

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0613863-2 A2**

(22) Data de Depósito: 19/07/2006
(43) Data da Publicação: 15/02/2011
(RPI 2093)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 45/06
A61K 31/553
A61K 31/506

(54) Título: **COMPOSIÇÕES PARA TRATAMENTO DE MASTOCITOSE SISTÊMICA**

(30) Prioridade Unionista: 20/07/2005 US 60/701,098

(73) Titular(es): PETER VALENT

(72) Inventor(es): PETER VALENT

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemens, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006064431 de 19/07/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/010014 de 25/01/2007

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES PARA TRATAMENTO DE MASTOCITOSE SISTÊMICA. A presente invenção refere-se ao uso da combinação dos inibidores de fosfato de tirosina AMN107 e PK0412 para a preparação de um fármaco para o tratamento de uma doença proliferativa relacionada a mastócitos. A presente invenção também se refere a um tratamento de combinação de um inibidor de fosfato de tirosina com um inibidor de TK que seja eficaz contra uma doença proliferativa relacionada a mastócitos, incluindo particularmente mastocitose sistêmica (SM), incluindo SM agressiva (ASM) e leucemia de mastócitos (MCL).

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSIÇÕES PARA TRATAMENTO DE MASTOCITOSE SISTÊMICA**".

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se ao uso de inibidores da tirosina
5 quinase para a preparação de um fármaco para o tratamento de mastocitose sistêmica. A presente invenção também se refere a um método de tratamento de mastocitose sistêmica.

Antecedentes da Invenção

A mastocitose sistêmica (SM) pode ser classificada em SM indolente (pouca ou nenhuma evidência de função de órgão prejudicada), SM
10 agressiva (presença de função de órgão prejudicada), doença de células hematológicas não-mastócitos associada a SM (SM-AHNMD) e leucemia de mastócitos. A apresentação clínica de SM em adultos é heterogênea e inclui doença cutânea (normalmente urticária pigmentosa), sintomas de liberação
15 de mediador de mastócito (cefaléia, rubor, vertigem, síncope, anafilaxia e outros) e lesão direta ou indireta de órgãos (dor óssea por lesões ósseas líticas, osteoporose ou fraturas ósseas, hepatoesplenomegalia, citopenia por envolvimento da medula óssea). Além disso, cerca de 20% dos pacientes com SM podem apresentar eosinofilia significativa e, às vezes, isolada
20 (Tefferi e Pardanani 2004).

Em geral, a leucemia de mastócitos é uma doença terminal com a sobrevida medida em meses e, até agora, nenhuma terapia eficaz. A história natural da SM indolente é muito melhor com uma sobrevida mediana medida em décadas e progressão infrequente para SM agressiva e SM-
25 AHNMD. O resultado da SM-AHNMD é determinado pela AHNMD associada e é significativamente pior do que SM sem AHNMD. Tanto na SM sem AHNMD indolente, quanto agressiva, um teor aumentado de mastócitos e eosinófilos de medula óssea, fosfatase alcalina sérica aumentada e hepatoesplenomegalia foram associados a um prognóstico ruim (Tefferi e Pardanani 2004). A remissão histológica e clínica completa foi conseguida em
30 pacientes com SM associada à fusão de genes FIP1L1-PDGFR α , quando tratada com Gleevec® (Pardanani 2003a, Pardanani 2003b).

Sumário da Invenção

Vários conceitos de tratamento emergentes para neoplasias mielóides se baseiam em novos fármacos que têm como alvo tirosina quinases (TK) críticas ou moléculas de sinalização a jusante.¹⁻⁵ A mastocitose sistêmica (SM) é uma neoplasia hematopoiética que se comporta como uma doença mieloproliferativa indolente na maioria dos pacientes, mas que também pode se apresentar como uma doença agressiva (a SM agressiva é aqui designada como "ASM") ou mesmo como uma leucemia, por exemplo, leucemia de mastócitos (aqui designada como "MCL").⁶⁻¹¹ Em pacientes com ASM e MCL, a resposta à terapia convencional é ruim na maioria dos casos, e o prognóstico é grave.⁶⁻¹² Conseqüentemente, foram feitas inúmeras tentativas para identificar novos alvos de terapia em mastócitos neoplásicos (MC) e para definir novas estratégias de tratamento para esses pacientes.⁹⁻¹²

Na maioria dos pacientes com SM, incluindo aqueles que são diagnosticados com ASM ou MCL, a mutação no ponto *c-KIT* somático D816V (Asp816Val) é detectável em células (mastócitos) neoplásicas.¹³⁻¹⁷ Essa mutação pontual está associada à fosforilação independente de ligante e ativação de KIT, e diferenciação autônoma e crescimento de células afetadas.^{17,18} Com base nessa associação com atividade de tirosina quinase (TK) constitutiva, a variante com mutação D816V de KIT é um alvo de terapia atraente.^{9-12,19}

Foram feitos inúmeros esforços em anos recentes para identificar fármacos adequados que inibissem a atividade de TK do KIT D816V.^{9-12,19-24} Descobriu-se recentemente que o inibidor de TK imatinib (STI571), que é amplamente usado em hematologia clínica, neutraliza o crescimento de MC neoplásico, exibindo KIT do tipo selvagem (wt) ou a variante com mutação F522C de ocorrência rara do KIT.²⁰⁻²³ Além disso, descobriu-se que esse fármaco bloqueia o crescimento de células neoplásicas em pacientes que tenham SM associada à eosinofilia clonal e um gene de fusão FIP1L1/PDGFRA (SM com leucemia eosinofílica crônica associada, aqui chamada de "SM-CEL").²⁴⁻²⁶ Entretanto, o imatinib foi incapaz de inibir o

crescimento de MC neoplásicos portadores da mutação de *c-KIT* D816V20-22, o que indica a clara necessidade de pesquisas adicionais de novos inibidores de TK que bloqueiem KIT D816V e, portanto, o crescimento de MC neoplásicos em SM.

5 Os novos fármacos direcionados a TK PKC412 e AMN107 neutralizam a atividade de TK de D816V-KIT e inibem o crescimento de MC humanos neoplásicos e células Ba/F3 com expressão induzível por doxíciclina de KIT-D816V, o crescimento de mastócitos neoplásicos primários e o crescimento da linhagem MCL humana HMC-1, que é portadora dessa mutação
10 *c-KIT*. PKC412 se mostra um fármaco superior, com valores de IC50 de 50 - 250 nM e sem diferenças observadas entre células HMC-1 exibindo ou sem KIT-D816V. Em contraste, AMN107 exibe efeitos mais potentes em células HMC-1 KIT-D816V-negativas. Resultados correspondentes são obtidos com células Ba/F3 exibindo KIT do tipo selvagem ou com mutação D816V. Os
15 efeitos inibidores de crescimento de PKC412 e AMN107 em HMC-1 estão associados à indução de apoptose e regulação negativa de CD2 e CD63. Verifica-se que PKC412 coopera com AMN107, imatinib e cladribina (isto é, 2CdA) na produção da inibição de crescimento em HMC-1. Também se demonstra que PKC412 tem sinergia com AMN107 e cladribina (2CdA) na pro-
20 dução da inibição de crescimento em células HMC-1. Juntos, PKC412 e AMN107 representa novos agentes promissores para a terapia direcionada de SM.

Esta invenção se refere a um tratamento em combinação de PKC412 e AMN107 que é eficaz contra SM, particularmente SM associada à
25 mutação de *c-KIT* oncogênica D816V. Esta invenção também se refere a um tratamento de combinação de PKC412 e um inibidor de TK que é eficaz contra SM, particularmente mastocitose sistêmica (SM) incluindo SM agressiva (ASM) e leucemia de mastócitos (MCL). Em uma modalidade preferida, SM, ASM e MCL estão associadas à mutação *c-KIT* oncogênica, incluindo parti-
30 cularmente D816V.

Breve Descrição dos Desenhos

As Figuras 1A-D são uma representação dos efeitos de inibido-

res de TK sobre a fosforilação de KIT em células neoplásicas. Figuras 1A,B: fosforilação de KIT em células HMC-1.1 (Figura 1A) e células HMC-1.2 (exibindo KIT D816V; Figura 1B) após incubação em meio de controle (Controle), imatinib STI571 (1 μ M), PKC412 (1 μ M), ou AMN107 (1 μ M) durante 4 horas. Figura 1C,D: fosforilação de KIT em células Ton.Kit.wt (Figura 1C) e células Ton.Kit.D816V.27 (Figura 1D) após incubação em meio de controle (Controle), imatinib (isto é, STI571) (1 μ M), PKC412 (1 μ M), ou AMN107 (1 μ M) durante 4 horas. Antes da descrição ao fármaco, células Ton.Kit.wt e células Ton.Kit.D816V.27 são mantidas em doxíciclina, , 1 μ g/mL durante 24 horas para induzir a expressão de KIT. No caso do clone Ton.Kit.wt, as células também são expostas a SCF (100 ng/mL, 4 horas) para induzir a fosforilação de KIT (p-KIT). Em todas as células, a imunoprecipitação é conduzida usando-se o mAb anti-KIT SR-1. O Western blotting é feito usando-se mAb anti-fosfo 4G10 para detecção de p-KIT, e mAb anti-KIT 1C1 para detecção da proteína KIT total.

As Figuras 2A-D são uma representação gráfica dos efeitos de PKC412, AMN107 e imatinib sobre a proliferação de células HMC-1. Figura 2A: Efeitos dependentes do tempo de PKC412 sobre a captação de 3H-timidina em células HMC-1.2. As células HMC-1.2 são incubadas com meio de controle ou PKC412 (300 nM) a 37°C e 5% de CO₂ por vários períodos de tempo, conforme indicado. Depois da incubação, a captação de 3H-timidina é analisada. Os resultados são expressos como porcentagem do controle (isto é, a captação de 3H-timidina no meio de controle em cada momento) e representam a média $\pm$ S.D. de triplicatas. Figura 2B-D: Efeitos dependentes da dose de inibidores de TK sobre a captação de 3H-timidina em células HMC-1. Células HMC-1.1 (●-●) e células HMC-1.2 (■-■) são incubadas em meio de controle na ausência (0) ou presença de várias concentrações de PKC412 (Figura 2B), AMN107 (Figura 2C) ou imatinib (Figura 2D) a 37°C durante 48 horas. Depois da incubação, mede-se a captação de 3H-timidina. Os resultados são expressos como porcentagem do controle (0, 100%) e representam a média $\pm$ S.D. de pelo menos 3 experimentos independentes.

As Figuras 3A-B são uma representação gráfica dos efeitos de PKC412, AMN107 e imatinib sobre a captação de 3H-timidina em células Ton.Kit. Figura 3A: Células Ton.Kit.wt são mantidas em meio de controle (barras claras) ou são induzidas para expressar wt KIT ativada por adição de doxíciclina (1 µg/mL) e SCF (barras escuras). Em ambas as condições, as células são expostas a meio de controle (Co) ou a várias concentrações de PKC412, AMN107 ou imatinib (STI571), conforme indicado, durante 48 horas (37°C, 5% de CO₂). Depois disso, a captação de 3H-timidina é avaliada conforme descrito no texto. Os resultados são expressos como porcentagem do controle (Co) e representam a média ± S.D. de três experimentos independentes. Figura 3B: Células Ton.Kit.D816V.27 são mantidas em meio de controle (barras claras) ou são induzidas a expressar KIT D816V por adição de doxíciclina (1 µg/mL) (barras escuras) e, então, são expostas a meio de controle (Co) ou a várias concentrações de PKC412, AMN107 ou imatinib (STI571), conforme indicado, durante 48 horas (37°C, 5% de CO₂). Depois disso, determina-se a captação de 3H-timidina. Os resultados são expressos como porcentagem do controle (células expostas a meio de controle, aqui designadas como "Co") e representam a média ± S.D. de três experimentos independentes.

A Figura 4 é uma representação gráfica da regulação negativa por PKC412 do crescimento de células (mastócitos) neoplásicas primárias exibindo D816V. Células neoplásicas primárias de medula óssea expressando KIT D816V são isoladas de pacientes com mastocitose sistêmica latente. As células isoladas são incubadas em meio de controle (Co) ou com várias concentrações de PKC412, AMN107 e imatinib conforme indicado. O crescimento celular é quantificado por medição da captação de 3H-timidina. Os resultados são expressos como porcentagem do controle (em que Co é igual a 100%) e representam a média ± S.D. de triplicatas. Em células bm normais, não se observa nenhum efeito de PKC412 (não mostrado).

As Figuras 5A-F são uma representação gráfica dos efeitos de inibidores de TK sobre a apoptose de células HMC-1. Células HMC-1.1 (Figuras 5A,C,E) e células HMC-1.2 (Figuras 5B,D,F) são cultivadas na ausên-

cia (Co) ou presença de várias concentrações de PKC412 (Figuras 5A,B), AMN107 (Figuras 5C,D) ou imatinib (Figuras 5E,F), conforme indicado, a 37°C durante 24 horas. Depois disso, as porcentagens de células apoptóticas são quantificadas por microscopia óptica. Os resultados representam a
5 média $\pm$ S.D. de três experimentos independentes.

As Figuras 6A-D são uma representação do exame por microscopia eletrônica da apoptose induzida por PKC412 em células HMC-1. Células HMC-1.2 são incubadas com meio de controle (Figura 6A), PKC412, 500 nM (Figura 6B) ou PKC412, 900 nM (Figuras 6C,D) a 37°C durante 24 horas.
10 Então, as células são colhidas e analisadas quanto a sinais ultra-estruturais de apoptose. Enquanto células apoptóticas raramente eram vistas em culturas mantidas com meio de controle (Figura 6A), células HMC-1.2 cultivadas em PKC412 (Figuras 6B-D) freqüentemente apresentaram sinais de apoptose, incluindo contração celular, ondulação da membrana, vacuolização e
15 condensação da cromatina nuclear.

A Figura 7 é uma representação de células HMC-1.2 expostas a meio de controle (Controle), PKC412 (1 μ M), AMN107 (1 μ M) ou imatinib (1 μ M) a 37°C durante 24 horas. Então, as células são examinadas quanto à viabilidade e à apoptose por coloração combinada com iodeto de propídio
20 (PI)/Vnexina A-FITC.

As Figuras 8A-H são uma representação da apoptose em células HMC-1 avaliadas por ensaio Tunel. Células HMC-1.1 (Figuras 8A-D) e células HCM-1.2 (Figuras 8E-H) são incubadas em meio de controle (Figuras 8A,E), PKC412, 1 μ M (Figuras 8B,F), AMN107, 1 μ M (Figuras 8C,G) ou imatinib, 1 μ M (Figuras 8D,H) a 37°C durante 24 horas. Depois disso, as células
25 são colhidas e submetidas ao ensaio Tunel. Conforme se observa, PKC412 produziu apoptose na maioria das células HMC-1.1 e HMC-1.2, ao passo que AMN107 e imatinib mostraram potentes efeitos indutores de apoptose apenas em células HNC-1.1 (Figuras 8C,D), mas não em células HMC-1.2
30 exibindo KIT D816V (Figuras 8G,H).

As Figuras 9A-B são uma representação gráfica dos efeitos de inibidores de TK sobre a expressão de antígenos de superfície celular em

células HMC-1.2. Figura 9A: Células HMC-1.2 são expostas a meio de controle (Co, barras claras), PKC412, 1 μ M (barras escuras), AMN107, 1 μ M (barras hachuradas) ou imatinib (isto é, STI571), 1 μ M (barras cinza) a 37°C durante 24 horas. Os resultados mostram a porcentagem do controle e representam a média $\pm$ S.D. de 3 experimentos independentes. Figura 9B: Efeito dependente de dose de PKC412 sobre a expressão de CD63 em células HMC-1.2. As células são incubadas com várias concentrações de PKC412, conforme indicado, a 37°C durante 24 horas. Depois disso, as células são colhidas e examinadas quanto à expressão de CD63 por citometria de fluxo. A figura mostra um resultado típico de um experimento. Conforme se observa, PKC412 diminuiu de maneira dependente da dose a expressão de CD63.

As Figuras 10A-J são uma representação gráfica dos efeitos sinérgicos de fármacos sobre o crescimento de células HMC-1. Células HMC-1.1 desprovidas de KIT D816V (Figuras 10A-F) e células HMC-1.2 exibindo KIT D816V (Figuras 10G-J) são incubadas com meio de controle (0) ou várias combinações de fármacos (em razão fixa), conforme indicado, a 37°C durante 48 horas para determinar efeitos antiproliferativos cooperativos. Figuras 10A,C,E,G,I: Depois da incubação com fármacos isolados (Figuras 10A: PKC412, ■-■; AMN107, ●-●; Figura 10C: STI571, ■-■; AMN107, ●-●; Figura 10E: STI571, ■-■; PKC412, ●-●; Figura 10G: PKC412, ■-■; AMN107, ●-●; Figura 10I: PKC412, ■-■; 2CdA, ●-●) ou combinações de fármacos (▲-▲), as células são analisadas quanto à captação de 3H-timidina. Os resultados mostram a captação de 3H-timidina como porcentagem do controle (meio de controle, designado como "0" ou como "100%") e representam a média $\pm$ S.D. de triplicatas de um experimento típico (resultados correspondentes são obtidos em pelo menos 2 outros experimentos para cada combinação de fármacos). As imagens à direita (Figuras 10B,D,F,H,J) mostram valores de índice de combinação determinados para cada fração afetada, de acordo com o método de Chou e Talalay³⁹ usando o software Calcosyn. Um valor de índice de combinação (CI) de 1,0 indica um efeito aditivo, um CI maior que 1,0 indica antagonismo, e um CI de menos de 1,0 indica sinergia.

As Figuras 11A-D são uma representação dos efeitos de dasatinib sobre a fosforilação de KIT em células neoplásicas. As Figuras 11A,B representam a fosforilação com tirosina de KIT em células HMC-1.1 (Figura 11A) e células HMC-1.2 (exibindo KIT D816V) (Figura 11B) depois da incubação em meio de controle ou várias concentrações de dasatinib durante 4 horas. As Figuras 11C,D representam a fosforilação de KIT em células Ton.Kit.wt expostas à doxíciclina (Figura 11C) e células Ton.Kit.D816V.27 (Figura 11D) depois da incubação em meio de controle (0) ou dasatinib (10-3 - 103 nM) durante 4 horas. Antes da descrição ao fármaco, células Ton.Kit.wt e células Ton.Kit.D816V.27 foram mantidas em meio de controle (Controle) ou em doxíciclina durante 24 horas para induzir a expressão de KIT. No caso de Ton.Kit.wt, as células também foram expostas a SCF (100 ng/mL, 4 horas) para induzir a fosforilação de KIT (p-KIT). Em todas as células, a imunoprecipitação foi conduzida usando-se o mAb anti-KIT 1C1. O Western blotting foi realizado usando-se o mAb anti-fosfo-tyr 4G10 para detecção de p-KIT e o mAb anti-KIT 1C1 para detecção de proteína KIT total (KIT).

As Figuras 12A-F são uma representação dos efeitos de dasatinib sobre a proliferação de células HMC-1 e o crescimento e formação de aglomerados de células BaF/3. A Figura 12A representa os efeitos dependentes do tempo de dasatinib sobre a captação de 3H-timidina em células HMC-1.1 (■-■) e células HMC-1.2 (●-●). Células HMC-1.1 foram incubadas com dasatinib a 10 nM, e células HMC-1.2 com dasatinib a 1 µM, a 37°C e 5% de CO2 por vários períodos de tempo, conforme indicado. Depois da incubação, mediu-se a captação de 3H-timidina. Os resultados são expressos como porcentagem do controle (= a captação de 3H-timidina em células mantidas em meio de controle) e representam a média ± S.D. de 3 experimentos independentes. A Figura 12B representa efeitos dependentes da dose de dasatinib sobre a captação de 3H-timidina em células HMC-1.1 (■-■) e células HMC-1.2 (●-●). As células foram incubadas em meio de controle na ausência ou presença de várias concentrações de dasatinib a 37°C durante 48 horas. Depois da incubação, mediu-se a captação de 3H-timidina.

