

Rola kinaz JAK w patogenezie nowotworów mieloproliferacyjnych Philadelphia-ujemnych. Możliwości terapii celowanej

A role of JAK in the pathogenesis of Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms. Target therapy possibilities

prof. dr hab. n. med. Krzysztof Lewandowski

*Katedra i Klinika Hematologii i Chorób Rozrostowych Układu Krwiotwórczego
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu
Kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. n. med. Mieczysław Komarnicki*



STRESZCZENIE

W ostatnich latach dokonano istotnego postępu w zrozumieniu patogenezy nowotworów mieloproliferacyjnych, w szczególności tych z mutacjami w obrębie genu *JAK2*. W 2005 roku liczne grupy badawcze potwierdziły występowanie mutacji V617F w obrębie egzonu 14. genu *JAK2*. Okazało się, że defekt ten jest obecny u 96% chorych z czerwienicą prawdziwą (PV), u 35–70% pacjentów z nadpłytkowością samoistną (ET) oraz u około 50% osób z pierwotną mielofibrozą (PM). W późniejszym okresie udokumentowano także występowanie innych zaburzeń sekwencji genu *JAK2* w obrębie egzonów 12.–15., w tym substytucji nukleotydowych, insercji lub delecji oraz defektów insercyjno-delecyjnych. W większości wymienionych defektów badania eksperymentalne potwierdziły, że ich obecność prowadzi do zakłócenia procesu autoinhibicji kinazy *JAK2*. Konsekwencją biologiczną wymienionych anomalii jest proliferacja komórek obciążonych defektem, niezależnie od obecności cytokin. Odkrycie związku między obecnością mutacji w obrębie genu *JAK2* a rozwojem nowotworów mieloproliferacyjnych stało się przesłanką do podjęcia prac zmierzających do opracowania małowcząsteczkowych inhibitorów *JAK2*. Początkowo były to substancje współzawodniczące z substratami kinazy o miejsce wiązania w obrębie domeny katalitycznej *JAK2*. Wkrótce potem niezależnie oceniono poddane substancje o budowie zbliżonej do ATP – analogi pyridonów oraz pyrimidyny. Większość z inhibitorów *JAK2* to związki współzawodniczące z ATP o miejsce wiązania w obrębie domeny kinazowej [TG101348 (TargeGen), INCB018424 (ruxolitinib, Incyte), CYT387 (Cytobia), CEP-701 (lestaurtinib, Cephalon), XL019 (Exelixis), SB1518 (S*Bio, według licencji Onyx jako ONX0803) oraz AZD1480 (AstraZeneca)]. Ich zastosowanie u pacjentów z mielofibrozą prowadzi do zmniejszenia objętości śledziony u około połowy z nich, zmniejszenia nasilenia objawów ogólnych, wzrostu tolerancji wysiłku fizycznego oraz poprawy jakości życia. U chorych z PV oraz ET terapia za pomocą inhibitorów *JAK2* skutkuje znaczącą poprawą w zakresie parametrów krwi obwodowej oraz wyraźnym zmniejszeniem zapotrzebowania na leczenie upustami krwi. Większość z wymienionych inhibitorów *JAK2* jest obecnie oceniana w badaniach klinicznych. Wydaje się jednak, że ich zastosowanie może już w niedalekiej przyszłości zmienić obowiązujące standardy terapii *JAK2*-dodatnich nowotworów mieloproliferacyjnych.

SŁOWA KLUCZOWE: nowotwory mieloproliferacyjne Philadelphia-ujemne, *JAK2*, mutacje, inhibitory *JAK2*

ABSTRACT

In recent years a significant progress has been made in understanding of the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms, especially the one with mutation in *JAK2* gene. In 2005 several study groups confirmed the presence of V617F mutation in exon 14 of *JAK2* gene. It was documented that anomaly is present in 96% of polycythaemia vera patients (PV), in 35–70% of patients with essential thrombocythaemia (ET) and in about 50% of patients with primary myelofibrosis (PM). Later on, also other sequence aberrations of *JAK2* gene were found in exon 12–15, among others a single nucleotide substitutions, insertions or deletions, and also insertion-deletions defects. In the case of most of the mentioned mutations, experimental studies confirmed their relations with abnormal autoinhibition process of JAK2 and cytokine-independent proliferation of cells carrying defect. Discovery of relation between the presence of mutations in *JAK2* gene gave insight to initiation of works to prepare small molecules with inhibitory activity against JAK2. Initially, non-ATP competitive JAK2 inhibitors for the APT-binding catalytic site were tested. Thereafter, ATP-competitive pyridones and pyrimidine analogs were independently evaluated. Most of JAK2 inhibitors belong to ATP competitive inhibitors [TG101348 (TargeGen), INCB018424 (ruxolitinib, Incyte), CYT387 (Cytobia), CEP-701 (lestaurtinib, Cephalon), XL019 (Exelixis), SB1518 (S*Bio, according to Onyx licence as ONX0803) and AZD1480 (AstraZeneca)]. Its administration in myelofibrosis leads to reduction of spleen volume in about 50% of patients, reduction of general symptoms intensity, increase of physical exercise tolerability and improvement of quality-of-life. In PV and ET patients JAK2 inhibitors therapy resulted in significant improvement of complete blood count results and in significant reduction of flebotomy needs. Presently, most of JAK2 inhibitors are evaluated in clinical trials. However, it seems that their use may change current standards of therapy of *JAK2* positive myeloproliferative neoplasms in the nearest future.

KEY WORDS: Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms, JAK2, mutations, JAK2 inhibitors

WSTĘP

Do klasycznych postaci przewlekłych nowotworów mieloproliferacyjnych (CMPN) Philadelphia-ujemnych należą czerwieńca prawdziwa (PV), nadpłytkowość samoistna (ET) oraz pierwotna mielofibroza (PM). Uważa się, że wszystkie choroby z tej grupy są wynikiem transformacji nowotworowej wielopotencjalnej komórki hematopoetycznej. Jak dotąd nie znaleziono jednak żadnej specyficznej aberracji cytogenetycznej powiązanej z poszczególnymi postaciami Philadelphia-negatywnych CMPN. Jedynie u około 30% chorych z PV potwierdzono obecność delekcji 9p.

Istotny postęp w zakresie poznania patogenezy CMPN dokonał się na początku XXI wieku. W 2005 roku liczne grupy badawcze doniosły o obecności nabytej mutacji genu kinazy Janusowej 2 (*JAK2* V617F) u pacjentów z PV, a w 2006 roku tiazolizynedionów dwóch innych mutacji somatycznych: W515L oraz W515K w obrębie sekwencji genu receptora dla trombopoetyny (*MPL*) u *JAK2* V617F-ujemnych chorych na PM [1–3]. Okazało się, że obecność wymienionych defektów genów *JAK2* i *MPL* w komórkach hematopoetycznych prowadzi do konstytutywnej aktywacji szlaku sygnałowego JAK-STAT i do proliferacji komórek docelowych niezależnej od obecności cytokin i czynników wzrostu.

Obecność mutacji V617F zlokalizowanej w egzonie 14. genu *JAK2* potwierdzono u 95% chorych z PV, u 35–70% pacjentów z ET oraz u około 50% osób z PM [4–8]. Przeprowadzone badania wykazały ponadto, że obecność mutacji V617F genu *JAK2* jest powiązana z obecnością haplotypu 46/1, a także innych wrodzonych defektów sprzyjających wystąpieniu choroby [9–11]. W rzadkich przypadkach CMPN Philadelphia-negatywnych oraz *JAK2* V617F – negatywnych można także wykazać obecność innych defektów w obrębie egzonów 12., 13. lub 14. genu *JAK2*. Okazało się, że mutacje zlokalizowane w obrębie egzonu 12. są względnie specyficzne dla *JAK2* V617F-ujemnych postaci PV (3% wszystkich przypadków PV) oraz że najczęściej dotyczą one pozycji aminokwasowych 536–547 [12].

