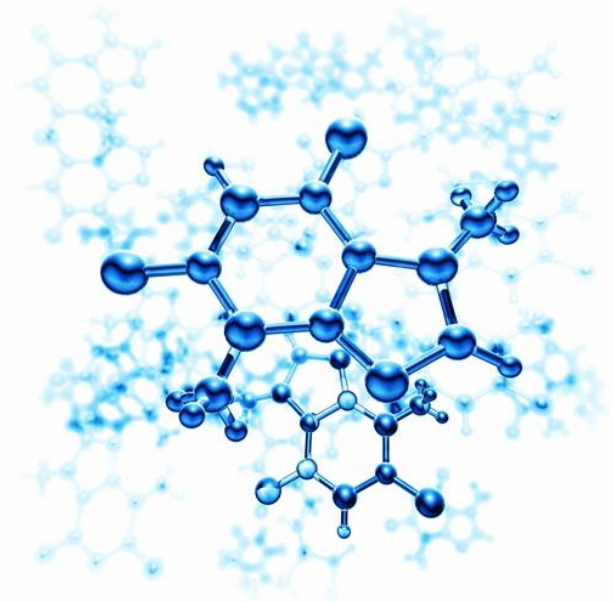
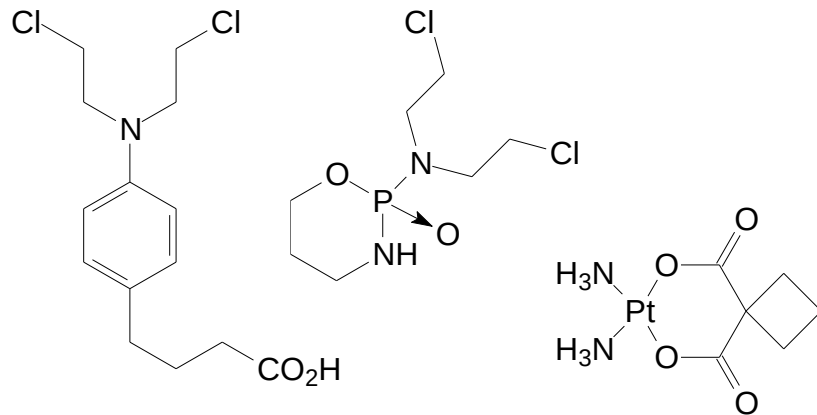


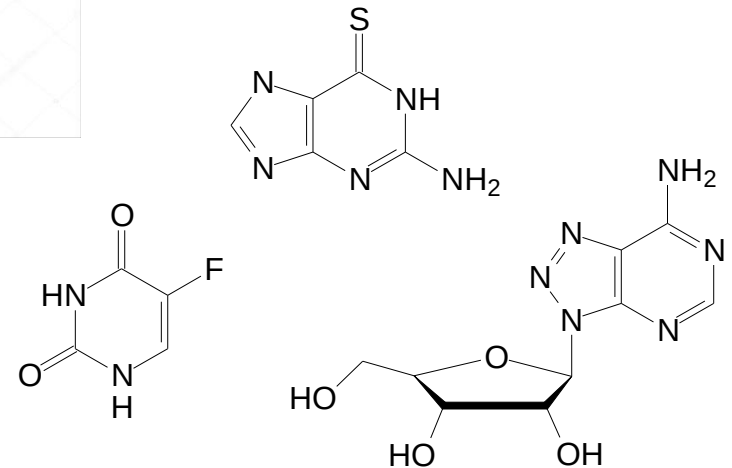
Ενζυμική αναστολή – σχεδιασμός φαρμάκων που αναστέλλουν πρωτεϊνικές κινάσες



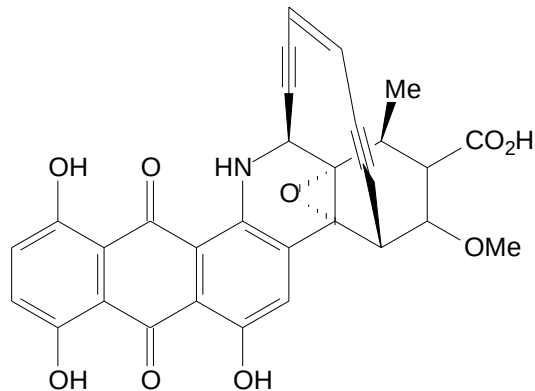
Αλκυλιωτικοί παράγοντες



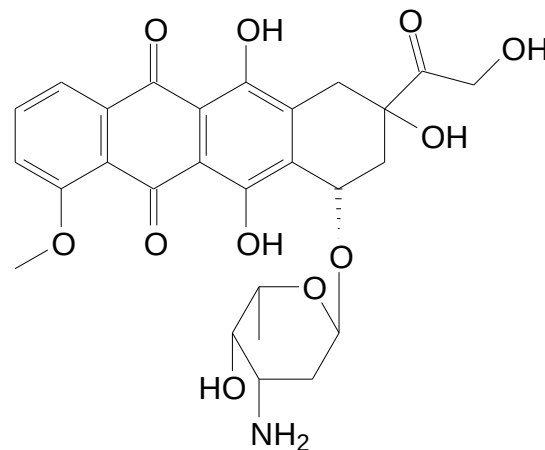
Αντιμεταβολίτες



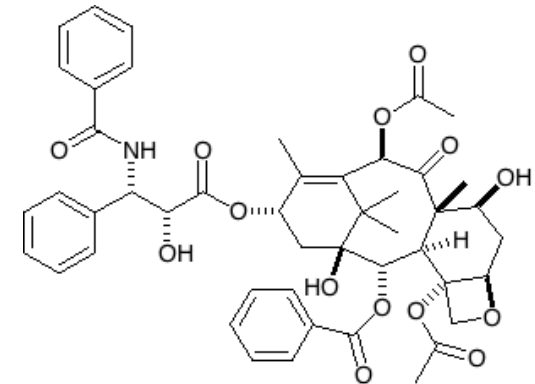
Μόρια που προκαλούν σχάση του DNA



Ενδοπαρεμβολείς



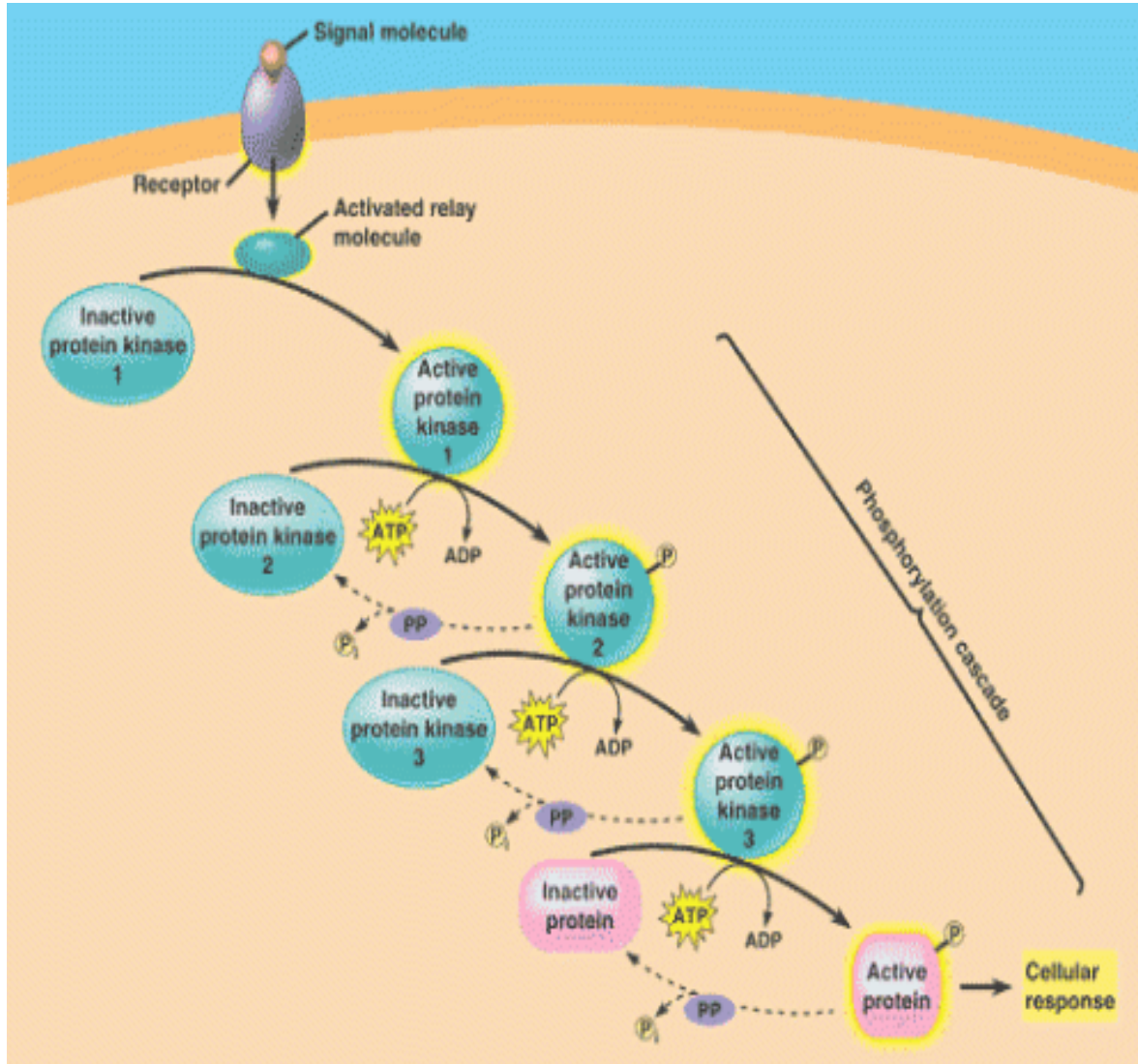
Αναστολείς κυτταρικών στοιχείων



Αντικαρκινικά φάρμακα

Targeted drug therapy: κατευθυντήρια γραμμή σε αντικαρκινικά και άλλα φάρμακα.

Αναστολείς πρωτεϊνικών κινάσων που υπερεκφράζονται και εμπλέκονται στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό ή/και την επιβίωση του κυττάρου. Έντονη ακαδημαϊκή δραστηριότητα + το **25-30% του R&D των φαρμακευτικών εταιρειών: κορυφαίο πεδίο ανάπτυξης νέων φαρμάκων.**

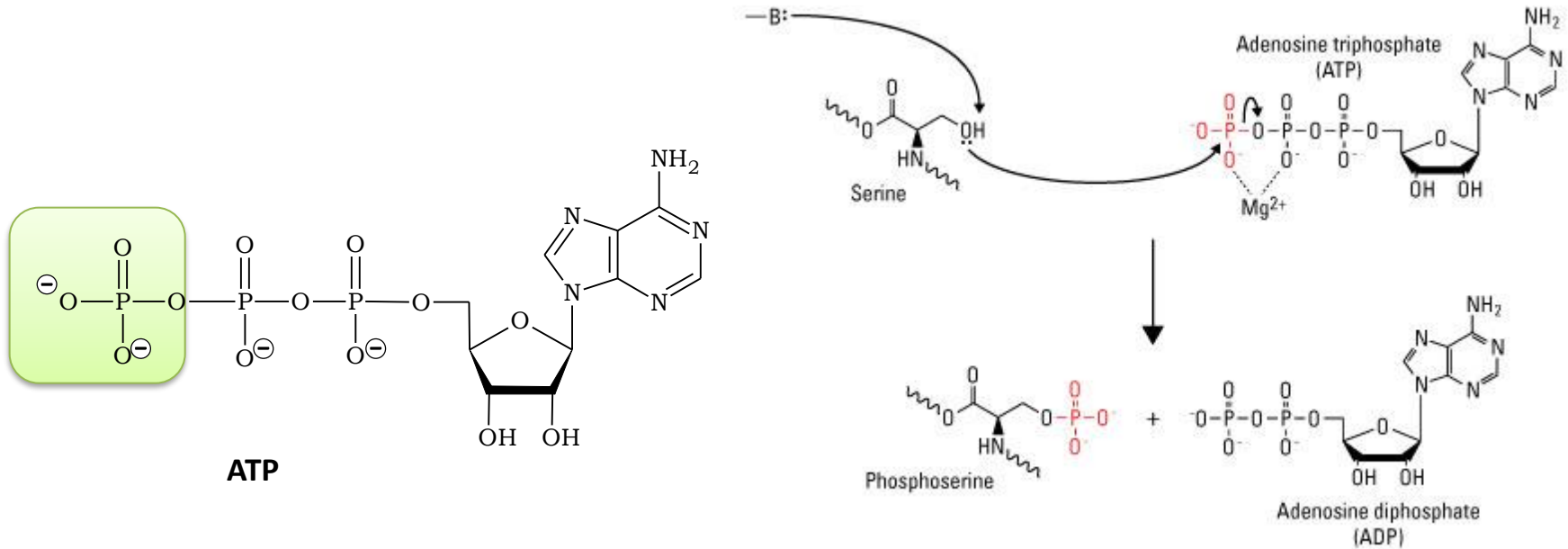


Η προσθήκη φωσφορικής ομάδας σε αμινοξικά υπόλοιπα πρωτεϊνών καταλύεται από εξειδικευμένα ένζυμα και επηρεάζει πληθώρα ιδιοτήτων, όπως:

- τον εντοπισμό των πρωτεϊνών
- την ενζυμική δραστηριότητα
- την αλληλεπίδραση με άλλα μόρια.

Με σειρά διαδοχικών φωσφορυλιώσεων λειτουργούν τα σηματοδοτικά μονοπάτια, που διοχετεύουν προς τον πυρήνα (μεταγωγή/transduction) τα λαμβανόμενα από το περιβάλλον σήματα, ώστε να υπάρξει κατάλληλη κυτταρική ανταπόκριση: τροποποίηση του μεταβολισμού, έκφραση γονιδίων, κυτταρική διαίρεση, απόπτωση κλπ

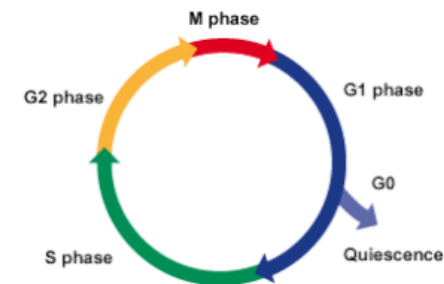
Ανεξαρτήτως της εξειδικευμένης λειτουργίας τους όλες **οι πρωτεϊνικές κινάσες καταλύουν τη μεταφορά της γ-φωσφορικής ομάδας του ATP** στο υδροξύλιο τυροσίνης, σερίνης, ή θρεονίνης (που συμμετέχουν σε δομικές πρωτεΐνες, μεταβολικά ένζυμα ή παράγοντες μεταγραφής).



Σε συνδυασμό με τις φωσφατάσες, που καταλύουν την αντίστροφη αντίδραση υδρόλυσης της φωσφορικής ομάδας δίνοντας τέλος στη διάρκεια του σήματος, **ελέγχουν όλες τις φυσιολογικά σημαντικές ιδιότητες του κυττάρου**: τη διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό, την ικανότητα μετάστασης, την απόπτωση.

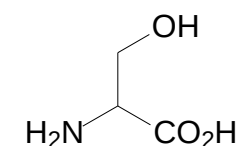
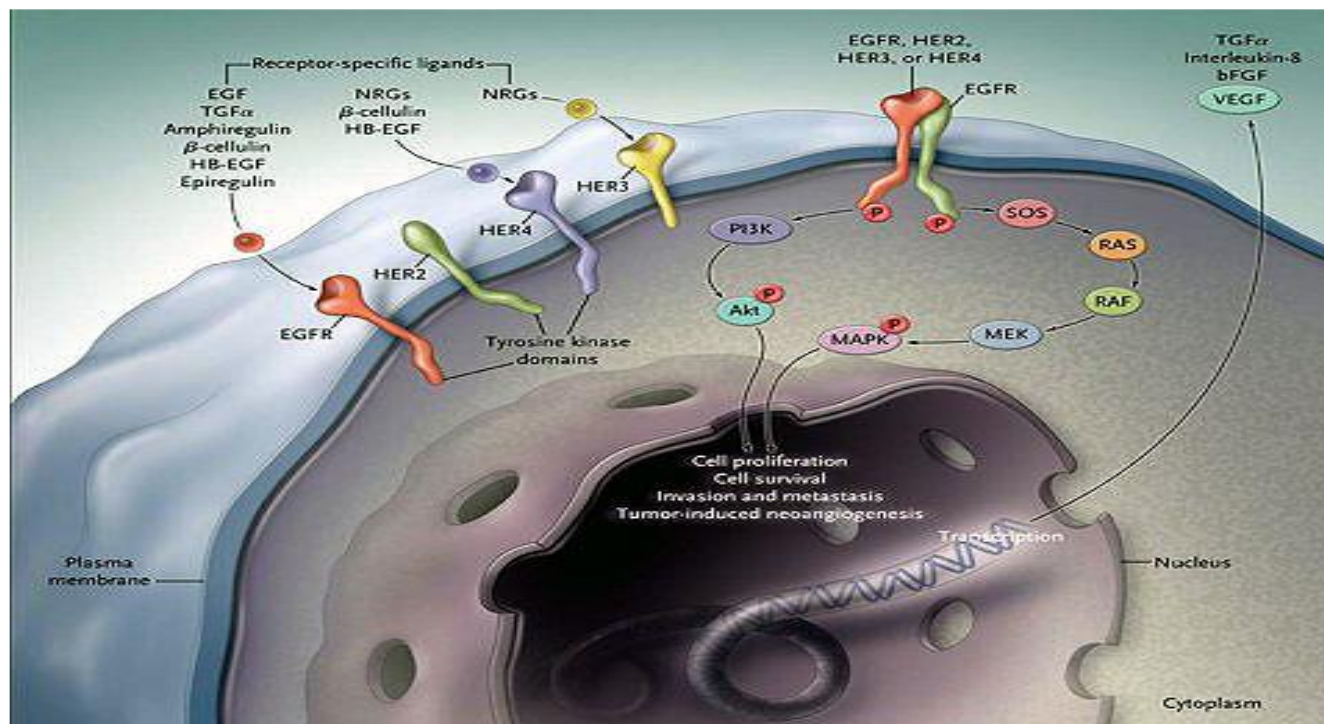
Οι κινάσες χαρακτηρίζονται με βάση το υπόστρωμα που φωσφορυλιώνουν:

- **Πρωτεϊνικές κινάσες** (τυροσίνης, σερίνης/θρεονίνης, διπλής εξειδίκευσης)
- **Λιπιδικές κινάσες** (φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης)
- **Υδατανθρακικές κινάσες**
- **Κινάσες νουκλεοτιδίων, βιταμίνων κλπ**

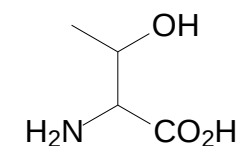


Λειτουργικά οι πρωτεϊνικές κινάσες κατατάσσονται σε:

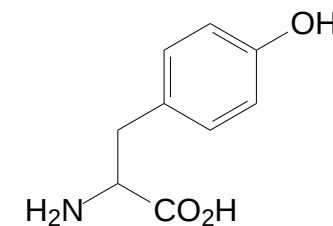
- **κινάσες-υποδοχείς (κινάσες τυροσίνης)**
- **κυτταροπλασματικές κινάσες - κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες**



