

Ruxolitinib ve etki mekanizmaları

Ruxolitinib and effect mechanisms

Bakiye Göker Bağca, Çığır Biray Avcı

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Öz

Ruxolitinib JAK1 ve JAK2 tirozin kinazlarının inhibitörüdür. Jakafi adıyla piyasaya sürülen ruxolitinib, miyelofibroz tedavisinde onaylanan ilk kimyasal ajan olarak 2011 yılından beri kullanılmaktadır. Miyeloproliferatif neoplazmlar (MPN) Philadelphia kromozom (Ph) pozitif ve negatif hastalıkları içerir. 2001 yılında imatinib tirozin kinazının geliştirilmesinden bu yana Ph+ kronik miyeloid lösemi tedavisinde tirozin kinaz inhibitörlerine odaklanılmıştır. Direnç gelişimine bağlı olarak yeni nesil tirozin kinaz inhibitörleri geliştirilmiş ve kullanılmıştır. Bunun tersine Ph- MPN'lerde hedefli tedavi daha az anlaşılabilir bir konudur. Ph-MPN'ler genellikle JAK-STAT yolağının mutasyonlarından kaynaklanır. Bu derlemede hem Ph+ hem de Ph-MPN'lerde en güncel tirozin kinaz inhibitörü olan ruxolitinib ile oluşturulabilecek hedefli tedavi seçenekleri incelenmiştir.

Anahtar sözcükler: Mekanizmalar; miyeloproliferatif neoplazmlar; ruxolitinib.

ABSTRACT

Ruxolitinib is the inhibitor of JAK1 and JAK2 tyrosine kinases. Known as Jakafi, ruxolitinib is the first approved chemical agent for myelofibrosis treatment which has been used since 2011. Myeloproliferative neoplasms (MPN) include Philadelphia chromosome (Ph) positive and negative disorders. Since the development of imatinib in 2001, treatment of Ph+ chronic myeloid leukemia has focused on tyrosine kinase inhibitors. New generation tyrosine kinase inhibitors were improved and used depending on development of resistance. On the contrary, targeted therapy in Ph- MPNs is a contemporary topic that is less discovered. MPNs usually arise from mutations in JAK-STAT pathway. In this review, we analyze targeted therapy options via ruxolitinib as the most current tyrosine kinase inhibitor for both Ph+ and Ph- myeloproliferative neoplasms.

Keywords: Mechanisms; myeloproliferative neoplasm's; ruxolitinib.

Miyeloproliferatif neoplazmlar (MPN) kemik iliğinin klonal hastalığıdır.^[1] Dünya Sağlık Örgütü'nün 2008'de revize ettiği miyeloid malignansilerin sınıflandırılmasına göre primer miyelofibroz (PMF), polisitemia vera (PV), trombositemia (ET) Philadelphia (Ph) negatif klasik miyeloproliferatif olarak adlandırılan miyeloproliferatif neoplazmların (MPN) gruplarıdır.^[1,2] Miyelofibroz (MF) ileri yaş grubunu etkileyen (>60 yaş) aşamalı olarak ilerleyen kemik iliği fibrozu, yetersiz hematopoiez, sitopeni, anemi, splenomegali (dalak genişlemesi) semptomlarıyla karakterize bir hastalıktır.^[3] Klonal bir hastalık olan MF bu karakterize özelliklerinin yanı sıra gece terlemesi, ateş, kilo

kayıbı gibi yapısal semptomlarla birlikte erken ölüm riski de taşımaktadır.^[4] Miyelofibroz terimi PMF hastalarını tanımlamakla birlikte; fenotipik olarak PV ve ET'yi takip eden post-PV MF ve post-ET MF hastalıklarını tanımlamak için de kullanılmaktadır.^[5] Ayrıca PMF büyük ölçüde akut miyeloid lösemiye dönüşme riski taşımaktadır.^[8] Miyelofibroz için kullanılmakta olan tedavi yöntemleri hem palyatif açıdan hem de iyileştirici özellikleri bakımından yeterli değildir.^[6,7] Miyelofibroz ilişkili anemi rekombinant eritropoietin, androjenler ve talidomid gibi ilaçlarla ya da transfüzyonla tedavi edilir.^[6,7] Miyelofibroz ilişkili splenomegalinin ise hidroksiüre gibi mevcut ilaçlarla tedavisi

zor olduğundan pek çok hasta splenektomi/splenektomi işlemine ya da zorlu radyoterapi sürecine maruz kalmaktadır.^[6,7] Hastalığın ileri evrelerinde uygulanan allojenik kök hücre nakli ise önemli ölçüde mortalite ve morbidite ile ilişkilendirilmiştir. Miyelofibroz tedavisinde kullanılan standart yöntemlerin hastalık semptomlarını yönetmede etkili olmaması bu yöndeki ihtiyacı ortaya koymuştur.^[6,7]