PRZEKAZYWANIE SYGNAŁU KOMÓRKOWEGO DROGĄ JAK-STAT W WYNIKU STYMULACJI RECEPTORA CYTOKINOWEGO

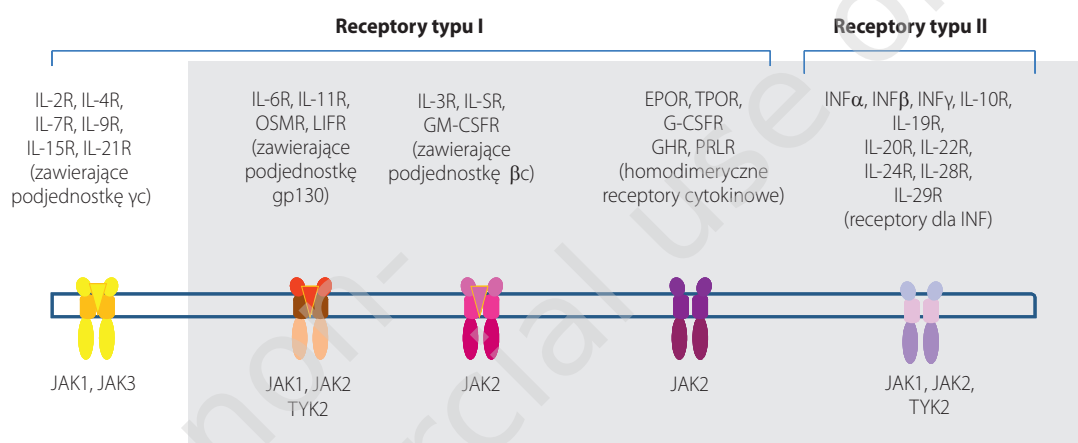
Kinazy Janus uczestniczą w procesie przekazywania sygnału komórkowego pośredniczonego poprzez receptory dla cytokin oraz

czynników wzrostu. Należy pamiętać, że część z nich ma strukturę jednołańcuchową (np. dla EPO, PRL, GH, G-CSF), a inne wielołańcuchową (np. dla IL-3, IL-5, GM-CSF). Typy receptorów oraz cytokiny o powinowactwie do określonego rodzaju receptora przedstawiono na rycinie 1.

Y694 w przypadku STAT5) zlokalizowanej w końcu karboksylowym czynnika transkrypcyjnego STAT. Proces fosforylacji tyrozyny STAT, w zależności od rodzaju komórek i natury interakcji liganda z receptorem, może być wynikiem interakcji STAT z receptorem dla czynnika wzrostu, JAK lub kinazą Src. Proces ten

RYCINA 1.

Typy receptorów dla cytokin, w tym kinazy Janus 2 [13].



Objaśnienia użytych skrótów: IL-xR – receptor dla określonego (x) typu interleukiny, OSMR – receptor dla onkostatyny M (ang. *oncostatin M receptor*), LIFR – receptor dla czynnika hamującego białaczkę (ang. *leukemia inhibitory factor*), GM-CSFR – receptor dla granulocytowo-makrofagowego czynnika wzrostu, PRLR – receptor dla prolaktyny, INF – interferon, JAK – kinaza tyrozynowa Janus, TYK – receptor dla kinazy tyrozynowej Tyk.

Proces przekazywania sygnału komórkowego po związaniu liganda z odpowiednim receptorem ma charakter etapowy. Jego podstawą są reakcje fosforylacji określonych cząsteczek tyrozyny w obrębie struktury poszczególnych białek uczestniczących w procesie przekazywania sygnału, a także ich zmiany konformacyjne kreujące miejsca wiązania dla kolejnych białek uczestniczących w procesie transdukcji sygnału. W przypadku szlaku sygnałowego JAK-STAT wiązanie cytokiny/czynnika wzrostu z receptorem prowadzi do jego dimeryzacji/oligomeryzacji. Kolejnym skutkiem związania agonisty z receptorem jest przemieszczenie związanych z receptorem poprzez domenę SH2 cząsteczek JAK (rekrutacja JAK). Rekrutacja JAK skutkuje ich fosforylacją na drodze autofosforylacji i/lub transfosforylacji (przy udziale innej cząsteczki JAK lub kinazy z innej rodziny kinaz tyrozynowych). Aktywowana kinaza Janus pośredniczy w fosforylacji docelowej cząsteczki tyrozyny w obrębie receptora. W ten sposób dochodzi do utworzenia miejsca wiążącego (miejsca dokowania) domenę SH2. Dzięki temu możliwe jest przyłączenie kolejnej cząsteczki uczestniczącej w szlaku sygnałowym (np. STAT, kinazy Src, fosfatazy białkowe, białka adaptorowe w procesie przekazywania sygnału, w tym Shc, Grb2 lub kinaza PI-3) [13, 14].

W przypadku szlaku sygnałowego JAK-STAT po związaniu cząsteczki STAT z receptorem dochodzi do fosforylacji tyrozyny (np.

inicjuje reorientację białek STAT i ich homo- lub heterodimeryzację. Dimeryzacja STAT jest rezultatem interakcji między domeną SH2 na jednej z cząsteczek STAT a fosforylowaną tyrozyną na drugiej cząsteczce STAT. Po fosforylacji dimery STAT przemieszczają się do jądra, wiążą się poprzez domenę wiążącą DNA z sekwencją genu docelowego i inicjują proces transkrypcji.

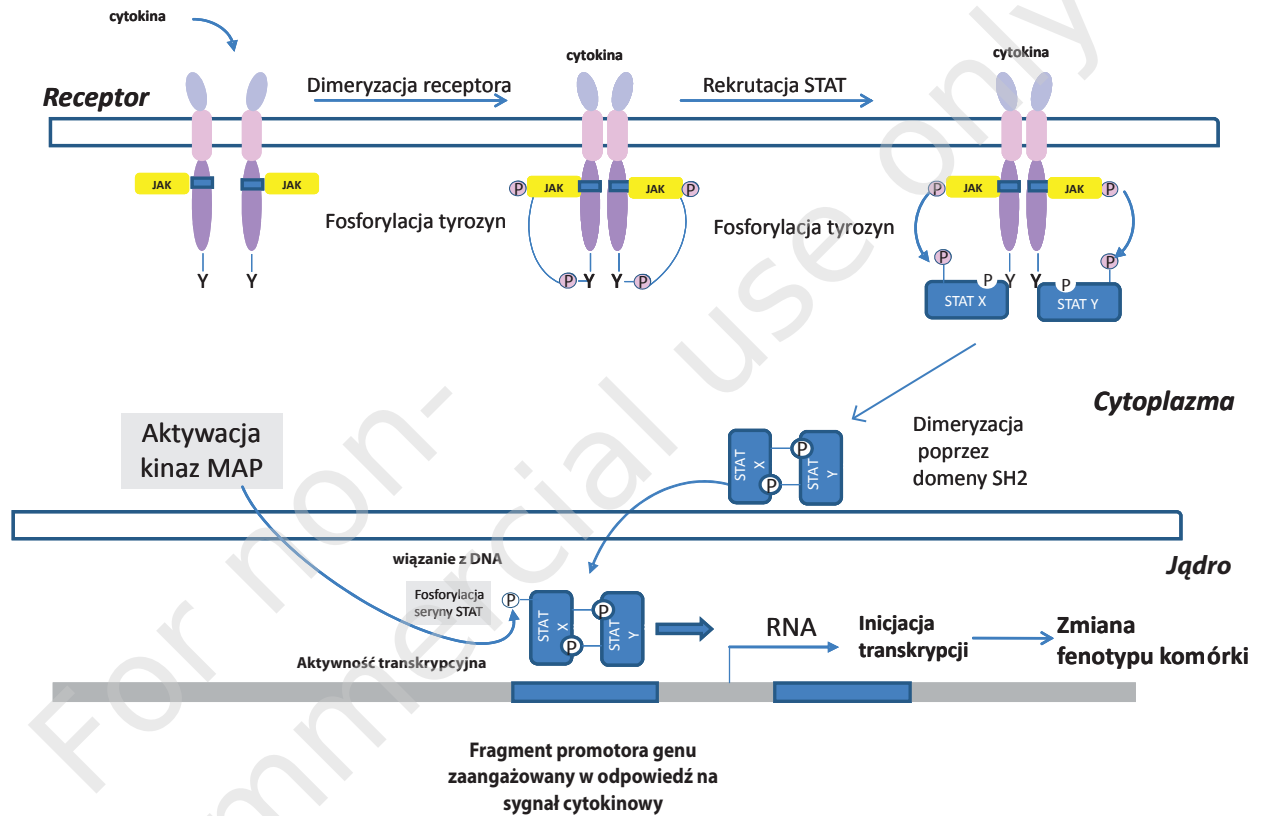
Aktywność STAT (z wyjątkiem STAT2) jest kontrolowana przez kinazy serynowo-treoninowe (np. ERK, p38, mTOR). Regulacja aktywności STAT jest możliwa na drodze fosforylacji seryny w domenie transaktywacyjnej (w obrębie konserwatywnego motywu PSMP). Schemat ideowy przebiegu reakcji przedstawiono na rycinie 2.