Os resultados são expressos como porcentagem do controle e representam a média $\pm$ S.D. de 3 experimentos independentes. (Figura 12C) Efeitos de dasatinib sobre o crescimento de células Ton.Kit.wt. As células foram mantidas em meio contendo IL-3 antes da e durante a incubação com dasatinib (●-●) ou foram pré-incubadas com doxiciclina (1 μ g/mL) na presença de IL-3 durante 24 horas e, então, foram incubadas com várias concentrações de dasatinib em meio contendo doxiciclina e SCF (100 ng/mL) sem IL-3 durante 48 horas a 37°C (■-■). Depois da incubação, as células foram colhidas e submetidas a experimentos de captação de 3H-timidina. Os resultados são expressos como porcentagem do controle e representam a média $\pm$ S.D. de 3 experimentos independentes. (Figura 12D) Efeitos de dasatinib sobre o crescimento de células Ton.Kit.D816V. As células foram incubadas em meio de controle (+IL-3) e várias concentrações de dasatinib (conforme indicado) na ausência (●-●) ou presença (■-■) de doxiciclina (1 μ g/mL) durante 48 horas (37°C). Depois disso, a viabilidade celular foi determinada pelo teste de exclusão de azul tripiano. Os resultados são expressos como porcentagem de células viáveis (calculada a partir da porcentagem de células positivas para azul tripiano) em comparação com o controle (sem dasatinib = 100%) e representam a média $\pm$ S.D. de 3 experimentos independentes. (Figuras 12E,F) Efeitos de dasatinib (Figura 12E) e AMN107 (Figura 12F) sobre a formação de aglomerado induzido por KIT-D816V em células Ton.Kit.D816V.27. As células foram incubadas sem doxiciclina (Co) ou em doxiciclina (1 μ g/mL) na ausência ou presença de várias concentrações de dasatinib ou AMN107, conforme indicado, durante 24 horas. Depois da incubação, os números de aglomerados foram contados sob um microscópio invertido. Os resultados são expressos como porcentagem de formação de aglomerados em comparação com células mantidas em meio de controle (Co) e doxiciclina (= 100%) e representam a média $\pm$ S.D. de 3 experimentos independentes.

A Figura 13 é uma representação de que dasatinib regula negativamente o crescimento de células neoplásicas primárias em um paciente com SM positiva para KIT D816V com leucemia associada. Células neoplá-

sicas primárias de medula óssea foram isoladas de um paciente com ASM positiva para KIT D816V associada a AML. As células isoladas foram incubadas em meio de controle ou em várias concentrações de dasatinib (●-●), PKC412 (■-■), AMN107 (▲-▲) ou imatinib (▼-▼), conforme indicado. O crescimento celular foi quantificado por medição da captação de 3H-timidina. Os resultados são expressos como porcentagem do controle (células mantidas em meio de controle = 100%) e representam a média $\pm$ S.D. de triplicatas. Em células de medula óssea normais, nenhum efeito dos inibidores de TK aplicados foi observado (não mostrado).

As Figuras 14A-C representam que dasatinib induz apoptose em células HMC-1. (Figuras 14A,B) Células HMC-1.1 (Figura 14A) e células HMC-1.2 (Figura 14B) foram cultivadas na ausência (Co) ou presença de várias concentrações de dasatinib, conforme indicado, durante 24 horas. Depois disso, as porcentagens de células apoptóticas foram quantificadas por microscopia óptica. Os resultados representam a média $\pm$ S.D. de três experimentos independentes. O asterisco indica $p < 0,05$. (Figura 14C) O exame por microscopia eletrônica de apoptose induzida por dasatinib em células HMC-1.1 e células HMC-1.2. Células HMC-1 foram incubadas com meio de controle ou dasatinib (1 μ M) a 37°C durante 24 horas. Então, as células foram colhidas e analisadas quanto a sinais ultra-estruturais de apoptose. Enquanto células apoptóticas raramente eram vistas em culturas mantidas em meio de controle, a maioria das células HMC-1 cultivadas em dasatinib apresentaram sinais de apoptose incluindo contração celular, ondulação da membrana, vacuolização e condensação da cromatina nuclear. (Figura 14D,E) Apoptose induzida por dasatinib em células HMC-1 avaliadas por ensaio Tunel. Células HMC-1.1 (Figura 14D) e células HMC-1.2 (Figura 14E) foram incubadas em meio de controle, várias concentrações de dasatinib (conforme indicado) ou PKC412 (100 nM e 1 μ M), conforme indicado, a 37°C durante 24 horas. Depois disso, as células foram colhidas e submetidas a ensaio Tunel. Conforme se observa, dasatinib produziu apoptose dependente da dose em células HMC-1.1 e HMC-1.2.

As Figuras 15A-F representam os efeitos de dasatinib sobre a

expressão de antígenos de superfície celular em células HMC-1. (Figura 15A) Células HMC-1.1 e células HMC-1.2 (Figura 15B) foram expostas a meio de controle ou várias concentrações de dasatinib (conforme indicado) ou PKC412 (1 μ M) a 37°C durante 24 horas. Depois da incubação, as células foram examinadas quanto à expressão de vários antígenos CD por citometria de fluxo usando mAbs específicos para CD. As Figuras 15C-D mostram os níveis de intensidade de fluorescência média (MFI) como porcentagem do controle (= 100%). Os resultados representam a média $\pm$ S.D. de 3 experimentos independentes. Asterisco: $p < 0,05$. (Figuras 15E,F) Expressão de CD63 em células HMC-1.1 (Figura 15E) e células HMC-1.2 (Figura 15F) depois da incubação em meio de controle, várias concentrações de dasatinib ou PKC412 (1 μ M) a 37°C durante 24 horas. A citometria de fluxo foi efetuada com o mAb contra CD63 CLB-gran12 (linha cheia). A linha tracejada representa o anticorpo de controle correspondente a isotipo.

As Figuras 16A-D representam efeitos sinérgicos de fármacos sobre o crescimento de células HMC-1. Células HMC-1.1 (Figuras 16A-B) e células HMC-1.2 exibindo KIT D816V (Figuras 16C-D) foram incubadas com fármacos isolados ou várias combinações de fármacos (a uma razão fixa) a 37°C durante 48 horas antes de se determinar a captação de 3H-timidina. (Figura 16A) HMC-1.1 foram incubadas com várias concentrações de dasatinib (■-■) ou PKC412 (●-●) ou combinações de ambos os fármacos (▲-▲). (Figura 16B) HMC-1.1 foram incubadas com várias concentrações de dasatinib (●-●) ou imatinib (■-■) ou combinações de ambos os fármacos (▲-▲). (Figura 16C) Células HMC-1.2 foram incubadas com várias concentrações de dasatinib (■-■) ou PKC412 (●-●) ou com combinações de ambos os fármacos (▲-▲). (Figura 16D) Células HMC-1.2 foram incubadas com várias concentrações de dasatinib (■-■) ou 2CdA (●-●) ou com combinações de ambos os fármacos (▲-▲). Os resultados representam a média $\pm$ S.D. de triplicatas de um experimento típico. Conforme avaliado pelo programa Cal-cusyn, as interações dos fármacos (Figuras 16A-D) se mostraram de natureza sinérgica.

A Figura 17 representa células HMC-1.2 que foram incubadas

com meio de controle ou várias concentrações de dasatinib, conforme indicado, a 37°C durante 48 horas. Depois disso, mediu-se a captação de 3H-timidina. Os resultados são expressos como porcentagem do controle (células mantidas em meio de controle = 100%) e representam a média $\pm$ S.D. de três experimentos independentes.

Descrição Detalhada

O problema a ser resolvido pela presente invenção é o uso de uma combinação de PKC412 e AMN107 no tratamento de mastocitose sistêmica, particularmente SM associada à mutação oncogênica de c-KIT D816V.

Na maioria dos pacientes com mastocitose sistêmica (SM), incluindo SM agressiva e leucemia de mastócitos (MCL), as células neoplásicas expressam a mutação oncogênica de c-KIT D816V. Essa mutação ativa a tirosina quinase (TK) do receptor de KIT, que, portanto, representa um alvo atrativo para a terapia. Entretanto, a maioria dos inibidores de TK disponíveis, incluindo STI571 (imatinib; Novartis Pharma AG), são incapazes de bloquear a atividade de TK do KIT D816V a concentrações farmacológicas. Apresenta-se provas de que os novos fármacos direcionados a TK PKC412 e AMN107 (Novartis) bloqueiam a atividade de TK de KIT com mutação D816V e neutralizam o crescimento de células Ba/F3 com expressão induzida por doxíciclina de KIT D816V, assim como o crescimento da linhagem celular HMC-1 de leucemia de mastócitos humana que expressa essa mutação de c-KIT. Descobriu-se que PKC412 é o agente mais potente, com valores de IC50 de 50 - 200 nM e sem diferenças observadas entre células HMC-1 exibindo ou desprovidas de KIT D816V. Em contraste, AMN107 exibiu potentes efeitos apenas na ausência de KIT D816V em células HMC-1 (IC50 de 5 - 10 nM, com comparação com HMC-1 que expressa KIT D816V: IC50 de 1 - 5 μ M). Resultados correspondentes são obtidos com células Ba/F3 exibindo a variante de tipo selvagem ou com mutação D816V de KIT.

Subseqüentemente, examina-se o efeito de PKC412 sobre MC neoplásicos primários obtidos da medula óssea de um paciente com SM exibindo KIT D816V. Em linha com os dados de linhagem celular, PKC412 ini-

biu de maneira dependente da dose a captação de 3H-timidina em MC neoplásicos (IC50: 50 nM) nesse paciente, ao passo que nenhum efeito significativo é encontrado com AMN107 (0,1 - 3 µM) e imatinib (1 µM). Os efeitos inibidores de crescimento de PKC412 e AMN107 em células HMC-1 estão

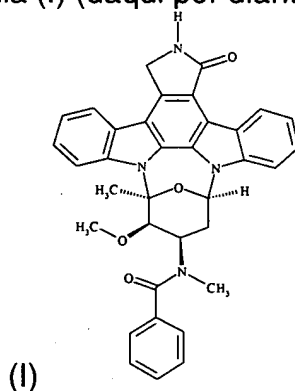
5 associados à inibição de TK de KIT em experimentos de fosfomanchamento e à indução de apoptose, conforme avaliado por morfologia convencional e por microscopia eletrônica. Além disso, descobriu-se que PKC412 regula negativamente a expressão de CD2 e CD63 (dois antígenos de superfície celular regulados positivamente em SM) em células HMC-1. Em experimen-

10 tos de co-incubação, descobriu-se que PKC412 faz sinergia com AMN107, imatinib e cladribina (2CdA), produzindo inibição do crescimento em células HMC-1 portadoras de KIT D816V, assim como em células HMC-1 desprovidas de KIT D816V. Em resumo, os dados mostram que PKC412 e AMN107 isoladamente e em combinação neutralizam o crescimento de mastócitos

15 neoplásicos que expressam a variante com mutação D816V de KIT. Ambos os fármacos podem, portanto, ser considerados como novos agentes promissores para terapia direcionado em pacientes com SM agressiva e MCL.

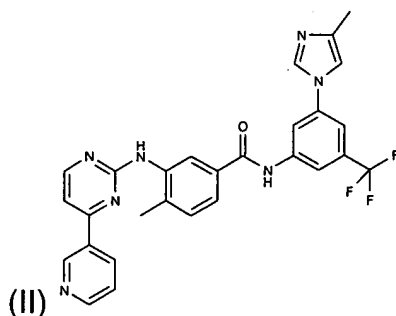
Conseqüentemente, a presente invenção se refere ao uso de N-[(9S,10R,11R,13R)-2,3,10,11,12,13-hexaidro-10-metóxi-9-metil-1-oxo-9,13-

20 epóxi-1H,9H-diindol[1,2,3-gh:3',2',1'-lm]pirrol[3,4-j][1,7]benzodiazonin-11-il]-N-metilbenzamida de fórmula (I) (daqui por diante: "PKC412"):



em combinação com 4-Metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil] benza-

mida de fórmula (II) (daqui por diante: "AMN107");



ou um sal farmaceuticamente aceitável de qualquer um ou de ambos, para o tratamento de mastocitose sistêmica.

As abreviações aqui usadas têm, de preferência, dentro do contexto desta descrição, os seguintes significados, a menos que indicado de

5 outra forma:

ASM	mastocitose sistêmica agressiva
bm	medula óssea
cladribina	2-clorodesoxiadenosina
FCS	soro de novilho fetal
10 IFN α	interferon-alfa
IP	imunoprecipitação
MCL	leucemia de mastócitos
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PE	ficoeritrina
15 rh	humano recombinante
TA	temperatura ambiente
SCF	fator de célula-tronco
SM	mastocitose sistêmica
SSM	mastocitose sistêmica latente
20 TK	tirosina quinase
wt	tipo selvagem

Os termos genéricos aqui usados têm, de preferência, dentro do contexto desta descrição, os seguintes significados, a menos que indicado de outra forma:

25 Quando se usa a forma plural para compostos, sais e outros, isso significa também um composto, sal ou similar.

Quaisquer átomos de carbono assimétricos podem estar presen-

tes na configuração (R), (S) ou (R,S), de preferência na configuração (R) ou (S). Os compostos podem, portanto, estar presentes como misturas de isômeros ou como isômeros puros, de preferência como diastereômeros enantiomericamente puros.

- 5 A invenção também se refere a possíveis tautômeros dos compostos da fórmula I e da fórmula II.

Os sais são particularmente os sais farmaceuticamente aceitáveis de compostos da fórmula I e da fórmula II. Compostos da fórmula I e da fórmula II podem ser administrados sequencial ou concomitantemente. Compostos da fórmula I e da fórmula II podem ser combinados em uma formulação única ou estar em formulações separadas.

Esses sais são formados, por exemplo, como sais de adição de ácido, de preferência com ácidos orgânicos ou inorgânicos, a partir de compostos de fórmula I e/ou fórmula II com um átomo de nitrogênio básico, particularmente os sais farmaceuticamente aceitáveis. Ácidos inorgânicos adequados são, por exemplo, ácidos halogênicos, como ácido clorídrico, ácido sulfúrico ou ácido fosfórico. Ácidos orgânicos adequados são, por exemplo, ácidos carboxílicos, fosfônicos, sulfônicos ou sulfâmicos, por exemplo, ácido acético, ácido propiônico, ácido octanóico, ácido decanóico, ácido dodecanóico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido adípico, ácido pimélico, ácido subérico, ácido azeláico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, aminoácidos, como ácido glutâmico ou ácido aspártico, ácido maléico, ácido hidroximaléico, ácido metilmaléico, ácido ciclohexanocarboxílico, ácido adamantanocarboxílico, ácido benzóico, ácido salicílico, ácido 4-aminossalicílico, ácido ftálico, ácido fenilacético, ácido mandélico, ácido cinâmico, ácido metano- ou etano-sulfônico, ácido 2-hidroxietanossulfônico, ácido etano-1,2-dissulfônico, ácido benzenossulfônico, ácido 2-naftalenossulfônico, ácido 1,5-naftaleno-dissulfônico, ácido dodecilsulfúrico, ácido 2-, 3- ou 4-metilbenzenossulfônico, ácido metilsulfúrico, ácido etilsulfúrico, ácido N-cicloexilsulfâmico, ácido N-metil-, N-etil- ou N-propil-sulfâmico ou outros ácidos protônicos orgânicos, como ácido ascórbico.

Na presença de radicais negativamente carregados, como carboxí ou sulfo, os sais também podem ser formados com bases, por exemplo, sais de metais ou amônio, como sais de metais alcalinos ou metais alcalino-terrosos, por exemplo, sais de sódio, potássio, magnésio ou cálcio, ou sais de amônio com amônia ou aminas orgânicas adequadas, como monoaminas terciárias, por exemplo, trietilamina ou tri(2-hidroxietil)amina, ou bases heterocíclicas, por exemplo, N-etil-piperidina ou N,N'-dimetilpiperazina.

Quando um grupo básico e um grupo ácido estão presentes na mesma molécula, um composto da fórmula I e/ou da fórmula II também pode formar sais internos.

Para fins de isolamento ou purificação, também é possível usar sais farmacologicamente inaceitáveis, por exemplo, picratos ou percloratos. Para uso terapêutico, apenas sais farmacologicamente aceitáveis ou compostos livres são empregados (quando aplicável, na forma de preparações farmacêuticas), e essas são, portanto, preferidas.

Em vista da íntima relação entre os novos compostos em forma livre e aqueles na forma de seus sais, incluindo aqueles sais que podem ser usados como intermediários, por exemplo, na purificação ou identificação dos novos compostos, quaisquer referências aos compostos livres acima e abaixo devem ser entendidas como se referindo também aos sais correspondentes, quando apropriado e conveniente.

No caso de serem dadas citações de pedidos de patentes ou publicações científicas, a matéria dos produtos finais, as preparações farmacêuticas e as reivindicações são aqui incorporadas no presente pedido por referência a essas publicações. Se aparecer qualquer discrepância entre declarações em uma referência incorporada e a presente descrição, então, devem prevalecer as declarações na presente descrição.

A estrutura dos agentes ativos identificados por números de código, nomes genéricos ou comerciais pode ser tirada da atual edição do compêndio-padrão "The Merck Index" ou de bases de dados, por exemplo, Patentes Internacionais (por exemplo, IMS World Publications). Seu conteúdo correspondente é aqui incorporado por referência.

Descobriu-se agora, surpreendentemente, que a combinação de AMN107 e PKC412 possui propriedades terapêuticas que a tornam particularmente útil como um inibidor da atividade de tirosina quinase e, particularmente, para o tratamento e profilaxia de doenças induzidas por KIT-D816V oncogênico, como mastocitose sistêmica.

KIT-D816V, conforme usado acima e abaixo, é a designação do produto de mutação do gene *c-Kit*, em que o ácido nucléico que codifica o ácido aspártico no resíduo 816 do polipeptídeo KIT sofre uma mutação para codificar uma valina. KIT-D816V também se refere ao produto polipeptídico do gene *c-KIT* oncogênico com mutação.

A presente invenção se refere, portanto, ao uso da combinação de AMN107 e PKC412 para a preparação de um fármaco para o tratamento de mastocitose sistêmica induzida por mutação oncogênica de c-KIT D816V ou outras doenças associadas à mutação oncogênica de c-KIT D816V ou mutações similares que ativem a tirosina quinase.

Mastocitose sistêmica (SM) inclui SM indolente, SM agressiva e doença hematológica de células não-mastócitos associada a SM e leucemia de mastócitos.

O termo "mastocitose", conforme aqui usado, se refere à mastocitose sistêmica, por exemplo, mastocitoma e também a neoplasias de mastócitos caninos. A mastocitose é um transtorno mieloproliferativo com limitadas opções de tratamento e, em geral, um prognóstico ruim. A patogênese da mastocitose foi atribuída à ativação constitutiva do receptor de tirosina quinase KIT. Em uma grande maioria dos pacientes com mastocitose, a atividade desregulada de tirosina quinase de KIT é devido a uma mutação no códon 816 da proteína (D816V), que também confere resistência a imatinib ou mesilato de imatinib, este último sendo comercializado como Gleevec® nos Estados Unidos ou Glivec® e outros lugares, *in vitro* e *in vivo*.

Mastócitos desempenham um importante papel como células efectoras primárias nos transtornos alérgicos aqui mencionados. A desgranulação mediada por IgE específica para antígeno de mastócitos leva à subsequente liberação de mediadores químicos e múltiplas citocinas e à síntese

de leucotrieno. Além disso, os mastócitos estão envolvidos na patogênese da esclerose múltipla.

Neoplasmas de mastócitos ocorrem tanto em seres humanos, quanto em animais. Em cães, neoplasmas de mastócitos são chamadas de mastocitomas, e a doença é comum, representando 7% - 21% dos tumores caninos. Deve-se fazer uma distinção entre a mastocitose humana, que normalmente é transitória ou indolente, e a neoplasia de mastócitos canina, que se comporta de maneira imprevisível e é frequentemente agressiva e metastática. Por exemplo, mastocitomas solitários humanos não metastatizam frequentemente; em contraste, 50% dos mastocitomas caninos se comportam de maneira maligna, conforme estimado por Hottendorf & Nielsen (1969) após uma revisão de 46 relatos publicados de tumores em 938 cães.

