > 80% pacientů poskytuje kombinace GS-1101 s rituximabem nebo bendamustinem [42]. Kombinace léčiv mobilizujících maligní B lymfocyty do periferie s monoklonálními protilátkami je velmi racionální, neboť bylo prokázáno, že stromální buňky kostní dřeně a lymfatických uzlin chrání B lymfocyty před efekty terapeutických protilátek [28]. U kombinace „BCR inhibitorů“ s protilátkami je pozorován velmi dobrý klinický efekt při odstranění některých komplikací plynoucích z aplikace chemoterapeutické komponenty onkologických režimů [43].

### Inhibice Btk pomocí ibrutinibu

Brutonova tyrosinkináza (Btk) byla popsána při studiu primárního imunodefici-

citu projevujícího se nízkou koncentrací imunoglobulinů v séru a absencí B lymfocytů v periferní krvi. Tento imunodeficit byl nazván X-vázaná agamaglobulinemie (XLA) u lidí a X-vázaná imunodefice u myši s mutací v genu Btk [44]. Btk je k BCR signalosomu připojena v závislosti na aktivitě PI3K a má esenciální funkce v aktivaci PLC $\gamma$ 2, která produkuje DAG, IP3 a umožňuje vyplavení kalcia (obr. 1). Btk je také zapojena do mnoha dalších interakcí B lymfocytů v mikroprostředí [21,22,45,46]. Terapeutický potenciál Btk inhibitoru byl poprvé odhalen při studiu agresivních buněk ABC subtypu DLBCL, kde byla prokázána jejich vysoká dependence na BCR dráze [47].

Ibrutinib (PCI-32765) je orální ireverzibilní inhibitor fosforylace a enzymatické

aktivity Btk, který kromě BCR signalizace inhibuje stromatem a cytokiny mediovanou protekci před apoptózou [48–50]. První studie fáze I testovala ibrutinib (výrobce Pharmacyclics) u 50 pacientů s relabovaným a refrakterním B buněčným lymfomem, kde popsala klinickou odpověď u 60 % pacientů [51]. Zároveň byl v této studii využit sofistikovaný přístup s fluorescenčně značenou próbou vázající se na Btk, který umožnil sledování vlivu dávky ibrutinibu na jeho vazbu ke kináze. Pomocí tohoto přístupu bylo popsáno, že 420 mg 1krát denně je dostatečnou dávkou k inhibici více než 90 % aktivity Btk [51]. Do navazující studie fáze Ib/II u CLL [29] bylo zatím zařazeno 116 pacientů, kteří jsou rozděleni do tří kohort na základě agresivity onemocnění: (i) dosud neléčení pacienti nad 65 let, (ii) relabující a refrakterní pacienti a (iii) pacienti s vysokým rizikem, u nichž došlo k progresi choroby po léčbě do 24 měsíců a/nebo mají del17p (delece 17p zahrnující tumor-supresor p53 je nejagresivnějším subtypem CLL s mediánem přežití cca tři roky). U těchto kohort jsou testovány dávky 420 a 840 mg/denně. Doposud zveřejněné výsledky jsou bezprecedentní, neboť bez ohledu na nepříznivé prognostické faktory dosahuje tato léčba vysokého procenta klinických odpovědí (> 80 %) a u pacientů navozuje dlouhotrvající remisi (tab. 1, obr. 2 A). Předpokládán čas bez progresu po 22 měsících sledování je u relabovaných/refrakterních pacientů 76 % (n = 85) a u nepředléčených pacientů 96 % (n = 31), viz obr. 2 B, C. Podobně předpokládané přežití po 22 měsících je u relabovaných/refrakterních pacientů 85 % (n = 85) a u nepředléčených pacientů 96 % (n = 31). Hlavním nežádoucím účinkem léčby (stupeň ≤ 2) je diarea (54 %), fatigue (29 %), infekce horních cest dýchacích (29 %), rash (28 %), nausea (26 %) a atalgie (25 %). Hematologická toxicita stupně ≥ 3 je relativně vzácná (< 10 %) a nevykazuje známky kumulativní toxicity. Je zajímavé, že přes známý vliv absence funkčního Btk na vznik agamaglobulinemie k tomuto u CLL pacientů nedochází a léčba způsobuje spíše vyšší hladiny IgA a nemá efekt na plazmatické hladiny IgG/IgM [29]. Podobně

jako u GS-1101 je ibrutinib nyní testován v kombinaci s rituximabem [43] a pro účely registrace FDA porovnáván s léčbou chlorambucilem.