Ser

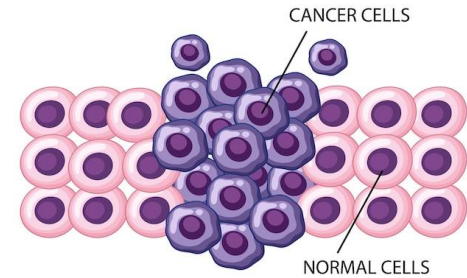


Thr



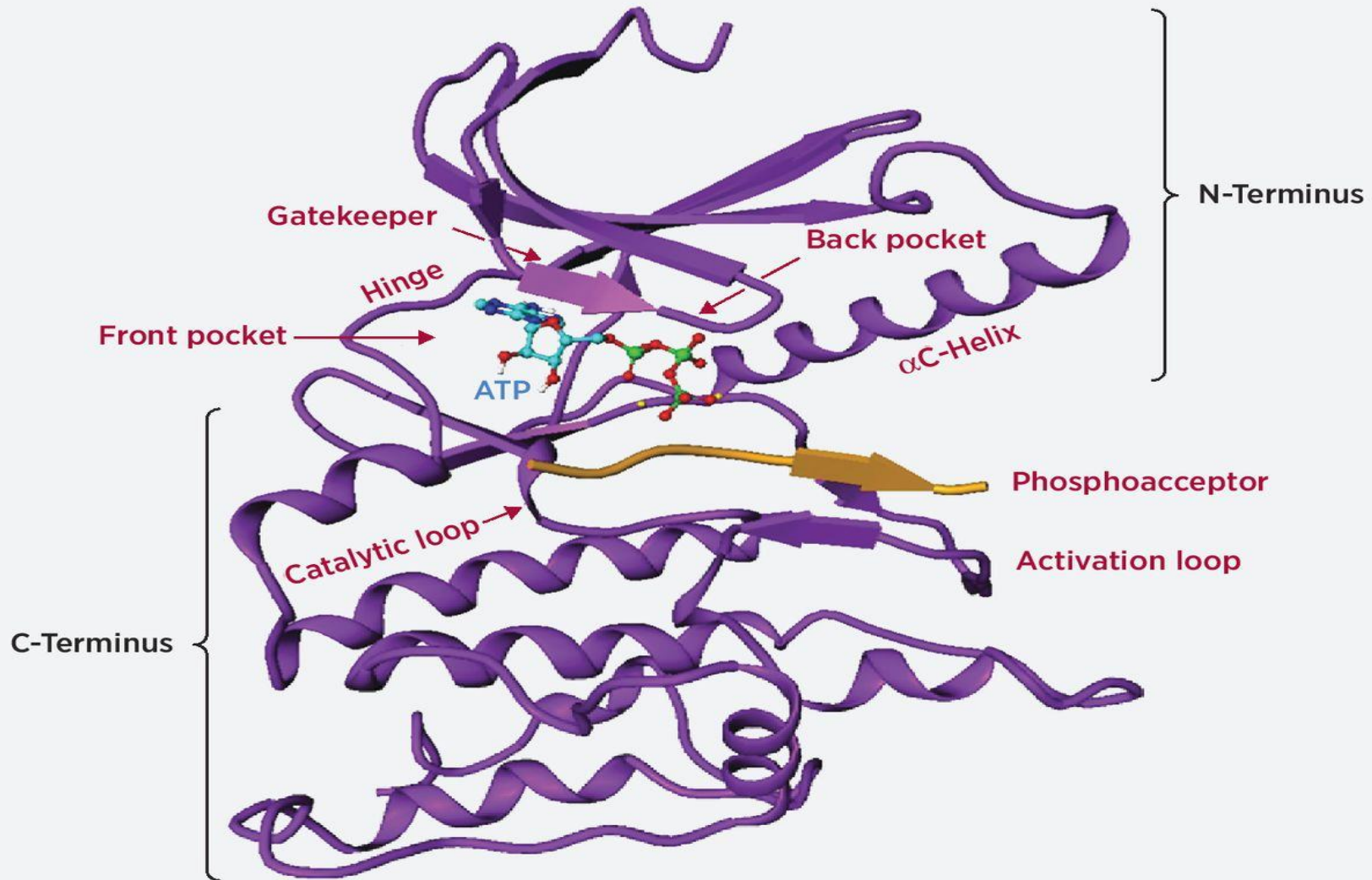
Tyr

Η απώλεια ελέγχου της φυσιολογικής λειτουργίας των πρωτεϊνικών κινασών αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό του καρκινικού κυττάρου. Οι πρωτεϊνικές κινάσες προωθούν την ανάπτυξη καρκίνου με διάφορους τρόπους:

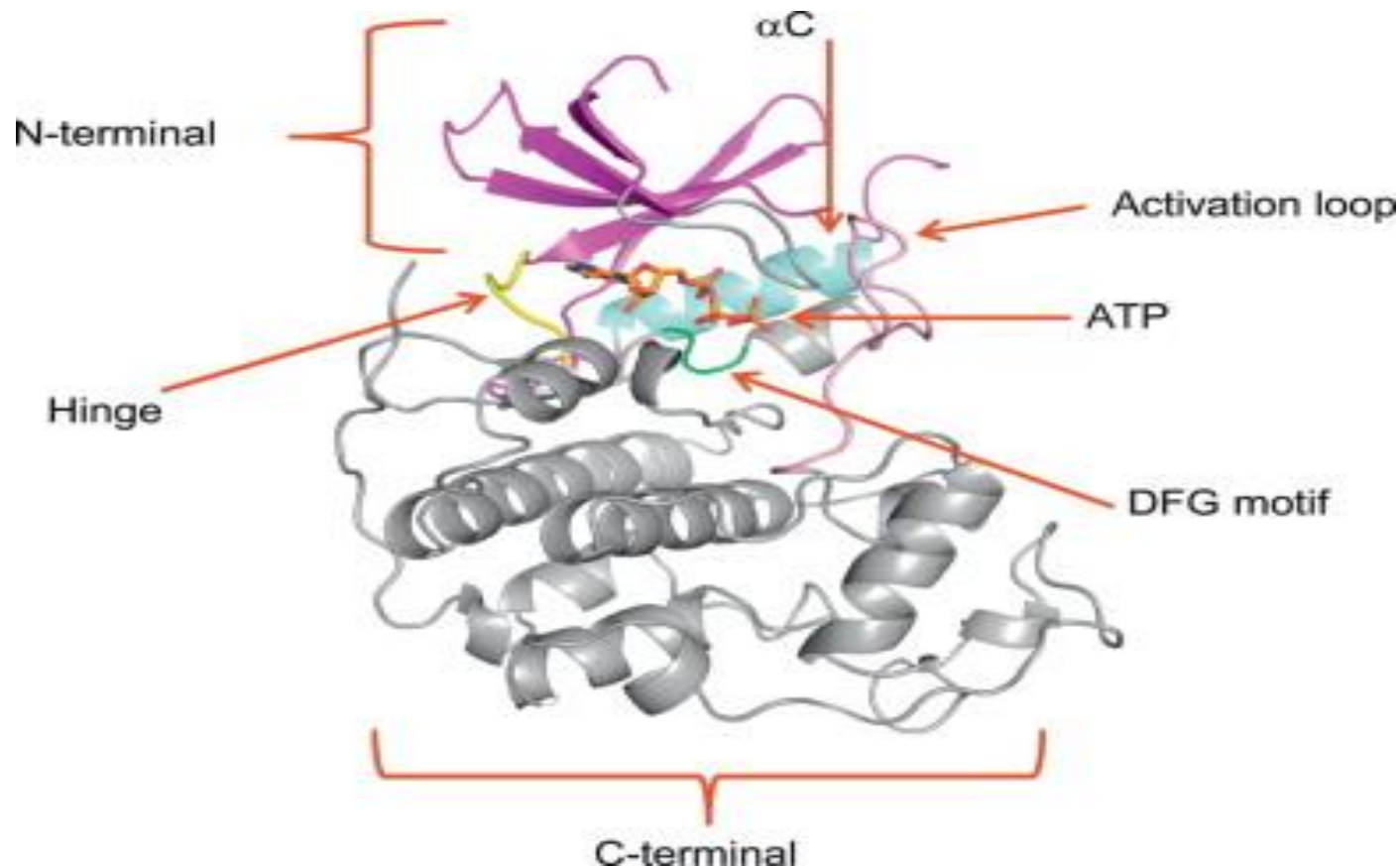


- **Συμπεριφέρεται ως ογκογόνος παράγοντας:** η παρουσία κινάσης που διατηρείται συνεχώς ενεργοποιημένη αρκεί για να μετατρέψει ένα φυσιολογικό κύτταρο σε καρκινικό. Πιθανότατα υποκρύπτεται κάποια μετάλλαξη, ή αλλαγή εντοπισμού του ενζύμου στο κυτταρικό περιβάλλον, με συνέπεια τη διαφυγή της κινάσης από τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς.
- **Λειτουργεί ως αποδέκτης ογκογόνου σήματος (downstream ογκογόνου):** χωρίς να μεταλλαχθεί η κινάση παίζει ενεργό ρόλο στη κυτταρική διαίρεση και τη διαφυγή από την απόπτωση, πιθανώς επειδή δέχεται συνεχώς τα αντίστοιχα σήματα.
- **Εμπλέκεται στη καρκινογένεση ή στην εξέλιξη της ασθένειας:** πχ ο υποδοχέας του αγγειακού αυξητικού παράγοντα (vascular endothelial growth factor receptor - VEGFR) που μέσω της αγγειογένεσης προωθεί τη τροφοδοσία και ανάπτυξη στερεών όγκων.

Μια ματιά στην ανατομία μιας κινάσης: σημαντικά δομικά χαρακτηριστικά



© 2015 American Association for Cancer Research

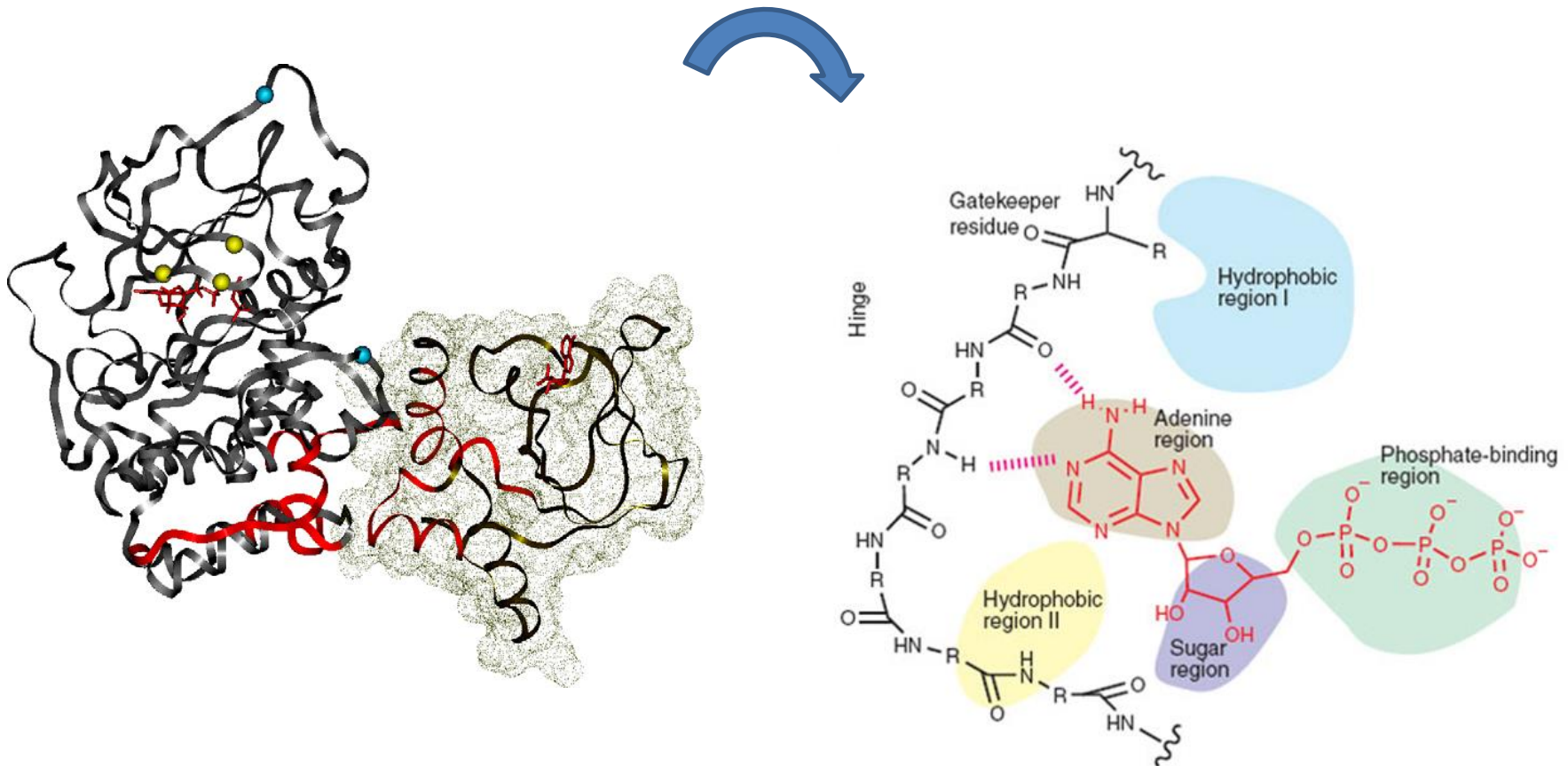


Η φωσφορυλίωση πρωτεΐνης είναι μετα-μεταφραστική τροποποίηση. Η προκύπτουσα δομική αλλαγή δημιουργεί θέση αναγνώρισης για ένα άλλο ένζυμο, ή επηρεάζει τη καταλυτική δράση της κινάσης, που σχετίζεται είτε με τη λειτουργία σηματοδοτικής οδού, είτε με την έναρξη ενός καταρράκτη σημάτων.

Η καταλυτική λειτουργία και το ενεργό κέντρο των κινασών διατηρούνται ισχυρά, όπως και η περιοχή δέσμευσης του κοινού τους συμπαραγόντα, ATP.

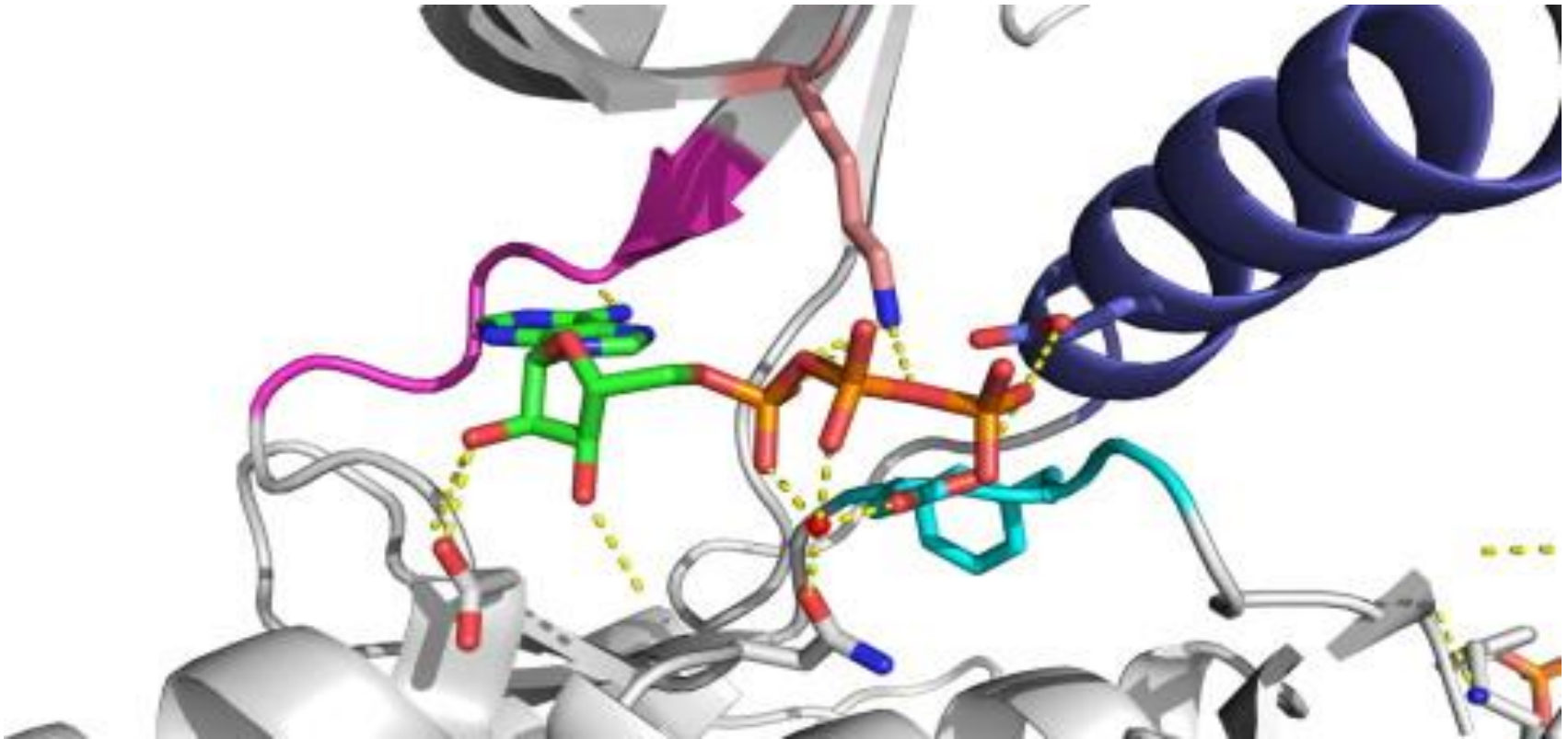
Στην αντίδραση μεταφοράς της φωσφορικής ομάδας συμμετέχουν τρεις περιοχές του ενεργού κέντρου της πρωτεϊνικής κινάσης:

- η θέση πρόσδεσης του ATP
- η περιοχή που καταλύει τη μεταφορά της φωσφορικής ομάδας από το ATP προς το υπόστρωμα και
- η περιοχή πρόσδεσης του πρωτεϊνικού υποστρώματος



Η θέση πρόσδεσης του ATP είναι σημαντική για τον σχεδιασμό αναστολέων

Δεσμοί υδρογόνου αναπτύσσονται μεταξύ του ετεροκυκλικού συστήματος του ATP και της ευκίνητης περιοχής της κινάσης, που εκτείνεται μεταξύ δύο διαμορφωμένων περιοχών (αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο). Οι αρχικές ανησυχίες, σχετικά με **τη δυσκολία εύρεσης εκλεκτικών αναστολέων** κατά τη στόχευση της θέσης δέσμευσης του ATP δεν επαληθεύτηκαν. Οι αναστολείς αναπτύσσουν δεσμούς εντός και εκτός της κοιλότητας πρόσδεσης του ATP και ανταγωνίζονται επιτυχώς το ενδοκυτταρικό ATP.