O envolvimento do receptor KIT na patogênese da mastocitose é sugerido pela observação de que várias mutações resultantes em ativação constitutiva de KIT foram detectadas em inúmeras linhagens de mastócitos. Por exemplo, uma mutação pontual no c-KIT humano, que causa a substituição de Asp816 por Val no domínio fosfotransferase e auto-ativação do receptor, ocorre em uma linhagem de leucemia de mastócitos humana de longo prazo (HMC-1) e no códon correspondente em duas linhagens de mastócitos de roedores. Além disso, essa mutação ativadora foi identificada in situ em alguns casos de mastocitose humana. Duas outras mutações ativadoras foram encontradas na região de justaposição de membrana intracelular de KIT, isto é, a substituição Val560Gly na linhagem de mastócitos humanos HMC-1, e uma deleção de sete aminoácidos (Thr573-His579) em uma linhagem de mastócitos de roedores chamada de FMA3.

A presente invenção se refere, mais particularmente, ao uso da combinação de AMN107 e PKC412 para a preparação de um fármaco para o tratamento de mastocitose sistêmica.

Em outra modalidade, a presente invenção apresenta um método para o tratamento de mastocitose sistêmica, compreendendo a administração a um mamífero necessitado desse tratamento de uma quantidade terapeuticamente eficaz da combinação de AMN107 e PKC412 ou sais ou

pró-fármacos farmacologicamente aceitáveis dos mesmos.

De preferência, a presente invenção apresenta um método para o tratamento de mamíferos, particularmente seres humanos, que sofram de mastocitose sistêmica, compreendendo a administração a um mamífero necessitado desse tratamento de uma quantidade inibidora de KIT-D816V da
5 combinação de AMN107 e PKC412 ou sais farmacologicamente aceitáveis dos mesmos.

Na presente descrição, o termo "tratamento" inclui tanto tratamento profilático, quanto preventivo, assim como tratamento curativo ou supressor de doença, incluindo o tratamento de pacientes com risco de contrair a doença ou com suspeita de terem contraído a doença, assim como pacientes doentes. Esse termo também inclui o tratamento para retardar a progressão da doença.
10

O termo "curativo", conforme aqui usado, significa eficácia no tratamento de episódios em curso envolvendo mastocitose sistêmica.
15

O termo "profilático" significa a prevenção do início ou recorrência de doenças envolvendo mastocitose sistêmica.

O termo "retardo da progressão", conforme aqui usado, significa a administração do composto ativo a pacientes que estejam em um pré-estágio ou em uma fase precoce da doença a ser tratada, em que seja diagnosticada, por exemplo, uma pré-forma da doença correspondente nos pacientes, ou em que os pacientes estejam em uma condição, por exemplo, durante um tratamento médico ou uma condição resultante de um acidente sob o qual seja provável que se desenvolva a doença correspondente.
20

Essa faixa imprevista de propriedades significa que o uso da combinação de AMN107 e PKC412 é de interesse particular para a fabricação de um medicamento para o tratamento de mastocitose sistêmica.
25

Esse efeito pode ser particularmente relevante em termos clínicos para pacientes para pacientes com mastocitose sistêmica.

Para demonstrar que a combinação de AMN107 e PKC412 é particularmente adequada para o tratamento de mastocitose sistêmica com boa margem terapêutica e outras vantagens, podem-se realizar ensaios clí-
30

nicos de maneira conhecida por aqueles versados na técnica.

A dosagem precisa da combinação de AMN107 e PKC412 a ser empregada para inibir mastocitose sistêmica depende de vários fatores, incluindo o hospedeiro, a natureza e a gravidade da condição que está sendo tratada, o modo de administração. A combinação de AMN107 e PKC412 pode ser administrada junto ou independentemente por qualquer via, incluindo a via oral, parenteral, por exemplo, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intratumoral ou retal ou enteral. De preferência, a combinação de AMN107 e PKC412 é administrada por via oral, de preferência a uma dosagem diária de 1 - 300 mg/kg de peso corporal ou, para a maioria dos grandes primatas, uma dosagem diária de 50 - 5.000, de preferência 500 - 3.000 mg. Uma dosagem diária oral preferida é de 1 - 75 mg/kg de peso corporal ou, para a maioria dos grandes primatas, uma dosagem diária de 10 - 2.000 mg, administrada como uma dose única ou dividida em múltiplas doses, como uma dosagem duas vezes ao dia.

A dosagem precisa de PKC412 administrada em combinação com AMN107 depende de vários fatores, incluindo o hospedeiro, a natureza e a gravidade da condição que está sendo tratada, o modo de administração. Entretanto, em geral, resultados satisfatórios são conseguidos quando PKC412 é administrada por via parenteral, por exemplo, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intratumoral ou retal ou enteral, por exemplo, oral, de preferência intravenosa ou, de preferência, oral, intravenosa a uma dosagem diária de 0,1 a 10 mg/kg de peso corporal, de preferência 1 a 5 mg/kg de peso corporal. Em ensaios humanos, uma dose total de 225 mg/dia é mais presumivelmente a Dose Máxima Tolerada (MTD). Uma dosagem diária intravenosa preferida é de 0,1 a 10 mg/kg de peso corporal ou, para a maioria dos grandes primatas, uma dosagem diária de 200 - 300 mg. Uma dosagem intravenosa típica é de 3 a 5 mg/kg, três a cinco vezes por semana.

Mais preferivelmente, PKC412 é administrada por via oral, por formas de dosagem como microemulsões, géis macios ou dispersões sólidas em dosagens de até cerca de 250 mg/dia, em particular 225 mg/dia,

administrada um, duas ou três vezes ao dia.

Normalmente, administra-se inicialmente uma pequena dose, e a dosagem é gradualmente aumentada até que a dosagem ótima para o hospedeiro sob tratamento seja determinada. O limite superior de dosagem é o imposto pelos efeitos colaterais e pode ser determinado por ensaio para o hospedeiro que está sendo tratado.

Combinações de AMN107 e PKC412 podem ser combinadas, independentemente ou juntos, com um ou mais veículos farmacologicamente aceitáveis e, opcionalmente, um ou mais outros adjuvantes farmacêuticos convencionais e administradas por via enteral, por exemplo oral, na forma de comprimidos, cápsulas, caplets e outras, ou parenteral, por exemplo, intraperitoneal ou intravenosa, na forma de soluções ou suspensões injetáveis estéreis. As composições enterais e parenterais podem ser preparadas por meios convencionais.

A combinação de AMN107 e PKC412 pode ser usada isoladamente ou combinada com pelo menos um outro composto farmacologicamente ativo para uso nessas patologias. Esses compostos ativos podem ser combinados na mesma preparação farmacêutica ou na forma de preparações combinadas em "kit de partes", no sentido de que os parceiros de combinação possam ser dosados independentemente ou com o uso de diferentes combinações fixadas com quantidades distintas dos parceiros de combinação, isto é, simultaneamente ou de maneira cronologicamente escalonada, isto é, em diferentes momentos e com intervalos de tempo iguais ou diferentes para qualquer parte do kit de partes. Exemplos não-limitativos de compostos que podem ser citados para uso em combinação com a combinação de AMN107 e PKC412 são fármacos quimioterápicos citotóxicos, como citosina arabinosida, daunorrubicina, doxorrubicina, ciclofosfamida, VP-16 ou imatinib e outros. Além disso, a combinação de AMN107 e PKC412 poderia ser combinada com outros inibidores de transdução de sinal ou outros fármacos direcionados a oncogenes, com a expectativa de que resultaria uma sinergia significativa.

A invenção também se refere à combinação de AMN107 e

PKC412 conforme aqui descrita com imatinib para o tratamento da doença e condições aqui descritas. A administração dessa combinação pode ser efetuada ao mesmo tempo, por exemplo, na forma de uma composição ou preparação farmacêutica combinada fixa ou seqüencialmente ou de maneira escalonada no tempo. A administração da combinação de AMN107 e PKC412 em uma forma de dosagem conforme aqui descrita e de imatinib em sua forma comercializada de GLEEVEC® nos EUA (GLIVEC® na Europa) e com as dosagens consideradas para essas formas de dosagem é atualmente preferida.

O tratamento de mastocitose sistêmica com a combinação acima pode ser um chamado tratamento de primeira linha, isto é, o tratamento de uma doença recém-diagnosticada, sem nenhuma quimioterapia precedente ou similar, ou também pode ser um chamado tratamento de segunda linha, isto é, o tratamento da doença depois de um tratamento precedente com imatinib ou a combinação de AMN107 e PKC412, dependendo da gravidade ou estágio da doença, assim como da condição global do paciente e outros.

A eficácia da combinação de AMN107 e PKC412 para o tratamento de mastocitose sistêmica é ilustrada pelos resultados dos exemplos a seguir. Esses exemplos ilustram a invenção, sem, de forma alguma, limitar seu escopo.

Exemplos

Exemplo 1: Estudo Clínico

Avalia-se o efeito do Composto (II) sobre os níveis de transcrito de *c-KIT* e o status de mutação de *c-kit* em células malignas tiradas do sangue e/ou medula óssea. SM pode resultar de atividade alterada de quinase. SM associada a *c-Kit* D816V também pode resultar de uma mutação ativadora no gene *KIT*. Q-RT-PCR para transcrito de *c-KIT* D816V na linha basal, ciclo 1 dia 15, ciclo 1, 2, 3 dia 28 e a cada 3º ciclo subsequente, término do estudo. Análise de mutação de *c-kit*: três grupos separados, cada um com as seguintes populações de pacientes: Pontos terminais de SM: taxas de resposta após 3 meses de terapia.

Exemplo 2: Combinação de AMN107 e PKC412

No presente estudo, é demonstrado que os novos inibidores de TK PKC4125 e AMN10727 neutralizam o crescimento de células neoplásicas MC e Ba/F3 humanas que expressam KIT D816V muito eficazmente.

- 5 PKC412 parece ser o composto mais potente com relação a isso, Também é demonstrado que PKC412 e AMN107 têm sinergia na produção da inibição do crescimento em células HMC-1 expressando ou desprovidas de KIT D816V. Esses dados mostram que PKC412 e AMN107 podem ser novos fármacos direcionados promissores para o tratamento de mastocitose.

10 Materiais e Métodos

Reagentes

- Os inibidores de TK imatinib (STI571), AMN10727 e PKC4125 são obtidos da Novartis Pharma AG (Basiléia, Suíça). Soluções de estoque de AMN107 e PKC412 são preparadas por dissolução em sulfóxido de dimetila (DMSO) (Merck, Darmstadt, Alemanha). Fator de célula-tronco (SCF) humano recombinante (rh) é adquirido na Strathmann Biotech (Hannover, Alemanha), meio RPMI 1640 e soro de novilho fetal (FCS) da PAA Laboratories (Pasching, Áustria), L-glutamina e meio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM) da Gibco Life Technologies (Gaithersburg, MD), 3H-timidina da Amersham (Buckinghamshire, UK) e iodeto de propídio da Sigma (St. Louis, MO). Interferon alfa (IFN α) é obtido da Roche (Basiléia, Suíça), 2-clorodesoxiadenosina (cladribina, aqui designada como "2CdA") da Janssen Cilag (Titusville, NJ) e rh interleucina-4 (IL-4) da Peprotech (Rocky Hill, NJ). Os anticorpos monoclonais (mAbs) marcados com ficoeritrina (PE) IVTO85 (CD2), WM15 (CD13), YB5.B8 (CD117), N6B6.2 (CD164) e 97A6 (CD203c) 25 são adquiridos na Becton Dickinson (San Jose, CA), e o mAb conjugado a PE CLB-gran12 (CD63) da Immunotech (Marselha, França).

Células HMC-1 expressando ou desprovidas de *c-KIT* D816V

- A linhagem de mastócitos humanos HMC-128 gerada a partir de 30 um paciente com leucemia de mastócitos foi gentilmente fornecida pelo Dr. J. H. Butterfield (Mayo Clinic, Rochester, MN). Dois subclones de HMC-1 são usados, a saber, HMC-1.1 portador da mutação de *c-KIT* V560G, mas não a

mutação de *c-KIT* D816V20 e um segundo subclone, HMC-1.2, portador de ambas as mutações de *c-KIT*, isto é, V560G e D816V.20 As células HMC-1 são cultivadas em IMDM suplementado com 10% de FCS, L-glutamina e antibióticos a 37°C e 5% de CO₂. As células HMC-1 são novamente des-

5 congeladas a partir de um estoque original a cada 4 a 8 semanas e são semanalmente submetidas a uma passagem. Como controle de "estabilidade fenotípica", células HMC-1 são periodicamente verificadas quanto a i) a presença de grânulos metacromáticos, ii) expressão de KIT de superfície e iii) o efeito de modulação negativa de IL-4 (100 U/mL, 48 horas) sobre a expres-

10 são de KIT.29 Esses experimentos de controle são feitos antes de cada conjunto de experimentos, e apenas células HMC-1 exibindo todas as características do clone original29 são usadas.

Células Ba/F3 com expressão induzível de wt *c-KIT* ou *c-KIT* D816V

A geração de células Ba/F3 com expressão induzível por doxiciclina de wt *c-KIT* (Ton.Kit.wt) ou *c-KIT* D816V é descrita em detalhes em outro lugar.30 Em resumo, células Ba/F3 expressando o transativador tet reverso31,32 são co-transfectadas com vetor pTRE2 (Clontech, Palo Alto, CA) contendo cDNA de *c-KIT* D816V (ou cDNA de wt *c-KIT*, ambos gentilmente

20 fornecidos pelo Dr. J. B. Longley, Universidade de Columbia, Nova Iorque, EUA) e pTK-Hyg (Clontech) por eletroporação. Depois da eletroporação, células transfectadas de maneira estável são selecionadas por cultivo em higromicina, e clonadas por diluição limitativa. No presente estudo, o subclone Ton.Kit.D816V.27 é usado em todos os experimentos. Essas células Ton.Kit.D816V exibem uma baixa taxa de crescimento por descrição à doxi-

25 ciclina.30 Conforme avaliado por Western blotting, imunocitoquímica, PCR e análise de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (R-FLP)16, a expressão de KIT D816V pode ser induzida em células Ton.Kit.D816V.27 em 12 horas por exposição à doxiciclina (1 µg/mL).30

Isolamento de Mastócitos Neoplásicos Primários

30 MC de medula óssea (bm) primários são obtidos de uma paciente mulher (idade de 54) com mastocitose sistêmica latente (SSM), uma subvariante distinta de SM caracterizada pelo envolvimento de múltiplas linha-

gens hematopoiéticas e detecção de *c-KIT* D816V em células mielóides de linhagem MC e não MC.³⁴⁻³⁶ Para fins de controle, analisa-se bm obtida de um paciente sofrendo de linfoma maligno (sem envolvimento da bm) que foram submetidos a escalonamento. Ambos os pacientes deram seu consentimento informado antes da punção da bm. O aspirado de bm é obtido da crista ilíaca posterior e coletada em seringas contendo heparina livre de conservante. As células são postas em camadas sobre Ficoll para isolar células mononucleares (MNC). Verifica-se que as frações de MNC contêm 5% de MC no paciente com SSM e menos de 1% de MC na amostra de controle (bm normal). A viabilidade celular é > 90%. A presença da mutação de *c-KIT* D816V em MNC de bm no paciente com SSM é confirmada por RT-PCR e análise RFLP efetuada conforme anteriormente descrito.¹⁶

Análise de Fosforilação de Kit por Western Blotting

Células HMC-1 (106/mL) e células Ba/F3 (106/mL) contendo wt KIT (Ton.Kit.wt) ou KIT D816V (Ton.Kit.D816V.27) são incubadas com PKC412 (1 μ M), AMN107 (1 μ M), imatinib (1 μ M) ou meio de controle a 37°C durante 4 horas. Antes da descrição a fármacos inibidores, as células Ton.Kit.wt e as células Ton.Kit.D816V.27 são incubadas com doxiciclina (1 μ g/mL) a 37°C durante 24 horas para induzir a expressão de KIT. No caso de células Ton.Kit.wt, a fosforilação de KIT é induzida por adição de rhSCF (100 ng/mL). Imunoprecipitação (IP) e Western blotting são efetuados conforme anteriormente descrito.³² Em resumo, as células são lavadas a 4°C e ressuspensas em tampão RIPA (1 mL de tampão por 108 células) consistindo em 50 mM de Tris, 150 mM de cloreto de sódio (NaCl), 1% de nonidet P40 (NP-40), 0,25% de ácido desoxicólico, 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 1 mM de ácido etileno-diamina-tetraacético (EDTA), 1 mM de fluoreto de sódio (NaF), 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) e 1 mM de ortovanadato de sódio (Na₃VO₄). Depois da incubação em tampão RIPA suplementado com coquetel inibidor de proteinase (Roche) durante 30 minutos a 4°C (vigorosamente remoinhado a cada 5 minutos), os lisados são centrifugados para remover partículas insolúveis. Para IP, lisados de 1 x 10⁷ células são incubados com anticorpo anti-KIT SR137 (gentilmente fornecido

pelo Dr. V. Broudy, Universidade de Washington, Seattle, WA) ou com o anticorpo anti-KIT 1C138 (gentilmente fornecido pelo Dr. H.-J. Bühring, Universidade de Tübingen, Alemanha) e contas de proteína G Sepharose (Amersham) em tampão IP (50 mM de Tris-Cl, pH 7,4, 150 mM de NaCl, 100 mM de NaF e 1% de NP40) a 4°C durante uma noite. Então, as contas são lavadas 3 vezes em tampão IP. Lisados e imunoprecipitados são, então, separados sob condições redutoras por eletroforese em SDS-gel de poli-acrilamida a 7,5% e transferidos para uma membrana de nitrocelulose (Protran, Schleicher & Schuell, Keene, NH) em tampão contendo 25 mM de Tris, 192 mM de glicina e 20% de metanol a 4°C. As membranas são bloqueadas durante 1 hora em 5% de reagente de bloqueio (Roche) e são, então, incubadas com anticorpo anti-KIT 1C1 ou com o anticorpo monoclonal 4G10 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) dirigido contra proteínas fosforiladas com tirosina, a 4°C durante uma noite. A reatividade do anticorpo é tornada visível por anticorpo IgG anticamundongo de ovelha e reagente de detecção Lumigen PS-3 (ambos da Amersham) e um filme CL-Xposure (Pierce Biotechnology, Rockford, IL).

Medição da Captação de 3H-Timidina

Para determinar os efeitos do fármaco inibidor de crescimento, células HMC-1 e células Ba/F3 contendo wt KIT ativada com SCF (Ton.Kit.wt) ou KIT D816V (Ton.Kit.D816V.27) são incubadas com várias concentrações de PKC412 (100 pM – 10 µM), AMN107 (1 nM – 100 µM) ou imatinib (3 nM – 300 µM) em placas de cultura de 96 cavidades (PTT, Trasadingen, Suíça) a 37°C em 5% de CO₂ durante 48 horas. Em experimentos de curso temporal, células HMC-1 são expostas a PKC412 (300 nM) durante vários períodos de tempo (1, 12, 24, 36 e 48 horas). Em experimentos selecionados, células HMC-1 (ambas subclones) são incubadas com várias concentrações de IFNα (0,1 – 500.000 U/mL) ou 2CdA (0,005 – 10 µg/mL). Células primárias (células de bm de um paciente com SSM e células de bm de controle) são cultivadas na presença ou ausência de inibidores (PKC412, 50-500 nM; AMN107, 100 nM-30 µM; imatinib, 1 µM) durante 48 horas.

Depois da incubação, 1 µCi de 3H-timidina é adicionado a cada

poço e mantido durante 12 horas (37°C). Então, as células são colhidas em membranas de filtro (Packard Bioscience, Meriden, CT) em um coletor Filtermate 196 (Packard Bioscience). Os filtros são secados ao ar, e a radioatividade ligada é contada em um contador β (Top-Count NXT, Packard Bioscience).