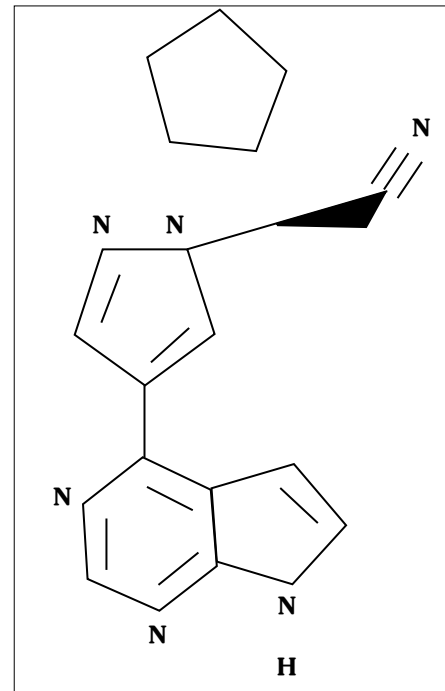
Ph-MPN gruplarından biri olan MF'nin moleküler patogenezi tam olarak aydınlatılmamış olsa da hastalığa dair belli mutasyonlar tanımlanmıştır. 2005 yılında birbirinden bağımsız grupların Janus kinaz 2 (JAK2) geninde 617. kodondaki valinin fenilalanine dönüşmesine neden olan bir 1849. nükleotit olan guaninin (G) timine (T) değiştiği JAK2V617F mutasyonunu keşfetmişlerdir.^[9] Bu mutasyonların çeşitli tip MPN'li hastaların büyük çoğunluğunda bulunduğu (PV'de %95, ET'de %50 PMF'de %20) olarak bildirilmesi JAK'ları önemli bir konu olarak gündeme taşımıştır.^[9]

JAK olarak bilinen Janus kinaz ailesi yedi tane JAK homolog (JH) domaini ile karakterize edilmiş JAK1, JAK2, JAK3 ve non-reseptör tirozin kinaz 2 (TYK2) tirozin kinazlarından oluşur.^[10] JAK ailesi kinazları STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B ve STAT6 transkripsiyon faktörlerini içeren STAT'larla (signal transducer and activator of transcription) birlikte JAK-STAT sinyal iletim yolağını oluşturur.^[10] JAK-STAT sinyal iletim yolağı gen ekspresyonunu düzenleyen etkili ve karmaşık bir sistemdir.^[11] Sitokinler, hormonlar ya da büyüme faktörleri gibi çeşitli etkenlerle reseptörün uyarılması JAK aktivasyonuna, bu da STAT'ların seçici olarak fosforillenmesine neden olur. Fosforillenen STAT'lar dimerize olarak nükleusa yönelir ve gen regülasyonunu düzenlemek üzere hedef genin promotör bölgesine bağlanırlar.^[12] JAK-STAT yolağının aktivasyonu aracılığıyla hücre bölünmesi, hücre göçü ve apoptozun uyarılması, bu sinyal yolağındaki bozuklukların MF'yi de içeren hematolojik malignansilerin oluşumuyla ilişkilendirilmesine neden olmuştur.^[12]

Ruxolitinib (INCB018424) güçlü, seçenekli JAK1 ve JAK2 inhibitörüdür.^[13] Temel etkisi JAK'ın STAT'ı fosforile edebilmesini önleyerek hücre bölünmesini engelleme ve apoptoz indüksiyonudur.^[13] Ruxolitinib (INCB018424) tirozin kinaz inhibitörü olma özelliği ile MF tedavisinde kullanılmaya başlayan ilk ajandır.^[14] Moleküler

yapısı Şekil 1'de görüldüğü gibi olan ruxolitinibin (INCB018424) kimyasal özellikleri Tablo 1'de verilmiştir. Ruxolitinibin 2011 yılının Kasım ayında FDA tarafından onaylanarak klinikte kullanılan şekli ise bir fosfat grubu eklenmiş olan ruxolitinib fosfattır. Ruxolitinib fosfatın görünüş ve moleküler ağırlık gibi bazı özellikleri değişmiş durumdadır (Tablo 2).^[15]