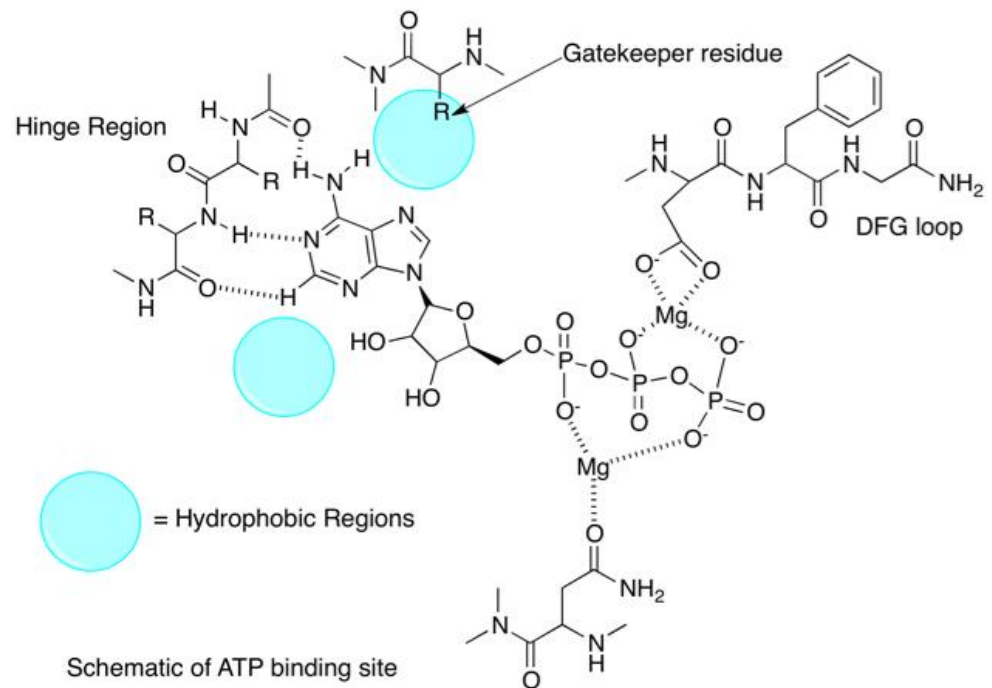
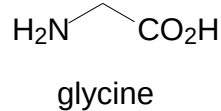
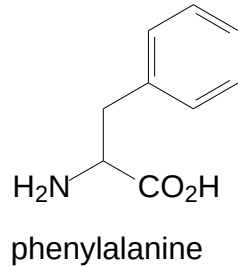
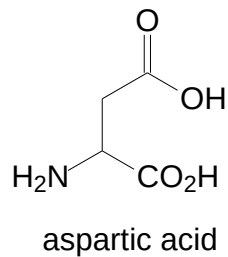


Αντισταθμιστικά Mg^{2+} (με κόκκινο) Ευκίνητη περιοχή (Hinge - μωβ), Δεσμός άλατος με λυσίνη (ροζ) DFG μοτίβο (γαλάζιο), α -C έλικας (σκούρο μπλε), δ H (με κίτρινο)

Θέση πρόσδεσης του ATP

Ο μικρός αμινοτελικός λοβός αποτελείται από 5 β-πτυχωτές επιφάνειες και μια α-έλικα (αC-έλικα). Όταν η κινάση λαμβάνει την ενεργή διαμόρφωση **ένα ισχυρά διατηρημένο Glu της αC-έλικας σχηματίζει γέφυρα άλατος με Lys της β3**. Μεταξύ β1 και β2 εντοπίζεται μια **ευκίνητη περιοχή πλούσια σε γλυκίνη**, που διευθετεί κατάλληλα τις φωσφορικές ομάδες του νουκλεοτίδιου. Ακολουθείται από **Val που σχηματίζει υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με την αδενίνη του ATP**.

Ο μεγάλος καρβοξυτελικός λοβός αποτελείται κυρίως από α-έλικες. Η καταλυτική περιοχή είναι το μόνο σταθερό τμήμα του. Περιέχει ένα **ασπαρτικό υπόλοιπο (D) που λειτουργεί σαν βάση**, για τον ιονισμό του $-OH$ που θα φωσφορυλιωθεί, διευκολύνοντας την προσβολή της $\gamma-PO_4$ του ATP (βλ. διαφάνεια 3). Ένα **δεύτερο ασπαρτικό υπόλοιπο (D) είναι το πρώτο αμινοξύ του ευκίνητου βρόγχου ενεργοποίησης (activation loop, A-loop)**, που είναι σημαντικός για τη πρόσδεση του υποστρώματος και αρχίζει με μια συντηρημένη **τριάδα αμινοξέων Asp-Phe-Gly (DFG μοτίβο)**. Το ασπαρτικό υπόλοιπο της τριάδας συμπλοκοποιεί τα αντισταθμιστικά ιόντα Mg^{2+} των φωσφορικών ομάδων και παίζει ενεργό ρόλο στην μεταφορά της $\gamma-PO_4$, ενώ η **Phe** τοποθετείται κάτω από την **αC-έλικα**, σταθεροποιώντας την σε κατάλληλη θέση, ως προς τον βρόγχο ενεργοποίησης.

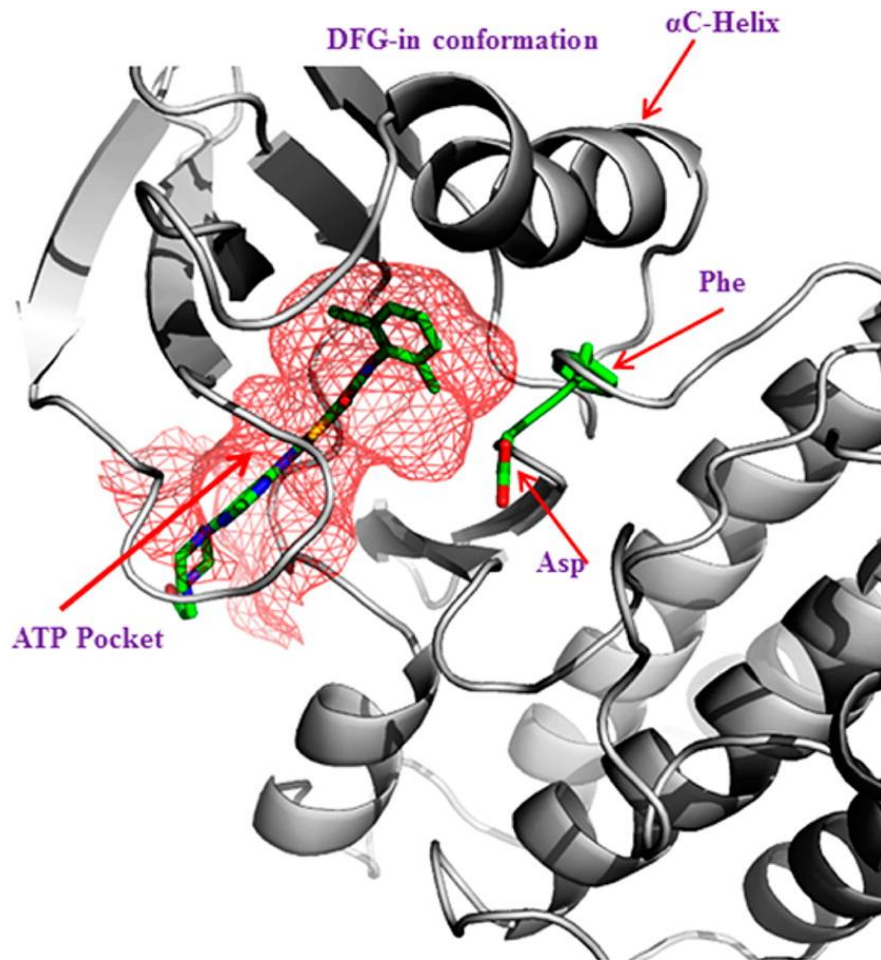


Για την κατάλυση είναι σημαντικές οι θέσεις:

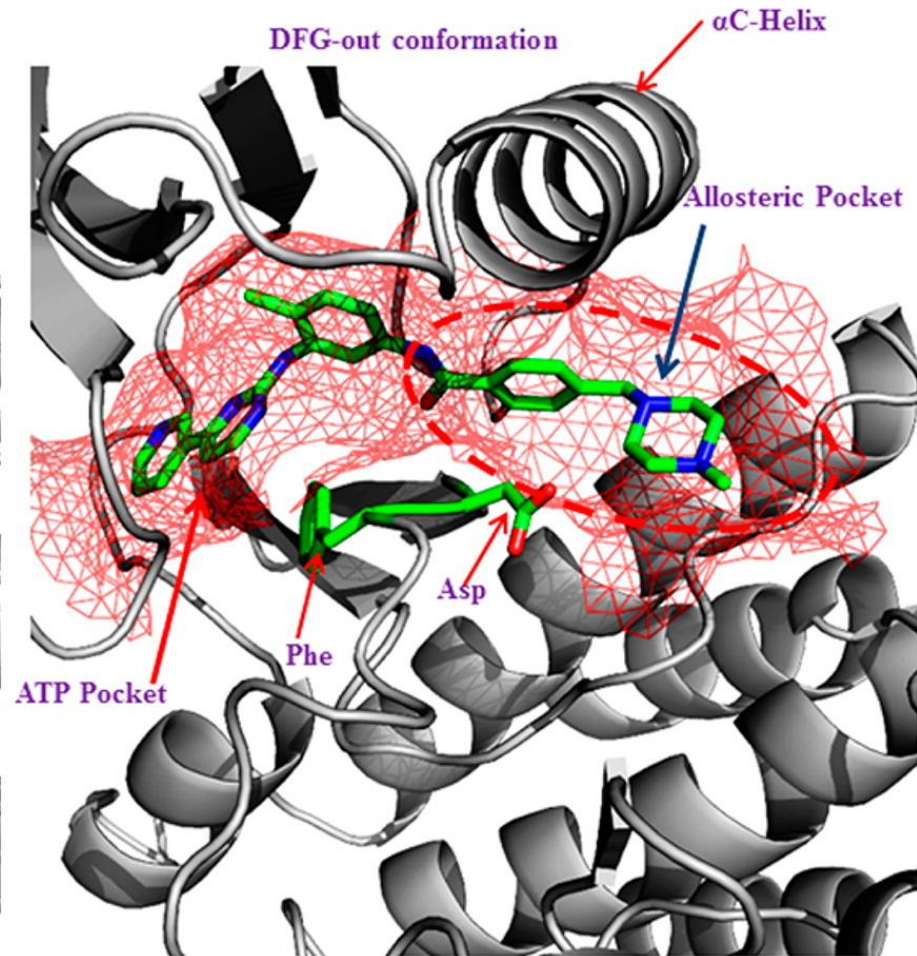
- της **αC-έλικας** (αC-in = ενεργό ένζυμο, αC-out = ανενεργό)
- του **DFG-Asp μοτίβου** (DFG-Asp in = ενεργό ένζυμο, DFG-Asp out = ανενεργό)
- του **βρόγχου ενεργοποίησης** (AS open, = ενεργό ένζυμο, AS closed = ανενεργό).

Το DFG μοτίβο περιστρέφεται εντός ή εκτός του ενεργού κέντρου, με ακραίες διαμορφώσεις την ενεργή (DFG-in) και την ανενεργή (DFG-out) διαμόρφωση.

Στην **DFG-in διαμόρφωση προσδέεται το ATP και το υπόστρωμα** και «μεταφέρεται» η φωσφορική ομάδα. Στην **DFG-out διαμόρφωση** ο βρόγχος ενεργοποίησης βρίσκεται σε κλειστή διαμόρφωση: το Asp(D) δεν συμπλοκοποιεί τα ιόντα Mg^{2+} ενώ η Phe (F), αντί να σταθεροποιεί την αC-in διαμόρφωση, μετατοπίζεται προς το υδατικό περιβάλλον, αποκαλύπτοντας μια φαρδιά, λιπόφιλη κοιλότητα.

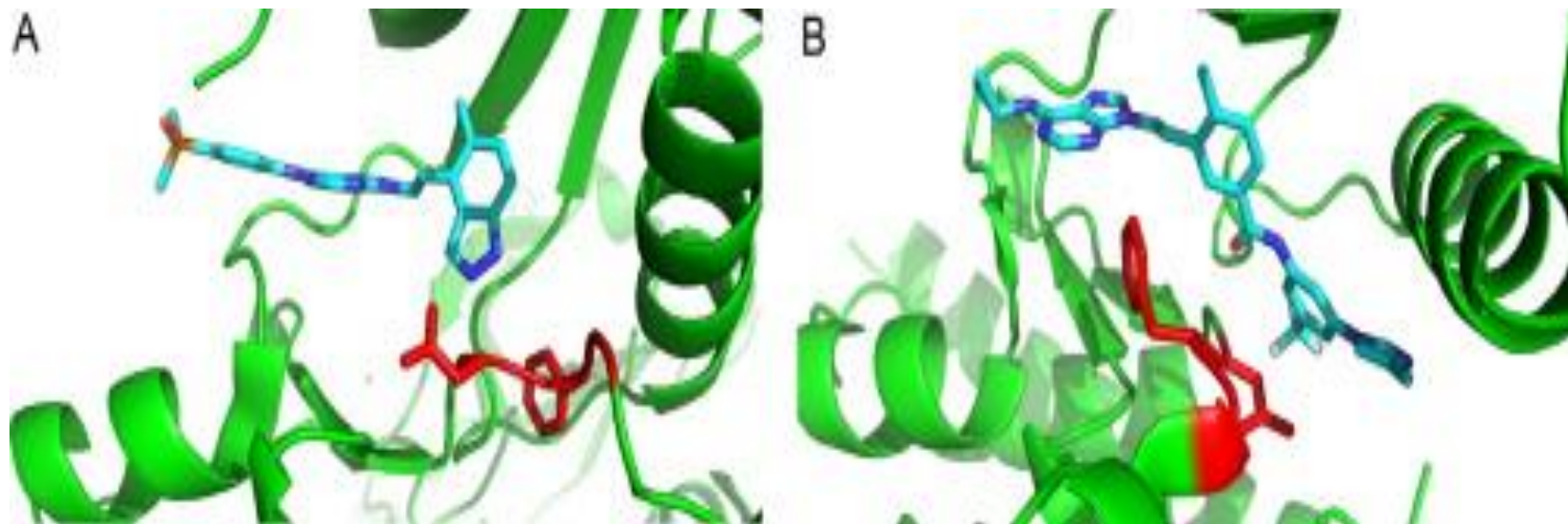


Ενεργή διαμόρφωση ABL κινάσης με αναστολέα



Ανενεργή διαμόρφωση ABL κινάσης με αναστολέα

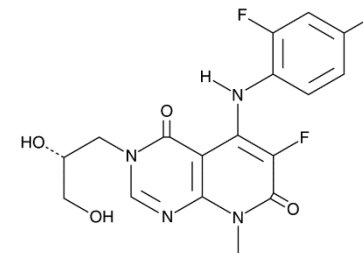
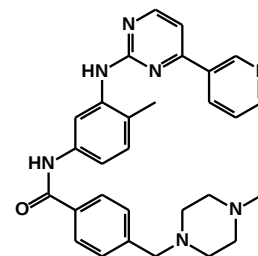
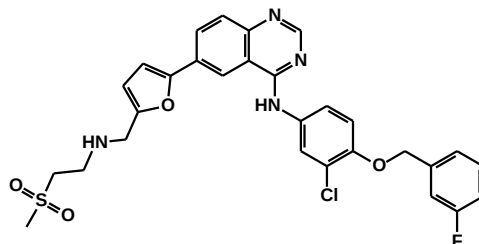
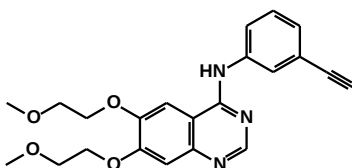
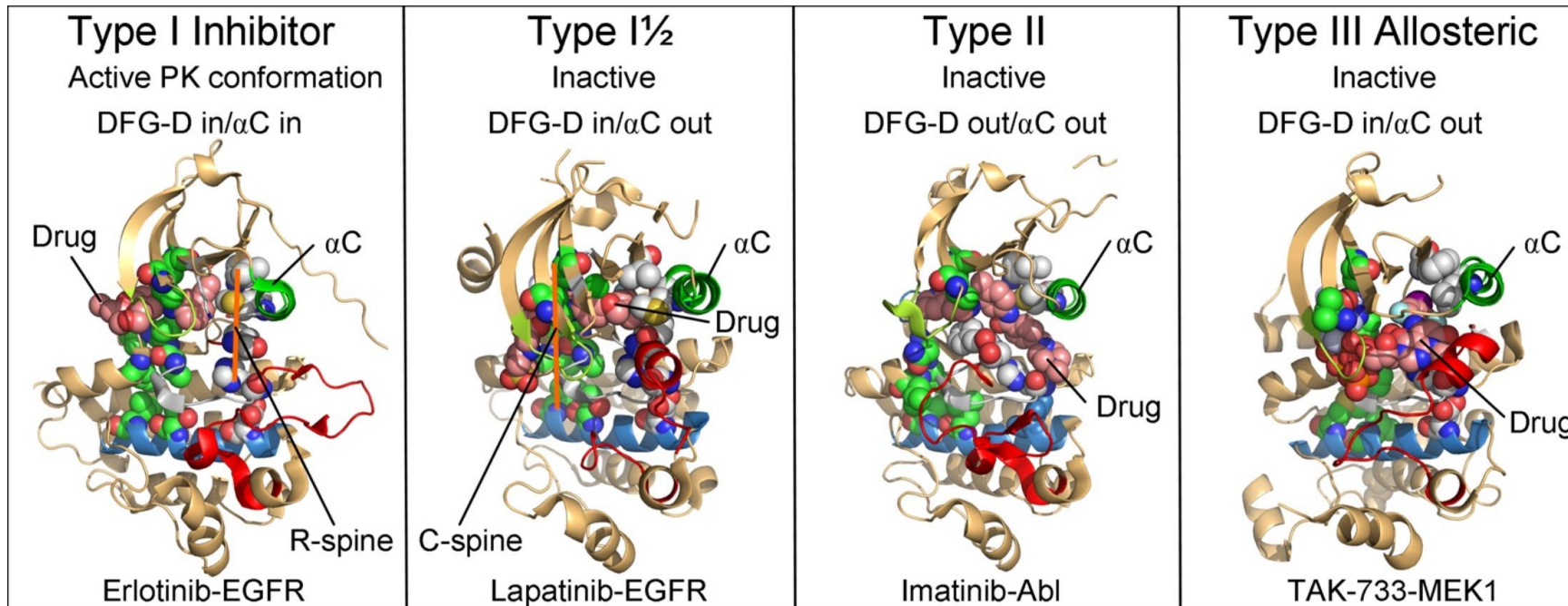
Η αναστολή του ενζύμου μπορεί να γίνει από παράγωγο που ανταγωνίζεται το ATP και καταλαμβάνει τη θέση του στην ενεργή διαμόρφωση του ενζύμου (**αναστολέας τύπου I**), ή από παράγωγο που σταθεροποιεί την ανενεργή του διαμόρφωση (**αναστολέας τύπου II**).



(A) Διαμόρφωση του βρόγχου ενεργοποίησης και του μοτίβου **DFG (DFG-in, με κόκκινο)** της κινάσης c-ABL (με πράσινο) κατά τη πρόσδεση αναστολέα τύπου I. Διακρίνεται καθαρά η τοποθέτηση του ασπαρτικού υπόλοιπου της τριάδας, που κατευθύνεται προς τη περιοχή δέσμευσης του ATP.

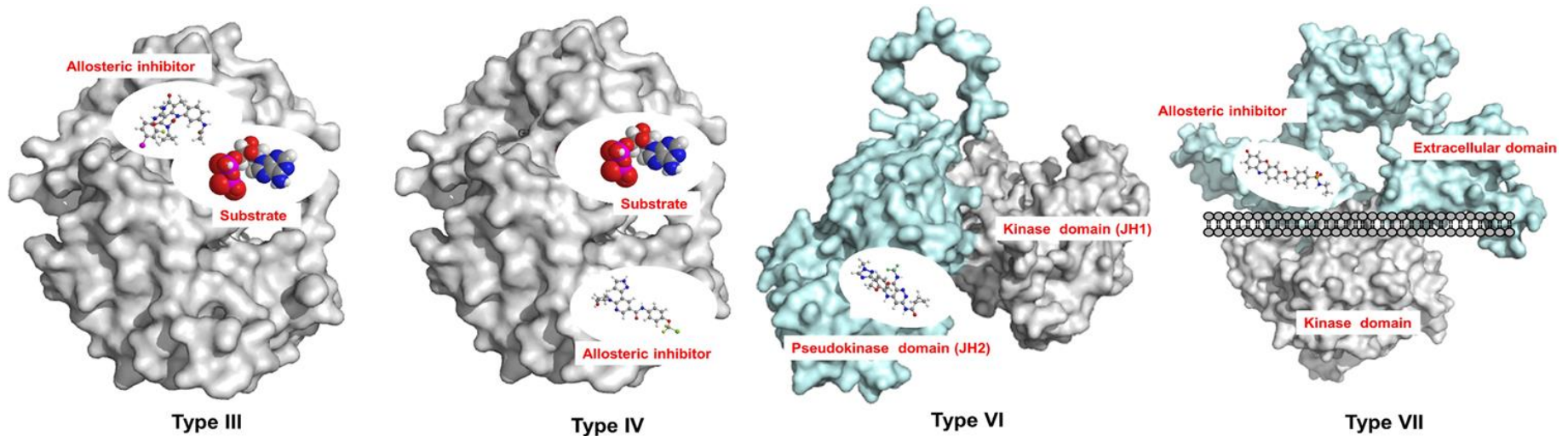
(B) Για τη πρόσδεση αναστολέα τύπου II, η ίδια κινάση λαμβάνει την διαμόρφωση DFG-out. Η φαινυλαλανίνη γυρίζει προς τη περιοχή δέσμευσης του ATP, αποκαλύπτοντας τη δευτερεύουσα υδρόφοβη κοιλότητα που είναι προσβάσιμη για τον αναστολέα.