Em um conjunto separado de experimentos, determina-se os efeitos de combinações de fármacos (aditivos versus sinérgicos) sobre o crescimento de MC neoplásicos. Para essa finalidade, células HMC-1 (ambas subclones) são expostas a várias combinações de fármacos (PKC412, AMN107, imatinib, IFN α , 2CdA) a uma razão fixa de concentrações de fármacos. Interações de fármacos (aditivas versus sinérgicas) são determinadas por cálculo dos valores de índice de combinação usando um software comercialmente disponível (Calculusyn; Biosoft, Ferguson, MO).³⁹ Todos os experimentos são realizados em triplicata.

15 Avaliação de Apoptose por Morfologia Convencional e Microscopia Eletrônica

Os efeitos de inibidores de TK sobre a apoptose em células HMC-1 são analisados por exame morfológico, citometria de fluxo e microscopia eletrônica. Em experimentos típicos, células HMC-1 são incubadas com várias concentrações de PKC412 (500 nM - 1 μ M), AMN107 (50 nM - 10 μ M), imatinib (50 nM - 10 μ M) ou meio de controle em placas de cultura de 6 cavidades (PTT) em meio IMDM contendo 10% de FCS a 37°C durante 24 horas. A porcentagem de células apoptóticas é quantificada em preparações de citospin tingidas com Wright-Giemsa. A apoptose é definida de acordo com critérios citomorfológicos convencionais (contração celular, condensação da estrutura da cromatina).⁴⁰

Para confirmar a apoptose em células HMC-1, a microscopia eletrônica é realizada conforme descrito^{41,42} usando-se células HMC-1 (ambas subclones) expostas a PKC412 (500 nM, 900 nM ou 1 μ M), AMN107 (1 μ M), imatinib (1 μ M) ou meio de controle em frascos de cultura de plástico de 25 mL (PTT) durante 24 horas. Depois da incubação, as células são lavadas e fixadas em 2% de paraformaldeído, 2,5% de glutaraldeído e 0,025%

de CaCl_2 tamponados em 0.1 mol/L de tampão cacodilato de sódio (pH 7,4) à temperatura ambiente (TA) durante 60 minutos. Então, as células são lavadas três vezes em 0,1 mol/L de tampão cacodilato de sódio, em suspensão em 2% de ágar e centrifugadas. Os péletes são pós-fixados com 1,3% de OsO_4 (tamponados em 0,66 mol/L de colidina) e tingidas "em bloco" em 2% de acetato de uranila e tampão de maleato de sódio (pH 4,4) durante duas horas à TA. Então, os péletes são enxaguados, desidratados em série de álcool e incrustados em EPON 812. Seções ultrafinas (85 nm) são cortadas e colocadas em grades de ouro. As seções são contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo e visualizadas em um microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200 EX II (JEOL, Tóquio, Japão). A presença de células apoptóticas é determinada usando-se critérios morfológicos convencionais (veja acima).

Avaliação de Apoptose por Ensaio Tunel e Citometria de Fluxo

Para confirmar a apoptose em células HMC-1 expostas a PKC412 (1 μM), AMN107 (1 μM) ou imatinib (1 μM) durante 24 horas, aplica-se um ensaio Tunel (marcação de extremidade de ponta com dTUP-fluoresceno mediada por transferase terminal in situ) conforme anteriormente descrito.^{43,44} Em resumo, as células são primeiro lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e fixadas em formaldeído a 1%, a pH 7,4, a 0°C durante 15 minutos. Então, as células são tratadas com etanol a 70% (gelado) durante uma hora, lavadas em PBS e incubadas em solução de reação de transferase terminal contendo CoCl_2 , DNA desóxi-nucleotidil-exotransferase e biotin-16-2'-desóxi-uridin-5'-trifosfato (preparado de acordo com as instruções de fabricante Boehringer Mannheim, Alemanha) a 37°C durante 10 minutos. Depois da incubação, as células são lavadas e, então, incubadas com Estreptavidina FLuoresceína (Boehringer Mannheim) (10 $\mu\text{g/mL}$) a 37°C durante 20 minutos. As células HMC-1 são, então, lavadas e analisadas com um microscópio de fluorescência Nikon Microphot-FXA (Tóquio, Japão).

Para a determinação citométrica de fluxo da apoptose e viabilidade celular, realiza-se um tingimento com anexina V/iodeto de propídio

combinados. Para essa finalidade, as células HMC-1 são expostas a PKC412 (0,5, 1 e 2,5 μ M), AMN107 (0,5, 1 e 2,5 μ M), imatinib (0,5, 1 e 2,5 μ M) ou meio de controle a 37°C durante 24 horas. Depois disso, as células são lavadas em PBS e, então, são incubadas com anexina V-APC (Alexis Biochemicals, Lausen, Suíça) em tampão de ligação contendo HEPES (10 mM, pH 7,4), NaCl (140 mM) e CaCl₂ (2,5 mM). Depois disso, adiciona-se iodeto de propídio (1 μ g/mL). As células são, então, lavadas e analisadas por citometria de fluxo em um FACSCalibur (Becton Dickinson).

Avaliação da Expressão de Antígenos de Superfície Ligados à Ativação em

10 Células HMC-1

A expressão de antígenos de superfície celular em células HMC-1 portadoras de KIT D816V (células HMC-1.2) é determinada por citometria de fluxo após cultura de curto prazo (durante 24 horas) em meio de controle ou meio suplementado com inibidores de TK (PKC412, 1 μ M; AMN107, 1 μ M; imatinib, 1 μ M). Em experimentos selecionados, aplicam-se várias concentrações de PKC412 (50, 100, 250, 500 e 1000 nM). Depois da incubação com fármacos, as células HMC-1 são lavadas e submetidas à citometria de fluxo de cor única usando anticorpos conjugados a PE contra antígenos de MC sabidamente superexpressados em MC neoplásicos em SM (em comparação com MC normais) e/ou que são expressados em um estágio precoce da mastopoiese (CD2, CD13, CD63, CD117, CD164, CD203c).⁴⁵⁻⁴⁷ A citometria de fluxo é realizada em um FACSan (Becton Dickinson) conforme anteriormente descrito.²⁹

Análise Estatística

25 Para determinar o significado de diferenças entre taxas de proliferação, apoptose e níveis de expressão em superfície após a descrição de células HMC-1 a inibidores, aplica-se o teste t de Student para amostras dependentes. Os resultados são considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

Resultados

Efeitos de PKC412 e AMN107 sobre a Atividade de TK KIT com mutação D816V

Conforme avaliado por IP e Western blotting, PKC412 (1 μ M) diminuiu a fosforilação de KIT em células HMC-1.1 (exibindo a mutação de c-KIT V560G, mas não a mutação de c-KIT D816V), assim como em células HMC-1.2 portadoras da mutação V560G, assim como a variante com mutação D816V de KIT (Figuras 1A e 1B). O novo inibidor de TK AMN107 (1 μ M) reduziu fortemente a fosforilação de KIT em células HMC-1.1, mas mostrou apenas um efeito fraco na fosforilação de KIT em células HMC-1.2 a 1 μ M. Da mesma forma, imatinib (1 μ M) reduziu a fosforilação de KIT em células HMC-1.1, mas não inibiu a fosforilação de KIT em células HMC-1.2 (Figuras 1A e 1B). Em uma etapa seguinte, examinam-se os efeitos dos inibidores de TK em células Ba/F3 exibindo wt KIT (Ton.Kit.wt) ou KIT D816V (Ton.Kit.D816V.27) após descrição à doxíciclina. Em células Ton.Kit.wt, KIT pareceu ser fosforilada na presença (mas não na ausência) de SCF, ao passo que se verificou que KIT era constitutivamente fosforilada em células Ton.Kit.D816V.27 (Figura 1C). Conforme se observa na Figura 1C, todos os 3 inibidores de TK (PKC412, AMN107, imatinib, cada um a 1 μ M) diminuíram a fosforilação de KIT induzida por SCF em células Ton.Kit.wt. Em contraste, apenas PKC412 e, em menor grau, AMN107, diminuíram a fosforilação de KIT independente de SCF em células Ton.Kit.D816V-27. Imatinib (1 μ M) não mostrou nenhum efeito detectável na fosforilação de KIT nessas células (Figura 1D). Esses dados mostram que PKC412 é um novo potente inibidor da atividade de TK de wt KIT, KIT V560G e KIT D816V e que AMN107 é um novo potente inibidor de wt KIT e KIT V560G e um inibidor mais fracos de (auto)fosforilação de KIT D816V.

Efeitos de Inibidores de TK Sobre a Captação de 3H-timidina em Células HMC-1

Em experimentos de curso temporal, efeitos inibidores máximos de PKC412, AMN107 e imatinib sobre o crescimento de células HMC-1.1 e células HMC-1.2 são observados após 36 - 48 horas. A Figura 2A mostra o

efeito dependente do tempo de PKC412 (300 nM) sobre o crescimento de células HMC-1.2. Conforme mostrado nas Figuras 2B e 2C, PKC412 e AMN107 se mostram capazes de neutralizar a captação de 3H-timidina em células HMC-1.1 e células HMC-1.2 de maneira dependente da dose. De maneira interessante, a IC50 para os efeitos de PKC412 nesses dois subclones parecia estar na mesma faixa (50 - 250 nM) (Figura 2B). Em contraste, os valores de IC50 para os efeitos de AMN107 sobre a proliferação são significativamente mais elevados em células HMC-1.2 (1 - 5 µM) em comparação com os encontrados em células HMC-1.1 (3 - 10 nM) (Figura 2C). Conforme esperado, imatinib só é eficaz a concentrações farmacologicamente relevantes em células HMC-1.1 (IC50: 10 - 30 nM), ao passo que nenhum efeito antiproliferativo significativo de imatinib em células HMC-1.2 é observado (Figura 2D), confirmando dados anteriores. Uma observação interessante é que AMN107 é o composto mais potente (em bases molares), quando se comparam os efeitos inibidores de crescimento dos três fármacos em células HMC-1.1 exibindo a mutação de c-KIT V560G (mas não a mutação de c-KIT D816V) (Figuras 2B-D).

Efeitos de Inibidores de TK sobre o Crescimento de Células Ba/F3 Expressando wt KIT ou KIT D816V

Conforme mostrado na Figura 3A, todos os 3 inibidores de TK se mostram capazes de neutralizar o crescimento dependente de SCF de células Ton.Kit.wt expostas à doxíciclina (expressando KIT) de maneira dependente da dose, com valores de IC50 de 3 - 30 nM para PKC412, 30 - 300 nM para AMN107 e 3 - 30 nM para imatinib. Em contraste, em células Ton.Kit.D816V, apenas PKC412 (IC50: 100 - 300 nM) e, em menor grau, AMN107 (IC50: 1-3 µM) se mostram capazes de inibir a incorporação de 3H-timidina, ao passo que nenhum efeito significativo é obtido com imatinib na faixa de dose testada (Figura 3B). Nenhum dos três inibidores usados se mostrou capaz de neutralizar o crescimento de células Ton.Kit.wt ou células Ton.Kit.D816V. Na ausência de doxíciclina, isto é, na ausência de KIT (Figuras 3A e 3B). Em experimentos de controle adicionais, nem doxíciclina (1 µg/mL) nem os inibidores de TK (imatinib, PKC412, AMN107) mostraram

efeitos inibidores de crescimento em células Ba/F3 de controle (não transfectadas) (não mostrado).

PKC412 e AMN107 Neutralizam o Crescimento de Células (Mastócitos) Neoplásicas Primárias Expressando KIT D816V

5 Para reconfirmar os efeitos antiproliferativos de PKC412 e AMN107 em mastocitose sistêmica, examina-se a resposta de MC neoplásicos primários derivados de medula óssea (bm) em um paciente com SM latente, uma subvariante especial de SM, que a maioria das células mielóides (MC, assim como células de linhagem não MC) exibem KIT D816V. De fato, 10 embora a pureza de MC seja de apenas 4%, a maioria das células mielóides nessa amostra exibiu KIT D816V. Nessas células de bem neoplásicas, PKC412 e AMN107 se mostraram capazes de inibir a captação espontânea de 3H-timidina de maneira dependente da dose, ao passo que nenhum efeito significativo é observado com imatinib (1 μ M) (Figura 4). Na amostra de 15 controle (bm normal, sem doença hematológica), PKC412 não mostrou nenhum efeito sobre a captação de 3H-timidina (não mostrado).

PKC412 e AMN107 Induzem Apoptose em células HMC-1

 Para explorar os mecanismos subjacentes aos efeitos inibidores de crescimento de PKC412 e AMN107 em MC humanos neoplásicos exibindo ou desprovidos de KIT D816V, analisam-se sinais morfológicos e bioquímicos de apoptose em células HMC-1.1 e células HMC-1.2 após descrição 20 ao fármaco. Nesses experimentos, PKC412 se mostra capaz de induzir apoptose tanto em ambos os subclones de HMC-1 de maneira dependente da dose (Figuras 5A e 5B). AMN107 também se mostra capaz de induzir apoptose em ambos os subclones de HMC-1 de maneira dependente da dose, 25 mas o efeito desse composto é muito mais pronunciado em células HMC-1.1 (Figura 5C) em comparação com os encontrados em células HMC-1.2 (Figura 5D). Da mesma forma, imatinib se mostra capaz de produzir apoptose em células HMC-1.1 (Figura 5E), mas não mostrou nenhum efeito em células 30 HMC-1.2 (Figura 5F). Os efeitos indutores de apoptose dos fármacos em células HMC-1 poderiam ser confirmados por microscopia eletrônica. Mais uma vez, todos os três fármacos (cada um a 1 μ M) se mostram capazes de

induzir apoptose em células HMC-1.1, ao passo que, em células HMC-1.2, apenas PKC412 e, em menor grau, AMN107 se mostram capazes de produzir apoptose em células HMC-1.2. A Figura 6 mostra o efeito indutor de apoptose de PKC412 (1 μ M, 24 horas) em células HMC-1.2. Conforme se observa, muitas das células HMC-1 expostas a PKC412 (Figuras 6B-D) exibiram sinais ultra-estruturais típicos de apoptose, em comparação com células mantidas em meio de controle (Figura 6A). Finalmente, são capazes de demonstrar os efeitos indutores de apoptose de PKC412 e AMN107 em células HMC-1 por coloração com anexina V/iodeto de propídio combinados e citometria de fluxo (Figura 7), assim como em um ensaio Tunel (Figura 8). Em ambos os ensaios, PKC412 (1 μ M) e, em menor grau, AMN107 (1 μ M) se mostram capazes de induzir apoptose em HMC-1.2, ao passo que imatinib não mostrou nenhum efeito (Figuras 7 e 8E-H). Em contraste, em células HMC-1.1, todos os 3 compostos se mostram capazes de induzir apoptose conforme avaliado por ensaio Tunel (Figuras 8A-D).

Esses dados fornecem evidências de que os efeitos inibidores de crescimento de PKC412 e AMN107 em células HMC-1 estão associados à indução de apoptose.

PKC412 Regula Negativamente a expressão de Antígenos de Superfície Celular Ligados à Ativação e Relacionados a SM em células HMC-1

Vários antígenos de superfície celular que são tipicamente (super)expressados em MC neoplásicos em SM podem desempenhar um papel no crescimento, ativação ou distribuição de células neoplásicas.^{45,46} Algumas dessas moléculas podem ser reguladas positivamente diretamente pela variante com mutação D816V de KIT.³⁰ Conseqüentemente, pergunta-se se PKC412, AMN107 ou imatinib influenciaria a expressão de antígenos de superfície celular em células HMC-1.2. Células HMC-1.2 não-estimuladas se mostram capazes de expressar LFA-2 (CD2), aminopeptidase-N (CD13), CD63, KIT (CD117), CD164 e E-NPP3 (CD203c) confirmando dados anteriores.⁴⁵⁻⁴⁷ A incubação de células HMC-1.2 com PKC412 resultou em uma diminuição significativa na expressão de CD2, CD63 e CD164 ($p < 0,05$) (Figura 9A). Em contraste, nenhum efeito significativo de PKC412 sobre a ex-

pressão de CD13 ou CD203c é observado (Figura 9A). No caso de KIT, uma leve diminuição da expressão em células HMC-1.2 é encontrada com a descrição a PKC412 (assim como com descrição a AMN107 ou imatinib), mas o efeito não é significativo ($p > 0,05$) (Figura 9A). Os efeitos de PKC412 sobre a expressão de CD2 e CD63 se mostram dependentes da dose. A Figura 9B mostra os efeitos de várias concentrações de PKC412 sobre a expressão de CD63 em células HMC-1.2. Em contraste com PKC412, nenhum efeito significativo de AMN107 ou imatinib sobre a expressão de antígenos CD em células HMC-1.2 é observado (Figura 9A).

10 PKC412 Coopera com outros Fármacos Direcionados e Convencionais na Produção da Inibição de Crescimento em Células HMC-1

Conforme avaliado por incorporação de 3H-timidina, PKC412 se mostra capaz de cooperar com AMN107 na produção da inibição de crescimento em células HMC-1.1 e células HMC-1.2 (Figura 10; Tabela 1). No caso de células HMC-1.1, a interação de fármacos se mostra claramente sinérgica, ao passo que, em células HMC-1.2, as interações são aditivas, em vez de sinérgicas (Figura 10; Tabela 1). Além disso, PKC412 e 2CdA, um fármaco usado com sucesso para tratar mastocitose agressiva, se mostram capazes de inibir o crescimento de células HMC-1.1 de maneira sinérgica, e o mesmo efeito sinérgico é observado com PKC412 e imatinib (Tabela 1). Mais uma vez, entretanto, não se observa nenhum efeito sinérgico claro de PKC412 e 2CdA sobre o crescimento de células HMC-1.2. Da mesma forma, AMN107 e imatinib produziram efeitos inibidores sinérgicos apenas em células HMC-1.1 (Figura 10), mas não em células HMC-1.2 portadoras de KIT D816V (Tabela 1). Não se observa nenhum efeito sinérgico ou aditivo sobre o crescimento de células HMC-1, quando se combinam PKC412 e interferon-alfa ($IFN\alpha$) ou AMN107 e $IFN\alpha$ (Tabela 1). Um resumo das interações dos fármacos é mostrado na Tabela 1.

Tabela 1

Interações dos fármacos em células HMC-1.1 e células HMC-1.2

	PKC412	AMN107	STI571	2CdA	IFN α
PKC412		+	+	+	-
AMN107	$\pm$		+	+	-
STI571	n.t.	$\pm$		n.t.	n.t.
2CdA	$\pm$	$\pm$	n.t.		n.t.
IFN α	-	-	n.t.	n.t.	

Conforme mostrado na Tabela 1, os efeitos de várias combinações de fármacos sobre o crescimento de células HMC-1.1 (quadrados brancos no lado superior direito) e células HMC-1.2 (quadrados cinza no lado inferior esquerdo) são determinados por ensaio de incorporação de 3H-timidina. Cada combinação de fármacos é testada em pelo menos três experimentos independentes. Os fármacos são aplicados a uma razão fixa, e os efeitos resultantes (e o tipo de interação medicamentosa) determinado pelo software Calculusyn. Contagem: +, efeito inibidor do crescimento sinérgico; +/-, efeito aditivo; -, efeito menos que aditivo (antagonista). n.t., não testado.

Discussão

A mutação somática de *c-KIT* D816V é um defeito de gene que leva à ativação constitutiva do domínio TK do receptor de KIT, que está envolvido de maneira crítica no crescimento (neoplásico) de MC e, portanto, na patogênese de SM.¹³⁻¹⁷ Conseqüentemente, tentativas recentes focalizaram na identificação e desenvolvimento de compostos farmacológicos que pudessem inibir a atividade de TK da variante com mutação D816V de KIT e, dessa forma, pudessem inibir o crescimento de MC neoplásicos em pacientes com SM.⁹⁻¹² Foi descrito aqui que o inibidor de TK PKC412 e, em menor grau, AMN107 inibem a atividade de TK de KIT-D816V, assim como o crescimento de MC humanos neoplásicos portadores dessa mutação de *c-KIT* particular. Além disso, é mostrado que ambos os fármacos cooperam entre si, assim como com outros fármacos direcionados e convencionais na produção da inibição de crescimento em MC neoplásicos.