İnsan JAK1 (837-1142), JAK2 (828-1132), JAK3 (781-1124), Tyk2 (873-1187) kinaz domainleri N-terminal epitop etiketleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)'nda çoğaltılmış, SF21 hücreleri aracılığıyla rekombinant proteinlerinin üretimi gerçekleştirilmiş, bu rekombinant proteinlere 200nM ruxolitinib uygulanarak "TR-FRET" yöntemi ile ruxolitinibin inhibitör konsantrasyon (IC₅₀) değerleri belirlenmiştir. JAK2 için 2.8 nM, JAK1 için 3.3 nM, JAK3 için 428 nM Tyk2 için 19 nM olarak belirlenen değerlerle birlikte ruxolitinib seçici ve güçlü JAK1 ve JAK2 inhibitörü olarak belirlenmiştir. İnterleukin 6 (IL-6) ve thrombopoietin (TPO) ile sitümüle edilmiş heparinli tam kan testleri kullanılarak artırılmış ruxolitinib dozu uygulanması sonucunda fosforile STAT3 ile "ELISA yöntemi" kullanılarak IC₅₀ değerleri JAK1 için (IL-6 aracılığıyla) 282 nM, JAK2 için (TPO aracılığıyla) 281 nM olarak



Şekil 1. Ruxolitinibin moleküler yapısı.

Tablo 1. Ruxolitinibin kimyasal özellikleri

INCB numarası	INCB018424, INC424
CAS numarası	941678-49-5
Etki şekli	JAK1 JAK2 inhibitörü
Moleküler ağırlığı	306.37 g/mol
Molekül formülü	C17H18N6
Görünüş	Açık sarı renkte toz
Saklama	-20 °C'de 2 yıl
IUPAC adlandırması	(R)-3-(4-(7H-pyrrolo[2,3d]pyrimidin-4-yl)-1H-pyrazol-1-yl)-3-cyclopentylpropanetnitrile

Tablo 2. Ruxolitinib fosfatın kimyasal özellikleri

Klinikte kullanılan şekli	Ruxolitinib fosfat
Klinikteki adı	Jakafi (Novartis)
Lisans kurum/tarih	FDA/Kasım 2011
CAS numarası	1092939-17-7
Moleküler ağırlığı	404.36 g/mol
Molekül formülü	C17H18N6.H3O4P
Görünüş	Açık pembe toz
IUPAC adlandırması	(R)-3-(4-(7H-pyrrolo[2,3d]pyrimidin-4-yl)-1H-pyrazol-1-yl)-3-cyclopentylpropanetnitrile fosphat

belirlenmiştir. JAK2V617F-pozitif hücrelere ruxolitinib uygulanmasının canlılık, büyüme, çoğalmayı azalttığı gösterilmiştir. JAK2V617F-pozitif hücrelere 150 nM, 400 nM, 1000 nM ruxolitinib uygulanmasıyla kontrole göre sırasıyla 4.3, 7.2 ve 13.2 kat apoptoz artışı olduğu gösterilmiştir. Polisitemia vera'lı JAK2V617F-pozitif hastalardan elde edilen hücrelerle yapılan çalışmalarla ruxolitinibin eritroid ve miyeloid progenitörlerin gelişimini doz bağımlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. IC₅₀ değeri eritroid progenitörler için 223 nM, miyeloid progenitörler için 444 nM olarak bulunmuştur.^[16]

Fare modellerinde MF oluşturulmuş, bu fareler iki gruba ayrılmış ve gruplardan birine üç hafta boyunca ruxolitinib uygulaması yapılmıştır. Ruxolitinib almayan farelerde 15. günden itibaren ölümler başlamış ve 20. günde farelerin neredeyse %90'ının öldüğü gözlenmiştir. Ruxolitinib uygulaması farelerin ölüm oranını büyük ölçüde azaltmıştır. Dalak büyüklüklerinin incelenmesiyle ruxolitinib uygulamasının splenomegaliyi belirgin ölçüde azalttığı görülmüştür. Dalaktan elde edilen örneklerin PZR'de çoğaltılmasıyla JAK2V617F sıklığının yaklaşık %33 oranında azaldığı belirlenmiştir. Histolojik incelemeler sonucunda ruxolitinibin malignan hücrelerin oranını azalttığı da belirlenmiştir. Bütün bu çalışmalar ruxolitinibin MF tedavisinde kullanılabileceği fikrini desteklemektedir.^[16]