Κατηγορίες αναστολέων κινασών



Η σχετική εκλεκτικότητα των αναστολέων είναι εφικτή λόγω της ύπαρξης 5 τουλάχιστον διαφορετικών λιπόφιλων κοιλοτήτων που περιστοιχίζουν τη θέση πρόσδεσης του ATP. Οι αναστολείς τύπου I1/2 και II που αναγνωρίζουν την ανενεργή κινάση (α C-out) θεωρούνται εκλεκτικότεροι από τους αναστολείς τύπου I. Οι **αλλοστερικοί αναστολείς** είναι σαφώς **εκλεκτικότεροι** με μειωμένη πιθανότητα για off target toxicity.

Τύποι αλλοστερικών αναστολέων κινασών



Οι αλλοστερικοί αναστολείς τύπου III και IV συνδέονται στη καταλυτική περιοχή του ενζύμου, σε θέση σαφώς διαφορετική από τη θέση πρόσδεσης του ATP.

Οι τύπου III δεσμεύονται πλησίον της θέσης πρόσδεσης του ATP, ενώ οι τύπου IV σε πιο απομακρυσμένη θέση, επηρεάζοντας όμως τη λειτουργικότητα του ενζύμου, είτε την ενεργοποίηση του από την προηγούμενη (upstream) κινάση, είτε τη φωσφορυλίωση μιας επόμενης (downstream) κινάσης.

Οι αλλοστερικοί αναστολείς τύπου VI και VII συνδέονται εκτός καταλυτικής περιοχής.

Οι τύπου VI αναστέλλουν τη δράση ψευδοκινάσης, ενώ οι τύπου VII αναστέλλουν την εξωκυτταρική πρόσδεση σε κινάσες - υποδοχείς.

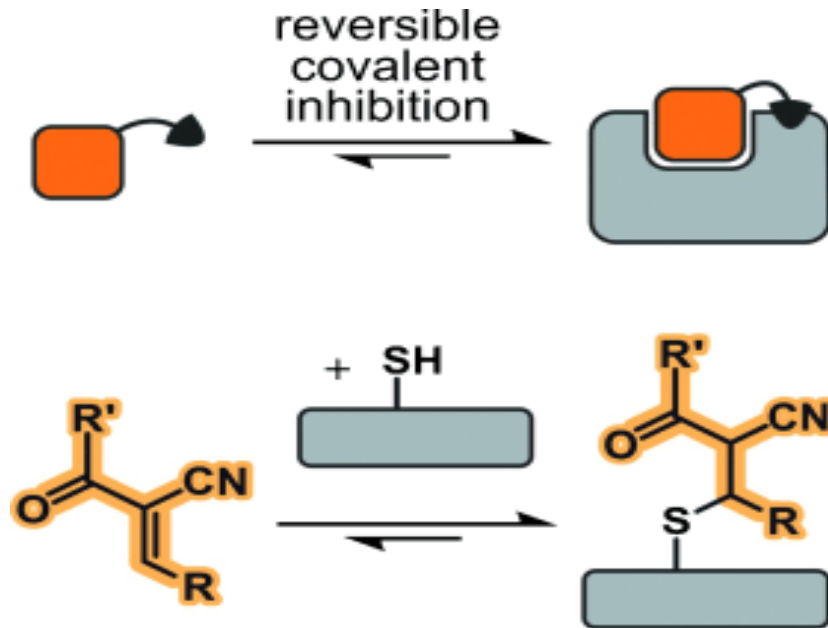
Στόχευση της περιοχής ψευδοκινάσης – αναστολείς τύπου VI

Η ανάγνωση του ανθρώπινου κινώματος αποκάλυψε ότι το 10% των κινασών φέρουν μεταλλάξεις στα σημαντικά για τη κατάλυση αμινοξικά μοτίβα, με αποτέλεσμα να έχουν χάσει (βάσει των *in silico* μοντέλων) την καταλυτική τους ιδιότητα, γι' αυτό και ονομάσθηκαν ψευδοκινάσες - 'pseudokinases'.

Θεωρούνται τροποποιητές της μεταγωγής σήματος με πληθώρα μηχανισμών.

Μεταλλάξεις ορισμένων ψευδοκινασών, ή της έκφρασης τους έχουν συνδεθεί με την εμφάνιση **αυτοάνοσων νοσημάτων** και διαφόρων μορφών **καρκίνου**, καθιστώντας ενδιαφέρουσα τη μελέτη τους ως πιθανών στόχων φαρμακευτικής θεραπείας.

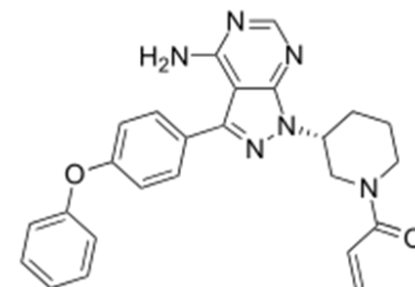
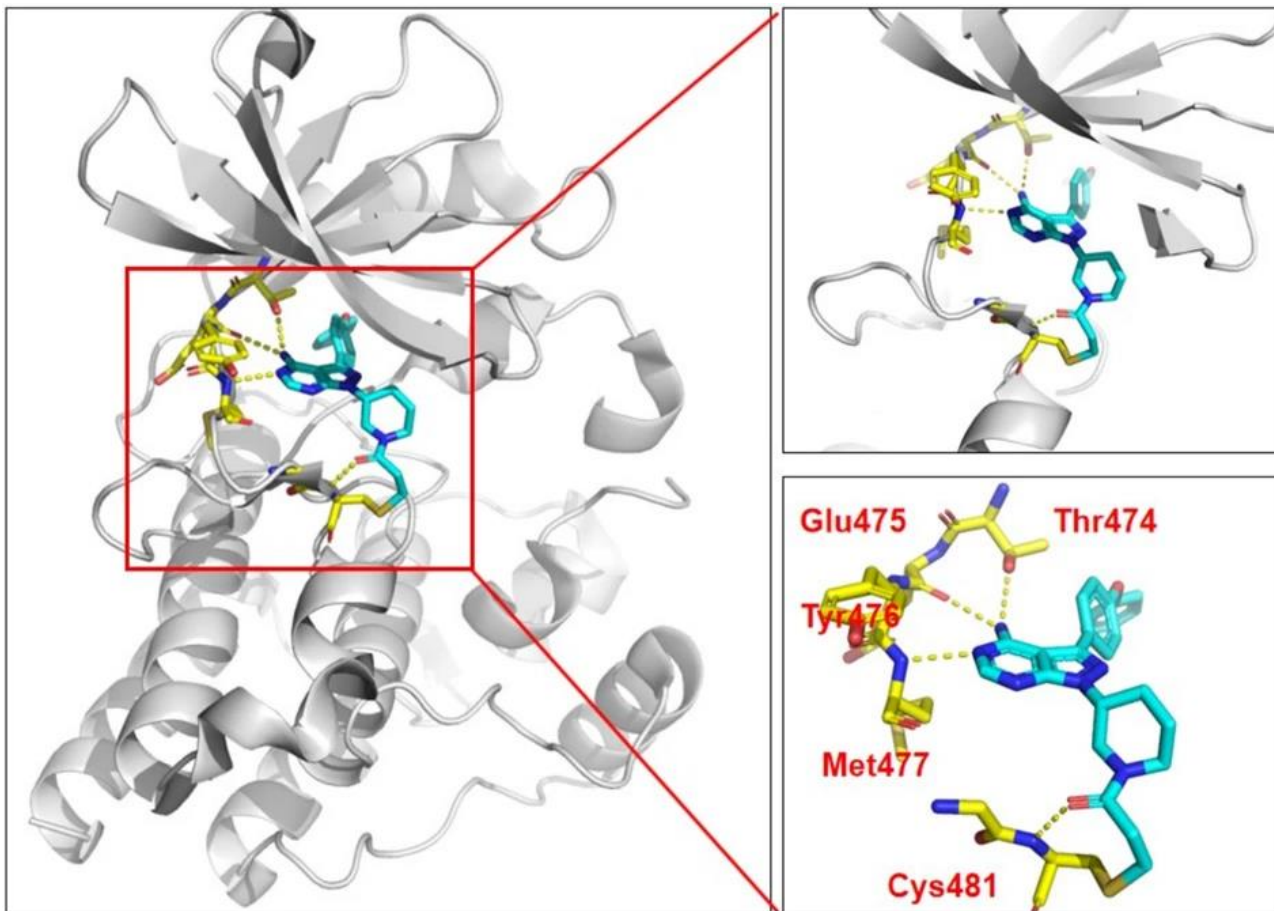
Μη αντιστρεπτοί αναστολείς (τύπου V)



Αντιδρούν συνήθως με θειολομάδες των ενζύμων (υπόλοιπο κυστεΐνης)

Η προσθήκη σε κατάλληλες θέσεις ηλεκτρονιόφιλων ομάδων μπορεί να μετατρέψει τους αντιστρεπτούς αναστολείς σε μη αντιστρεπτούς.

Το 50% των κινασών στα ευκαρυωτικά κύτταρα διαθέτουν τουλάχιστον ένα υπόλοιπο κυστεΐνης, πλησίον της θέσης πρόσδεσης του ATP.

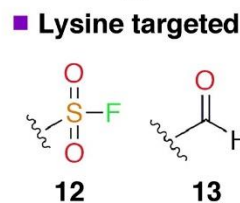
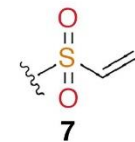
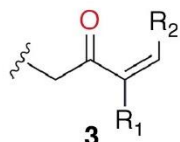
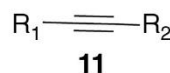
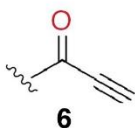
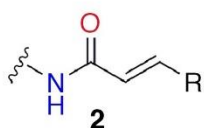
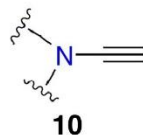
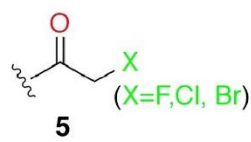
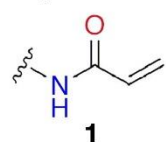


Ibrutinib

Παράδειγμα μη αντιστρεπτού αναστολέα: η δέσμευση του **ibrutinib** στην κινάση BTK. Το πυριμιδινικό N και η $-NH_2$ της πυραζολοπυριμιδίνης σχηματίζουν 3 δ.Η (με **Glu475**, **Tyr476** και **Thr474**). Το καρβονύλιο σχηματίζει δ.Η με την **Cys481** η οποία στη συνέχεια θα κάνει πυρηνόφιλη προσβολή τύπου Michael.

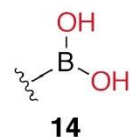
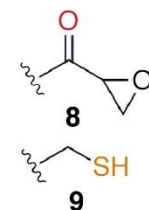
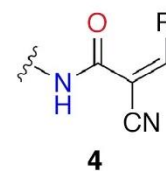
(a)

■ Cysteine targeted

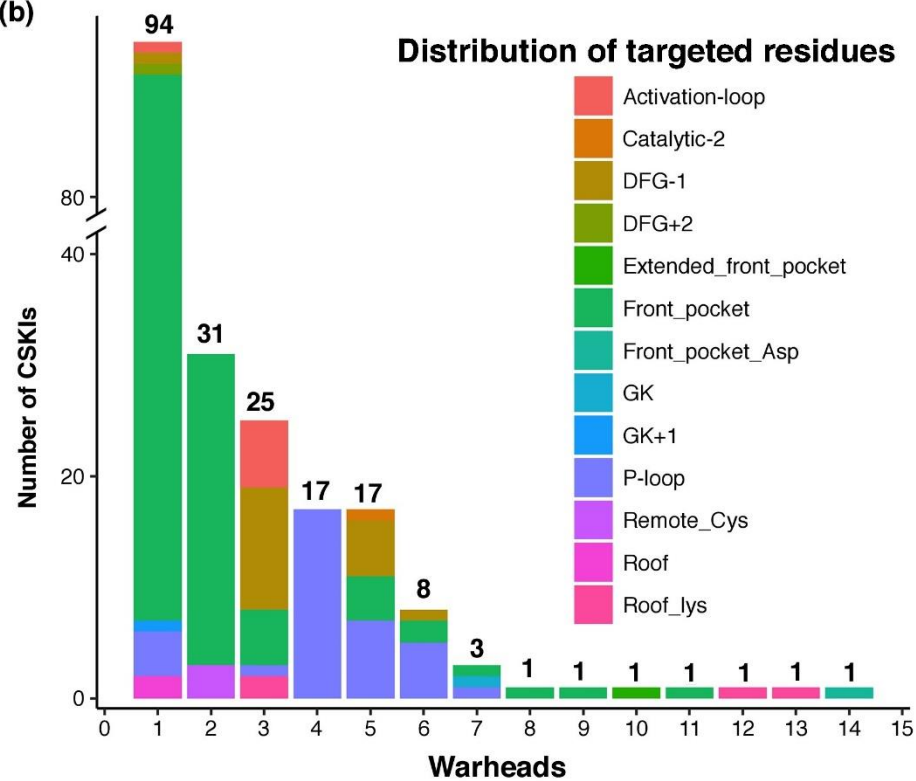


■ Lysine targeted

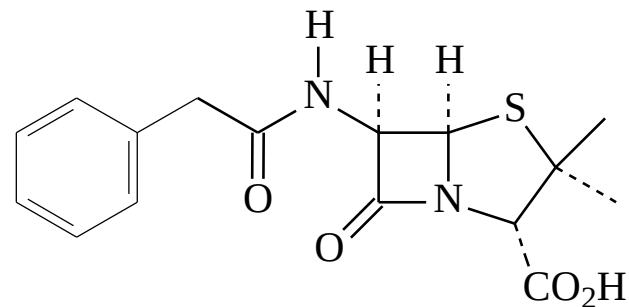
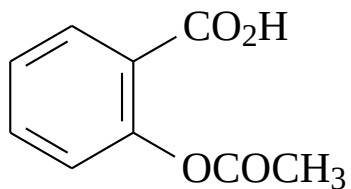
■ Aspartic acid targeted



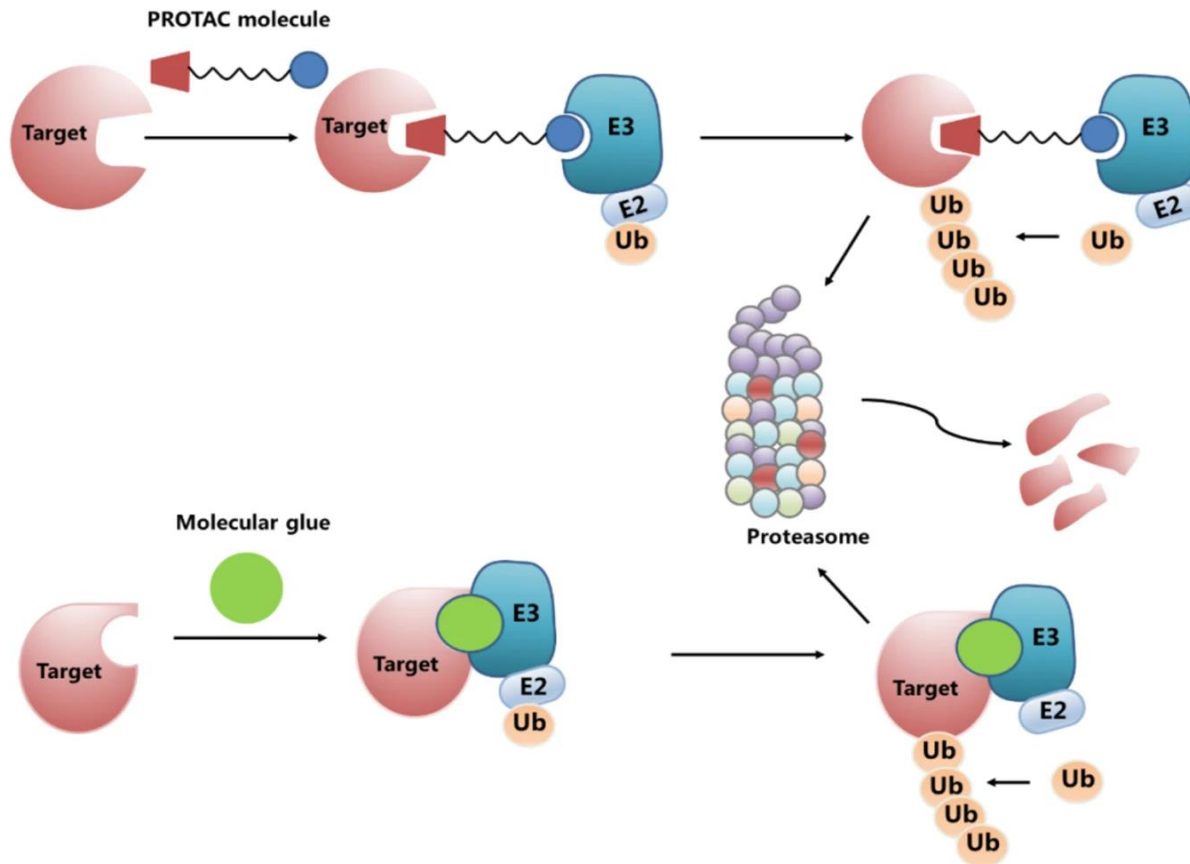
(b)



Σημαντικά φάρμακα που δρουν ως μη αντιστρεπτοί αναστολείς ενζύμων.



Παραδείγματα μη αντιστρεπτών αναστολέων στην αντικαρκινική θεραπεία:
5-FU, gemcitabine.

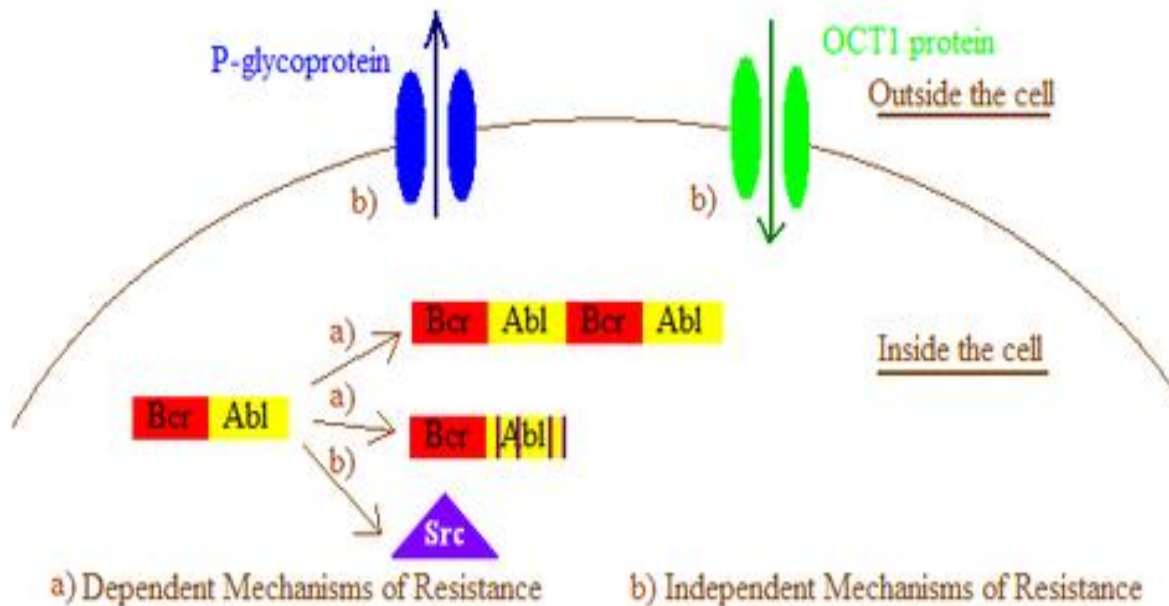


ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΝΕΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ - proteolysis targeting chimeras (PROTAC)- molecular glue

Η πρωτεΐνη-στόχος (κινάση) δεσμεύεται με χιμαιρικό μόριο, που φέρει linker κατάλληλου μεγέθους και στο άλλο του άκρο την E3 ubiquitin λιγάση.