PKC412 é um novo inibidor relacionado à esteurosporina de

PKC e de várias TKs incluindo KDR, PDGFRA, FLT3 e KIT.⁵ No presente estudo, é demonstrado que PKC412 neutraliza o crescimento de MC neoplásicos humanos e células Ba/F3 que expressam a variante com mutação D816V de KIT. Com relação a células Ba/F3, os dados estão em linha com os resultados de Gowney et al.⁴⁸ De maneira interessante, a faixa de dose eficaz para células Ba/F3 se mostra a mesma que a encontrada em células HMC-1.2 portadoras de KIT D816V. Outra observação interessante é que a IC₅₀ para os efeitos de PKC412 nos dois subclones de HMC-1 (expressando ou desprovidos de KIT D816V) pareceram estar na mesma faixa. Finalmente, são capazes de confirmar os efeitos inibidores de crescimento de PKC412 para células (mastócitos) neoplásicas humanas primárias que expressam KIT D816V. Como a mutação D816V de c-KIT é detectável na maioria de todos os pacientes com SM independentemente do subtipo da doença,¹³⁻¹⁷ esses dados são de considerável importância. De fato, PKC412 parece ser o primeiro inibidor de TK que confirmadamente neutraliza o crescimento de MC humanos portadores de KIT D816V da mesma maneira que MC que expressam KIT wt. Também é digno com relação a isso, que os efeitos inibidores de PKC412 em células KIT D816V positivas excadem as atividades antiproliferativas de AMN107 e imatinib. Com base nessas observações, PKC412 parece ser um novo fármaco direcionado atraente para ser considerado para uso em ensaios clínicos em pacientes com SM (agressiva) ou MCL.

Dados recentes sugerem que AMN107 é um inibidor mais potente da atividade TK de BCR/ABL.²⁷ Também foi descrito que AMN107 inibe a atividade de TK de KIT do tipo selvagem.²⁷ No presente estudo, foi descoberto que AMN107 exerce potentes efeitos em células HMC-1 portadoras da mutação V560G de *c-KIT*, mas exibe apenas efeitos fracos em células HMC-1 portadoras tanto de KIT V560G, quanto de KIT D816V. Da mesma forma, AMN107 mostrou apenas efeitos fracos sobre o crescimento de células Ba/F3 que expressam a variante com mutação D816V de KIT. Esses dados sugerem que a mutação D816V de c-KIT, mas não a mutação de c-KIT V560G, confere resistência relativa contra AMN107, embora AMN107 ainda

retenha efeitos inibidores em células HMC-1 KIT D816V positivas em comparação com imatinib. Os impressionantes efeitos antiproliferativos de AMN107 em células V560G positivas também sugerem que esse composto possa ser um fármaco candidato principal atraente para tumores de células estromais gastrointestinais (GISTs), em que mutações no códon 560 de *c-KIT* foram recentemente relatados.⁴⁹

Inúmeros inibidores farmacológicos direcionados à atividade de TK de moléculas pró-oncogênicas foram recentemente desenvolvidos em hematologia clínica.^{5,12,19,27} Os efeitos inibidores de crescimento desses inibidores de TK em células neoplásicas (que expressam o alvo apropriado) normalmente estão associados à perda de atividade de TK e a apoptose consecutiva. No presente estudo, são capazes de demonstrar que os efeitos inibidores de crescimento de PKC412 em MC humanos neoplásicos (HMC-1) estão associados à inibição de TK de KIT (com mutação), assim como a apoptose. De fato, são capazes de demonstrar que PKC412 induz apoptose em células HMC-1.1 (que expressam KIT V560G, mas não KIT D816V), assim como em células HMC-1.1 (que expressam KIT V560G e KIT D816V). O efeito indutor de apoptose de PKC412 é demonstrável por microscopia óptica e eletrônica, assim como por citometria de fluxo e em um ensaio Tunel. Conforme esperado, AMN107 e imatinib mostraram efeitos indutores de apoptose significativos em células HMC-1.1, mas não exibiram efeitos significativos em células HMC-1.2.

Inúmeros antígenos de superfície celular são tipicamente (super)expressados em MC humanos neoplásicos. Da mesma forma, em contraste com MC normais, MC neoplásicos em pacientes com SM expressam CD2 e CD25.^{45,46} Além disso, os níveis de CD63 e CD203c expressados em MC neoplásicos na SM estão mais elevados em comparação com MC normais. Em vários casos, como CD63, a variante com mutação D816V de KIT pode levar diretamente a uma expressão aumentada na superfície.³⁰ Estão, conseqüentemente, interessados em saber se o direcionamento para KIT com mutação D816V em células HMC-1 por PKC412 está associado a uma diminuição na expressão de antígenos CD de superfície "relacionados a

SM". Os resultados dos experimentos mostram que PKC412 regula negativamente a expressão de CD2, CD63 e CD164 em células HMC-1.2 exibindo KIT D816V. Também se observa um efeito leve, mas insignificante, de PKC412 (assim como de AMN107) sobre a expressão de KIT. Uma observação interessante é que AMN107 foi incapaz de suprimir a expressão de CD2 e CD63 em células HMC-1.2. Isso provavelmente é devido ao efeito mais fraco desse composto sobre a atividade de TK da KIT D816V, quando comparado com o efeito de PKC412.

Inúmeros dados recentes sugerem que o tratamento de neoplasias mielóides com inibidores de TK como agentes únicos pode ser insuficiente para controlar a doença durante períodos de tempo prolongados. Isso foi documentado para o uso de imatinib em CML (avançada)^{50,51} e também pode se aplicar a pacientes com ASM ou MCL.⁵² Nestes últimos pacientes, esse é um problema particular, pois a mutação D816V confere uma resistência primária (relativa) de KIT contra imatinib e, em menor grau, resistência relativa contra AMN107. Para superar a resistência, inúmeras estratégias farmacológicas diferentes podem ser consideradas. Uma possibilidade é aplicar combinações de fármacos. Conseqüentemente, estão interessados em aprender se PKC412 e AMN107 exibiriam efeitos antiproliferativos sinérgicos em células HMC-1.1 e HMC-1.2. De fato, os dados mostram que PKC412 coopera com imatinib e AMN107 na produção da inibição de crescimento em ambos os clones de HMC-1. Além disso, PKC412 e 2CdA, um fármaco que foi descrito como neutralizador do crescimento de MC neoplásicos *in vivo* em pacientes com SM (agressiva), mostraram efeitos inibidores cooperativos sobre o crescimento de células HMC-1.1- e HMC-1.2. Entretanto, de maneira interessante, verifica-se que as interações dos fármacos só são sinérgicas em células HMC-1.1, mas não em células HMC-1.2. Isso pode ser explicado pelos efeitos relativamente fracos (AMN107) ou ausentes (imatinib) de fármacos co-aplicados sobre a atividade de TK de KIT e, portanto, sobre o crescimento de células HMC-1.2 portadoras de D816V, em comparação com os efeitos muito mais pronunciados dos mesmos fármacos em células HMC-1.1. Nenhum efeito cooperativo do fármaco é observado quando se combina

IFN α com AMN107 ou PKC412. Se combinações de fármacos consistindo em PKC412 e outros fármacos (direcionados) serão de valor clínico em pacientes com ASM ou MCL permanece desconhecido.

Assim, até agora, apenas poucos agentes com efeitos antiproliferativos documentados sobre MC neoplásicos *in vivo* em pacientes com SM foram apresentados, e nenhum desses fármacos produz remissões completas de longa duração em pacientes com ASM ou MCL. A noção de que PKC412 é o novo inibidor mais potente do crescimento de MC humanos neoplásicos portadores da variante com mutação D816V de KIT é particularmente interessante com relação a isso.

Em resumo, é demonstrado que PKC412 e AMN107 são novos fármacos promissores direcionados a KIT do tipo selvagem e variantes com mutação de KIT em SM. Embora cada um dos dois fármacos possa exibir um perfil farmacológico distinto com efeitos únicos sobre variantes com mutação de KIT, uma abordagem mais eficaz e promissora pode ser a de combinar ambos os fármacos entre si ou com o medicamento clinicamente estabelecido 2CdA para tratar pacientes com ASM ou MCL no futuro.

Exemplo 2: Combinação de Dasatinib e PKC412

Na maioria de todos os pacientes com mastocitose sistêmica (SM) incluindo SM agressiva e leucemia de mastócitos (MCL), as células neoplásicas apresentam a variante com mutação D816V de KIT. KIT-D816V exibe atividade constitutiva de tirosina quinase (TK) e foi implicada no crescimento de células malignas. Conseqüentemente, foram feitas várias tentativas de identificar fármacos direcionados a KIT-D816V. Descobriu-se que o inibidor de TK dasatinib (BMS-354825) neutraliza a atividade de TK de KIT do tipo selvagem (wt) e KIT-D816V em células Ba/F3 com expressão de KIT induzível por doxíciclina. Além disso, dasatinib se mostra capaz de inibir a formação de aglomerados induzida por KIT D816V e a viabilidade em células Ba/F3, assim como o crescimento de células HMC-1.1 (KIT-D816V negativas) e células HMC-1.2 (KIT-D816V positivas). Os efeitos de dasatinib são dependentes da dose, com valores de IC₅₀ 100 – 1.000 vezes maiores naquelas portadoras de KIT-D816V, em comparação com células desprovidas

de KIT-D816V. Os efeitos inibidores de dasatinib em células HMC-1 se mostram associados à apoptose e a uma diminuição na expressão de CD2 e CD63. Além disso, dasatinib se mostra capaz de cooperar com PKC412, AMN107, imatinib e 2CdA na produção de inibição do crescimento. Em células HMC-1.1, todas as interações de fármacos aplicadas se mostraram sinérgicas. Em contraste, em HMC-1.2, apenas as combinações "dasatinib + PKC412" e "dasatinib + 2CdA" produzem efeitos sinérgicos. Essas combinações de fármacos podem, portanto, representar uma interessante abordagem farmacológica para o tratamento de SM agressiva ou MCL.

10 Introdução

Receptores de tirosina quinase, como o receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) ou receptor de fator de célula-tronco (SCFR, KIT), são freqüentemente desregulados e mostram atividade de tirosina quinase (TK) constitutiva em pacientes com neoplasias hematopoiéticas.¹⁻⁵ Essas moléculas representam, portanto, alvos atraentes para terapia com fármacos. De fato, durante os últimos anos, vários conceitos de tratamento emergentes se basearam em novos fármacos direcionados a TK crítica em células mielóides neoplásicas.¹⁻⁵

A mastocitose sistêmica (SM) é um neoplasma mielóide caracterizado por crescimento anormal e acúmulo de mastócitos neoplásicos (MC) em um ou mais órgãos. Variantes indolentes, assim como agressivas de SM foram descritas.⁶⁻⁹ Em pacientes com SM agressiva (ASM) e naqueles que estejam sofrendo da variante leucêmica de SM, isto é, leucemia de mastócitos (MCL), a resposta a fármacos convencionais é ruim, e o prognóstico é grave.⁶⁻¹² Conseqüentemente, inúmeras tentativas foram feitas para identificar novos alvos terapêuticos em MC neoplásicos e para desenvolver os respectivos conceitos de tratamento.⁹⁻¹²

Na maioria dos pacientes sofrendo de SM, incluindo aqueles com ASM ou MCL, a mutação D816V de KIT é detectável.¹³⁻¹⁷ Essa mutação está associada à fosforilação independente de ligante de KIT, assim como ao crescimento autônomo de células.^{17,18} Com base nessa noção, a variante com mutação D816V de KIT foi reconhecida como o principal alvo

de terapia.^{9-12,19} Assim, inúmeros esforços foram despendidos para identificar inibidores de TK que neutralizassem a fosforilação de KIT-D816V e o crescimento de MC neoplásicos.^{9-12,19-24} Imatinib (STI571), um potente inibidor de BCR/ABL, foi recentemente descrito como neutralizando o crescimento de MC neoplásicos que exibem KIT de tipo selvagem (wt) ou a variante com mutação F522C de ocorrência rara de KIT.²⁰⁻²³ Além disso, esse fármaco se mostrou capaz de bloquear o crescimento de células neoplásicas em pacientes que têm leucemia eosinofílica crônica com o gene de fusão FIP1L1/PDGFRA com ou sem SM coexistente.²⁴⁻²⁶ Entretanto, foi incapaz de inibir o crescimento de MC neoplásicos portadores de KIT D816V.²⁰⁻²² Mais recentemente, outros demonstraram que PKC412 ²⁷ neutraliza a atividade de TK de KIT-D816V e, dessa forma, regula negativamente o crescimento de MC neoplásicos.²⁸⁻³⁰ Também foi descrito que o novo inibidor de TK AMN10731 neutraliza o crescimento de células neoplásicas exibindo KIT-D816V a concentrações de fármaco relativamente altas.^{30,32} Entretanto, a maioria desses compostos pode não produzir remissão completa de longa duração em pacientes com ASM ou MCL, pelo menos como agentes únicos. Além disso, conforme acima mencionado, vários desses fármacos agente apenas em MC exibindo wt KIT, mas não inibem o crescimento de MC portadoras de KIT-D816V. Conseqüentemente, é importante pesquisar mais novos inibidores de TK direcionados a KIT e examinar efeitos de fármacos cooperativos. Com relação a combinações de fármacos, demonstra-se recentemente que PKC412 e AMN107 produzem efeitos inibidores de crescimento cooperativos em células HMC-1.³⁰ Entretanto, embora essa combinação de fármacos produzisse efeitos inibidores sinérgicos em células HMC-1 desprovidas de KIT-D816V, nenhum efeito sinérgico foi observado em células HMC-1.2 expressando KIT-D816V.³⁰ Outras combinações de fármacos também foram incapazes de exercer efeitos inibidores sinérgicos em mastócitos exibindo KIT-D816V.³⁰

Dasatinib (BMS-354825) é um novo inibidor de src quinases e de vários inibidores de TK incluindo KIT.^{33,34} Também foi descrito que dasatinib inibe a fosforilação de KIT-D816V e o crescimento de MC neoplási-

cos.^{34,35} No presente estudo, demonstra-se que dasatinib bloqueia várias das funções relacionadas à doença dependentes de KIT-D816V em células neoplásicas, incluindo a sobrevivência e formação de aglomerados, assim como a expressão de CD2 e CD63. Além disso, os dados mostram que dasatinib tem sinergia com PKC412, assim como com 2CdA na produção da inibição de crescimento em células HMC-1.2. Segundo o melhor conhecimento, essa é a primeira combinação de inibidores de TK descrita com ação sinérgica em MC portadores de KIT-D816V. Os dados também sugerem que dasatinib isoladamente ou em combinação com outros medicamentos pode ser um agente promissor para o tratamento de pacientes com ASM ou MCL.

Materiais e Métodos

Reagentes

Dasatinib (BMS-354825)³³ foi fornecido pela Bristol-Myers Squibb (New Brunswick, NJ) e imatinib (STI571), AMN107,³¹ e PKC412²⁷ pela Novartis Pharma AG (Basileia, Suíça). Soluções de estoque de dasatinib, AMN107 e PKC412 foram preparadas por dissolução em sulfóxido de dimetila (DMSO) (Merck, Darmstadt, Alemanha). Fator de célula-tronco (SCF) humano recombinante (rh) foi adquirido na Strathmann Biotech (Hanover, Alemanha), meio RPMI 1640 e soro de novilho fetal (FCS) da PAA Laboratories (Pasching, Áustria), L-glutamina e meio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM) da Gibco Life Technologies (Gaithersburg, MD), 3H-timidina da Amersham (Buckinghamshire, UK), 2-cloro-desoxiadenosina (cladribina = 2CdA) da Sigma (St. Louis, MO) e rh interleukin-4 (IL-4) da Peprotech (Rocky Hill, NJ). Os anticorpos monoclonais (mAbs) marcados com PE RPA-2.10 (CD2), WM15 (CD13), YB5.B8 (CD117) e N6B6.2 (CD164), assim como MOPC-21 (mIgG1) e G155-178 (mIgG2a) foram adquiridos na Becton Dickinson (San Jose, CA), e o mAb conjugado a PE CLB-gran12 (CD63) na Immunotech (Marselha, França). O mAb marcado com PE VIM5 (CD87) foi gentilmente fornecido pelo Dr. Otto Majdic (Instituto de Imunologia, Universidade de Medicina de Viena, Áustria).

CÉLULAS HMC-1 EXPRESSANDO OU DESPROVIDAS DE KIT D816V

A linhagem de mastócitos humanos HMC-136, gerada a partir

de um paciente com MCL, foi gentilmente fornecida pelo Dr. J. H. Butterfield (Mayo Clinic, Rochester, MN). Dois subclones de HMC-1 foram usados, a saber, HMC-1.1 portador da mutação V560G de KIT, mas não KIT D816V,²⁰ e um segundo subclone, HMC-1.2, portador de ambas as mutações de KIT, isto é, V560G e D816V.²⁰ As células HMC-1 foram cultivadas em IMDM suplementado com 10% de FCS, L-glutamina, alfa-tioglicerol (Sigma) e antibióticos a 37°C e 5% de CO₂. As células foram novamente descongeladas de um estoque original a cada 4 - 8 semanas e submetidas a passagens semanalmente. As células HMC-1 foram periodicamente verificadas quanto a i) a presença de grânulos metacromáticos, ii) expressão de KIT e iii) o efeito de regulação negativa de IL-4 (100 U/mL, 48 horas) na expressão de KIT.³⁷

Células BA/F3 com Expressão Induzível de wt KIT ou KIT D816V

A geração de células Ba/F3 com expressão induzível por doxíclicina de wt c-KIT (Ton.Kit.wt) ou c-KIT D816V foi anteriormente descrita.^{30,38} Em resumo, células Ba/F3 que expressam um transativador tet reverso^{39,40} foram co-transfectadas com vetor pTRE2 (Clontech, Palo Alto, CA) contendo cDNA de KIT D816V (ou cDNA de wt KIT, ambos gentilmente enviados pelo Dr. J. B. Longley, Universidade de Columbia, Nova Iorque, EUA) e pTK-Hyg (Clontech) por eletroporação. Células transfectadas de maneira estável foram selecionadas por cultivo em higromicina e clonadas por diluição limitativa. Neste estudo, o subclone Ton.Kit.D816V.²⁷³⁸ foi usado em todos os experimentos. A expressão de KIT-D816V pode ser induzida nessas células (em 12 horas) por exposição à doxíclicina (1 µg/mL).³⁸

Isolamento De Células Neoplásicas Primárias

Células primárias de medula óssea (bm) foram obtidas de um paciente com ASM KIT D816V positiva e AML associada e de um paciente com bm normal. As amostras aspiradas de bm foram coletadas em seringas contendo heparina livre de conservante. As células foram postas em camadas sobre Ficoll para isolar células mononucleares (MNC). A viabilidade das células era > 90% em ambos os casos. No paciente com ASM-AML, verificou-se que MNC isoladas continham > 90% de blastócitos. Ambos os pacientes deram seu consentimento escrito antes da punção de bm ou doação

de sangue. O estudo foi aprovado pela comissão revisora institucional local e foi conduzido de acordo com a declaração de Helsinki.