Ibrutinib se také ukázal dobře účinným u lymfomu z plášťových buněk, který je obecně obtížně léčitelný a se špatnou prognózou [52]. V této studii byl ibrutinib podán 48 pacientům, z nichž 19 mělo za sebou léčbu bortezomibem. Pacienti ve studii byli všichni starší 60 let (medián 67 let), s mediánem počtu předěšlých terapií 2 (1–5). Terapeutické odpovědi dle IWG kritérií bylo dosaženo u 67 % pacientů (58 % u bortezomib-nepředléčených a 75 % u bortezomib-předléčených). Nejčastějším nežádoucím efektem byla stejně jako u CLL diarea a léčba byla prakticky bez známek myelotoxicity [52].

Zajímavých výsledků bylo také dosaženo při podání ibrutinibu pacientům s DLBCL, kteří byli rozděleni pro hodnocení účinnosti na prognosticky nepříznivý subtyp ABC (activated B cell, n = 29) a prognosticky příznivý subtyp GC (germinal center, n = 20) [53]. Autoři studie předpokládali, že na rozdíl od klasické terapie můžeme u pacientů s ABC očekávat lepší terapeutickou odpověď, neboť byla popsána „závislost“ těchto buněk na BCR dráze a četné mutace v CD79a/b, které ji konstitutivně aktivují. Tato hypotéza se potvrdila a u subtypu ABC dosáhlo klinické odpovědi 40 % pacientů ve srovnání s 5 % u subtypu GC. Subtyp ABC byl vůči ibrutinibu responsivní bez ohledu na přítomnost (60 % pacientů) či absenci mutace v CD79b [53]. Tyto výsledky naznačují potenciál ibrutinibu v léčbě u agresivního DLBCL a již jsou testovány možnosti synergie s mTOR inhibitory.

### Závěr

Intenzivní výzkum molekulární patogeneze B buněčných lymfomů umožnil odhalení dependence některých těchto onemocnění či subtypů onemocnění na aktivaci BCR signalizace. Klinické testování molekul, které inhibují BCR-asociované kinázy, prokázalo, že je možné toto využít k účinné cílené léčbě CLL a některých lymfomů. Obrovskou výhodou těchto „BCR inhibitorů“ je jejich minimální myelotoxicita, orální aplikace, dobrý efekt i u onemocnění refrak-

terního na cytostatika (např. pacienti s aberací p53 u CLL, ABC subtyp DLBCL) a potenciál ke kombinaci s monoklonálními protilátkami, jejichž účinek potencují. Zůstává otázkou, do jaké míry jsou efekty „BCR inhibitorů“ kombinací jejich vlivu na další důležité dráhy, v nichž jsou cílové kinázy zapojeny (především migrace a adheze). Lepší pochopení mechanismu účinku je nezbytné pro jejich případné vzájemné kombinace a odhalení molekulárních mechanismů rezistence. V případě CLL se zdá, že léčba ibrutinibem či GS-1101 bude ve velmi blízké době schválena americkou F. D. A. (Federal Drug Agency) a stane se standardním režimem u tohoto onemocnění.

### Podíl autorů na rukopisu

Marek Mráz sepsal rukopis. Všichni autoři revidovali rukopis a přispěli k diskuzi nad relevancí publikovaných studií. Marek Mráz děkuje za diskuzi nad tématem Dr. T. J. Kippsovi a Dr. M. Choiovi (University of California, San Diego).

### Literatura

- Mráz M, Pavlová Š, Malčíková J et al. Molekulární patogeneze chronické lymfocytární leukémie. *Transfuzie a hematologie* dnes 2010; 16: 16–20.
- Zenz T, Mertens D, Küppers R et al. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2010; 10(1): 37–50.
- Mráz M, Trbušek M, Doležalová D et al. Identifikace patogeneticky významných mutací u chronické lymfocytární leukémie pomocí „sekvenování nové generace“. *Transfuzie a hematologie* dnes 2012; 18: 72–75.
- Dühren-von Minden M, Übelhart R, Schneider D et al. Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature* 2012; 489(7415): 309–312.
- Packham G, Stevenson F. The role of the B-cell receptor in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Semin Cancer Biol* 2010; 20(6): 391–399.
- Stevenson FK, Krysov S, Davies AJ et al. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011; 118(16): 4313–4320.
- Agathangelidis A, Darzentas N, Hadzidimitriou A et al. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood* 2012; 119(19): 4467–4475.
- Caligaris-Cappio F, Ghia P. Novel insights in chronic lymphocytic leukemia: are we getting closer to understanding the pathogenesis of the disease? *J Clin Oncol* 2008; 26(27): 4497–4503.
- Herve M, Xu K, Ng YS et al. Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. *J Clin Invest* 2005; 115(6): 1636–1643.
- Krysov S, Potter KN, Mockridge CI et al. Surface IgM of CLL cells displays unusual glycans indicative of engagement of antigen in vivo. *Blood* 2010; 115(21): 4198–4205.
- Catera R, Silverman GJ, Hatzi K et al. Chronic lymphocytic leukemia cells recognize conserved epitopes as-