Με ανάλογο τρόπο το **molecular glue** είναι μικρό μόριο που επάγει την αλληλεπίδραση της κινάσης με τη λιγάση, ώστε να στοχευθεί για αποικοδόμηση.

Επαγόμενη ανάπτυξη αντοχής προς τους αναστολείς κινασών

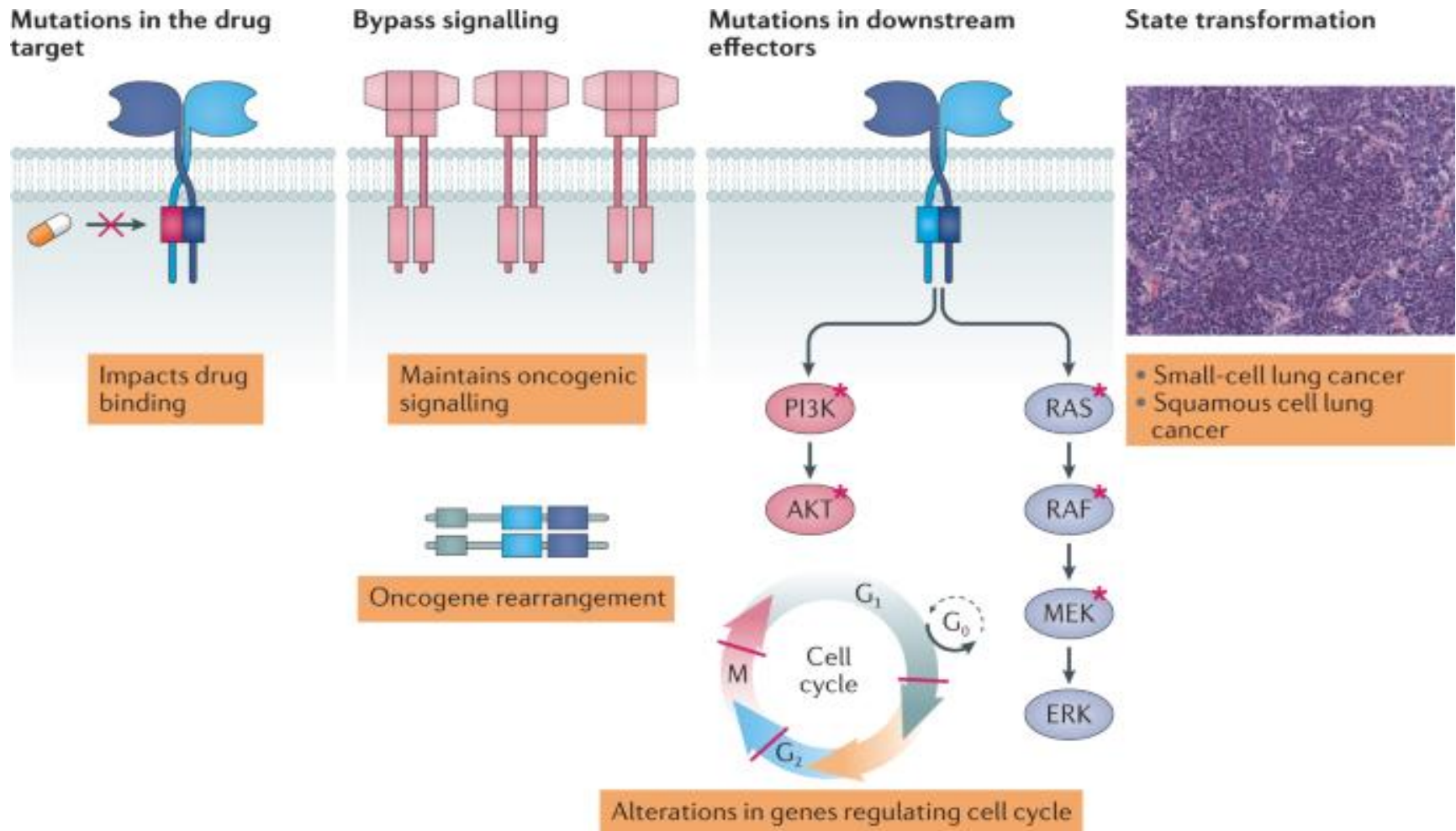


Η αντοχή μπορεί να οφείλεται και σε ποικιλία μηχανισμών, όπως:

1) υπερέκφραση του στόχου

2) μείωση της προσβασιμότητας του στόχου με μείωση της εισόδου ή αύξηση της εξόδου του φαρμάκου από το κύτταρο λόγω αλλαγής της δομής ή υπερέκφρασης αντλιών (πχ μείωση της έκφρασης του σημαντικού για τη διείσδυση μορίων στο κύτταρο μεταφορέα-1 οργανικών κατιόντων OCT1, ή υπερέκφραση της αντλίας εξόδου P-γλυκοπρωτεΐνης)

Επαγόμενη ανάπτυξη αντοχής προς τους αναστολείς κινασών

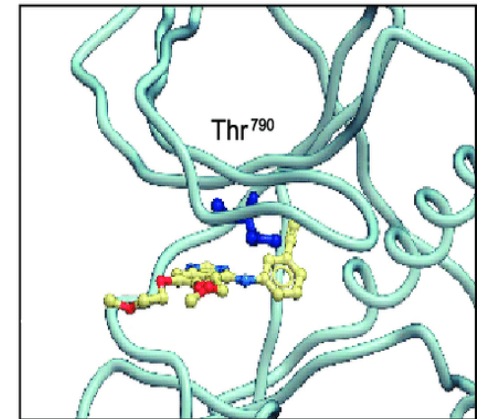
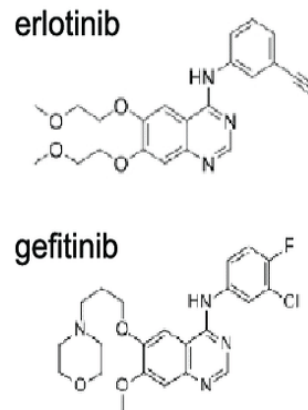
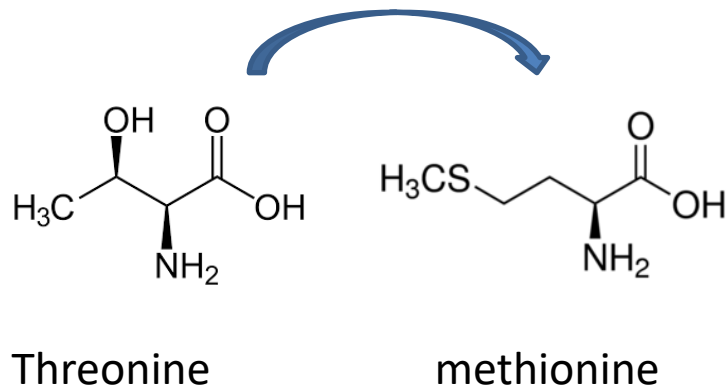


3) Η ενίσχυση εναλλακτικών μονοπατιών ή των επόμενων βημάτων της σηματοδότησης μέσω της επαγωγής μεταλλάξεων, μπορεί να οδηγήσει στην επαναφορά της λειτουργίας της οδού, παρά την αποτελεσματική διακοπή ενός βήματος.

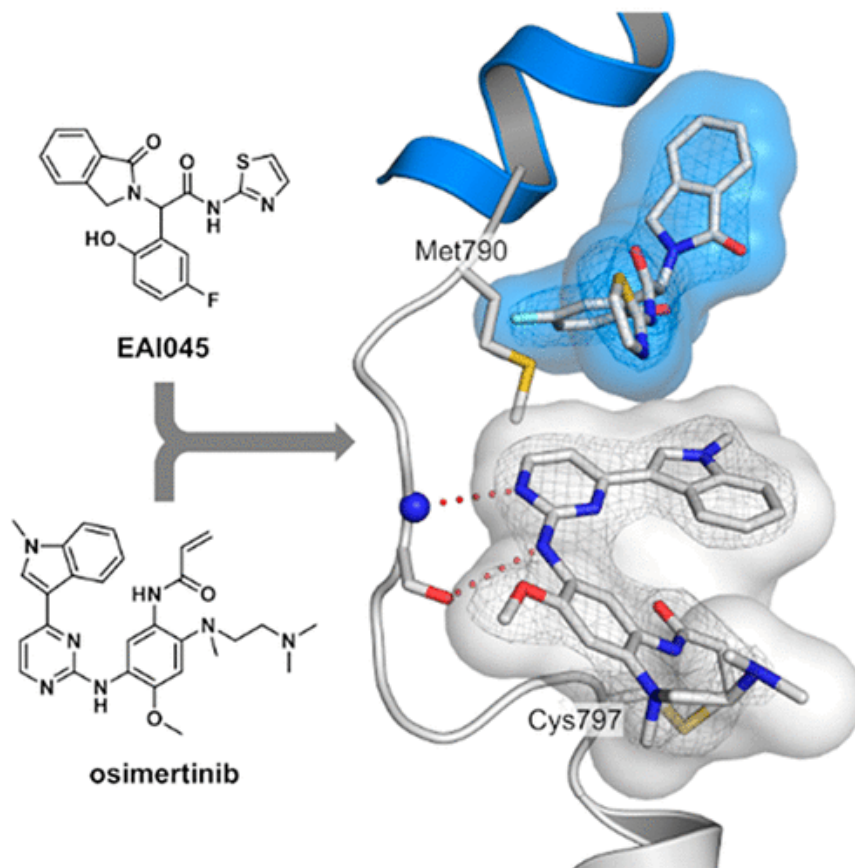
Επαγόμενη ανάπτυξη αντοχής προς τους αναστολείς κινασών

4) Η μείωση της συνάφειας της κινάσης με τον αναστολέα. Επιτυγχάνεται με πολλούς τρόπους:

- Στερεοχημική παρεμπόδιση για τη πρόσβαση στο ενεργό κέντρο
- Απώλεια σημείων σύνδεσης, δηλ του σχηματισμού δεσμών μεταξύ αναστολέα και ενζύμου
- Αύξηση της συνάφειας του ATP για τη πρόσδεση στο ενεργό κέντρο, ώστε να καταστεί δυσκολότερος (ως και ανέφικτος) ο επιτυχής ανταγωνισμός του ATP
- Απώλεια της ομάδας του ενεργού κέντρου, που σχηματίζει ομοιοπολικό δεσμό με τον αναστολέα (για τους μη αντιστρεπτούς αναστολείς)



Η πιο συνηθισμένη μετάλλαξη για ανάπτυξη αντοχής αφορά την αντικατάσταση του αμινοξέος-θυρωρού, που ελέγχει τη πρόσβαση στην υδρόφοβη κοιλότητα πρόσδεσης του ATP. Τα αμινοξέα-θυρωροί είναι λιπόφιλα, συνήθως χωρίς ιονιζόμενες ομάδες και προσδιορίζονται κυρίως από τον όγκο τους.



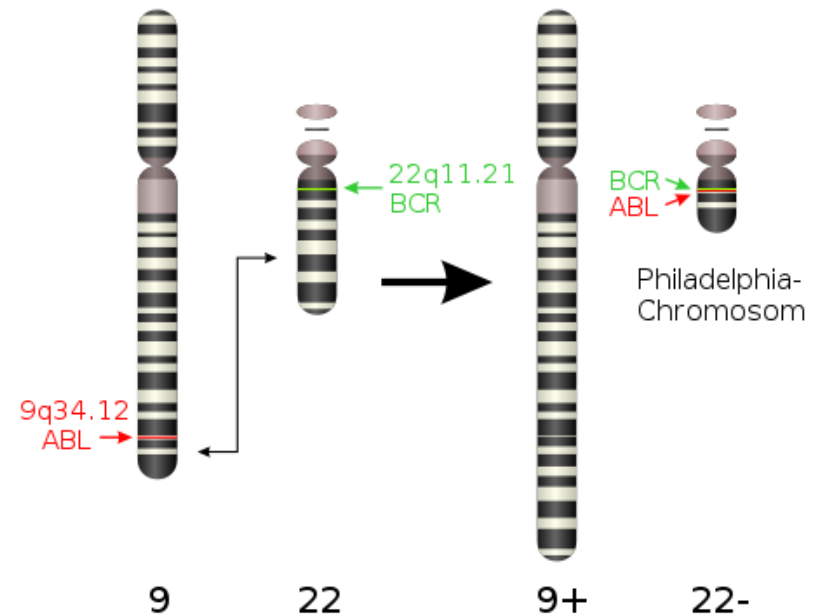
Για να αντιμετωπιστεί η αντοχή, αναπτύσσονται **αναστολείς επόμενης γενιάς**, οι οποίοι μπορεί να:

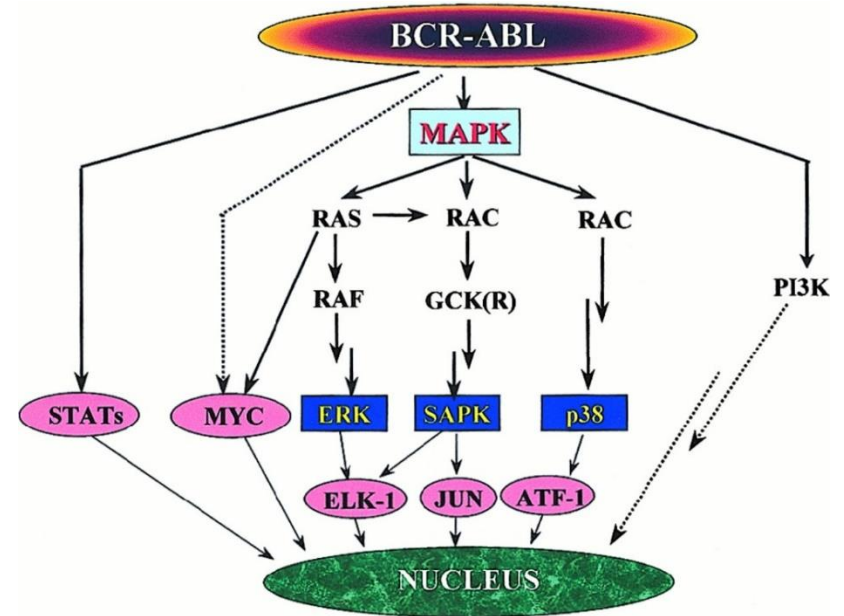
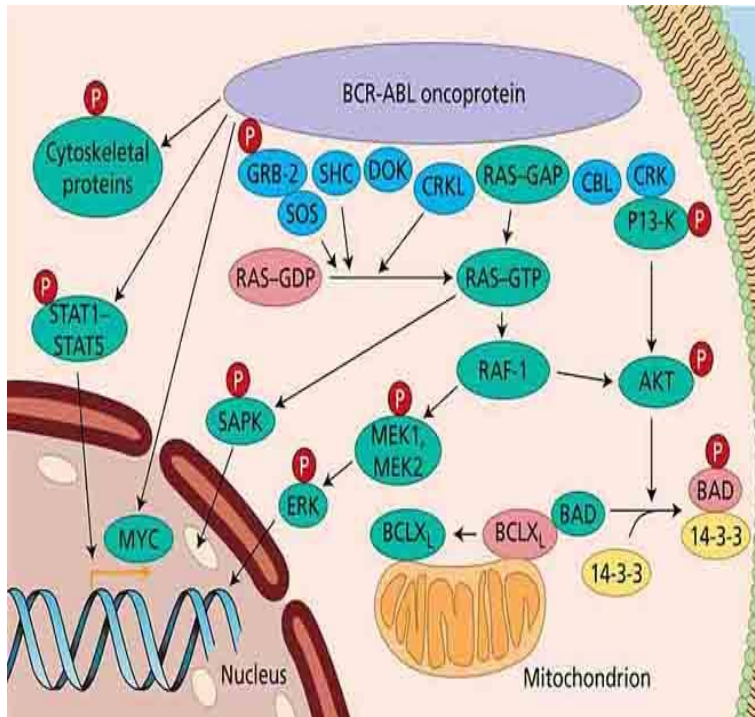
- Υπερβαίνουν την μετάλλαξη του αμινοξέος «θυρωρού»
- Συνδέονται ομοιοπολικά στην ATP περιοχή
- Συνδέονται εκτός της ATP περιοχής (αλλοστερικοί αναστολείς)
- Στοχεύουν ταυτόχρονα ένα σύνολο κινασών (multitargeting) σε ένα ή περισσότερα σηματοδοτικά μονοπάτια

Η ανάπτυξη του Imatinib

Η χρόνια μυελογενής λευχαιμία (CML) προκαλείται από την υπέρμετρη και ανεξέλεγκτη παραγωγή λευκών αιμοσφαιρίων από τον μυελό των οστών. Στο 95% των περιπτώσεων η ασθένεια οφείλεται στη παρουσία του «**χρωμόσωματος της Φιλαδέλφειας**», ενός χιμαιρικού χρωμοσώματος, που παράγεται από την αντιμετάθεση τμημάτων των χρωμοσωμάτων 9 και 22.

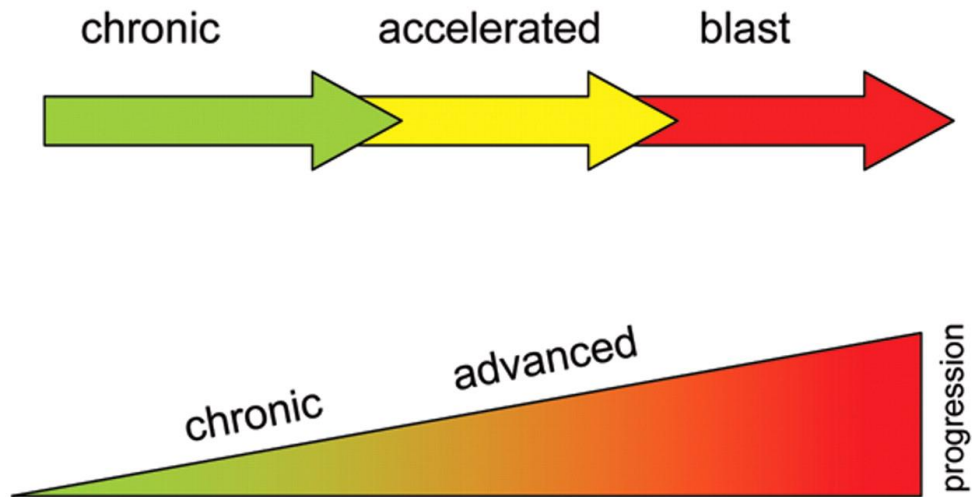
Το γονίδιο Abl (χρωμόσωμα 9) κωδικοποιεί την κινάση τυροσίνης Abl (Abelson). Συντήκεται με το γονίδιο Bcr (breakpoint cluster region protein, του χρωμοσώματος 22) και παράγει τη χιμαιρική πρωτεΐνη Bcr-Abl που δρα ως μονίμως ενεργοποιημένη κινάση τυροσίνης, αφού έχει απωλέσει τη ρυθμιστική της ιδιότητα.





Η υβριδική Bcr-Abl κινάση συμπεριφέρεται ως ογκογόνο: ενεργοποιεί οδούς μεταγωγής σήματος και μηχανισμούς που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό, την αναστολή απόπτωσης των κυττάρων και την απώλεια των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA.