RODZINA KINAZ TYROZYNOWYCH JANUS

Rodzinę JAK tworzą JAK1, JAK2, JAK3 oraz TYK2. Od innych białek należących do rodziny kinaz tyrozynowych odróżnia je unikalna struktura. Część aminoterminalna JAK zawiera dwa zasadnicze motywy: domenę Src homologiczną (SH2) i domenę FERM (ang. *Four-point-one*, *Ezrin*, *Radixin*, *Moesin*). Domena SH2 obejmuje uprzednio wyodrębniany region JH3 oraz część domeny JH4. Wyodrębniane uprzednio regiony JH5–JH7 według aktualnej klasyfikacji topograficznej znajdują się w obrębie

RYCINA 2.

Szlak przekazywania sygnału komórkowego drogą JAK-STAT. Po związaniu agonisty receptora (cytokina) dochodzi do dimeryzacji receptora, fosforylacji związanych z nim kinaz JAK, a następnie, w wyniku zmian konformacyjnych w obrębie receptora, udostępnienia miejsca „dokowania” dla odpowiednich cząsteczek STAT. Po fosforylacji związanych cząsteczek STAT przez kinazę JAK dochodzi do ich dimeryzacji poprzez domeny SH2. W obrębie jądra dimery STAT są ponownie fosforylowane przez kinazę MAP (MAPK), a następnie wiążą się z odpowiednim miejscem w obrębie genów docelowych, inicjując proces transkrypcji.



Objaśnienia użytych skrótów: STAT – czynnik zaangażowany w przekazywanie sygnału oraz inicjację transkrypcji (ang. *signal transduction and activation of transcription*), JAK – kinaza Janus, DNA – kwas deoksyrybonukleinowy, RNA – kwas rybonukleinowy, MAPK – kinazy aktywowane miogenami (ang. *MAP, mitogen-activated protein kinases*).

domeny FERM. Domena FERM pośredniczy w wiązaniu kinazy z odpowiednim receptorem oraz z innymi białkami. Uczestniczy także w procesie regulacji aktywności katalitycznej JAK. Wykazano bowiem, że obecność substytucji nukleotydowych w obrębie sekwencji kodującej tyrozynę 913 domeny FERM prowadzi do niezależnej od cytokin aktywacji kinazy [15].

Unikalną cechą kinaz z rodziny Janus jest obecność dwóch domen o znacznym stopniu homologii: JH1 i JH2. Obecność dwóch domen kinazowych była podstawą do nazwania tej rodziny *kinazami Janus*, od imienia rzymskiego boga o dwóch twarzach – Janusa [16]. Domena JH1 kinazy tyrozynowej jest domeną funkcjonalną i zawiera w obrębie pętli aktywacyjnej motyw YY. Domena JH2 (domena kinazopodobna), mimo że zawiera większość konserwatywnych aminokwasów charakterystycznych dla funkcjonalnych kinaz, nie ma jakiegokolwiek mierzalnej aktywności biologicznej. Jest to wynikiem utraty ugrupowań odpowie-

dzialnych za aktywność katalityczną kinazy i jej wiązanie z nukleotydami [17–19]. Domena kinazopodobna odgrywa jednak rolę regulatorową, i to zarówno w odniesieniu do aktywności JAK, jak i intensywności sygnału przekazywanego szlakiem JAK-STAT (ang. *signal transduction and activation of translation*). Negatywny wpływ domeny JH2 na aktywność katalityczną kinazy JAK2 (także JAK3) potwierdziły zarówno wyniki badań na modelach teoretycznych, jak i rezultaty badań biochemicznych właściwości kinazy [20–22]. Znaczenie domeny JH2 w procesie autoinhibicji kinazy Janus 2 potwierdziły również obserwacje późniejsze, poczynione u chorych z *JAK2 V617F*-dodatnimi nowotworami mieloproliferacyjnymi [2, 23]. Okazało się bowiem, że obecność wymienionego defektu prowadzi do zniesienia hamującego wpływu domeny JH2 na domenę JH1, a także do zmiany konformacji domeny JH1 umożliwiającej jej fosforylację przez związaną z nią cząsteczkę *JAK2 V617F*.

ABERRACJE CHROMOSOMALNE Z UDZIAŁEM 9p24 ORAZ MUTACJE GENU *JAK2*

Gen kinazy Janus 2 zlokalizowany jest na ramieniu krótkim chromosomu 9 (prążek 9p24). Zbudowany jest ze 143 tysięcy par zasad, z których 138 tysięcy przypada na introny. Sekwencja kodująca kinazę tyrozynową *JAK2* złożona jest z 25 egzonów, kodujących 1132 aminokwasy. Pierwsze doniesienie dotyczące obecności translokacji chromosomalnej obejmującej gen *JAK* opublikowano w 1997 roku. Aberrację tę zidentyfikowano w przypadku ostrej białaczki limfoblastycznej pre-B. Okazało się, że defekt ten jest wynikiem t(9;12)(p24;p13) prowadzącej do powstania genu fuzji *ETV6-JAK2*. Gen *ETV6-JAK2* zawiera fragmenty sekwencji kodującej fragmenty genów kodujących odpowiednio dla domeny oligomeryzacyjnej Helix-Loop-Helix białka *ETV6* (*ETV6*) oraz domeny (JH1) kinazy tyrozynowej Janus 2. W latach późniejszych potwierdzono występowanie u chorych z nowotworami limfo- i mieloproliferacyjnymi także innych aberracji chromosomalnych z udziałem genu *JAK2* [24–33]. Część z nich przedstawiono w tabeli 1.

TABELA 1.

Aberracje z udziałem genu *JAK2* obecne u chorych z nowotworami limfo- i mieloproliferacyjnymi.