- sociated with apoptosis and oxidation. *Mol Med* 2008; 14(10–12): 665–674.
12. Chu CC, CATERA R, Zhang L et al. Many chronic lymphocytic leukemia antibodies recognize apoptotic cells with exposed nonmuscle myosin heavy chain IIA: implications for patient outcome and cell of origin. *Blood* 2010; 115(19): 3907–3915.
  13. Steinger C, Widhopf GF, Ghia EM et al. Recombinant antibodies encoded by IGHV1–69 react with pUL32, a phosphoprotein of cytomegalovirus and B-cell superantigen. *Blood* 2012; 119(10): 2293–2301.
  14. Krysov S, Dias S, Paterson A et al. Surface IgM stimulation induces MEK1/2-dependent MYC expression in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2012; 119(1): 170–179.
  15. Potter KN, Mockridge CI, Neville L et al. Structural and functional features of the B-cell receptor in IgG-positive chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2006; 12(6): 1672–1679.
  16. Quiroga MP, Balakrishnan K, Kurtova AV et al. B-cell antigen receptor signaling enhances chronic lymphocytic leukemia cell migration and survival: specific targeting with a novel spleen tyrosine kinase inhibitor, R406. *Blood* 2009; 114(5): 1029–1037.
  17. Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF- $\kappa$ B activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011; 117(2): 563–574.
  18. Ceconi D, Zamò A, Bianchi E et al. Signal transduction pathways of mantle cell lymphoma: a phosphoproteome-based study. *Proteomics* 2008; 8(21): 4495–4506.
  19. Lenz G, Davis RE, Ngo VN et al. Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science* 2008; 319(5870): 1676–1679.
  20. Guarini A, Chiaretti S, Tavaloro S et al. BCR ligation induced by IgM stimulation results in gene expression and functional changes only in IgH unmutated chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Blood* 2008; 112(3): 782–792.
  21. Burger JA. Inhibiting B-cell receptor signaling pathways in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Hematol Malig Rep* 2012; 7(1): 26–33.
  22. Burger JA. Targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia is changing the therapeutic landscape. *Curr Opin Oncol* 2012; 24(6): 643–649.
  23. Dal Porto JM, Gauld SB, Merrell KT et al. B cell antigen receptor signaling 101. *Mol Immunol* 2004; 41(6–7): 599–613.
  24. Chen L, Widhopf G, Huynh L et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100(13): 4609–4614.
  25. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2004; 351(9): 893–901.
  26. Deaglio S, Capobianco A, Bergui L et al. CD38 is a signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2003; 102(6): 2146–2155.
  27. Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S et al. CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. *Blood* 2007; 110(12): 4012–4021.
  28. Mraz M, Zent CS, Church AK et al. Bone marrow stromal cells protect lymphoma B-cells from rituximab-induced apoptosis and targeting integrin  $\alpha$ -4- $\beta$ -1 (VLA-4) with natalizumab can overcome this resistance. *Br J Haematol* 2011; 155(1): 53–64.
  29. Byrd JC, Furman RR, Coutre S et al. The Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) Inhibitor Ibrutinib (PCI-32765) Promotes High Response Rate, Durable Remissions, and Is Tolerable in Treatment Naïve (TN) and Relapsed or Refractory (RR) Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) or Small Lymphocytic Lymphoma (SLL) Patients Including Patients with High-Risk (HR) Disease: New and Updated Results of 116 Patients in a Phase Ib/II Study *Blood* 2012; American Society of Hematology Annual Meeting, December. Atlanta, USA: abstract 189.
  30. Gobessi S, Laurenti L, Longo PG et al. Inhibition of constitutive and BCR-induced Syk activation downregulates Mcl-1 and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia* 2009; 23(4): 686–697.
  31. Gobessi S, Laurenti L, Longo PG et al. ZAP-70 enhances B-cell-receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells. *Blood* 2007; 109(5): 2032–2039.
  32. Buchner M, Baer C, Prinz G et al. Spleen tyrosine kinase inhibition prevents chemokine- and integrin-mediated stromal protective effects in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2010; 115(22): 4497–4506.
  33. Weinblatt ME, Kavanaugh A, Burgos-Vargas R et al. Treatment of rheumatoid arthritis with a Syk kinase inhibitor: a twelve-week, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2008; 58(11): 3309–3318.