Análise DDa Fosforilação de KIT por Western Blotting

Células HMC-1 (106/mL) e células Ton.Kit.D816V.27 (106/mL),
5 contendo wt KIT (Ton.Kit.wt) ou KIT D816V (Ton.Kit.D816V.27), foram incubadas com dasatinib (1 pM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM), PKC412 (1 µM), AMN107 (1 µM), imatinib (1 µM) ou meio de controle a 37°C durante 4 horas. Antes da descrição a fármacos inibidores, as células Ton.Kit.wt e células Ton.Kit.D816V.27 foram incubadas com doxíciclina (1 µg/mL) a 37°C durante
10 24 horas para induzir a expressão de KIT. No caso de células Ton.Kit.wt, a fosforilação de KIT foi induzida por adição de rhSCF (100 ng/mL). A imunoprecipitação (IP) e o Western blotting foram realizados conforme descrito.^{30,40} Em resumo, as células foram lavadas a 4°C e ressuspensas em tampão RIPA (1 mL de tampão por 108 células) contendo 50 mM de Tris,
15 150 mM de NaCl, 1% de nonidet P40 (NP-40), 0,25% de ácido desoxicolico, 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 1 mM de ácido etileno-diamina-tetraacético (EDTA), 1 mM de NaF, 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila e 1 mM de Na₃VO₄. Depois da incubação em tampão RIPA suplementado com coquetel inibidor de proteinase (Roche) durante 30 minutos a 4°C, os
20 lisados foram centrifugados. Para IP, lisados de 107 células foram incubados com anticorpo anti-KIT 1C1 (gentilmente fornecido pelo Dr. H.-J. Bühring, Universidade de Tübingen, Alemanha)⁴³ e glóbulos de proteína G Sepharose (Amersham) em tampão IP (50 mM de Tris-Cl, pH 7,4, 150 mM de NaCl, 100 mM de NaF e 1% de NP-40) a 4°C durante uma noite. As contas foram,
25 então, lavadas 3 vezes em tampão IP. Os lisados e imunoprecipitados foram separados sob condições redutoras por eletroforese em SDS-gel de poliácridamida a 7,5% e transferidos para uma membrana de nitrocelulose (Protran, Schleicher & Schuell, Keene, NH) em tampão contendo 25 mM de Tris, 192 mM de glicina e 20% de metanol a 4°C. As membranas foram bloqueadas
30 durante 1 hora em reagente de bloqueio a 5% (Roche) e foram, então, incubadas com anticorpo anti-KIT 1C1 ou com mAb anti-fosfo-proteína 4G10 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) a 4°C durante uma noite. A reativi-

dade de anticorpo foi tornada visível pelo anticorpo IgG anticamundongo de ovelha e reagente de detecção Lumingen PS-3 (ambos da Amersham), com filme CL-Xposure (Pierce Biotechnology, Rockford, IL).

Avaliação dos Efeitos dos Fármacos Sobre o Crescimento e Função de Células Ton.Kit.D816V.27

5 Células Ton.Kit.D816V.27 foram co-incubadas com doxiciclina (1 µg/mL) e várias concentrações de dasatinib ou AMN107 a 37°C durante 24 - 48 horas. A viabilidade celular foi determinada por exclusão com azul tripano. A formação de aglomerados foi analisada por microscopia invertida. Estudos anteriores haviam mostrado que a expressão de KIT-D816V em Ton.Kit.D816V.27 está associada a uma formação significativa de aglomerados, e que PKC412, mas não imatinib, regula negativamente a formação de aglomerados em células Ton.Kit.D816V.27.³⁸ No presente estudo, os efeitos de dasatinib (1 pM – 1 µM) e AMN107 sobre a formação de aglomerados de células Ton.Kit.D816V.27 foram analisados. Para fins de controle, os efeitos de PKC412 e imatinib também foram examinados. A formação de aglomerados foi determinada por microscopia óptica (contados como aglomerados por campo de alta potência = HPF) e expressada como porcentagem do controle (= doxiciclina isoladamente sem fármacos = 100%). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Medição da Captação de 3H-Timidina

Para determinar os efeitos do fármaco inibidor de crescimento, células HMC-1 foram incubadas com várias concentrações de dasatinib (100 fM - 10 µM), PKC412 (100 pM - 10 µM), AMN107 (1 nM - 100 µM) ou imatinib (3 nM - 300 µM) em placas de cultura de 96 cavidades (TPP, Trasadingen, Suíça) a 37°C durante 48 horas. Em experimentos de curso temporal, células HMC-1 foram expostas a dasatinib (HMC-1.1: 10 nM; HMC-1.2: 1 µM) durante 12, 24, 36 ou 48 horas. Em experimentos selecionados, células HMC-1 foram incubadas com várias concentrações de 2CdA (0,005–10 µg/mL). Células primárias (células de bm de um paciente com ASM-AML; células de bm de controle) foram cultivadas em meio de controle, dasatinib (100 pM – 10 µM), PKC412 (100 pM – 10 µM), AMN107 (100 pM - 10 µM) ou

imatinib (100 pM – 10 μ M) durante 48 horas. Depois da incubação, 1 μ Ci de 3H-timidina foi adicionado (37°C, 12 horas). As células foram, então, colhidas em membranas de filtro (Packard Bioscience, Meriden, CT) em um coletor Filtermate 196 (Packard Bioscience). Os filtros foram secados ao ar, e a

5 radioatividade ligada foi contada em um contador β (Top-Count NXT, Packard Bioscience). Para determinar os efeitos aditivos ou sinérgicos em potencial dos fármacos sobre o crescimento das células, células HMC-1 (ambas subclones) foram expostas a várias combinações de fármacos (dasatinib, PKC412, AMN107, imatinib, 2CdA) a uma razão fixa de concentrações

10 de fármacos. As interações dos fármacos (aditivas, sinérgicas) foram determinadas calculando-se os valores de índice de combinação (CI) com o software Calculusyn (Calculusyn; Biosoft, Ferguson, MO).⁴⁴ Um valor de CI de 1 indica um efeito aditivo, ao passo que valores de CI abaixo de 1 indicam sinergia dos efeitos dos fármacos. Todos os experimentos foram realizados

15 em triplicata.

Avaliação de Apoptose por Morfologia Convencional e Microscopia Eletrônica

Os efeitos de inibidores de TK sobre a apoptose foram analisados por exame morfológico, citometria de fluxo e microscopia eletrônica. Em

20 experimentos típicos, células HMC-1 foram incubadas com várias concentrações de dasatinib (1 pM - 1 μ M) ou meio de controle em placas de cultura de 6 cavidades (TPP) em IMDM contendo 10% de FCS a 37°C durante 24 horas. A porcentagem de células apoptóticas foi quantificada em preparações de citospin tingidas com Wright-Giemsa. A apoptose foi definida de acordo

25 com critérios citomorfológicos convencionais.⁴⁵ Para confirmar a apoptose em células HMC-1, a microscopia eletrônica foi realizada conforme descrito^{46,47} usando-se células HMC-1 (ambas subclones) expostas a dasatinib (1 pM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M), PKC412 (1 μ M) ou meio de controle durante 24 horas. Depois da incubação, as células foram lavadas e fixadas em 2%

30 de paraformaldeído, 2,5% de glutaraldeído e 0,025% de CaCl₂ tamponados em 0,1 mol/L de tampão cacodilato de sódio (pH 7,4) durante uma hora. As células foram, então, lavadas, postas em suspensão em 2% de ágar e centri-

fugadas. Os péletes foram pós-fixados com 1,3% de OsO₄ (tamponados em 0,66 mol/L de colidina) e tingidos "em bloco" em 2% de acetato de uranila e tampão maleato de sódio (pH 4,4) durante duas horas. Os péletes foram, então, enxaguados, desidratados em série de álcool e incrustados em EPON 812. Seções ultrafinas foram cortadas e colocadas em grades de ouro. As seções foram contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo e visualizadas em um microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200 EX II (JEOL, Tóquio, Japão).

Avaliação de Apoptose por Ensaio Tunel

Para confirmar a apoptose em células HMC-1 após descrição a dasatinib (1 pM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM) ou PKC412 (100 nM, 1 µM), um ensaio Tunel (marcação de extremidade de ponta com dTUP-fluorescente mediada por transferase terminal *in situ*) foi realizado usando-se "Fluoresceína de Kit de Detecção de Morte Celular *In Situ*" (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo, as células foram colocadas em citospins, fixadas em paraformaldeído a 4% em PBS a pH 7,4 à TA durante 60 minutos, lavadas e, então, permeabilizadas em 0,1% de Triton X-100 e 0,1% de citrato de sódio. Depois disso, as células foram lavadas e incubadas na solução de reação de transferase terminal contendo CoCl₂, desóxi-nucleotidiltransferase terminal e dUTP marcado com fluoresceína durante 60 minutos a 37°C. As células foram, então, lavadas e analisadas com um microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E 800 (Tóquio, Japão).

Avaliação da Expressão de Antígenos de Superfície Ligados à Ativação em Células HMC-1

A expressão de antígenos de superfície celular em células HMC-1 (ambas subclones) foi determinada por citometria de fluxo após a cultura em meio de controle ou meio suplementado com inibidores de TK (dasatinib, 1 pM - 5 µM; PKC412, 1 µM) a 37°C durante 24 horas. Depois da incubação com fármacos, as células foram lavadas e submetidas à citometria de fluxo de cor única usando anticorpos conjugados a PE contra vários antígenos de diferenciação de MC, incluindo determinantes conhecidas como expressa-

das de maneira aberrante (seletiva) em MC neoplásicos.⁴⁸⁻⁵¹ Os marcadores analisados foram CD2, CD13, CD63, CD87, CD117 e CD164. A citometria de fluxo foi realizada em um FACScan (Becton Dickinson) conforme descrito.^{30,37,51}

5 Análise Estatística

Para determinar o significado de diferenças entre taxas de proliferação, apoptose e níveis de expressão em superfície após a descrição de células HMC-1 a inibidores, aplicou-se o teste t de Student para amostras dependentes. Os resultados foram considerados estatisticamente significados quando p era $< 0,05$.

Resultados

Efeitos de Dasatinib Sobre a Atividade de Tk de KIT-D816V

Conforme avaliado por IP e Western blotting, dasatinib (1 nM - 1 μ M) diminuiu a fosforilação de KIT em células HMC-1.1 (que expressam KIT-V560G, mas não KIT D816V) (Figura 11A). Em células HMC-1.2 portadoras de ambas as mutações (KIT-V560G e KIT-D816V), dasatinib diminuiu a fosforilação de KIT a 1 μ M, mas não neutralizou a fosforilação de KIT a concentrações mais baixas (Figura 11B). Examina-se, a seguir, os efeitos de dasatinib em células Ba/F3 que expressam wt KIT (Ton.Kit.wt) ou KIT D816V (Ton.Kit.D816V.27) após exposição à doxíciclina. Em células Ton.Kit.wt, KIT pareceu ser fosforilada na presença de SCF, ao passo que KIT se mostrou constitutivamente fosforilada em células Ton.Kit.D816V.27. Conforme se observa na Figura 11C, dasatinib (10 nM – 1 μ M) diminuiu a fosforilação de KIT induzida por SCF em células Ton.Kit.wt. Em contraste, em células Ton.Kit.D816V.27 (que expressam KIT-D816V após exposição à doxíciclina), dasatinib diminuiu a fosforilação de KIT a 0,1 end 1 μ M, mas foi incapaz de diminuir a fosforilação de KIT a concentrações mais baixas (Figura 11D).

Efeitos de Inibidores de Tk Sobre a Captação de 3h-Timidina em Células HMC-1

Em experimentos de curso temporal, os efeitos inibidores máximos de dasatinib sobre o crescimento de células HMC-1.1 e células HMC-1.2 foram observados após 36 - 48 horas. A Figura 12A mostra os efeitos

dependentes do tempo de dasatinib (10 nM para células HMC-1.1; 1 μ M para células HMC-1.2) sobre o crescimento dessas células. Conforme mostrado na Figura 12B, dasatinib se mostrou capaz de neutralizar a captação de 3H-timidina em células HMC-1.1 e células HMC-1.2 de maneira dependente da dose. De maneira interessante, a IC₅₀ para os efeitos de dasatinib em células HMC-1.2 (200 - 500 nM) foi consideravelmente mais elevada em comparação com os valores de IC₅₀ obtidos para células HMC-1.1 (1 nM) (Figura 12B; Figura 17). Todavia, dasatinib se mostrou capaz de inibir o crescimento de células HMC-1.2 muito mais eficazmente em bases molares em comparação com imatinib (testado em paralelo). A Tabela 2 mostra um resumo dos valores de IC₅₀ obtidos para os efeitos de inibidores de TK aplicados em células HMC-1.1 e células HMC-1.2. Com relação aos efeitos de imatinib, AMN107 e PKC412, esses dados confirmaram resultados anteriores.³⁰

15 Tabela 2

Efeitos de fármacos direcionados (IC₅₀) sobre a captação de 3H-timidina em células HMC-1

	HMC-1.1	HMC-1.2
Dasatinib	0,1 nM - 3 nM	200 nM - 500 nM
Imatinib	10 nM - 30 nM	10 μ M - 30 μ M
PKC412	50 nM - 250 nM	50 nM - 250 nM
AMN107	3 nM - 10 nM	1 μ M - 5 μ M
2CdA	100 ng/mL - 300 ng/mL	10 ng/mL - 20 ng/mL

Efeitos de Inibidores de Tk Sobre o Crescimento de Células Ba/F3 Expressando WT KIT ou KIT D816v (Ton.Kit.D816V.27)

20 Dasatinib se mostrou capaz de neutralizar o crescimento dependente de SCF de células Ton.Kit.wt expostas à doxíciclina (que expressam KIT) de maneira dependente da dose (IC₅₀: 1 nM – 10 nM) (Figura 12C). Em células Ton.Kit.D816V.27, dasatinib também se mostrou capaz de inibir o crescimento e a viabilidade celular (Figura 12D). Dasatinib não neutralizou o crescimento de células Ton.Kit.wt na ausência de doxíciclina, isto é, na ausência de KIT (Figura 12C). Da mesma forma, dasatinib não produziu gran-

des efeitos inibidores do crescimento em células Ton.Kit.D816V.27 na ausência de KIT D816V (- doxíciclina) (Figura 12D). Além disso, em experimentos de controle adicionais, doxíciclina (1 µg/mL) não mostrou efeitos inibidores do crescimento em células Ba/F3 não transfectadas (não mostrado).

5 Efeitos de Dasatinib e Amn107 Sobre a Formação de Aglomerados Dependentes de KIT-D816V em Células Ton.Kit.D816V.27

Foi demonstrado anteriormente que KIT-D186V induz não apenas a diferenciação de mastócitos, mas também a formação de aglomerados em células Ba/F3, o que é particularmente interessante, pois a formação de aglomerados de mastócitos é uma achado primário e importante critério de doença em SM.³⁸ Também foi descrito que PKC412 regula negativamente a formação de aglomerados induzida por doxíciclina/KIT-D816V em células Ton.Kit.D816V.27.³⁸ No presente estudo, descobriu-se que dasatinib (100 nM – 1 µM) e, em menor grau, AMN107 (200 nM – 1 µM) neutralizam a formação de aglomerados dependentes de KIT-D816V em células Ba/F3 de maneira dependente da dose (Figuras 12E e 12F).

15 Dasatinib Neutraliza o Crescimento de Células Neoplásicas Primárias em um Paciente com SM KIT D816V Positiva com AML Associada

Para confirmar os efeitos medicamentosos antiproliferativos de dasatinib em SM, foram examinadas células neoplásicas primárias em um paciente com ASM positiva para KIT D816V associada a AML. Nesse paciente, dasatinib (IC₅₀: 0,3 – 1,0 nM), assim como PKC412 (IC₅₀: 10 - 30 nM) se mostraram capazes de inibir o crescimento espontâneo (captação de 3H-timidina) de células leucêmicas de maneira dependente da dose. AMN107 também mostrou um efeito inibidor do crescimento (100 - 300 nM), ao passo que imatinib (IC₅₀ > 1,0 µM) não neutralizou o crescimento de células neoplásicas nesse paciente (Figura 13). Na amostra de controle, isto é, em células bm normais, nem dasatinib nem os outros inibidores testados mostraram um efeito sobre a captação de 3H-timidina (não mostrado).

30 Dasatinib Induz Apoptose em Células HMC-1

Para explorar o mecanismo subjacente ao efeito inibidor de crescimento de dasatinib, foram analisados sinais morfológicos e bioquími-

cos de apoptose em células HMC-1 após descrição ao fármaco. Conforme avaliado por microscopia óptica, dasatinib se mostrou capaz de induzir apoptose (isto é, aumentar o número de células apoptóticas) em ambos os subclones de HMC-1 (Figuras 14A e 14B). PKC412 foi aplicado como controle e também se mostrou capaz de induzir apoptose em ambos os subclones de HMC-1, ao passo que imatinib foi se mostrou capaz de produzir apoptose em células HMC-1.1, mas não mostrou nenhum efeito em células HMC-1.2 (não mostrado). O efeito indutor de apoptose de dasatinib em células HMC-1 foi confirmado por microscopia eletrônica. De fato, dasatinib induziu apoptose tanto em células HMC-1.1, quanto HMC-1.2 a 1 μ M (Figura 14C). Finalmente, foram capazes de demonstrar o efeito indutor de apoptose de dasatinib em células HMC-1 em um ensaio Tunel (Figuras 14D e 14E). Nesse ensaio, dasatinib se mostrou capaz de induzir apoptose em células HMC-1.1 entre 1 e 1.000 nM e de induzir apoptose em células HMC-1.2 entre 100 e 1.000 nM. PKC412 (1 μ M) foi usado em paralelo como um controle e também induziu apoptose em ambas as linhagens celulares (Figuras 14D e 14E). Em contraste, imatinib (1 μ M) induziu apoptose apenas em células HMC-1.1, mas não mostrou nenhum efeito em células HMC-1.2 (não mostrado), confirmando dados anteriores.³⁰

20 Dasatinib Regula Negativamente a Expressão de Antígenos de Superfície Celular Ligados à Ativação em Células HMC-1

Vários antígenos de superfície celular, como CD2 ou CD63, são tipicamente (super)expressados em MC neoplásicos na SM.⁴⁸⁻⁵⁰ De maneira interessante, algumas dessas moléculas podem ser expressadas em MC neoplásicos de maneira dependente de KIT D816V³⁸ e/ou expressadas em um estágio precoce do desenvolvimento do mastócito humano.⁵¹ Consequentemente, foi investigado se o dasatinib influenciaria a expressão desses antígenos de superfície em células HMC-1. Células HMC-1.1 não estimuladas se mostraram capazes de expressar CD13, CD63, CD87, CD117 e CD164, e células HMC-1.2 expressaram CD2, CD13, CD63, CD87, CD117 e CD164, confirmando dados anteriores.^{30,38,50} A incubação de células HMC-1.1 com dasatinib resultou em uma diminuição significativa na expres-

são de CD13, CD63, CD87 e CD117 ($p < 0,05$) (Figura 15C). Em células HMC-1.2, dasatinib diminuiu significativamente a expressão de CD2, CD63 e CD87 ($p < 0,05$), mas não levou a uma diminuição significativa na expressão de CD13, CD117 ou CD164 (Figura 15D). Os efeitos de regulação negativa do dasatinib em experimentos de citometria de fluxo são exemplificados para CD63 nas Figura 15E (HMC-1.1) e Figura 15D (HMC-1.2).

Dasatinib Coopera com outros Inibidores de Tk E com 2CdA na Produção da Inibição de Crescimento em Células HMC-1

Conforme avaliado por incorporação de 3H-timidina, dasatinib mostrou cooperação com PKC412, AMN107, imatinib e 2CdA para causar inibição do crescimento em células HMC-1 (Tabela 3, Figura 16). Em células HMC-1.1, todas as interações dos fármacos testados se mostraram de natureza sinérgica (Figuras 16A e 16B). Em contraste, em células HMC-1.2, apenas as combinações "dasatinib e PKC412" e "dasatinib e 2CdA" produziram uma sinergia clara (Figuras 16C e 16D), ao passo que as outras combinações de fármacos mostraram efeitos inibidores do crescimento sinérgico, sobre o crescimento celular (Tabela 3). Conforme mostrado na Tabela 3, os efeitos cooperativos dos fármacos sobre o crescimento de células HMC-1.2 (painéis superiores; cinza) e células HMC-1.1 (painéis inferiores; cinza escuro) foram determinados medindo-se a captação de 3H-timidina. Efeitos cooperativos dos fármacos foram calculados pelo software CalcuSyn.

Tabela 3

Avaliação dos efeitos sinérgicos de fármacos sobre o crescimento de células HMC-1

	Dasatinib	Imatinib	PKC412	AMN107	2CdA
Dasatinib		±	+	±	+
Imatinib	+		n.t.	±	n.t.
PKC412	+	+		±	±
AMN107	n.t.	+	+		±
2CdA	n.t.	n.t.	+	+	

Interações dos fármacos: +, efeitos sinérgicos; ±, efeitos aditivos; -, efeitos antagonistas.