Rodzaj aberracji chromosomalnej	Gen fuzyjny	Choroba	Znaczenie czynnościowe
t(9;12)(p24;p13)	ETV6-JAK2 (TEL-JAK2)	Wczesna postać białaczki limfoblastycznej pre-B Białaczki limfo- i mieloblastyczne	Konstytutywna aktywacja kinazy Janus 2, niezależny od IL-3 oraz G-CSF wzrost prekursorów mieloidalnych
t(8;9)(p22;p24)	PCM1-JAK2	Ostre białaczki Przewlekła białaczka szpikowa Chłoniaki T-komórkowe	Konstytutywna aktywacja kinazy Janus 2 w wyniku fuzji domeny <i>coiled-coil</i> genu <i>PCM1</i> oraz domeny katalitycznej kinazy <i>JAK2</i>
t(9;22)(p24;q11.2)	BCR-JAK2	Przewlekła białaczka szpikowa	Konstytutywna aktywacja kinazy Janus 2 w wyniku fuzji domeny <i>coiled-coil</i> genu <i>BCR</i> oraz domeny katalitycznej (JH1) genu <i>JAK2</i> (oporność na imatynib)
t(3;9)(q21;p24)	RPN1-JAK2	Idiopatyczne włóknienie szpiku	Konsekwencje biologiczne nieznanne, hipotetycznie konstytutywna aktywacja kinazy Janus 2
t(5;22)(q14.1;p24.1)	SSBP2-JAK2	Wczesna postać białaczki limfoblastycznej pre-B	Konsekwencje biologiczne nieznanne, hipotetycznie konstytutywna aktywacja kinazy Janus 2
-	PAX5-JAK2	Ostra białaczka limfoblastyczna u dzieci	Konsekwencje biologiczne nieznanne, hipotetycznie konstytutywna aktywacja kinazy Janus 2

MUTACJE GENU *JAK2* PROWADZĄCE DO ZAKŁÓCENIA PROCESU AUTOINHIBICJI KINAZY JANUS 2

Podobnie jak aberracje chromosomalne także mutacje punktowe, insercje lub delecje mogą prowadzić do konstytutywnej aktywacji kinazy Janus 2. Ich obecność potwierdzono u pacjentów z nowo-

tworami mieloproliferacyjnymi, a także u chorych z niektórymi postaciami zespołu mielodysplastycznego. Dotychczas zidentyfikowano kilkadziesiąt mutacji genu *JAK2*, których obecność prowadzi do podobnych zmian funkcji kinazy Janus 2. Co ciekawe, są one zlokalizowane w różnych obszarach genu *JAK2* (egzony 12.–15.).

Mutacje egzonu 14.

Obecność mutacji punktowych w obrębie genu *JAK2* z rodziny kinaz tyrozynowych po raz pierwszy udokumentowano w 2005 roku. Stało się to możliwe dzięki analizie chorych na CMPN i odkryciu transwersji G1849T prowadzącej do substytucji V617F w obrębie sekwencji aminokwasowej kinazy Janus 2 [2, 23, 34]. Późniejsze badania dowiodły, że defekt ten jest również obecny u około 20–50% chorych z niedokrwistością oporną na leczenie z obecnością patologicznych syderoblastów i znaczącą nadpłytkowością (RARS-T) oraz u około 5% chorych z ostrą białaczką szpikową i MDS [35].

W oparciu o analizę struktury krystalograficznej kinazy Janus 2 oraz symulacje na modelach atomowych wysunięto przypuszczenie, że obecność mutacji V617F prowadzi do zakłócenia inter-

akcji o charakterze autoinhibycyjnym między domeną pseudokinazy (JH2) a domeną kinazową (JH1) [36]. Okazało się także, że w przypadkach V617F-dodatnich efekt autoinhibycyjny domeny JH2 jest uzależniony od obecności w środkowej części domeny JH2 (*aC helix*) F595. Wykazano bowiem, że substytucja F595 przez alaninę, lizynę lub walinę prowadzi do znacznego ograni-

czenia procesu konstytutywnej aktywacji kinazy Janus 2 w przypadkach V617F-dodatnich [37].

U chorych na nowotwory mieloproliferacyjne potwierdzono występowanie również innych zmian w obrębie egzonu 14. genu *JAK2*. Należą do nich między innymi defekty o charakterze delecyjnym. Początkowo ich wykrycie nie było możliwe. Do oceny obecności mutacji stosowano bowiem DNA i metodę bezpośredniego sekwencjonowania. Obecność mutacji delecyjnych genu *JAK2* potwierdziły dopiero badania RNA i analiza obecności produktów alternatywnego składania. Do najczęściej stwierdzanych defektów tego typu należy egzon 14del.

Obok obecności mutacji o charakterze delecyjnym u chorych na nowotwory mieloproliferacyjne potwierdzono także obecność innych mutacji punktowych w obrębie egzonu 14., w tym K603Q, H606Q, H608Y, V617I czy też C618R. Ich wpływ na funkcję JAK2 jest obecnie w trakcie oceny [38, 39].

Mutacje egzonu 12.

Ich obecność wykazano u 3–5% chorych z czerwienicą prawdziwą z nieobecną mutacją V617F genu *JAK2* [40]. W odróżnieniu od mutacji V617F, która u pacjentów z PV jest obecna w postaci homozygotycznej, mutacje egzonu 12. mają charakter heterozygotyczny. Mogą one być obecne także w obrębie sekwencji kodującej strukturę domeny JH2, co może prowadzić do zakłócenia procesu autoinhibicji kinazy, podobnie jak ma to miejsce w przypadku defektów zlokalizowanych w obrębie egzonu 14.

Jak dotąd w obrębie egzonu 12. potwierdzono występowanie różnorodnych defektów molekularnych, w tym mutacji punktowych, mutacji insercyjno-delecyjnych oraz zmian delecyjnych [41]. Do najczęściej występujących należą K539L,

F537K539 (F537-K539delinsL), R541-E543 delinsK oraz N542-E543 (N542-E543del) [3, 12]. Śledzenie obecności defektów egzonu 12. genu *JAK2* wydaje się mieć szczególne znaczenie u osób pochodzenia azjatyckiego z podejrzeniem czerwienicy, u których częstość wymienionych defektów jest szczególnie wysoka i wynosi 23% [42].

Mutacje egzonów 13. i 15.

Podobnie jak mutacje egzonu 12. wszystkie z dotychczas opisanych defektów w obrębie egzonów 13. i 15. mają charakter heterozygotyczny. Ich wykrycie było możliwe dzięki badaniom przesiewowym locus genu *JAK2* u blisko 20 000 osób z podejrzeniem nowotworu mieloproliferacyjnego [39]. Do najczęstszych zmian, których obecność potwierdzono w obrębie egzonu 13., należą: F557L, R564L, R564Q, V567A, G571S/R, L579F, H587N i S591L. Nieco mniej defektów molekularnych zidentyfikowano w obrębie egzonu 15. Do najczęściej występujących należą L624P oraz I645V [3].

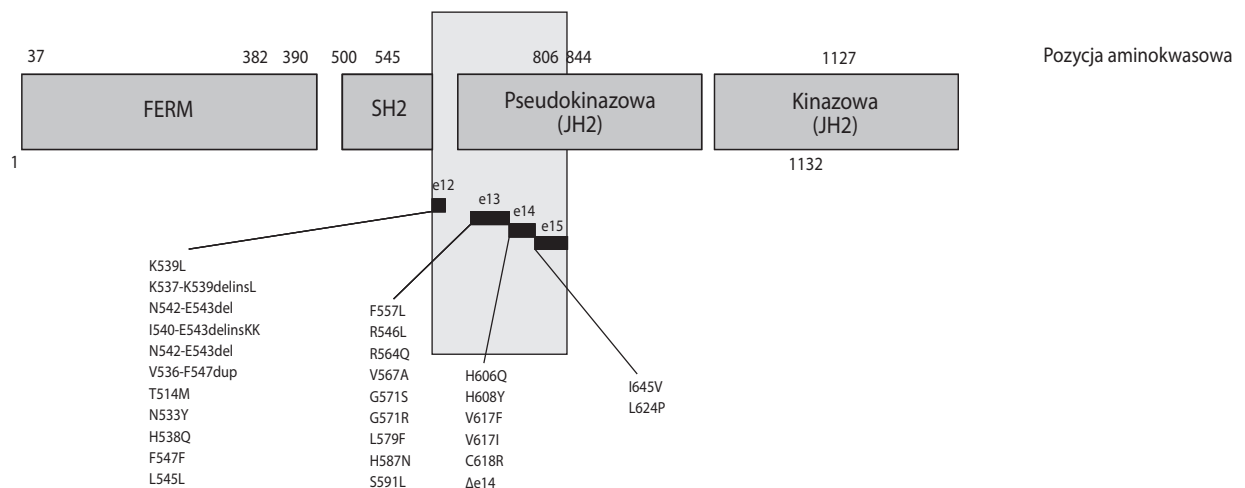
Lokalizację najczęstszych defektów molekularnych w obrębie genu *JAK2* przedstawiono na rycinie 3.