Ruxolitinibin JAK2V617F-pozitif ve negatif PMF ya da post-ET ve post-PV MF hastalarında faz 1 ve 2 çalışmaları yapılmıştır.^[17] Başlangıç dozu olarak günde iki kere 25 mg ya da tek doz 100 mg ruxolitinib alan 153 hastanın tamamında ortalama 14.7 ayda etki görülmüştür. Günde 2 kez 15 mg uygulanan başlangıç dozu en etkili ve güvenli doz olarak belirlenmiştir. Bu dozda 33 hastanın 17'sinde (%52) 12 ay veya daha fazla süren hızlı bir objektif yanıt (splenomegalinin 50

azalması) sağlanmış ve bu terapi sonucunda evre 3 ve 4 hastaların sadece %10'undan az bir bölümünde miyelosüpresyon gibi yan etkiler gözlenmiştir. Kilo kaybı, yorgunluk, gece terlemeleri ve kaşıntı gibi zayıf düşürücü belirtileri olan hastalarda hızlı bir iyileşme görülmüştür. Klinik faydalar yaygın MF'de yükseltilmiş enflamatuar sitokinlerin dolaşımdaki seviyelerinin anlamlı bir azalması ile ilişkilendirilmiştir. Günde iki kez 15 mg ve günde iki kez 25 mg ruxolitinib alan hastalarda splenomegalide %50 ve daha fazla azalma ile klinik iyileşme gösterilmiştir. Altı ay boyunca günde iki kez 10-25 mg dozunda ruxolitinib alan hastaların gece terlemesi, kaşıntı, karın ağrısı, kemik veya kas ağrısı semptomlarında en az %50 azalma oluşmuştur. Günde iki kez 10 mg ila 25 mg ruxolitinib alan hastalarda vücut kütle indeksine bağlı olarak ağırlık artışı görülmüştür.^[17] Tüm bu olumlu sonuçlar ruxolitinibin MF tedavisinde kimyasal ajan olarak kullanılmasına olanak tanımıştır.

Güçlü ve seçenekli JAK1 ve JAK2 inhibitörü olan ruxolitinib, kemokin ve sitokinlerle ilişkilendirilmiş hastalıkların tedavisinde de güncel bir konu olarak yerini almaya başlamıştır. Chemoattractant protein 1 [CC chemokine ligand 2 (Ccl2)] geni tarafından kodlanan MCP1 monosit kemotaksik proteinler ailesinden bir kemokindir ve fibroblastlar ile makrofajlarda üretilmektedir. MCP1 ilişkili olarak çeşitli alerjik enflamasyonların yanı sıra plazmadaki protein seviyesine bağlı olarak romatoid artrit ve diyabet, genin polimorfizmleri ile ilgili de tüberküloz ve psoriasis hastalıkları tanımlanmıştır. Pattison ve ark.nın^[18] yaptıkları çalışmada LPS ya da poly (I:C) sitümülayonu ile gerçekleşen MCP1 üretiminin devamlılığının interferon beta (IFN β) aracılı bir geri besleme döngüsüne gereksinim duyduğu gösterilmiştir. Buna uygun şekilde, ekzojen IFN β diğer uyarıcıların yokluğunda MCP1 üretimini indükleyebilmektedir. İnterferon beta sinyalinin

ruxolitinib ile engellenmesi, MCP1 transkripsiyonunu inhibe etmiştir. MCP1 promotörü potansiyel bir STAT bağlanma bölgesi içermektedir, çalışma ile STAT1'in IFN β sitümlasyonunu gerçekleştirdiği de gösterilmiştir.^[18] Böylece JAK inhibitörü olan ruxolitinibin MCP1 transkripsiyonunu ayarlayabildiği farelerle yapılan deneylerde *in vivo* olarak gösterilmiştir. Bu çalışma MCP1 ile ilişkilendirilen alerjik enflamasyonların ve romatoid artrit, diyabet, tüberküloz ve psoriasis gibi hastalıkların tedavisinde ruxolitinibin kullanılabileceği konusunda önemli bir adım oluşturmuştur.^[18]

IL-4, IL-12, IL-23, timik stromal lenfopoietin, interferon gama (IFN γ) gibi bazı sitokinlerle ilişkilendirilen Fridman ve ark.nın^[19] yaptıkları bir diğer çalışmada ise psoriasis ve atopik dermatitis gibi enflamatuvar deri hastalıklarının patogeneğinde rol alan bu sitokinlerin ruxolitinib aracılığıyla sinyal iletiminin engellenmesi *in vitro* olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın devamında ruxolitinibin 100 nM'nin altındaki dozlarda *in vivo* olarak hastalığa bağlı semptomları azalttığı görülmüştür. Bu çalışmayı referans alarak gerçekleştirilen Punwani ve ark.nın^[20] yaptıkları çalışmada %0.5, %1, %1.5 ruxolitinib-fosfat içeren krem 28 gün boyunca psoriasisli hastalar üzerinde topik olarak uygulanmıştır. Bu gruplar plasebo grubuyla karşılaştırıldığında semptomların azaldığı görülmüştür.