ΧΡΟΝΙΑ ΜΥΕΛΟΓΕΝΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ



- Χρόνια φάση της ασθένειας (4-6 χρόνια): ήπια συμπτώματα (κούραση, αιμορραγία/μολύνσεις, απώλεια βάρους)
- Επιταχυνόμενη φάση (1 έτος) χαρακτηρίζεται από δυσκολότερη απόκριση σε θεραπεία
- Τελική φάση (βλαστική κρίση) διαρκεί 3-6 εβδομάδες

Στο 85% των περιπτώσεων η διάγνωση γίνεται κατά τη χρόνια φάση

Θεραπεία χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (CML)

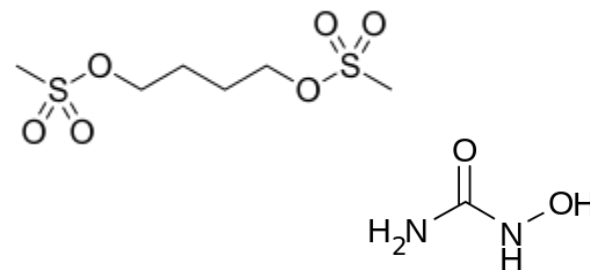
Busulfan (1953)

Hydroxyurea (1964)

IFN- α (1986)

Μεταμόσχευση μυελού

Imatinib (2001)



Timeline of Therapy for Chronic Myelogenous Leukemia



Η κυκλοφορία του imatinib **άλλαξε δραματικά την αντιμετώπιση της Ph⁺ CML**, που από θανατηφόρα ασθένεια μετατράπηκε, για την πλειοψηφία των ασθενών, σε διαχειρίσιμη χρόνια παθολογική κατάσταση.

Δρα **εξειδικευμένα**, όχι αδιάκριτα έναντι όλων των ταχέως αναπτυσσόμενων κυττάρων

Είναι **καλά ανεκτό**, με ήπιες παρενέργειες (ναυτία, έμετος, διάρροια, πονοκέφαλος)

Χορήγηση από το στόμα (συνήθης δόση 400mg/ημέρα)

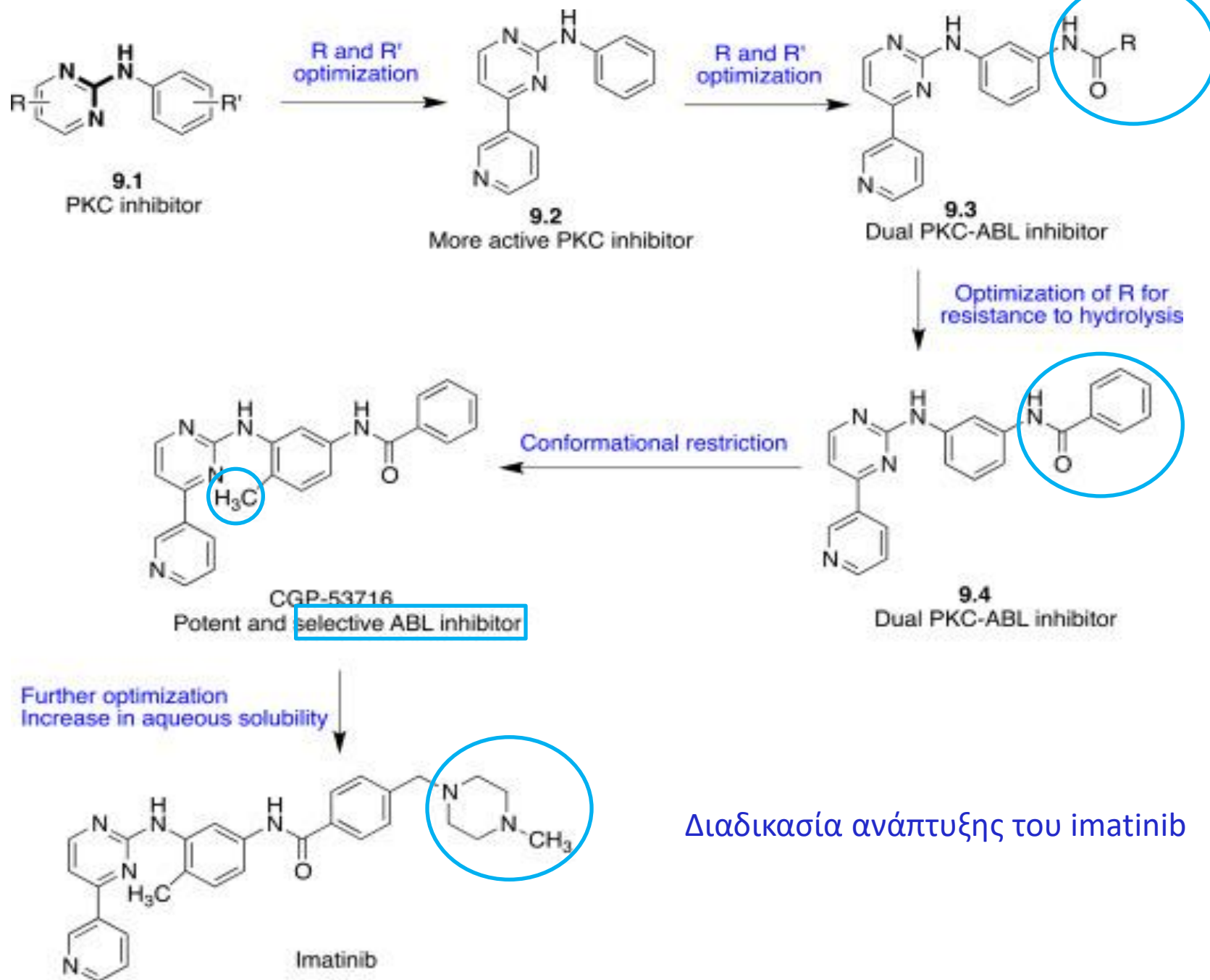
Η ανταπόκριση των ασθενών φθάνει στο 85% αν χορηγηθεί στη χρόνια φάση.



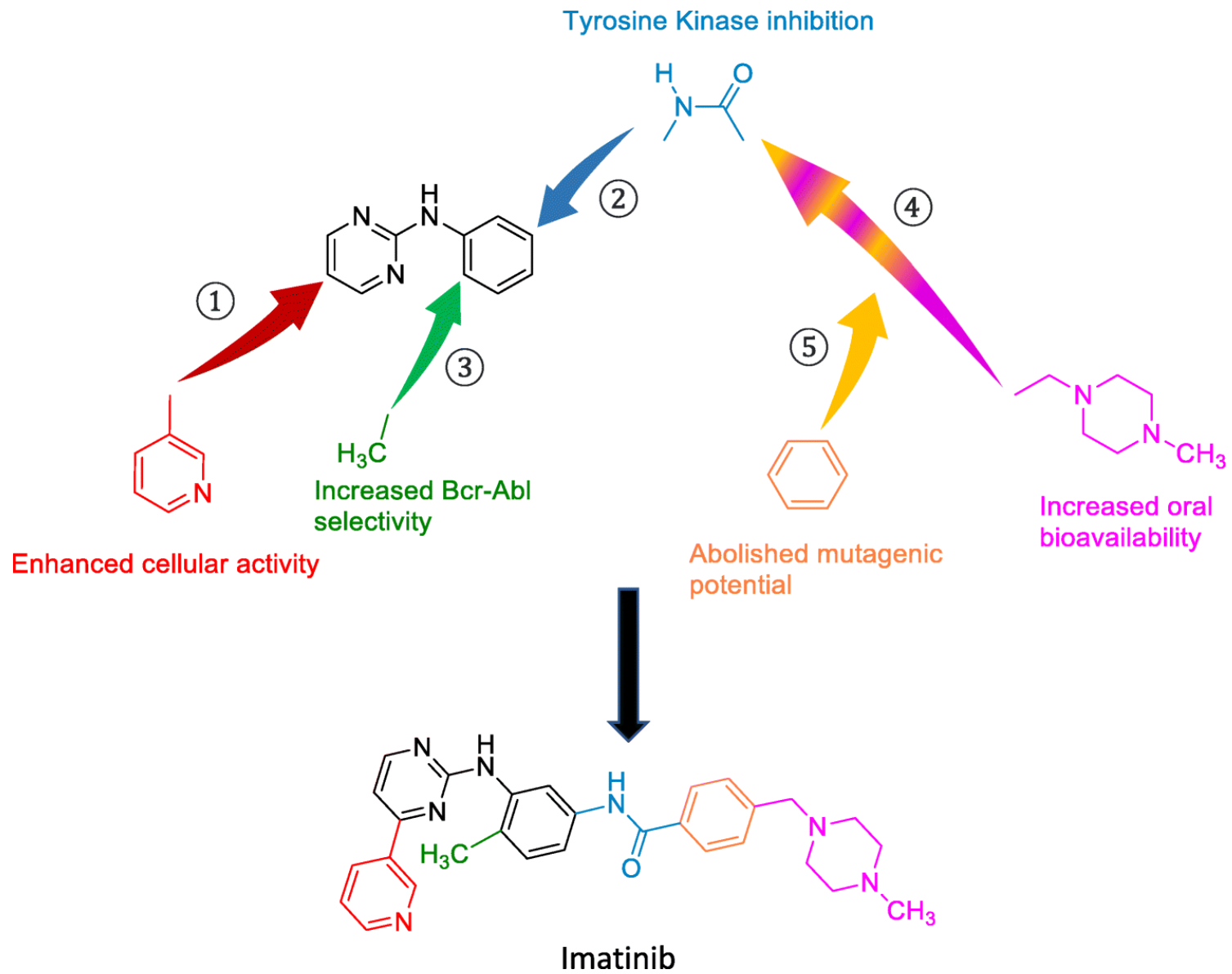
Εκ των υστέρων εκτίμηση: στην επιτυχία συμβάλλουν η έγκαιρη διάγνωση λόγω υγρής βιοψίας και η πολυφαρμακολογία του αναστολέα = αναστολή κ.α. κινασών.

Αύξηση του εμπορικού ενδιαφέροντος. Παρά τα χαμηλά ποσοστά εμφάνισης της ασθένειας, τουλάχιστον 100.000 ασθενείς εξαρτούν την επιβίωσή τους από τη λήψη του φαρμάκου.

Κατά παράδοξο τρόπο η καινοτόμα αυτή αντικαρκινική θεραπεία αύξησε το ποσοστό των ασθενών, αφού δεν οδηγεί σε πλήρη θεραπεία.

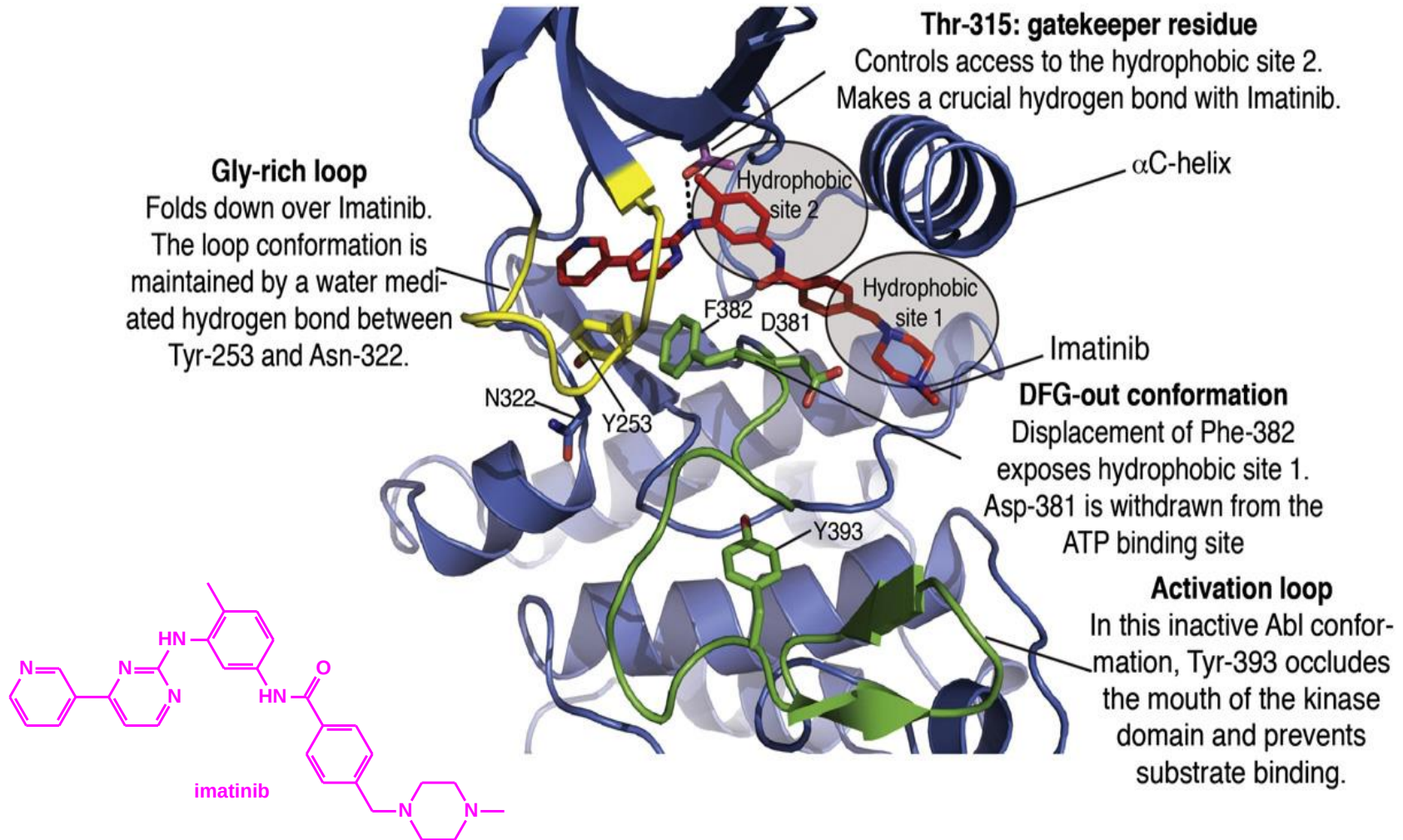


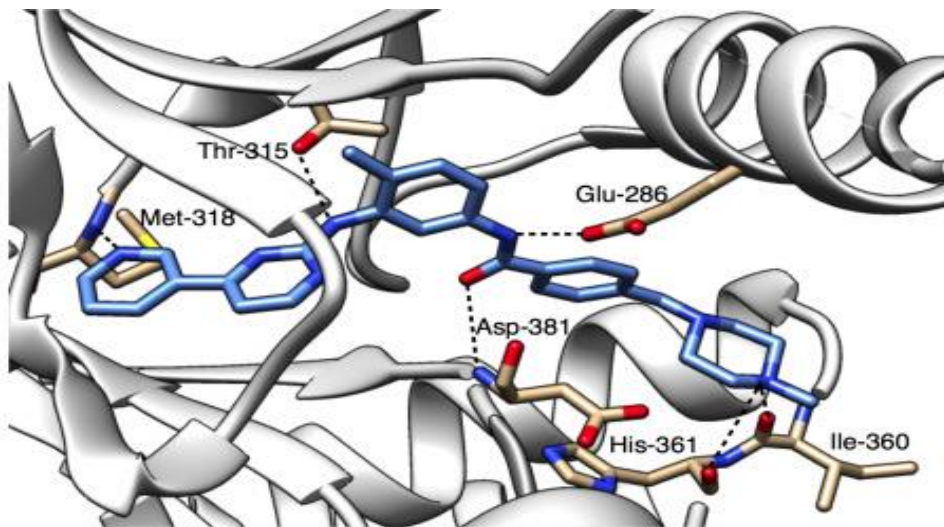
Διαδικασία ανάπτυξης του imatinib



Σχέσεις δομής/δράσης

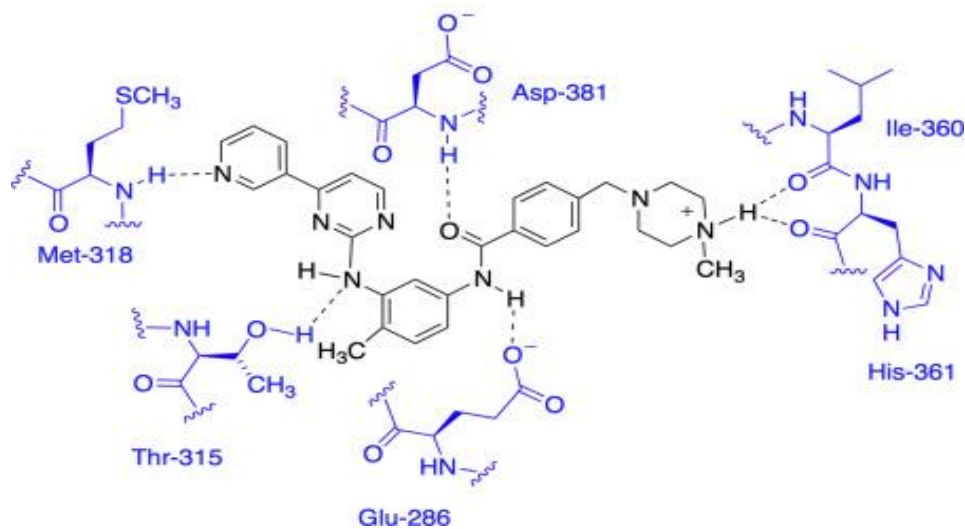
Η **CML** παρουσιάζει απλούστερη παθογένεση από άλλες μορφές καρκίνου και προσφέρει σαφή φαρμακευτικό στόχο: **η ανακάλυψη του imatinib αποτελεί καλό παράδειγμα, σχετικά με τη σημασία που έχει η γνώση του βιολογικού υπόβαθρου, για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων**



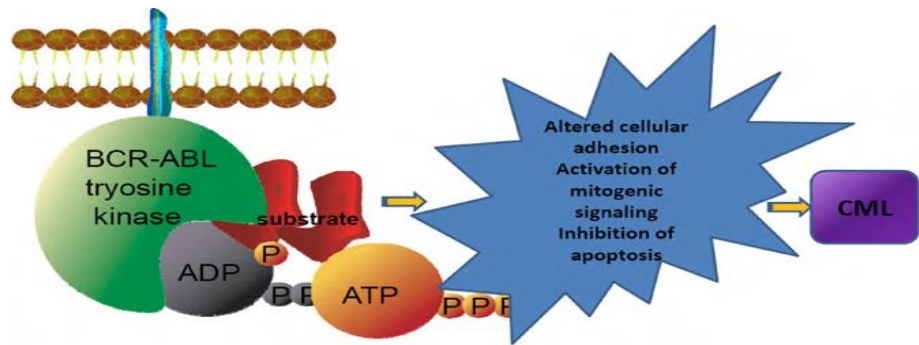


Το **DFG μοτίβο** της κινάσης: **Asp381-Phe382-Gly383**.

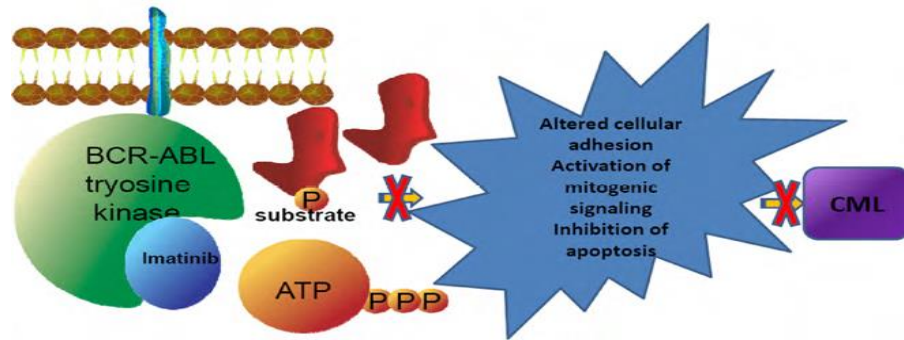
Το φάρμακο συνδέεται με **6 δΗ**: το πυριδινικό άζωτο και το αμιδικό καρβονύλιο είναι δέκτες δ.Η από **Met318** και **Asp381**, αντίστοιχα. Το αμιδικό NH είναι δότης σε δΗ με το φορτισμένο καρβοξύλιο του **Glu286**, ενώ το αμινικό NH είναι δότης σε δΗ με την **Thr315** (αμινοξύ-θυρωρός). Η πρωτονιωμένη 4-μεθυλοπιπεριδίνη συνδέεται με τα backbone καρβονύλια των **Ile360** και **His361**.