ZŁOŻONE ABERRACJE GENETYCZNE Z UDZIAŁEM JAK V617F

W ostatnich latach opublikowano dane potwierdzające możliwość współwystępowania u chorych na nowotwory mieloproliferacyjne komórek *JAK* V617F-dodatnich oraz *BCR-ABL*-dodatnich. Co ciekawe, jednoczesne występowanie wymienionych defektów opisano zarówno w przypadkach chorych wyjściowo *BCR-ABL*-ujemnych/*JAK2* V617F-dodatnich [43], jak i *BCR-ABL*-dodatnich/*JAK2* V617F-ujemnych [44]. W tym ostatnim

RYCINA 3.

Struktura genu *JAK2* z uwzględnieniem obszarów, w których obecność zmian prowadzi do substytucji aminokwasowych mogących zakłócać proces autoinhibicji kinazy ([14], zmodyfikowano).



przypadku pojawienie się klonu komórkowego *JAK2* V617F-dodatniego miało miejsce w trakcie leczenia imatynibem przewlekłej białaczki szpikowej [45].

Wyjaśnienie tej koincydencji nie wydaje się aż tak trudne. Wiadomo bowiem, że stała, wysoka aktywność kinazy *JAK2* jest czynnikiem podtrzymującym stabilność białka BCR-ABL. Może to prowadzić do przedłużonego utrzymywania się wysokiej komórkowej aktywności kinazy BCR-ABL, a tym samym podtrzymywania sygnału proliferacyjnego oraz fenotypu mutacyjnego [46]. To ostatnie spostrzeżenie wydaje się uzasadnieniem teoretycznym do podejmowania prób terapii przewlekłej białaczki szpikowej jednocześnie za pomocą inhibitora kinazy tyrozynowej BCR-ABL oraz inhibitora kinazy *JAK2*, i to niezależnie od stanu mutacyjnego obu białek.

INHIBITORY KINAZY JAK 2

Odkrycie związku między obecnością mutacji w obrębie genu *JAK2* a rozwojem nowotworów mieloproliferacyjnych stało się przesłanką podjęcia prac zmierzających do opracowania małowcząsteczkowych inhibitorów kinazy *JAK2*. Początkowo były to substancje o strukturze zbliżonej do budowy klasycznego inhibitora *JAK2* – tyrphostin AG490, współzawodniczące z substratem o miejsce wiązania w obrębie domeny kinazowej *JAK2*. Wkrótce potem niezależnej ocenie poddano także substancje o budowie zbliżonej do ATP – analogi pyridonów oraz pyrimidyny. Z uwagi na to, że związki te pierwotnie opracowano z intencją hamowania aktywności katalitycznej kinazy *JAK2*, nazwano je *inhibitorami typu I*. Nieco później do podobnych celów zaadaptowano inhibitory innych kinaz obdarzone właściwościami inhibitorowymi wobec *JAK2*. Tę grupę inhibitorów nazwano *inhibitorami typu II* [47].

Inhibitory *JAK2* współzawodniczące o miejsce wiązania z ATP w obrębie domeny kinazowej

Poznanie podstaw molekularnych nowotworów mieloproliferacyjnych doprowadziło do opracowania szeregu leków celowanych molekularnie. Większość z nich jest obecnie przedmiotem oceny w badaniach klinicznych. Należą do nich między innymi inhibitory szlaku mTOR (ewerolimus), MAPK (erlotinib) czy też NF- κ B (bortezomib), a także inhibitory *JAK2*.

Większość inhibitorów *JAK2* to związki małowcząsteczkowe współzawodniczące z ATP o miejsce wiązania w obrębie domeny kinazowej [TG101348 (TargeGen), INCB018424 (ruxolitinib, Incyte), CYT387 (Cytopia), CEP-701 (lestaurtinib, Cephalon), XL019 (Exelixis), SB1518 (S*Bio, według licencji Onyx jako ONX0803), AZD1480 (AstraZeneca)]. Ich hamujący wpływ na

przekazywanie sygnału komórkowego pośredniczonego przez IL-6 oraz proliferację *JAK2* V617F – pozytywnych komórek linii Ba/F3W potwierdziły badania przedkliniczne [48, 49].

INCB018424 (ruxolitinib, Novartis AG)

Doustny analog pyrrolo[2,3-d]pyrimidyny wywołujący w stężeniach subnanomolarnych wpływ inhibitorowy na aktywność kinazy *JAK1* i kinazy *JAK2*, z istotnie niższą aktywnością hamującą wobec kinazy *JAK3*. Lek w stężeniach nanomolarnych hamuje wzrost komórek *JAK2* V617F-dodatnich. W warunkach in vitro hamuje również przekazywanie sygnału szlakiem *JAK2*/STAT5. Lek pomyślnie przeszedł badania kliniczne fazy II u chorych z czerwienicą prawdziwą, nadpłytkowością samoistną oraz pierwotną mielofibrozą [50]. Obecnie trwają również badania kliniczne nad zastosowaniem ruxolitinibu u chorych z mielofibrozą – COMFORT I (ruxolitinib v. placebo) oraz COMFORT II (ruxolitinib v. najlepsze dostępne leczenie). Pierwotnymi punktami końcowymi badań są odsetek pacjentów z redukcją objętości śledziony $\geq 35\%$ w porównaniu z objętością wyjściową po 24 tygodniach terapii (COMFORT I) oraz odsetek pacjentów z redukcją objętości śledziony $\geq 35\%$ w porównaniu z objętością wyjściową po 48 tygodniach leczenia (COMFORT II). Według ostatnich danych oba badania osiągnęły zamierzone pierwotne punkty końcowe. Na ich wyniki końcowe trzeba jednak poczekać.

TG101348

Lek jest analogiem biaryl-meta-pirimidyny. Wykazuje w stężeniach nanomolarnych wpływ inhibitorowy na *JAK2* typu dzikiego oraz *JAK2* V617F. Inhibitor hamuje także fms-podobną kinazę tyrozynową (FLT3) oraz kinazę RET. Jednocześnie, w porównaniu z innymi kinazami z rodziny JAK, TG101348 wykazuje wysoką selektywność względem *JAK2*. TG101348 przeszedł z powodzeniem badania kliniczne I fazy przeprowadzone na chorych z PM, post-PV MF oraz post-ET MF [49]. W wyniku tych badań ustalono, że maksymalna doustna dawka tolerowana wynosi 680 mg/dzień. Do dalszych badań klinicznych II i III fazy zarekomendowano jednak dawkę 400–500 mg/dzień.

CEP-701 (Lestaurtinib)

Lek jest analogiem staurosporyny (indolokarbazol). Został opracowany i zaakceptowany przez Food and Drug Administration (FDA) do leczenia ostrej białaczki szpikowej FLT3-dodatniej. Okazało się jednak, że inhibitor w stężeniach nanomolarnych skutecznie hamuje również wzrost komórek *JAK2* V617F-dodatnich. CEP-701 podlega obecnie badaniom II fazy u chorych z PM, post-PV MF oraz post-ET MF [51, 52].