Sonuç olarak, seçici ve güçlü bir JAK1 ve JAK2 inhibitörü olan ruxolitinib en yeni tirozin kinaz inhibitörü olarak güncel durumdadır. Yapılmakta olan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ruxolitinibin Philadelphia kromozom pozitif ve negatif miyeloproliferatif neoplazmaların ve sitokinler aracılığıyla gerçekleşen çeşitli enflamasyonların hedefe yönelik tedavisinde güncel bir konu olarak yerini alacağını göstermektedir.

Çıkar çakışması beyanı

Yazarlar bu yazının hazırlanması ve yayınlanması aşamasında herhangi bir çıkar çakışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansman

Yazarlar bu yazının araştırma ve yazarlık sürecinde herhangi bir finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002;100:2292-302.
2. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009;114:937-51.
3. Mesa RA, Shields A, Hare T, Erickson-Viitanen S, Sun W, Sarlis NJ, et al. Progressive burden of myelofibrosis in untreated patients: assessment of patient-reported outcomes in patients randomized to placebo in the COMFORT-I study. *Leuk Res* 2013;37:911-6.
4. Mesa RA, Kantarjian H, Tefferi A, Dueck A, Levy R, Vaddi K, et al. Evaluating the serial use of the Myelofibrosis Symptom Assessment Form for measuring symptomatic improvement: performance in 87 myelofibrosis patients on a JAK1 and JAK2 inhibitor (INCB018424) clinical trial. *Cancer* 2011;117:4869-77.
5. Mascarenhas J, Mughal TI, Verstovsek S. Biology and clinical management of myeloproliferative neoplasms and development of the JAK inhibitor ruxolitinib. *Curr Med Chem* 2012;19:4399-413.
6. Tefferi A, Pardanani A. Serious adverse events during ruxolitinib treatment discontinuation in patients with myelofibrosis. *Mayo Clin Proc* 2011;86:1188-91.
7. Tefferi A. How I treat myelofibrosis. *Blood* 2011;117:3494-504.
8. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, Morra E, Rumi E, Pereira A, et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood* 2010;115:1703-8.
9. Tefferi A. The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. *Leukemia* 2008;22:3-13.
10. Seavey MM, Dobrzanski P. The many faces of Janus kinase. *Biochem Pharmacol* 2012;83:1136-45.
11. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* 2004;117:1281-3.
12. Nicolas CS, Amici M, Bortolotto ZA, Doherty A, Csaba Z, Fafouri A, et al. The role of JAK-STAT signaling within the CNS. *JAKSTAT* 2013;2:22925.
13. Ostojic A, Vrhovac R, Verstovsek S. Ruxolitinib: a new JAK1/2 inhibitor that offers promising options for treatment of myelofibrosis. *Future Oncol* 2011;7:1035-43.
14. Yang LP, Keating GM. Ruxolitinib: in the treatment of myelofibrosis. *Drugs* 2012;72:2117-27.
15. Mascarenhas J, Hoffman R. Ruxolitinib: the first FDA approved therapy for the treatment of myelofibrosis. *Clin Cancer Res* 2012;18:3008-14.
16. Quintás-Cardama A, Vaddi K, Liu P, Manshoury T, Li J, Scherle PA, et al. Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2010;115:3109-17.
17. Verstovsek S, Kantarjian H, Mesa RA, Pardanani AD, Cortes-Franco J, Thomas DA, et al. Safety and

- efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *N Engl J Med* 2010;363:1117-27.
18. Pattison MJ, MacKenzie KF, Elcombe SE, Arthur JS. IFN β autocrine feedback is required to sustain TLR induced production of MCP-1 in macrophages. *FEBS Lett* 2013;587:1496-503.
 19. Fridman JS, Scherle PA, Collins R, Burn T, Neilan CL, Hertel D, et al. Preclinical evaluation of local JAK1 and JAK2 inhibition in cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol* 2011;131:1838-44.
 20. Punwani N, Scherle P, Flores R, Shi J, Liang J, Yeleswaram S, et al. Preliminary clinical activity of a topical JAK1/2 inhibitor in the treatment of psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 2012;67:658-64.