Discussão

Em pacientes com SM, crescimento autônomo independente de fator e acúmulo de MC são características comuns a todas as variantes da doença. A mutação somática de KIT D816V é um defeito relacionado a SM considerado como responsável pela ativação constitutiva de KIT e pelo crescimento autônomo de células.¹³⁻¹⁷ Conseqüentemente, foram feitas tentativas recentes de identificar compostos farmacológicos que inibam a atividade de TK de KIT-D816V e, portanto, o crescimento/acúmulo de células neoplásicas.⁹⁻¹² Foi descrito que o novo inibidor de TK dasatinib bloqueia a atividade de TK de KIT-D816V, assim como várias funções relacionadas à doença dependentes de KIT D816V em células neoplásicas. Além disso, foi demonstrado que dasatinib tem sinergia com PKC412, assim como com outros fármacos direcionados e convencionais na produção de inibição do crescimento em MC neoplásicos.

Dasatinib, também conhecido como BMS-354825, é um inibidor de TK novo que exerce efeitos profundos sobre várias TK, incluindo B-CR/ABL e KIT, e também apresenta atividade considerável contra várias src quinases.³³⁻³⁵ Com base em sua atividade "direcionada a TK", o dasatinib foi recentemente considerado como um agente antineoplásico que pode inibir o crescimento de células neoplásicas em várias neoplasias mielóides.³³⁻³⁵ No presente estudo, foi descoberto que dasatinib neutraliza a atividade de TK da oncoproteína KIT-D816V relacionada a SM e inibe *in vitro* o crescimento de MC humanos portadores dessa mutação de KIT, o que confirma publicações anteriores.^{34,35} Além disso, foi descoberto que dasatinib neutraliza a formação de aglomerados dependente de KIT-D816V em células Ba/F3, assim como a expressão de CD2 e CD63 em células HMC-1.2. Portanto, dasatinib bloqueia várias funções relacionadas à doença (SM) e dependentes de KIT-D816V em MC neoplásicos. Com relação à inibição de crescimento, uma observação interessante foi de que o efeito de dasatinib sobre wt KIT ou KIT G560V era mais pronunciado em comparação com o observado com KIT D816V. Uma observação similar foi recentemente feita com AMN107 e imatinib.³⁰ Entretanto, embora a mutação D816V de KIT

confira uma resistência quase completa contra imatinib, os outros dois inibidores de TK, isto é, AMN107 e dasatinib, retêm uma atividade considerável contra KIT D816V, com valores de IC50 mais baixos obtidos para dasatinib em comparação com AMN107 em bases molares, o que pode ser explicado por diferentes interações de alvos de fármacos ou pelo fato de que o dasatinib não apenas neutraliza a atividade de TK de KIT, mas também vários outros alvos em potencial, como src quinases. Uma observação interessante foi de que os efeitos inibidores de crescimento de dasatinib em células HMC-1.2 ocorrem a concentrações farmacológicas, confirmando publicações anteriores.^{34,35}

Na maioria dos casos, os inibidores de TK agem como inibidores do crescimento por bloqueio do crescimento celular dependente de TK com a conseqüente apoptose.^{30,35} Da mesma forma, no caso de dasatinib, foram capazes de mostrar que a inibição de crescimento de células HMC-1 está associada à perda de atividade de TK e é acompanhada por sinais de apoptose. Efeitos indutores de apoptose de dasatinib eram demonstráveis por microscopia óptica e eletrônica, assim como em um ensaio Tunel. Conforme esperado, dasatinib mostrou efeitos indutores de apoptose mais potentes em células HMC-1.1 do que em HMC-1.2, o que está em linha com resultados recentemente publicados.³⁵

Uma característica-chave e principal critério da OMS (WHO) na SM é a formação de aglomerados de MC em órgãos viscerais.^{41,42} Foi demonstrado recentemente que KIT D816V induz não apenas a diferenciação de mastócitos, mas também a formação de aglomerados em células Ba/F3.³⁸ Assim, a formação de aglomerados de MC pode ser uma etapa inicial e importante na patogênese de SM. No presente estudo, foram capazes de mostrar que dasatinib e AMN107 neutralizam a formação de aglomerados induzida por KIT D816V em células Ba/F3. Essa observação apresenta provas adicionais da ação específica e eficácia desses fármacos.

Vários antígenos de membrana de superfície celular são tipicamente (super)expressados em MC neoplásicos.⁴⁸⁻⁵⁰ Da mesma forma, em contraste com MC normais, MC neoplásicos em SM expressam CD2 e

- CD25.48-50 Além disso, várias moléculas de superfície celular, como CD63, são superexpressadas em MC neoplásicos em comparação com MC normais.⁴⁹ Em alguns casos (como CD63), a expressão de moléculas CD pode ser dependente de KIT-D816V.³⁸ Conseqüentemente, pergunta-se se o direcionamento a KIT D816V por dasatinib estaria associado a uma diminuição na expressão desses antígenos CD. Os resultados do estudo mostram que dasatinib regula negativamente a expressão de CD2, CD63 e CD87 em células HMC-1.2 (que exibem KIT D816V), ao passo que não foi encontrada nenhuma inibição significativa da expressão de CD13, CD117=KIT ou CD164.
- 10 Em contraste, em células HMC-1.1, dasatinib também se mostrou capaz de regular negativamente a expressão de CD13 e KIT. Uma explicação para essa discrepância seria a diferente sensibilidade (IC₅₀) dos dois subclones de HMC-1 à dasatinib. Uma possibilidade alternativa seria que, em células HMC-1.2, CD13 e KIT são, em geral, não suscetíveis à modulação induzida
- 15 por fármacos. Essa hipótese seria sustentada pela observação de que CD13 e KIT também eram expressadas nos mesmos níveis depois da incubação com PKC412, embora os valores de IC₅₀ para esse composto sejam idênticos nos dois subclones de HMC-1.

- Inúmeros dados recentes sugerem que o tratamento de neoplasias mielóides com inibidores de TK como um agente único possa não ser suficiente para controlar a doença durante um período de tempo prolongado. Isso foi documentado para imatinib e CML avançada^{51,52} e também pode se aplicar a pacientes com ASM ou MCL.²⁹ Assim, em muitos desses pacientes, encontra-se resistência ao fármaco. Para superar a resistência,
- 20 inúmeras estratégias farmacológicas podem ser consideradas. Uma abordagem razoável pode ser aplicada a combinações de fármacos.

- Em um estudo anterior, foi descoberto que PKC412, AMN107 e 2CdA exibem potentes efeitos cooperativos dos fármacos em células HMC-1.30 Entretanto, embora efeitos sinérgicos fossem observados com a maioria das combinações de fármacos em células HMC-1.1 desprovidas de KIT D816V, nenhuma interação sinérgica (mas apenas aditiva) dos fármacos foi observada em células HMC-1.2 portadoras de KIT D816V. Conseqüente-
- 30

mente, estavam altamente interessados em aprender se dasatinib, que exibe potentes efeitos em mastócitos portadores de KIT D816V como agente único, produziria efeitos sinérgicos nessas células quando combinado com outros potentes inibidores de KIT D816V. De fato, os resultados mostram que

5 dasatinib e PKC412, assim como dasatinib e 2CdA, um fármaco usado para tratar ASM e MCL54, inibem o crescimento de células HMC-1.2 de maneira sinérgica. Segundo o melhor conhecimento, essa é a primeira combinação de inibidores de TK que produz um efeito sinérgico sobre o crescimento de MC neoplásicos portadores de KIT D816V.

10 Em resumo, foi demonstrado que dasatinib e PKC412 são os fármacos direcionados mais promissores para o tratamento de ASM e MCL. Com base nos dados, parece razoável considerar a aplicação de combinações desses fármacos ou combinações entre esses fármacos e 2CdA para melhorar a terapia de pacientes com ASM ou MCL.

15 Referências do Exemplo 1

1. Reilly JT. Class III receptor tyrosine kinases: role in leukaemogenesis. *Br J Haematol.* 2002;116:744-757.
2. Deininger MW, Druker BJ. Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib. *Pharmacol Rev.* 2003;55:401-423.
- 20 3. Pardanani A, Tefferi A. Imatinib targets other than bcr/abl and their clinical relevance in myeloid disorders. *Blood.* 2004;104:1931-1939.
4. Shah NP, Tran C, Lee FY, Chen P, Norris D, Sawyers CL. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science.* 2004; 305:399-401.
- 25 5. Fabbro D, Ruetz S, Bodis S, et al. PKC412 - a protein kinase inhibitor with a broad therapeutic potential. *Anticancer Drug Des.* 2000;15:17-28.
6. Lennert K, Parwaresch MR. Mast cells and mast cell neoplasia: a review. *Histopathology* 1979;3:349-365.
7. Metcalfe DD. Classification and diagnosis of mastocytosis: current status. *J Invest Dermatol* 1991;96:2S-4S.
- 30 8. Valent P. Biology, classification and treatment of human mastocytosis. *Wi-en Klin Wschr.* 1996;108:385-397.

9. Valent P, Akin C, Sperr WR, et al. Diagnosis and treatment of systemic mastocytosis: state of the art. *Br J Haematol* 2003;122:695-717.
10. Akin C, Metcalfe DD. Systemic mastocytosis. *Annu Rev Med*. 2004;55:419-32.
- 5 11. Tefferi A, Pardanani A. Clinical, genetic, and therapeutic insights into systemic mast cell disease. *Curr Opin Hematol*. 2004;11:58-64.
12. Valent P, Ghannadan M, Akin C, et al. On the way to targeted therapy of mast cell neoplasms: identification of molecular targets in neoplastic mast cells and evaluation of arising treatment concepts. *Eur J Clin Invest*. 2004;34:41-52.
- 10 13. Nagata H, Worobec AS, Oh CK, et al. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene *c-kit* in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 1995;92:10560-10564.
- 15 14. Longley BJ, Tyrrell L, Lu SZ, et al. Somatic *c-kit* activating mutation in urticaria pigmentosa and aggressive mastocytosis: establishment of clonality in a human mast cell neoplasm. *Nat Genet*. 1996;12:312-314.
15. Longley BJ, Metcalfe DD, Tharp M, Wang X, Tyrrell L, Lu S-Z, et al. Activating and dominant inactivating *c-kit* catalytic domain mutations in distinct forms of human mastocytosis. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 1999;96:1609-1614.
- 20 16. Fritsche-Polanz R, Jordan JH, Feix A, et al. Mutation analysis of *C-KIT* in patients with myelodysplastic syndromes without mastocytosis and cases of systemic mastocytosis. *Br J Haematol*. 2001;113:357-364.
- 25 17. Feger F, Ribadeau Dumas A, Leriche L, Valent P, Arock M: Kit and *c-kit* mutations in mastocytosis: a short overview with special reference to novel molecular and diagnostic concepts. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;127:110-114.
- 30 18. Furitsu T, Tsujimura T, Tono T, et al. Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene *c-kit* in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of the *c-kit* product. *J Clin Invest*. 1993;92:1736-1744.

19. Tefferi A, Pardanani A. Systemic mastocytosis: current concepts and treatment advances. *Curr Hematol Rep*. 2004;3:197-202.
20. Akin C, Brockow K, D'Ambrosio C, et al. Effects of tyrosine kinase inhibitor STI571 on human mast cells bearing wild-type or mutated forms of c-kit. *Exp Hematol* 2003;31:686-692.
21. Ma Y, Zeng S, Metcalfe DD, et al. The *c-KIT* mutation causing human mastocytosis is resistant to STI571 and other KIT kinase inhibitors; kinases with enzymatic site mutations show different inhibitor sensitivity profiles than wild-type kinases and those with regulatory type mutations. *Blood* 2002;99:1741-1744.
22. Frost MJ, Ferrao PT, Hughes TP, Ashman LK. Juxtamembrane mutant V560GKit is more sensitive to Imatinib (STI571) compared with wild-type c-kit whereas the kinase domain mutant D816VKit is resistant. *Mol Cancer Ther*. 2002;1:1115-1124.
23. Akin C, Fumo G, Yavuz AS, Lipsky PE, Neckers L, Metcalfe DD. A novel form of mastocytosis associated with a transmembrane c-kit mutation and response to imatinib. *Blood*. 2004;103:3222-3225.
24. Pardanani A, Ketterling RP, Brockman SR, Flynn HC, Paternoster SF, Shearer BM, Reeder TL, Li CY, Cross NC, Cools J, Gilliland DG, Dewald GW, Tefferi A. CHIC2 deletion, a surrogate for FIP1L1-PDGFR α fusion, occurs in systemic mastocytosis associated with eosinophilia and predicts response to imatinib mesylate therapy. *Blood*. 2003;102:3093-3096.
25. Pardanani A, Elliott M, Reeder T, Li CY, Baxter EJ, Cross NC, Tefferi A. Imatinib for systemic mast-cell disease. *Lancet*. 2003;362:535-536.
26. Pardanani A, Tefferi A. Imatinib targets other than bcr/abl and their clinical relevance in myeloid disorders. *Blood*. 2004;104:1931-1939.
27. Weisberg E, Manley PW, Breitenstein W, et al. Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell*. 2005;7:129-141.
28. Butterfield JH, Weiler D, Dewald G, Gleich GJ. Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. *Leuk Res*. 1988;12:345-355.

29. Sillaber C, Strobl H, Bevec D, et al. IL-4 regulates c-kit proto-oncogene product expression in human mast and myeloid progenitor cells. *J Immunol.* 1991;147:4224-4228.
30. Mayerhofer M, Gleixner K, Aichberger K, et al. *c-kit* gene mutation D816V
5 as a single hit explains numerous features and the pathology of indolent systemic mastocytosis. manuscript submitted.
31. Daley GQ, Baltimore D. Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. *Proc Natl Acad Sci (USA).* 1988;85:9312-9316.
- 10 32. Sillaber C, Gesbert F, Frank DA, Sattler M, Griffin JD. STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells. *Blood.* 2000;95:2118-2125.
33. Valent P, Horny H-P, Escribano L, et al. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. Conference Report of "Year
15 2000 Working Conference on Mastocytosis". *Leuk Res.* 2001;25:603-625.
34. Valent P, Horny H-P, Li CY, et al. Mastocytosis (Mast cell disease). World Health Organization (WHO) Classification of Tumours. Pathology & Genetics. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. eds: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. 2001;1:291-302.
- 20 35. Yavuz AS, Lipsky PE, Yavuz S, Metcalfe DD, Akin C. Evidence for the involvement of a hematopoietic progenitor cell in systemic mastocytosis from single-cell analysis of mutations in the c-kit gene. *Blood.* 2002;100:661-665.
36. Valent P, Akin C, Sperr WR, Horny HP, Metcalfe DD. Smouldering mastocytosis: a novel subtype of systemic mastocytosis with slow progression.
25 *Int Arch Allergy Immunol.* 2002;127:137-139.
37. Broudy VC, Lin N, Zsebo KM, et al. Isolation and characterization of a monoclonal antibody that recognizes the human c-kit receptor. *Blood.* 1992;79:338-346.
38. Bühring HJ, Ashman LK, Gattei V, Knip B, Larregina A, Pinto A, Valent
30 P, van den Oord J. Stem-cell factor receptor (p145(c-kit)) summary report (CD117). in *Leucocyte Typing V. White Cell Differentiation Antigens.* eds: Schlossmann SF, Boumsell L, Gilks W, et al. Vol 2. pp 1882-1888. Oxford

University Press. 1995.

39. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 1984;22:27-55.
- 5 40. Van Cruchten S, Van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 2002;31:214-223.
41. Schedle A, Samorapoompichit P, Füreder W, et al. Metal ion-induced toxic histamine release from human basophils and mast cells. *J Biomed Mater Res*. 1998;39:560-567.
- 10 42. Samorapoompichit P, Kiener HP, Schernthaner GH, et al. Detection of tryptase in cytoplasmic granules of basophils in patients with chronic myeloid leukemia and other myeloid neoplasms. *Blood*. 2001;98:2580-2583.
43. Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. Detection of strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res*. 1993;53:1945-1951.
- 15 44. Walker PR, Carson C, Leblanc J, Sikorska M. Labeling DNA damage with terminal transferase. Applicability, specificity, and limitations. *Methods Mol Biol*. 2002;203:3-19.
- 20 45. Escribano L, Diaz-Agustin B, Bellas C, et al. Utility of flow cytometric analysis of mast cells in the diagnosis and classification of adult mastocytosis. *Leuk Res*. 2001;25:563-570.
46. Valent P, Schernthaner GH, Sperr WR, et al. Variable expression of activation-linked surface antigens on human mast cells in health and disease. *Immunol Rev*. 2001;179:74-81.
- 25 47. Ghannadan M, Hauswirth AW, Schernthaner GH, et al. Detection of novel CD antigens on the surface of human mast cells and basophils. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;127:299-307.
48. Gowney JD, Clark JJ, Adelsperger J, et al. Activation mutations of human c-KIT resistant to imatinib are sensitive to the tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Blood*. 2005, in press.
- 30 49. Corless CL, Fletcher JA, Heinrich MC. Biology of gastrointestinal stromal

tumors. *J Clin Oncol*. 2004;22:3813-3825.

50. Cowan-Jacob SW, Guez V, Fendrich G, et al. Imatinib (STI571) resistance in chronic myelogenous leukemia: molecular basis of the underlying mechanisms and potential strategies for treatment. *Mini Rev Med Chem*. 2004;4:285-299.

51. Weisberg E, Griffin JD. Resistance to imatinib (Glivec): update on clinical mechanisms. *Drug Resist Updat*. 2003;6:231-238.

52. Gotlib J, Berube C, Ruan J, et al. PKC412, inhibitor of the KIT tyrosine kinase, demonstrates efficacy in mast cell leukemia with the D816V KIT mutation. *Blood*. 2003;102:919a (abst).

Referências do Exemplo 2

1. Griffin J. The biology of signal transduction inhibition: basic science to novel therapies. *Semin Oncol*. 2001;28(5S):3-8.

2. Reilly JT. Class III receptor tyrosine kinases: role in leukaemogenesis. *Br J Haematol*. 2002;116:744-757.

3. Deininger MW, Druker BJ. Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib. *Pharmacol Rev*. 2003;55:401-423.

4. Pardanani A, Tefferi A. Imatinib targets other than bcr/abl and their clinical relevance in myeloid disorders. *Blood*. 2004;104:1931-1939.

5. Chalandon Y, Schwaller J. Targeting mutated protein tyrosine kinases and their signaling pathways in hematologic malignancies. *Haematologica*. 2005;90:949-968.

6. Lennert K, Parwaresch MR. Mast cells and mast cell neoplasia: a review. *Histopathology*. 1979;3:349-365.

7. Metcalfe DD. Classification and diagnosis of mastocytosis: current status. *J Invest Dermatol*. 1991;96:2S-4S.

8. Valent P. Biology, classification and treatment of human mastocytosis. *Wien Klin Wochenschr*. 1996;108:385-397.

9. Valent P, Akin C, Sperr WR, et al. Diagnosis and treatment of systemic mastocytosis: state of the art. *Br J Haematol*. 2003;122:695-717.

10. Akin C, Metcalfe DD. Systemic mastocytosis. *Annu Rev Med*. 2004;55:419-432.

11. Tefferi A, Pardanani A. Clinical, genetic, and therapeutic insights into systemic mast cell disease. *Curr Opin Hematol*. 2004;11:58-64.
12. Valent P, Ghannadan M, Akin C, et al. On the way to targeted therapy of mast cell neoplasms: identification of molecular targets in neoplastic mast cells and evaluation of arising treatment concepts. *Eur J Clin Invest*. 2004;34:41-52.
13. Nagata H, Worobec AS, Oh CK, et al. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 1995;92:10560-10564.
14. Longley BJ, Tyrrell L, Lu SZ, et al. Somatic c-kit activating mutation in urticaria pigmentosa and aggressive mastocytosis: establishment of clonality in a human mast cell neoplasm. *Nat Genet*. 1996;12:312-314.
15. Longley BJ, Metcalfe DD, Tharp M, et al. Activating and dominant inactivating c-kit catalytic domain mutations in distinct forms of human mastocytosis. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 1999;96:1609-1614.
16. Fritsche-Polanz R, Jordan JH, Feix A, et al. Mutation analysis of C-KIT in patients with myelodysplastic syndromes without mastocytosis and cases of systemic mastocytosis. *Br J Haematol*. 2001;113:357-364.
17. Feger F, Ribadeau Dumas A, Leriche L, Valent P, Arock M. Kit and c-kit mutations in mastocytosis: a short overview with special reference to novel molecular and diagnostic concepts. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;127:110-114.
18. Furitsu T, Tsujimura T, Tono T, et al. Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of the c-kit product. *J Clin Invest*. 1993;92:1736-1744.
19. Tefferi A, Pardanani A. Systemic mastocytosis: current concepts and treatment advances. *Curr Hematol Rep*. 2004;3:197-202.
20. Akin C, Brockow K, D'Ambrosio C, et al. Effects of tyrosine kinase inhibitor STI571 on human mast cells bearing wild-type or mutated forms of c-kit. *Exp Hematol* 2003;31:686-692.