CYT 387

Lek jest pochodną fenyl-amino-pirydyny. Hamuje aktywność JAK1 i JAK2. Wykazuje 10-krotnie mniejszą aktywność inhibitorową wobec JAK3. Hamuje przekazywanie sygnału szlakiem JAK-STAT w komórkach *JAK2* V617F-dodatnich, a w stężeniach mikromolarnych także wzrost wymienionych komórek. W warunkach in vitro CYT 387 hamuje wzrost kolonii erytroidalnych wyprowadzonych z komórek szpiku pozyskanych od chorych na czerwienicę prawdziwą. Inhibitor jest obecnie w trakcie badań klinicznych I/II fazy u chorych z mielofibrozą [53].

XL019 (Exelixis)

Lek w stężeniach nanomolarnych silnie hamuje aktywność kinaz z rodziny JAK, wykazując względną selektywność w odniesieniu do JAK2. XL019 pomyślnie przeszedł badania I fazy u chorych na PM [54].

SB1518

Doustny lek o strukturze makrocyclicznej o silnym i selektywnym działaniu inhibitorowym na JAK2 (IC_{50} =23 i 19 nM dla odpowiednio JAK2 WT i JAK2 V617F) oraz FLT3 (IC_{50} =22 nM) [55]. Obecnie trwają badania I/II fazy oceniające jego skuteczność u chorych z PM [14].

AZD1480 (pyrazoyl-pyrimidinediamina)

Najsilniejszy ze znanych inhibitorów JAK2, hamujący kinazę JAK2 w stężeniach pikomolowych. W porównaniu z JAK3 lek cechuje selektywność wobec JAK2. AZD1480 hamuje przekazywanie sygnałów szlakiem JAK/STAT, hamuje proliferację i indukuje proces apoptozy megakarioblastów *JAK2* V617F-pozytywnych wywodzących się z linii komórkowej SET2 [14, 56]. Hamuje także wzrost komórek macierzystych transferowanych zmutowanym genem *JAK2* u myszy. Obecnie trwają badania I/II fazy nad oceną jego skuteczności u chorych z PM.

NVP-BSK805 (quinoxaline)

Lek oceniany w badaniach przedklinicznych. W porównaniu z innymi kinazami z rodziny JAK w warunkach in vitro wykazuje 20-krotnie wyższą selektywność wobec kinazy JAK2. Selektywność ta została potwierdzona w odniesieniu do innych kinaz także w badaniach profilowych. NVP-BSK805 zmniejsza także fosforylację STAT5 w komórkach *JAK2* V617F-dodatnich, jednocześnie hamując ich proliferację oraz indukując proces ich apoptozy. W warunkach in vivo NVP-BSK805 cechuje dobra biodostępność oraz długi okres półtrwania. U myszy i szczurów lek znacznie zmniejsza objawy nadkrwistości wywołanej podawaniem rekombinowanej erytropoetyny oraz nasilenie objawów erytropoezy pozaszpikowej [57].

INHIBITORY WSPÓŁZAWODNICZĄCE Z SUBSTRATEM DLA JAK2

LS-104 (LymphoSign, AEgera)

Lek jest analogiem tyrphostin AG490 i jest jedynym inhibitorem JAK2 w tej grupie będącym w trakcie oceny w badaniach klinicznych. Hamuje także kinazę tyrozynową BCR-ABL. Nie wpływa na aktywność kinaz z rodziny Src. W badaniach przedklinicznych LS-104 wywoływał efekt cytotoksyczny w odniesieniu do komórek białaczkowych wywodzących się z linii mieloidalnej, a także limfoidalnej [60, 61]. Przedmiotem obecnie prowadzonych badań klinicznych II fazy jest ocena skuteczności leku u chorych z ostrą białaczką limfoblastyczną.

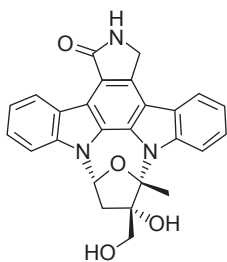
ON044580 (Onconova Therapeutics, Inc.)

Lek zbliżony budową do AG490. Ma właściwości podobne do LS-104. Jest inhibitorem kinaz BCR-ABL i JAK2. Okazał się wysoce specyficzny w stosunku do wymienionych kinaz w badaniach przesiewowych oceniających jego aktywność w odniesieniu do 300 innych kinaz [62, 63]. ON044580 wywołuje efekt cyto-

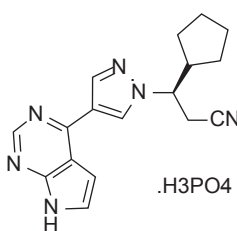
RYCINA 4.

Struktura chemiczna inhibitorów JAK2 ocenianych w badaniach klinicznych u chorych z przewlekłymi nowotworami mieloproliferacyjnymi (według [58]).

CEP-701 (lestaurtinib)



INCB018424 (ruxolitinib)



TG101348

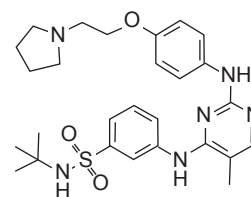


TABELA 2.

Siła i selektywność inhibitorów JAK (według [59]).

Środek	JAK2 IC ₅₀ (nM)	Selektywność wobec JAK (x razy)			Faza badań
		JAK2 v. JAK3	JAK2 v. JAK1	JAK2 v. TYK2	
Ruxolitinib	2,8	153	1,1	6,7	III
TG101348	3	332	35	135	II
Lestaurtinib	1	3	ND	ND	II
XL019	2	125	65	170	Wstrzymane

Objaśnienia użytych skrótów: IC₅₀ – stężenie hamujące wzrost kolonii komórkowych o 50%, JAK – kinaza Janusowa, TYK2 – niereceptorowa kinaza tyrozynowo-białkowa 2.

TABELA 3.

Aktywność inhibitorowa nowych inhibitorów JAK w testach opartych na pomiarze aktywności kinazy (zmodyfikowano według [59]).

Środek	IC ₅₀ (nM)				Faza badań
	JAK1	JAK2	JAK3	TYK2	
SB1518	23	23	56	2	I
CYT387	11	18	155	ND	I/II
AZD1480	1,3	<0,4	3,9	ND	I/II
NVP-BSK805	31,6	0,48	18,6	10,7	Przedkliniczna

Objaśnienia użytych skrótów: IC₅₀ – połowa minimalnego stężenia hamującego, JAK – kinaza Janusowa, TYK2 – niereceptorowa kinaza tyrozynowa 2.

toksyczny w stosunku do komórek z nadekspresją JAK2 V617F i BCR-ABL, a także komórek uzyskanych od pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową, i to niezależnie od fazy choroby oraz wrażliwości na imatynib. Jak dotąd nie przedstawiono jednak danych dotyczących skuteczności leku w warunkach in vivo.

Strukturę chemiczną wybranych inhibitorów JAK2, ich aktywność inhibitorową w testach opartych na pomiarach aktywności kinazy, a także porównanie ich siły i selektywności działania

przedstawiono odpowiednio na rycinie 4 oraz w tabelach 2 i 3. Dotychczasowe wyniki badań nad stosowaniem inhibitorów JAK2 u chorych na nowotwory mieloproliferacyjne jednoznacznie potwierdziły ich skuteczność terapeutyczną. Rezultaty prób klinicznych dotyczących zastosowania wybranych inhibitorów JAK2 u chorych na pierwotną mielofibrozę, czerwienicę prawdziwą oraz nadpłytkowość samoistną przedstawiono w tabelach 4 i 5.

TABELA 4.

Wyniki wstępne badań klinicznych nad zastosowaniem inhibitorów JAK2 u pacjentów z pierwotną mielofibrozą.