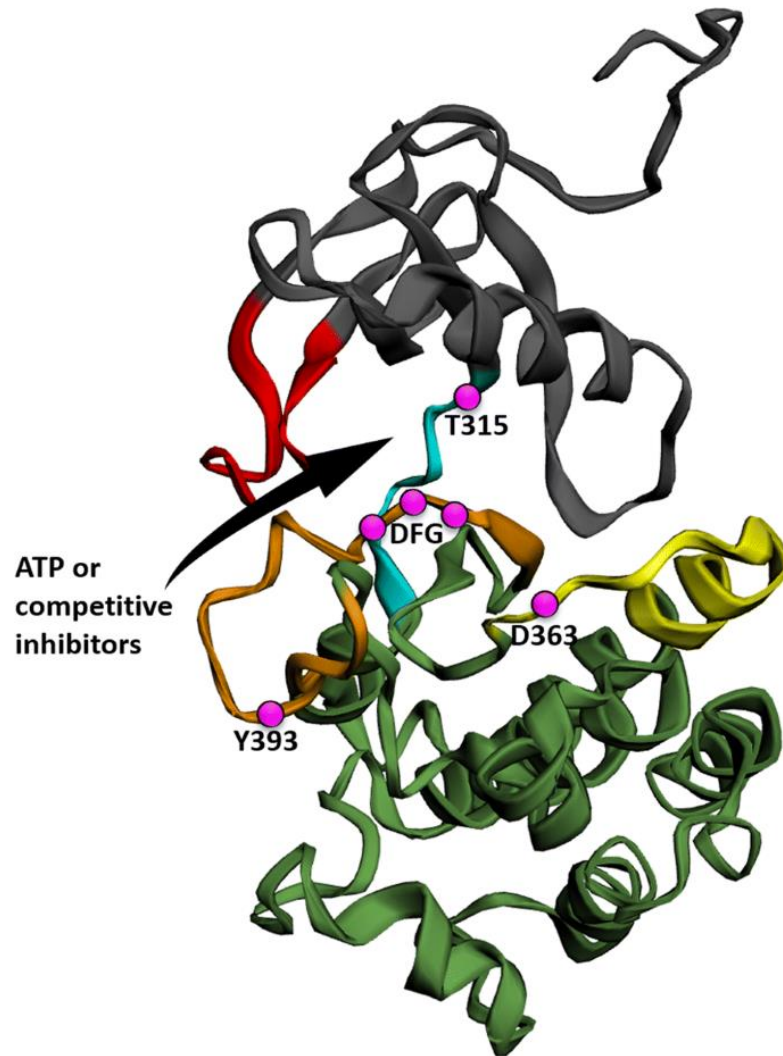
Επιπρόσθετα αναπτύσσονται δ Van der Waals και ππ-αλληλεπιδράσεις μεταξύ πυριδινικού δακτυλίου / Phe382 και πυριμιδινικού δακτυλίου / Phe317, που ισχυροποιούν περαιτέρω τη σύνδεση.



Το imatinib ανταγωνίζεται επιτυχώς το ATP και προσδένεται στην αντίστοιχη θέση της Bcr-Abl κινάσης σταθεροποιώντας την ανενεργή μορφή της.



Δυστυχώς, το 1/3 των ασθενών θα εμφανίσει αντοχή στο φάρμακο, εξαρτώμενη ή όχι από την επαγωγή μεταλλάξεων στην Bcr-Abl κινάση. Η πρώτες υπερσχύουν, καθιστώντας αναγκαία την ανάπτυξη αναστολέων της μεταλλαγμένης Bcr-Abl κινάσης.



3D μοντέλλο της καταλυτικής περιοχής της Bcr-Abl κινάσης.

Τα σημαντικά αμινοξικά υπόλοιπα σημειώνονται με έντονο ροζ χρώμα. Η **T315** είναι το αμινοξύ- θυρωρός της κοιλότητας πρόσδεσης του ATP (με μαύρο βέλος).

Το **D363** ιονίζεται για τη πυρηνόφιλη προσβολή της γ-φωσφορικής ομάδας.

Η **Y393** είναι ο στόχος της φωσφορυλίωσης, καθώς ρυθμίζει την περαιτέρω ενεργοποίηση της κινάσης.

Η τριάδα **DFG** συνδέεται κατάλληλα με τα αντισταθμιστικά ιόντα Mg^{2+} και πρέπει να λάβει DFG-in διαμόρφωση για να πραγματοποιηθεί η φωσφορυλίωση.

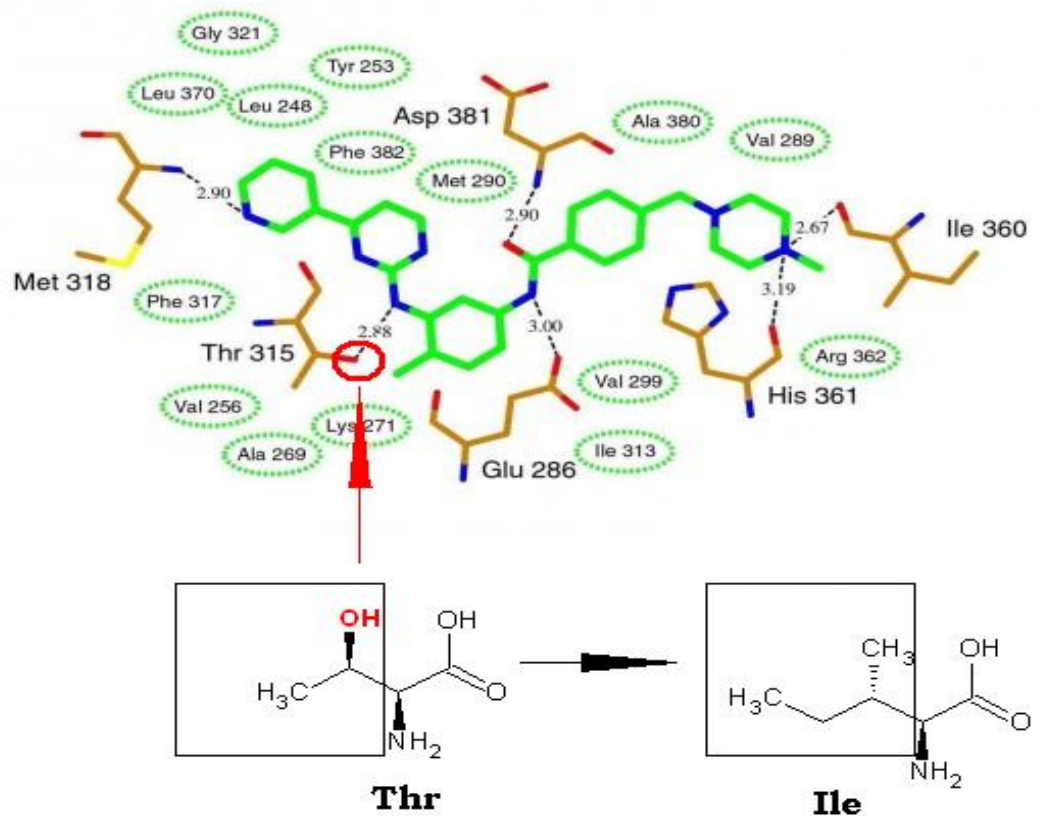
First-in-class versus next generation inhibitors

Στόχος: καλύτερα ανεκτοί και πιο αποτελεσματικοί αναστολείς - αντιμετώπιση της επαγόμενης αντοχής.

Παρατηρούνται συχνά μεταλλάξεις (~50) του ογκογονιδίου Bcr-Abl. Η σημαντικότερη αφορά στην αντικατάσταση του αμινοξέος-θυρωρού (T315I)

Point mutation: Η αντικατάσταση της κυτοσίνης 944 από θυμιδίνη στο γονίδιο της ABL έχει ως συνέπεια την αντικατάσταση του αμινοξέος-θυρωρού θρεονίνης (Thr315) από την ογκοδέστερη ισολευκίνη (Ile).

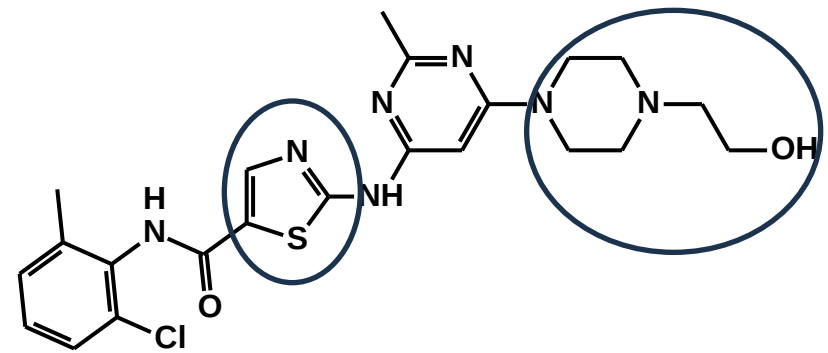
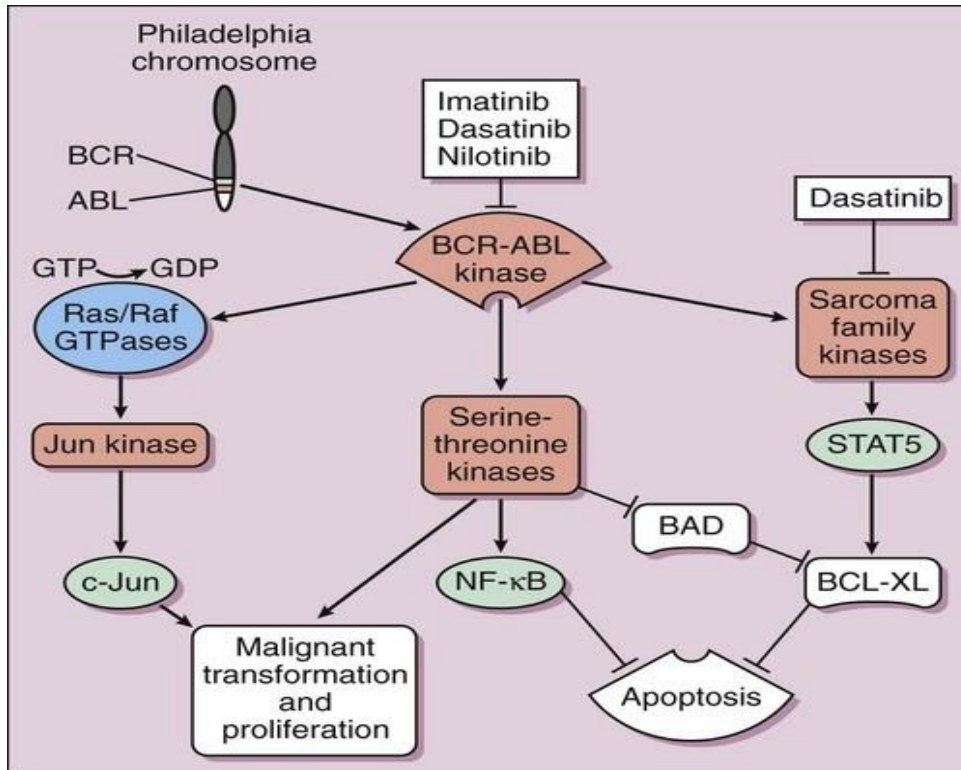
Η ΕΙΣΟΔΟΣ ΤΟΥ ΑΤΡ ΔΕΝ ΕΜΠΟΔΙΖΕΤΑΙ
Αντίθετα, εμποδίζεται η είσοδος του αναστολέα, ενώ η απώλεια ενός σημαντικού δH (-OH της θρεονίνης με αμινοπυριμιδίνη) εξασθενεί την αλληλεπίδραση.



Αναστολείς 2^{ης} γενιάς - τύπου I και τύπου II

Αναστολείς τύπου I Το **Dasatinib** εγκρίθηκε για τη θεραπεία ασθενών μη ανεκτικών ή με έλλειψη ανταπόκρισης στο Imatinib.

Διπλός αναστολέας τύπου I Δεσμεύεται στην ενεργή και στην ανενεργή διαμόρφωση του ενζύμου. Αναστέλλει 325 φορές ισχυρότερα από το imatinib την Bcr-Abl κινάση και 32/33 μεταλλαγμένες μορφές της, εκτός της T315I. Αναστέλλει επίσης την Src κινάση.



Dasatinib

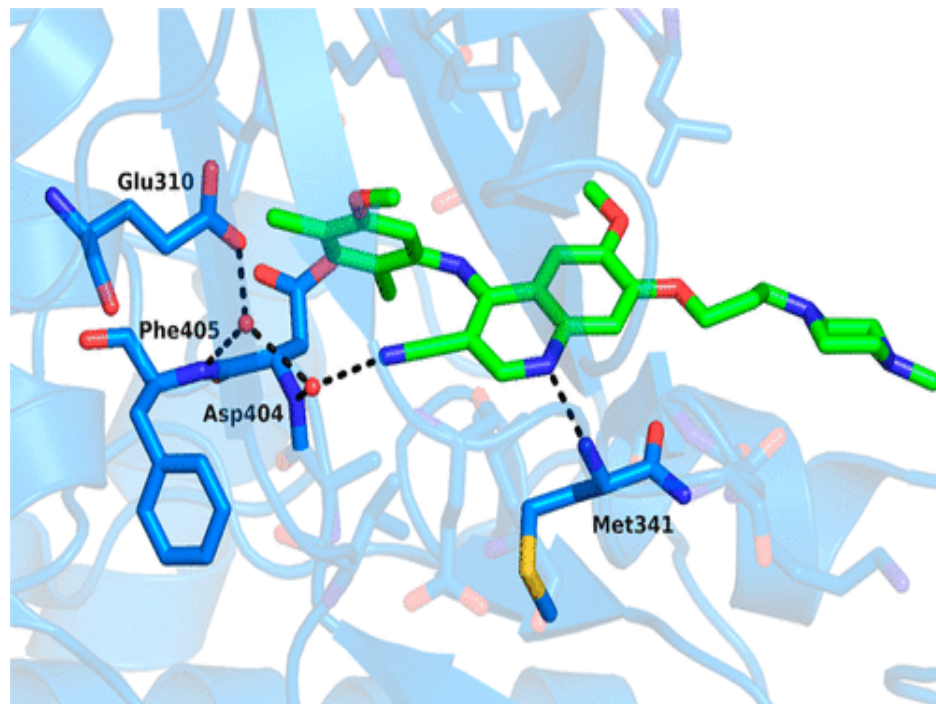
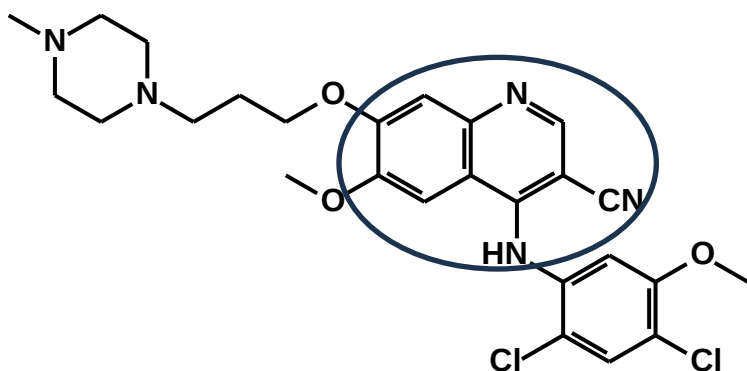
Sprycel (Bristol-Myers Squibb)

Η υψηλή εκλεκτικότητα δεν είναι απαραίτητη

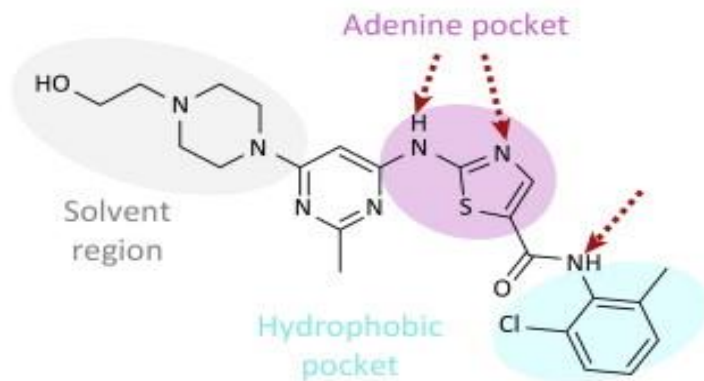
Το **Bosutinib** (Bosulif, Pfizer) αποτελεί θεραπεία πρώτης γραμμής, επειδή είναι **πολύ καλά ανεκτό από τους ασθενείς = αύξηση του χρόνου επιβίωσης.**

Διπλός αναστολέας τύπου Ι της Bcr-Abl και της Src κινάσης.

Δεν αντιμετωπίζει την μετάλλαξη T315I.

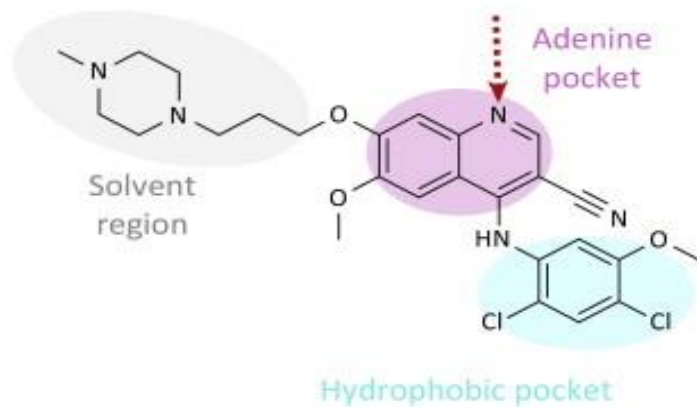


(A)



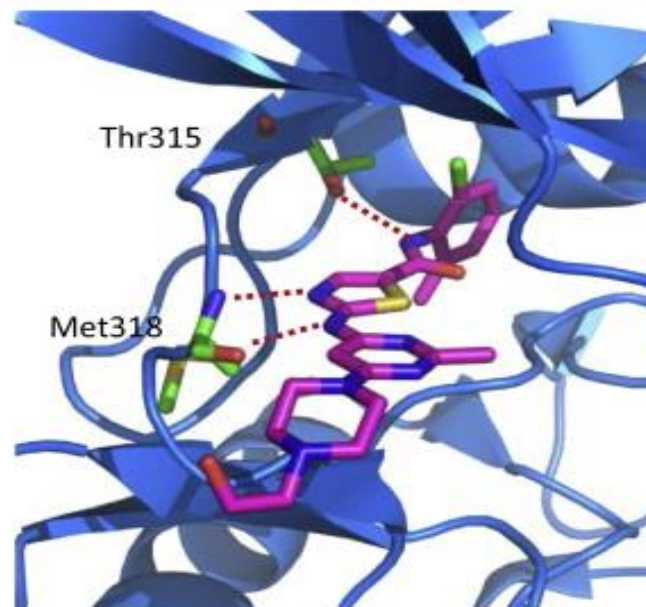
Dasatinib

(C)

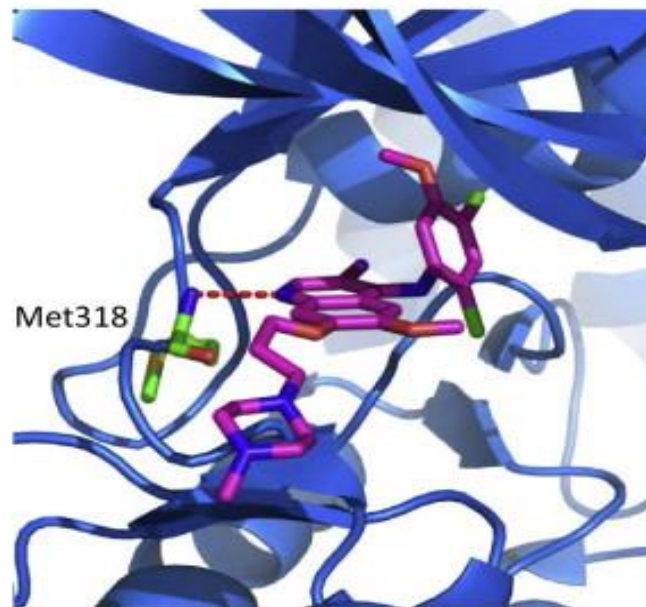


Bosutinib

(B)



(D)