21. Ma Y, Zeng S, Metcalfe DD, et al. The c-KIT mutation causing human mastocytosis is resistant to STI571 and other KIT kinase inhibitors; kinases with enzymatic site mutations show different inhibitor sensitivity profiles than wild-type kinases and those with regulatory type mutations. Blood
5 2002;99:1741-1744.
22. Frost MJ, Ferrao PT, Hughes TP, Ashman LK. Juxtamembrane mutant V560GKit is more sensitive to Imatinib (STI571) compared with wild-type c-kit whereas the kinase domain mutant D816VKit is resistant. Mol Cancer Ther. 2002;1:1115-1124.
- 10 23. Akin C, Fumo G, Yavuz AS, Lipsky PE, Neckers L, Metcalfe DD. A novel form of mastocytosis associated with a transmembrane c-kit mutation and response to imatinib. Blood. 2004;103:3222-3225.
24. Pardanani A, Ketterling RP, Brockman SR, et al. CHIC2 deletion, a surrogate for FIP1L1-PDGFR fusion, occurs in systemic mastocytosis associated with eosinophilia and predicts response to imatinib mesylate therapy.
15 2003;102:3093-3096.
25. Pardanani A, Elliott M, Reeder T, et al. Imatinib for systemic mast-cell disease. Lancet. 2003;362:535-536.
26. Pardanani A. Systemic mastocytosis: bone marrow pathology, classification, and current therapies. Acta Haematol. 2005;114:41-51.
20
27. Fabbro D, Ruetz S, Bodis S, et al. PKC412 - a protein kinase inhibitor with a broad therapeutic potential. Anticancer Drug Des. 2000;15:17-28.
28. Gowney JD, Clark JJ, Adelsperger J, et al. Activation mutations of human c-KIT resistant to imatinib are sensitive to the tyrosine kinase inhibitor PKC412. Blood. 2005;106:721-724.
25
29. Gotlib J, Berube C, Gowney JD, et al. Activity of the tyrosine kinase inhibitor PKC412 in a patient with mast cell leukemia with the D816V KIT mutation. Blood. 2005;106:2865-2870.
30. Gleixner KV, Mayerhofer M, Aichberger KJ, et al. The tyrosine kinase-targeting drug PKC412 inhibits in vitro growth of neoplastic human mast cells expressing the D816V-mutated variant of kit: comparison with AMN107, imatinib, and cladribine (2CdA), and evaluation of cooperative drug effects. Blo-
30

- od 2006;752-759.
31. Weisberg E, Manley PW, Breitenstein W, et al. Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell*. 2005;7:129-141.
 - 5 32. von Bubnoff N, Gorantla SH, Kancha RK, Lordick F, Peschel C, Duyster J. The systemic mastocytosis-specific activating cKit mutation D816V can be inhibited by the tyrosine kinase inhibitor AMN107. *Leukemia*. 2005;19:1670-1671.
 33. Shah NP, Tran C, Lee FY, Chen P, Norris D, Sawyers CL. Overriding
10 imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science*. 2004;305:399-401.
 34. Shah NP, Lee FY, Luo R, Jiang Y, Donker M, Akin C. Dasatinib (BMS-354825) inhibits KITD816V, an imatinib-resistant activating mutation that triggers neoplastic growth in the majority of patients with systemic mastocytosis.
15 *Blood*, in press. 2006.
 35. Schittenhelm MM, Shiraga S, Schroeder A, et al. Dasatinib (BMS-354825), a dual SRC/ABL kinase inhibitor, inhibits the kinase activity of wild-type, juxtamembrane, and activation loop mutant KIT isoforms associated with human malignancies. *Cancer Res*. 2006;66:473-481.
 - 20 36. Butterfield JH, Weiler D, Dewald G, Gleich GJ. Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. *Leuk Res*. 1988;12:345-355.
 37. Sillaber C, Strobl H, Bevec D, et al. IL-4 regulates c-kit proto-oncogene product expression in human mast and myeloid progenitor cells. *J Immunol*.
25 1991;147:4224-4228.
 38. Mayerhofer M, Aichberger KJ, Florian S, et al. c-kit D816V provides a strong signal for myelomastocytic differentiation and cluster formation in murine Ba/F3 cells. *Blood*. 2004;104:141a.
 39. Daley GQ, Baltimore D. Transformation of an interleukin 3-dependent
30 hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 1988;85:9312-9316.
 40. Sillaber C, Gesbert F, Frank DA, Sattler M, Griffin JD. STAT5 activation

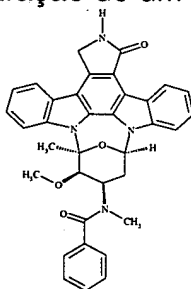
- contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells. *Blood*. 2000;95:2118-2125.
41. Valent P, Horny H-P, Escribano L, et al. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. Conference Report of "Year 2000 Working Conference on Mastocytosis". *Leuk Res*. 2001;25:603-625.
42. Valent P, Horny H-P, Li CY, et al. Mastocytosis (Mast cell disease). World Health Organization (WHO) Classification of Tumours. Pathology & Genetics. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. eds: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. 2001;1:291-302.
43. Bühring HJ, Ashman LK, Gattei V, et al. Stem-cell factor receptor (p145(c-kit)) summary report (CD117). in *Leucocyte Typing V. White Cell Differentiation Antigens*. eds: Schlossmann SF, Boumsell L, Gilks W, et al. Vol 2. pp 1882-1888. Oxford University Press. 1995.
44. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul*. 1984;22:27-55.
45. Van Cruchten S, Van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol*. 2002;31:214-223.
46. Schedle A, Samorapoompichit P, Füreder W, et al. Metal ion-induced toxic histamine release from human basophils and mast cells. *J Biomed Mater Res*. 1998;39:560-567.
47. Samorapoompichit P, Kiener HP, Schernthaner GH, et al. Detection of tryptase in cytoplasmic granules of basophils in patients with chronic myeloid leukemia and other myeloid neoplasms. *Blood*. 2001;98:2580-2583.
48. Escribano L, Orfao A, Diaz-Agustin B, et al. Indolent systemic mast cell disease in adults: immunophenotypic characterization of bone marrow mast cells and its diagnostic implications. *Blood*. 1998;91:2731-2736.
49. Escribano L, Diaz-Agustin B, Bellas C, et al. Utility of flow cytometric analysis of mast cells in the diagnosis and classification of adult mastocytosis. *Leuk Res*. 2001;25:563-570.
50. Valent P, Schernthaner GH, Sperr WR, et al. Variable expression of acti-

vation-linked surface antigens on human mast cells in health and disease. Immunol Rev. 2001;179:74-81.

51. Schernthaner GH, Hauswirth AW, Baghestanian M, et al. Detection of differentiation- and activation-linked cell surface antigens on cultured mast cell progenitors. Allergy. 2005;60:1248-1255.
52. Weisberg E, Griffin JD. Resistance to imatinib (Glivec): update on clinical mechanisms. Drug Resist Updat. 2003;6:231-238.
53. Daub H, Specht K, Ullrich A. Strategies to overcome resistance to targeted protein kinase inhibitors. Nat Rev Drug Discov. 2004;3:1001-1010.
- 10 54. Kluin-Nelemans HC, Oldhoff JM, Van Doormaal JJ, et al. Cladribine therapy for systemic mastocytosis. Blood 2003;102:4270-4276.

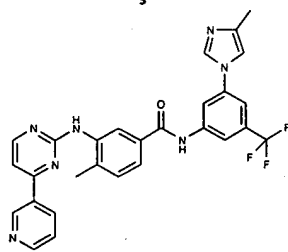
REIVINDICAÇÕES

1. Método de tratamento ou de prevenção de mastocitose sistêmica, compreendendo a administração de um composto de fórmula (I):



(I)

em combinação com um composto de fórmula (II):



(II)

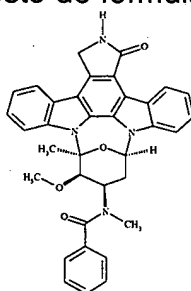
ou sal farmacologicamente aceitável do mesmo, em que a combinação trata ou previne uma doença proliferativa relacionada a mastócitos, como mastocitose sistêmica.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que a doença proliferativa relacionada a mastócitos é mastocitose sistêmica.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, em que a mastocitose sistêmica tem resistência a imatinib.

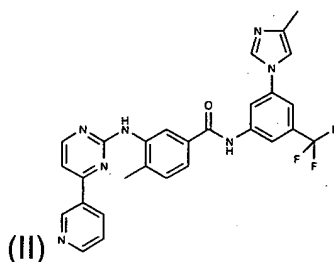
4. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que a mastocitose sistêmica está associada à mutação oncogênica KIT-D816V.

5. Uso de um composto de fórmula (I):



(I)

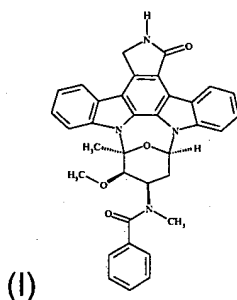
em combinação com um composto de fórmula (II):



ou sais farmacêuticamente aceitáveis do mesmo para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de mastocitose sistêmica.

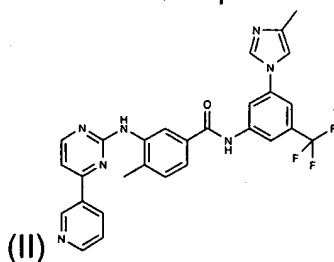
6. Uso, de acordo com a reivindicação 5, para o tratamento de mastocitose sistêmica associada à mutação oncogênica KIT-D816V.

7. Método para o tratamento de mamíferos sofrendo de mastocitose sistêmica, que compreende a administração a um mamífero necessitado desse tratamento de uma quantidade inibidora da atividade de KIT de um composto de fórmula (I):



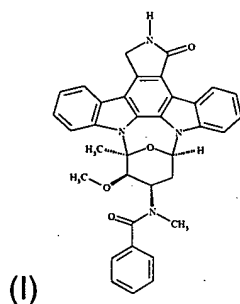
10

em combinação com um composto de fórmula (II):

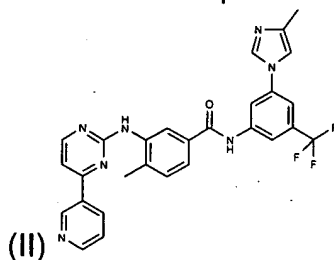


ou sais farmacêuticamente aceitáveis do mesmo.

8. Preparação farmacêutica para o tratamento de mastocitose sistêmica associada a KIT-D816V, compreendendo um composto de fórmula (I):

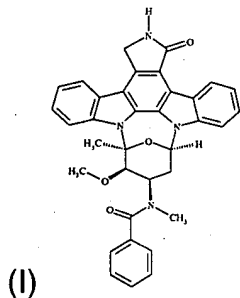


em combinação com um composto de fórmula (II):

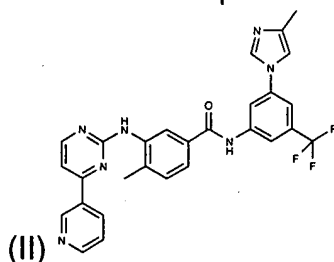


ou sais farmacologicamente aceitáveis do mesmo.

9. Método para o tratamento de mamíferos, incluindo o homem, que sofram de mastocitose sistêmica, compreendendo a administração a um
- 5 mamífero necessitado desse tratamento de um composto de fórmula (I):

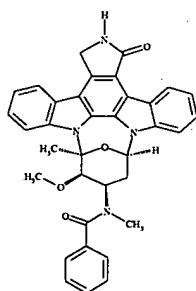


em combinação com um composto de fórmula (II):



ou sais farmacologicamente aceitáveis do mesmo.

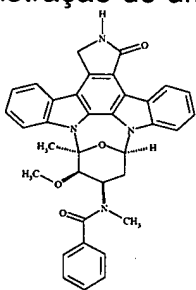
10. Método de tratamento ou de prevenção de mastocitose sistêmica, compreendendo a administração de um composto de fórmula (I):



(I)

em combinação com um inibidor da timidina quinase (TK); ou sais farmacologicamente aceitáveis do mesmo.

11. Método de tratamento ou de prevenção de mastocitose sistêmica, compreendendo a administração de um composto de fórmula (I):



(I)

5 em combinação com um inibidor da timidina quinase (TK), ou sal farmacologicamente aceitável do mesmo, em que a combinação trata ou previne uma doença proliferativa relacionada a mastócitos.

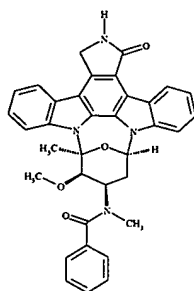
12. Método, de acordo com a reivindicação 11, em que a doença proliferativa relacionada a mastócitos é selecionada de mastocitose sistêmica, mastocitose sistêmica agressiva e leucemia de mastócitos.

13. Método, de acordo com a reivindicação 11, em que a doença proliferativa relacionada a mastócitos tem resistência a imatinib.

14. Método, de acordo com a reivindicação 11, para o tratamento de doença proliferativa relacionada a mastócitos associada a KIT do tipo selvagem ou com uma mutação oncogênica KIT G560V ou KIT-D816V.

15. Método, de acordo com a reivindicação 11, em que o inibidor de TK é selecionado de dasatinib e 2CdA.

16. Uso de um composto de fórmula (I):



(I)

em combinação com um inibidor da timidina quinase (TK), ou sais farmaceuticamente aceitáveis do mesmo para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de uma doença proliferativa relacionada a mastócitos.

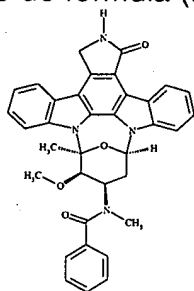
17. Uso, de acordo com a reivindicação 16, em que a doença proliferativa relacionada a mastócitos é selecionada de mastocitose sistêmica, mastocitose sistêmica agressiva e leucemia de mastócitos.

18. Uso, de acordo com a reivindicação 16, em que a doença proliferativa relacionada a mastócitos tem resistência a imatinib.

19. Uso, de acordo com a reivindicação 16, para o tratamento de doença proliferativa relacionada a mastócitos associada a KIT do tipo selvagem ou com uma mutação oncogênica KIT G560V ou KIT-D816V.

20. Uso, de acordo com a reivindicação 16, em que o inibidor de TK é selecionado de dasatinib e 2CdA.

21. Método para o tratamento de mamíferos sofrendo de doença proliferativa relacionada a mastócitos, que compreende a administração a um mamífero necessitado desse tratamento de uma quantidade inibidora da atividade de KIT de um composto de fórmula (I):



(I)

em combinação com um inibidor da timidina quinase (TK), ou sais farmaceuticamente aceitáveis do mesmo.

22. Método, de acordo com a reivindicação 21, em que a doença proliferativa relacionada a mastócitos é selecionada de mastocitose sistêmica,

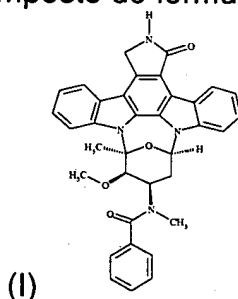
ca, mastocitose sistêmica agressiva e leucemia de mastócitos.

23. Método, de acordo com a reivindicação 21, em que a doença proliferativa relacionada a mastócitos tem resistência a imatinib.

24. Método, de acordo com a reivindicação 21, para o tratamento de doença proliferativa relacionada a mastócitos associada a KIT do tipo selvagem ou com uma mutação oncogênica KIT G560V ou KIT-D816V.

25. Método, de acordo com a reivindicação 21, em que o inibidor de TK é selecionado de dasatinib e 2CdA.

26. Preparação farmacêutica para o tratamento de doença proliferativa relacionada a mastócitos associada a KIT do tipo selvagem ou mutante, compreendendo um composto de fórmula (I):



em combinação com um inibidor da timidina quinase (TK), ou sais farmaceuticamente aceitáveis do mesmo.

27. Método, de acordo com a reivindicação 21, em que a doença proliferativa relacionada a mastócitos é selecionada de mastocitose sistêmica, mastocitose sistêmica agressiva e leucemia de mastócitos.

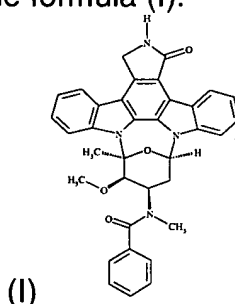
28. Método, de acordo com a reivindicação 21, em que a doença proliferativa relacionada a mastócitos tem resistência a imatinib.

29. Método, de acordo com a reivindicação 21, para o tratamento de doença proliferativa relacionada a mastócitos associada a KIT do tipo selvagem ou com uma mutação oncogênica KIT G560V ou KIT-D816V.

30. Método, de acordo com a reivindicação 21, em que o inibidor de TK é selecionado de dasatinib e 2CdA.

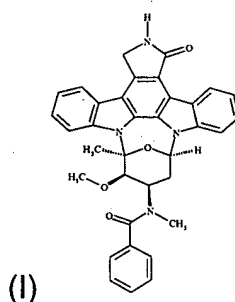
31. Método para o tratamento de mamíferos, incluindo o homem, que sofram de doença proliferativa relacionada a mastócitos associada a KIT do tipo selvagem ou com uma mutação oncogênica KIT G560V ou KIT-D816V, que compreende a administração a um mamífero necessitado desse

tratamento de um composto de fórmula (I):



em combinação com um inibidor da timidina quinase (TK), ou sais farmaceuticamente aceitáveis do mesmo.

32. Método para o tratamento de mamíferos, incluindo o homem,
5 que sofram de mastocitose sistêmica, que compreende a administração de um composto de fórmula (I):

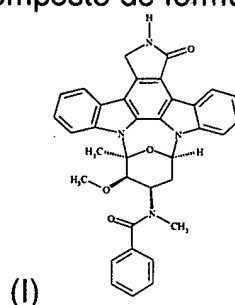


em combinação com um inibidor da timidina quinase (TK); ou sais farmaceuticamente aceitáveis do mesmo.

33. Método, de acordo com a reivindicação 31 ou 32, em que a
10 doença proliferativa relacionada a mastócitos é selecionada de mastocitose sistêmica, mastocitose sistêmica agressiva e leucemia de mastócitos.

34. Método, de acordo com a reivindicação 31 ou 32, em que a doença proliferativa relacionada a mastócitos tem resistência a imatinib.

35. Uso de um composto de fórmula (I)



- 15 em combinação com um inibidor da timidina quinase (TK), ou sais farmaceuticamente aceitáveis do mesmo para a preparação de uma composição far-

macêutica para o tratamento de doença proliferativa relacionada a mastócitos associada a KIT do tipo selvagem ou com uma mutação oncogênica KIT G560V ou KIT-D816V.

36. Método, de acordo com a reivindicação 31 ou 32, em que o
- 5 inibidor de TK é selecionado de dasatinib e 2CdA.

RESUMO

Patente de Invenção: "**COMPOSIÇÕES PARA TRATAMENTO DE MASTOCITOSE SISTÊMICA**".

- A presente invenção refere-se ao uso da combinação dos inibidores de fosfato de tirosina AMN107 e PKC412 para a preparação de um fármaco para o tratamento de uma doença proliferativa relacionada a mastócitos. A presente invenção também se refere a um tratamento de combinação de um inibidor de fosfato de tirosina com um inibidor de TK que seja eficaz contra uma doença proliferativa relacionada a mastócitos, incluindo particularmente mastocitose sistêmica (SM), incluindo SM agressiva (ASM) e leucemia de mastócitos (MCL).