Badanie	Terapia	Odpowiedzi	Toksyczność
Santos i wsp.	CEP-701(80 mg 2x dz.)	27% (↓ splenomegalii i nasilenia cytopenii)	Przewód pokarmowy, cytopenie
Hexner i wsp.	CEP-701 (80–160 mg 2x dz.)	Redukcja splenomegalii	jw.
Verstovsek i wsp.	NCB018424 (10–25 mg 2x dz.)	44% (↓ splenomegalii, zależności od przetoczeń preparatów krwi, ↓ objawów ogólnych, ↑ tolerancji wysiłku)	Małopłytkowość, anemia
Verstovsek i wsp.	SB1518 (500–600 mg 1x dz.)	28% (↓ splenomegalii)	Przewód pokarmowy, małopłytkowość
Pardanani i wsp.	TG101348 (30–800 mg 1x dz.)	Redukcja splenomegalii (49%), ↓ objawów ogólnych, leukocytozy, trombocytozy	Przewód pokarmowy, anemia, małopłytkowość
Shah i wsp.	XL019 (25–300 mg 1x dz. lub 25 mg 2x w tyg.)	Redukcja splenomegalii, objawów ogólnych, niedokrwistości, leukocytozy	Neurologiczna (badanie zamknięte)

TABELA 5.

Wyniki wstępne badań klinicznych nad zastosowaniem inhibitorów kinazy JAK2 u chorych na czerwienicę prawdziwą (PV) i nadpłytkowość samoistną (ET).

Badanie	Terapia	Odpowiedzi	Toksyczność
Moliterno i wsp.	CEP-701 (80 mg 2x dz.)	↓splenomegalii (83%), potrzeby krwiopustów (60%) PV: 97% (CR 45%) ET 90% (CR 13%)	Przewód pokarmowy, epizody zakrzepowe
Verstovsek i wsp.	INCB011824 (10–25 mg 2x dz.)	PV: 97% (CR 45%) ET 90% (CR 13%)	Niedokrwistość, małopłytkowość

W podsumowaniu należy stwierdzić, że zastosowanie inhibitorów JAK2 u pacjentów z mielofibrozą prowadzi do zmniejszenia wielkości śledziony u około połowy chorych, redukcji stopnia nasilenia występujących objawów ogólnych, zwiększenia tolerancji wysiłku fizycznego oraz poprawy jakości życia. U chorych z czerwienicą prawdziwą i nadpłytkowością samoistną ich podanie prowadzi do znaczącej poprawy w zakresie parametrów krwi

obwodowej oraz do wyraźnego zmniejszenia zapotrzebowania na leczenie upustami krwi.

Z wymienionych powodów zastosowanie inhibitorów kinazy tyrozynowej Janus 2 może już w niedalekiej przyszłości zmienić obowiązujące standardy terapii JAK2-dodatnich nowotworów mieloproliferacyjnych.

Piśmiennictwo

- Baxter E.J., Scott L.M., Campbell P.J. et al.: Cancer Genome Project Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365: 1054-1061.
- James C., Ugo V., Le Couedic J.P. et al.: A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005; 434: 1144-1148.
- Ma W., Zhang X., Wang X. et al.: MPL mutation profile in JAK2 mutation-negative patients with myeloproliferative disorders. *Diagn. Mol. Pathol.* 2011; 20: 34-9.
- Panani A.D.: Cytogenetic and molecular aspects of Philadelphia negative chronic myeloproliferative disorders: clinical implications. *Cancer Lett.* 2007; 255: 12-25.
- Baxter E.J., Scott L.M., Campbell P.J. et al.: Cancer genome project: acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365: 1054-1061.
- Passamonti F., Rumi E., Pietra D. et al.: Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation and constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders. *Blood* 2006; 107: 3676-3682.
- Lippert E., Boissinot M., Kralovics R. et al.: The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 2006; 108: 1865-1867.
- Tefferi A., Lasho T.L., Schwager S.M. et al.: The clinical phenotype of wild-type, heterozygous, and homozygous JAK2V617F in polycythemia vera. *Cancer* 2006; 106: 631-635.
- Jones A.V., Chase A., Silver R.T. et al.: JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat. Genet.* 2009; 41: 446-9.
- Kilpivaara O., Mukherjee S., Schram A.M. et al.: A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2(V617F)-positive myeloproliferative neoplasms. *Nat. Genet.* 2009; 41: 455-9.
- Olcaydu D., Harutyunyan A., Jäger R. et al.: A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nat. Genet.* 2009; 41: 450-4.
- Pietra D., Li S., Brisci A., Passamonti F. et al.: Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood* 2008; 111: 1686-9.
- Baker S.J., Rane S.G., Reddy E.P.: Hematopoietic cytokine receptor signaling. *Oncogene* 2007; 26: 6724-37.
- Jatiani S.S., Baker S.J., Silverman L.R. et al.: JAK/STAT Pathways in Cytokine Signaling and Myeloproliferative Disorders: Approaches for Targeted Therapies. *Genes Cancer* 2010; 1: 979-993.
- Funakoshi-Tago M., Tago K., Kasahara T. et al.: Negative regulation of Jak2 by its auto-phosphorylation at tyrosine 913 via the Epo signaling pathway. *Cell Signal.* 2008; 20: 1995-2001.
- Wilks A.F., Harpur A.G., Kurban R.R. et al.: Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. *Mol. Cell Biol.* 1991; 11: 2057-2065.
- Feng J., Witthuhn B.A., Matsuda T. et al.: Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. *Mol. Cell Biol.* 1997; 17: 2497-501.
- Liu K.D., Gaffen S.L., Goldsmith M.A. et al.: Janus kinases in interleukin-2-mediated signaling: JAK1 and JAK3 are differentially regulated by tyrosine phosphorylation. *Curr. Biol.* 1997; 7: 817-26.
- Saharinen P., Takaluoma K., Silvennoinen O.: Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol. Cell Biol.* 2000; 20: 3387-95.