  34. Braselmann S, Taylor V, Zhao H et al. R406, an orally available spleen tyrosine kinase inhibitor blocks  $\text{fc}$  receptor signaling and reduces immune complex-mediated inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 319(3): 998–1008.
  35. Friedberg JW, Sharman J, Sweetenham J et al. Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2010; 115(13): 2578–2585.
  36. Ringshausen I, Schneller F, Bogner C et al. Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase Cdelta. *Blood* 2002; 100(10): 3741–3748.
  37. Coutre SE, Byrd JC, Furman RR et al. Phase I study of CAL-101, an isoform-selective inhibitor of phosphatidylinositol 3 kinase P110 $\delta$ , in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia. *American Society of Clinical Oncology Meeting June 1–15, Chicago, USA. J Clin Oncol* 2011; 29 (Suppl 15): abstract 6631.
  38. Hoellenriegel J, Meadows SA, Sivina M et al. The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011; 118(13): 3603–3612.
  39. Meadows SA, Vega F, Kashishian A et al. PI3K inhibitor, GS-1101 (CAL-101), attenuates pathway signaling, induces apoptosis, and overcomes signals from the microenvironment in cellular models of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2012; 119(8): 1897–1900.
  40. Castillo JJ, Furman M, Winer ES. CAL-101: a phosphatidylinositol-3-kinase p110-delta inhibitor for the treatment of lymphoid malignancies. *Expert Opin Investig Drugs* 2012; 21(1): 15–22.
  41. Lannutti BJ, Meadows SA, Herman SE et al. CAL-101, a p110delta selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability. *Blood* 2011; 117(2): 591–594.
  42. Coutre SE, Leonard JP, Furman RR et al. Combinations of the Selective Phosphatidylinositol 3-Kinase-Delta (PI-3Kdelta) Inhibitor GS-1101 (CAL-101) with rituximab and/or bendamustine are tolerable and highly active in patients with relapsed or refractory Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): Results from a phase I study *American Society of Hematology Annual Meeting, December 2012. Atlanta, USA: abstract 191.*
  43. Burger JA, Keating MJ, Wierda WG et al. The Btk Inhibitor Ibrutinib (PCI-32765) in combination with rituximab is well tolerated and displays profound activity in high-risk Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Patients. *American Society of Hematology Annual Meeting, December 2012. Atlanta, USA: abstract 187.*
  44. Rawlings DJ, Saffran DC, Tsukada S et al. Mutation of unique region of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. *Science* 1993; 261(5119): 358–361.
  45. Buggy JJ, Elias L. Bruton tyrosine kinase (BTK) and its role in B-cell malignancy. *Int Rev Immunol* 2012; 31(2): 119–132.
  46. Honnigberg LA, Smith AM, Sirisawad M et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(29): 13075–13080.
  47. Davis RE, Ngo VN, Lenz G et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 2010; 463(7277): 88–92.
  48. Herman SE, Gordon AL, Hertlein E et al. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood* 2011; 117(23): 6287–6296.
  49. Ponader S, Chen SS, Buggy JJ et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo. *Blood* 2012; 119(5): 1182–1189.
  50. Winer ES, Ingham RR, Castillo JJ. PCI-32765: a novel Bruton's tyrosine kinase inhibitor for the treatment of lymphoid malignancies. *Expert Opin Investig Drugs* 2012; 21(3): 355–361.
  51. Advani RH, Buggy JJ, Sharman JP et al. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *J Clin Oncol* 2012; 31(1): 88–94.
  52. Wang L, Martin P, Blum KA. The Bruton's tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 is highly active as single-agent therapy in previously-treated Mantle Cell Lymphoma (MCL): Preliminary results of a Phase II trial. *American Society of Hematology Annual Meeting, December 2011. San Diego, USA: abstract 442.*
  53. Wilson WH, Gerecitano JF, Goy A et al. The Bruton's tyrosine kinase (BTK) Inhibitor, Ibrutinib (PCI-32765), Has Preferential Activity in the ABC subtype of relapsed/refractory de novo diffuse large B-Cell Lymphoma (DLBCL): Interim Results of a Multicenter, Open-Label, Phase 2 Study. *American Society of Hematology Annual Meeting, December 2012. Atlanta, USA: abstract 686.*
  54. Wiestner A. Emerging role of kinase-targeted strategies in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012; 120(24): 4684–4691.
  55. Woyach JA, Johnson AJ, Byrd JC. The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood* 2012; 120(6): 1175–1184.
  56. Flinn IW. B-cell receptor inhibitors in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Adv Hematol Oncol* 2011; 9(8): 605–606.