20. Lindauer K., Loerting T., Liedl K.R. et al.: Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising the two carboxy-terminal domains reveals a mechanism for autoregulation. *Protein Eng.* 2001; 14: 27-37.
21. Saharinen P., Silvennoinen O.: The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-inducible activation of signal transduction. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 47954-63.
22. Saharinen P., Vihinen M., Silvennoinen O.: Autoinhibition of Jak2 tyrosine kinase is dependent on specific regions in its pseudokinase domain. *Mol. Biol. Cell* 2003; 14: 1448-59.
23. Kralovics R., Passamonti F., Buser A.S. et al.: A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* 2005; 352: 1779-1790.
24. Peeters P., Raynaud S.D., Cools J. et al.: Fusion of TEL, the ETS-variant gene 6 (ETV6), to the receptor-associated kinase JAK2 as a result of t(9;12) in a lymphoid and t(9;15;12) in a myeloid leukemia. *Blood* 1997; 90: 2535-40.
25. Lacronique V., Boureux A., Valle V.D. et al.: A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science* 1997; 278: 1309-12.
26. Reiter A., Walz C., Watmore A. et al.: The t(8;9)(p22;p24) is a recurrent abnormality in chronic and acute leukemia that fuses PCM1 to JAK2. *Cancer Res.* 2005; 65: 2662-7.
27. Bousquet M., Quelen C., De Mas V. et al.: The t(8;9)(p22;p24) translocation in atypical chronic myeloid leukaemia yields a new PCM1-JAK2 fusion gene. *Oncogene* 2005; 24: 7248-52.
28. Murati A., Gelsi-Boyer V., Adéladde J. et al.: PCM1-JAK2 fusion in myeloproliferative disorders and acute erythroid leukemia with t(8;9) translocation. *Leukemia* 2005; 19: 1692-6.
29. Adéladde J., Pérot C., Gelsi-Boyer V. et al.: A t(8;9) translocation with PCM1-JAK2 fusion in a patient with T-cell lymphoma. *Leukemia* 2006; 20: 536-7.
30. Bousquet M., Brousset P.: Myeloproliferative disorders carrying the t(8;9) (PCM1-JAK2) translocation. *Hum. Pathol.* 2006; 37: 500.
31. Griesinger F., Hennig H., Hillmer F. et al.: A BCR-JAK2 fusion gene as the result of a t(9;22)(p24;q11.2) translocation in a patient with a clinically typical chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 44(3): 9-33.
32. Lane S.W., Fairbairn D.J., McCarthy C. et al.: Leukaemia cutis in atypical chronic myeloid leukaemia with a t(9;22) (p24;q11.2) leading to BCR-JAK2 fusion. *Br. J. Haematol.* 2008; 142: 503.
33. Poitras J.L., Dal Cin P., Aster J.C. et al.: Novel SSBP2-JAK2 fusion gene resulting from a t(5;9)(q14.1;p24.1) in pre-B acute lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; 47: 884-9.
34. Levine R.L., Wadleigh M., Cools J. et al.: Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005; 7: 387-397.
35. Tefferi A., Gilliland D.G.: Oncogenes in myeloproliferative disorders. *Cell Cycle* 2007; 1(6): 550-66.
36. Lee T.S., Ma W., Zhang X. et al.: Mechanisms of constitutive activation of Janus kinase 2-V617F revealed at the atomic level through molecular dynamics simulations. *Cancer* 2009; 115: 1692-700.
37. Dusa A., Mouton C., Pecquet Ch. et al.: JAK2 V617F Constitutive Activation Requires JH2 Residue F595: A Pseudokinase Domain Target for Specific Inhibitors. *PLoS ONE* 2010; 5: 11157.
38. Lee T.S., Ma W., Zhang Xi et al.: Structural effects of clinically observed mutations in JAK2 exons 13-15: comparison with V617F and exon 12 mutations. *BMC Structural Biology* 2009; 9: 58.
39. Ma W., Kantarjian H., Zhang X. et al.: Mutation profile of JAK2 transcripts in patients with chronic myeloproliferative neoplasias. *J. Mol. Diagn.* 2009; 11: 49-53.
40. Scott L.M., Tong W., Levine R.L. et al.: JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N. Engl. J. Med.* 2007; 356: 459-68.
41. Pardanani A., Lasho T.L., Finke C. et al.: Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera. *Leukemia* 2007; 21: 1960-3.
42. Yeh Y.M., Chen Y.L., Cheng H.Y. et al.: High percentage of JAK2 exon 12 mutation in Asian patients with polycythemia vera. *Am. J. Clin. Pathol.* 2010; 134: 266-70.
43. Jallades L., Hayette S., Tigaud I. et al.: Emergence of therapy-unrelated CML on a background of BCR-ABL-negative JAK2V617F-positive chronic idiopathic myelofibrosis. *Leuk. Res.* 2008; 32: 1608-10.
44. Krämer A., Reiter A., Kruth J. et al.: JAK2-V617F mutation in a patient with Philadelphia-chromosome-positive chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol.* 2007; 8: 658-60.
45. Hussein K., Bock O., Seegers A. et al.: Myelofibrosis evolving during imatinib treatment of a chronic myeloproliferative disease with coexisting BCR-ABL translocation and JAK2V617F mutation. *Blood* 2007; 109: 4106-7.
46. Xie S., Wang Y., Liu J. et al.: Involvement of Jak2 tyrosine phosphorylation in Bcr-Abl transformation. *Oncogene* 2001; 20: 6188-95.
47. Kiss R., Sayeski P.P., Keser G.M.: Recent developments on JAK2 inhibitors: a patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.* 2010; 20: 471-95.
48. Verstovsek S., Kantarjian H., Mesa R.A. et al.: Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *N. Engl. J. Med.* 2010; 363: 1117-1127.
49. Pardanani A., Gotlib J.R., Jamieson C. et al.: Safety and efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29: 789-796.
50. Mesa R.A., Kantarjian H., Tefferi A. 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 Apr 8; doi: 10.1002/cncr.26129 [online].
51. Hexner E., Goldberg J., Prchal J. et al.: A Multicenter, Open Label Phase I/II Study of CEP-701 (Lestaurtinib) in Adults With Myelofibrosis; a Report on Phase I: A Study of the Myeloproliferative Disorders Research Consortium (MPDRC). *ASH Annual Meeting Abstracts* 2009; 114: 754.
52. Santos F.P., Kantarjian H.M., Jain N. et al.: Phase 2 study of CEP-701, an orally available JAK2 inhibitor, in patients with primary or post-polycythemia vera/essential thrombocythemia myelofibrosis. *Blood* 2010; 115: 1131-6.
53. Pardanani A., George G., Lasho T.L. et al.: A Phase I/II study of CYT387, an oral JAK-1/2 Inhibitor, in myelofibrosis: significant response rates in anemia, splenomegaly, and constitutional symptoms. *Blood* 2010; 116: abstract 460.
54. Chen A.T., Prchal J.T.: JAK2 kinase inhibitors and myeloproliferative disorders. *Curr. Opin. Hematol.* 2010; 17: 110-6.
55. William A.D., Lee A.C., Blanchard S. et al.: Discovery of the Macrocycle 11-(2-Pyrrolidin-1-yl-ethoxy)-14,19-dioxo-5,7,26-triaza-tetracyclo [19.3.1.1(2,6).1(8,12)]heptacosyl(25),2(26),3,5,8,10,12(27),16,21,23-decaene (SB1518), a Potent Janus Kinase 2/Fms-Like Tyrosine Kinase-3 (JAK2/FLT3) Inhibitor for the Treatment of Myelofibrosis and Lymphoma. *J. Med. Chem.* 2011 May 23 [online].

56. Ioannidis S., Lamb M.L., Wang T. et al.: Discovery of 5-chloro-N(2)-[(1S)-1-(5-fluoropyrimidin-2-yl)ethyl]-N(4)-(5-methyl-1H-pyrazol-3-yl)pyrimidine-2,4-diamine (AZD1480) as a novel inhibitor of the Jak/Stat pathway. *J. Med. Chem.* 2010 Dec 7 [online].
57. Baffert F., Régnier C.H., De Pover A. et al.: Potent and selective inhibition of polycythemia by the quinoxaline JAK2 inhibitor NVP-BSK805. *Mol. Cancer Ther.* 2010; 9: 1945-55.
58. Santos F.P., Verstovsek S.: JAK2 inhibitors: what's the true therapeutic potential? *Blood Rev.* 2011; 25: 53-63.
59. Quintás-Cardama A., Kantarjian H., Cortes J. et al.: Janus kinase inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasias and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2011; 10: 127-40.
60. Kasper S., Breitenbuecher F., Hoehn Y. et al.: The kinase inhibitor LS104 induces apoptosis, enhances cytotoxic effects of chemotherapeutic drugs and is targeting the receptor tyrosine kinase FLT3 in acute myeloid leukemia. *Leuk. Res.* 2008; 32: 1698-708.
61. Lipka D.B., Hoffmann L.S., Heide F. et al.: LS104, a non-ATP-competitive small-molecule inhibitor of JAK2, is potently inducing apoptosis in JAK2V617F-positive cells. *Mol. Cancer Ther.* 2008; 7: 1176-84.
62. Reddy M.V., Pallela V.R., Cosenza S.C. et al.: Design, synthesis and evaluation of (E)-alpha-benzylthio chalcones as novel inhibitors of BCR-ABL kinase. *Bioorg. Med. Chem.* 2010; 18: 2317-26.
63. Jatiani S.S., Cosenza S.C., Reddy M.V. et al.: A Non-ATP-Competitive Dual Inhibitor of JAK2 and BCR-ABL Kinases: Elucidation of a Novel Therapeutic Spectrum Based on Substrate Competitive Inhibition. *Genes Cancer* 2010; 1: 331-345.

Adres do korespondencji:

prof. dr hab. n. med. Krzysztof Lewandowski
Katedra i Klinika Hematologii i Chorób Rozrostowych Układu Krwiotwórczego
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu
ul. Szamarzewskiego 84, 60-659 Poznań
tel.: (61) 854-93-45
e-mail: krzysztof.lewandowski@skpp.edu.pl