TRENDS in Pharmacological Sciences

Αναστολείς τύπου I

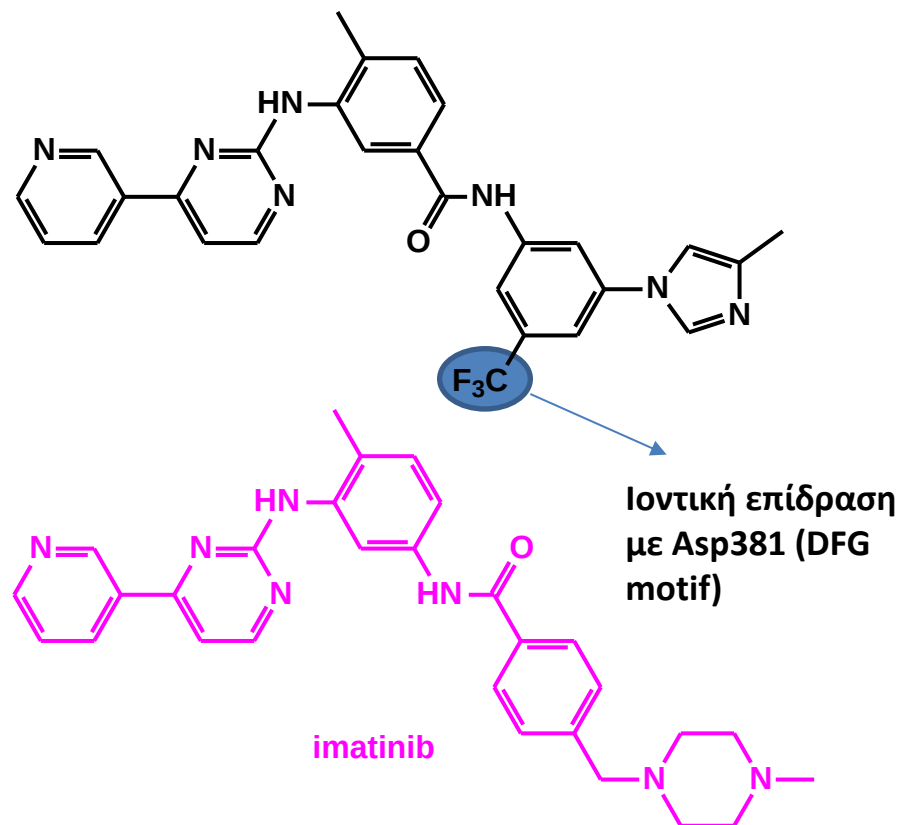
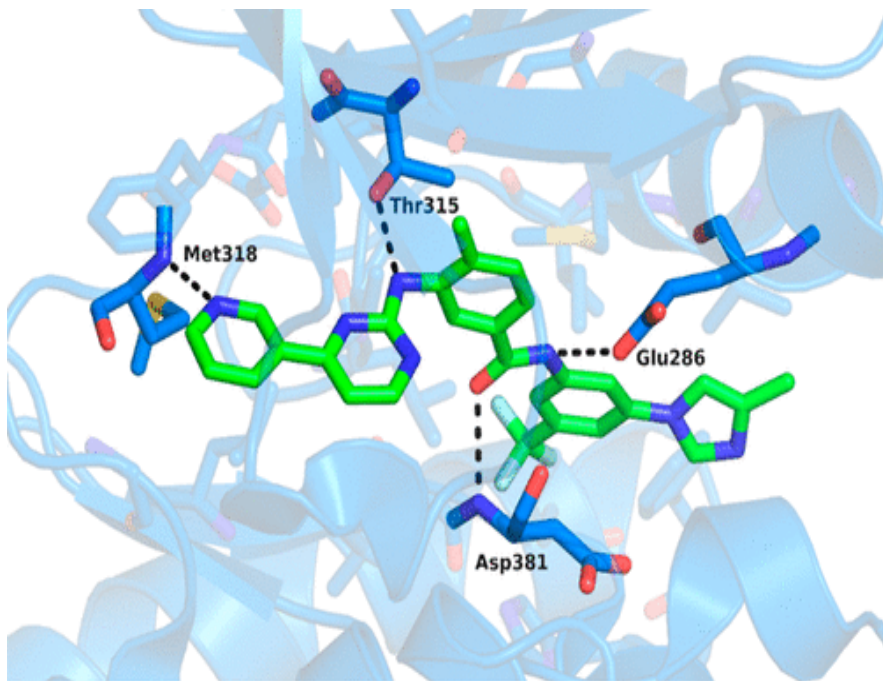
Αναστολείς 2^{ης} γενιάς τύπου II

Nilotinib: αντικατάσταση μεθυλοπιπεραζινικού υποκαταστάτη από 4-μεθυλιμιδαζόλιο, που προσδένεται στη δευτερεύουσα κοιλότητα. Λόγω της χαμηλότερης βασικότητας του μεθυλιμιδαζόλιου έναντι της μεθυλοπιπεραζίνης δεν αναγνωρίζεται καλά από την Ρ-γλυκοπρωτεΐνη, συνεπώς δεν αναπτύσσει αντοχή μη εξαρτώμενη από μεταλλαγμένη κινάση.

Αντιστροφή του αμιδικού δεσμού σε σχέση με το imatinib.

Προσθήκη τριφθορομεθυλομάδας που αναπτύσσει δεσμό vDW με το Asp του μοτίβου DFG, ενισχύοντας σημαντικά τη πρόσδεση: **10-30 φορές ισχυρότερη αναστολή** από το imatinib.

Δραστικό έναντι μεταλλαγμένων μορφών του ενζύμου, **εκτός του T315I.**

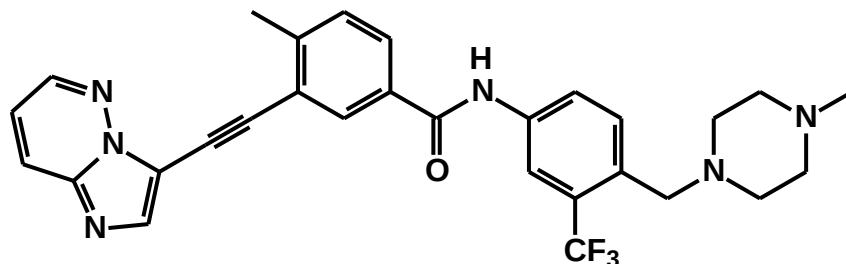


Φάρμακα 3^{ης} γενιάς

Το **Ponatinib** είναι τυπικός αναστολέας τύπου II της Bcr-Abl κινάσης. Εκτός της μη μεταλλαγμένης (wild type, wt) αναστέλλει πολλές μεταλλαγμένες μορφές του ενζύμου, συμπεριλαμβανόμενης της **Bcr-Abl T315I**. Έλαβε έγκριση (FDA) **με επείγουσες διαδικασίες** για ασθενείς με τη συγκεκριμένη μετάλλαξη.

Τοξικότερο από τους προηγούμενους αναστολείς με παρενέργειες από το καρδιαγγειακό (θρομβώσεις).

Το Ponatinib δεν είναι εκλεκτικός αναστολέας της Abl κινάσης, αλλά *multikinase* αναστολέας με υψηλή συγγένεια για 40 κινάσες.



Ponatinib

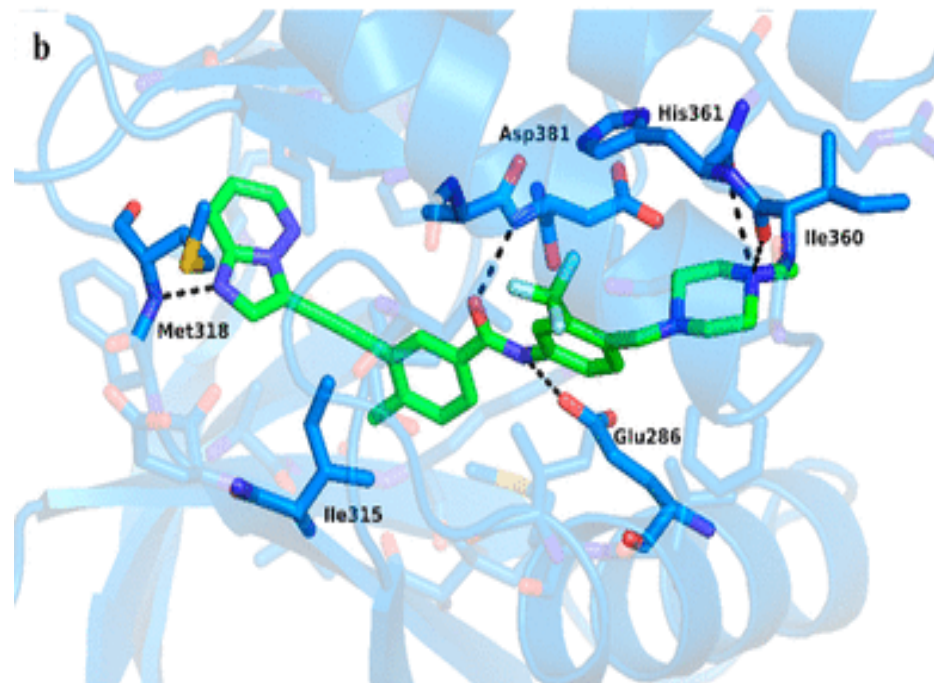
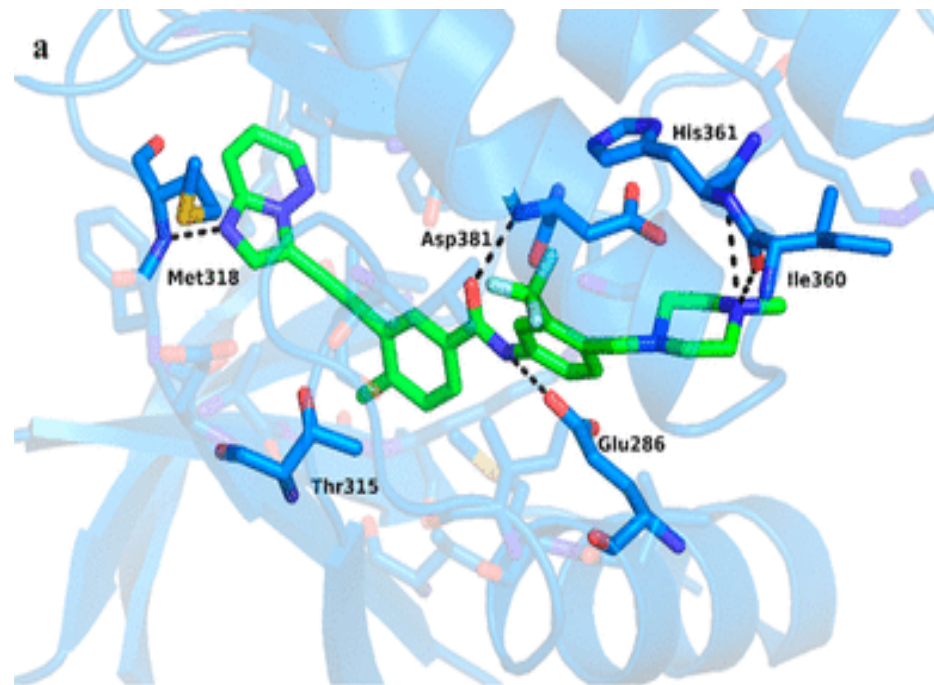
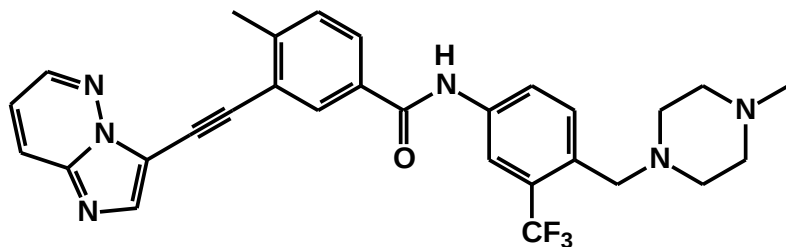
Iclusig (Ariad Pharmaceuticals)

Έντονος προβληματισμός σχετικά με το κόστος της θεραπείας
\$138,000 / έτος

Ο ιμιδαζο[1,2-*b*]πυριδαζινικός δακτύλιος καταλαμβάνει τη θέση της αδενίνης του ATP. Το ιμιδαζολικό άζωτο αναπτύσσει ισχυρό δεσμό με την **Met318** της ευκίνητης περιοχής.

Η μεθυλοφαινυλομάδα εισέρχεται στη δευτερεύουσα λιπόφιλη κοιλότητα πίσω από τον gatekeeper και η τριφθορομεθυλοφαινυλομάδα συνδέεται ισχυρά με το D της τριάδας DFG (**Asp381**) σταθεροποιώντας την **DFG-out** ανενεργή διαμόρφωση.

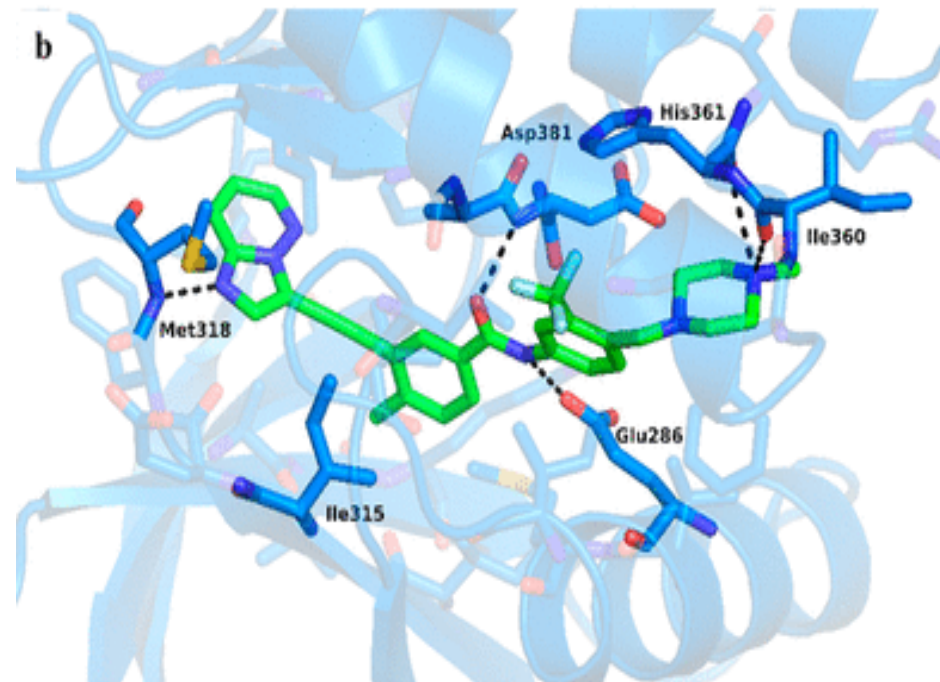
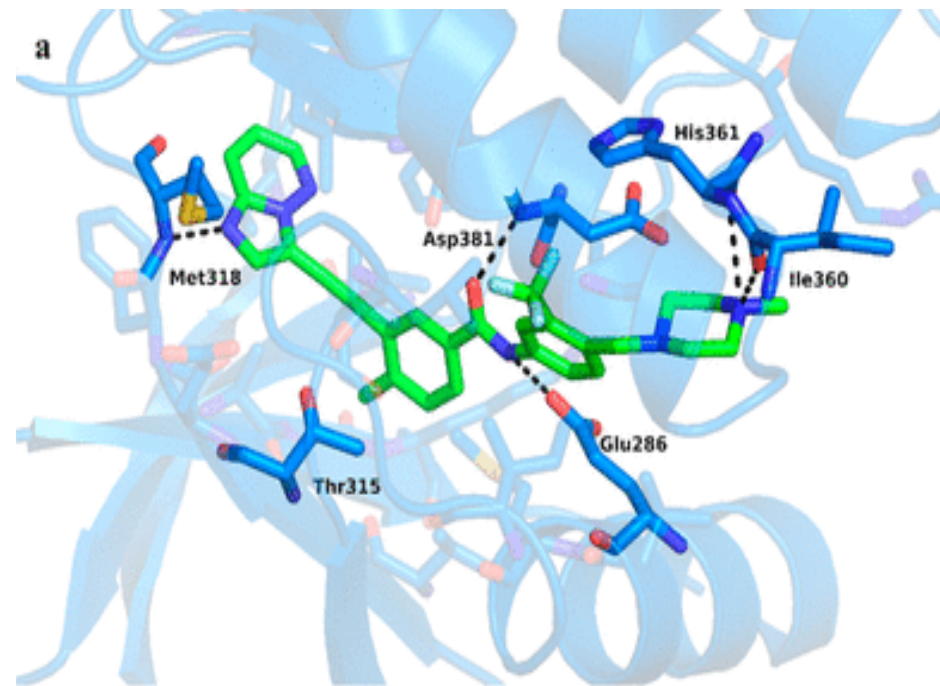
Η μεθυλοπιπεραζίνη συνεισφέρει στη πρόσδεση και αυξάνει την υδατοδιαλυτότητα συνεισφέροντας στη καλή φ/κ συμπεριφορά για χορήγηση από το στόμα.

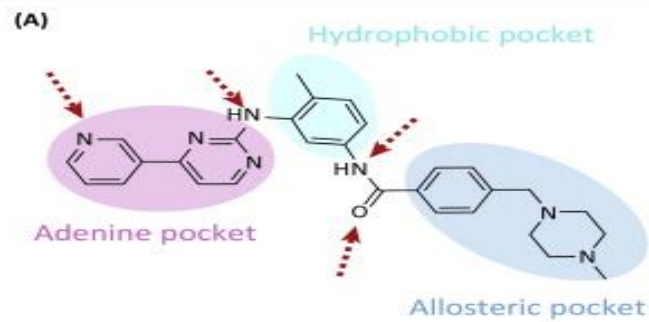


Η άκαμπτη αιθινυλομάδα λειτουργεί ως ενδιάμεσο (linker):

επιτρέπει τη διείσδυση του ιμιδαζο-πυριδαζινικού τμήματος στην καταλυτική περιοχή, στο wt (a) και στο μεταλλαγμένο ένζυμο (b), παρουσία της Ile315.

Η μείωση της στερεοχημικής παρεμπόδισης επιτρέπει στον αναστολέα να λάβει τη διευθέτηση που ευνοεί την αλληλεπίδραση με τη κινάση, παρουσία είτε Thr315, είτε Ile315: εντροπικό κέρδος





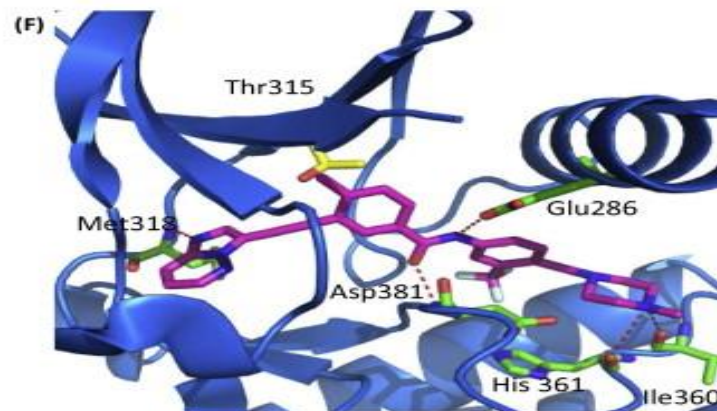
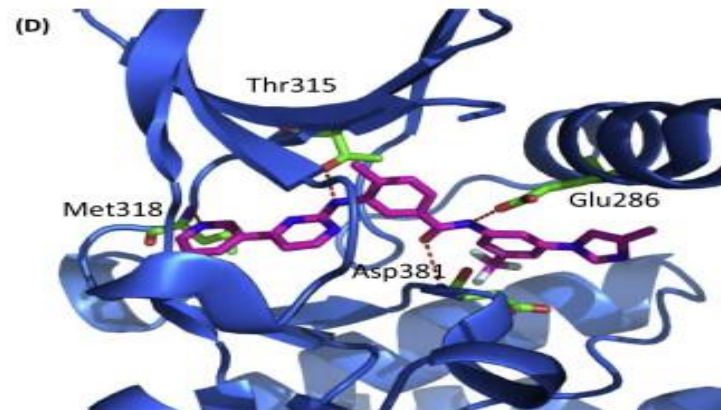
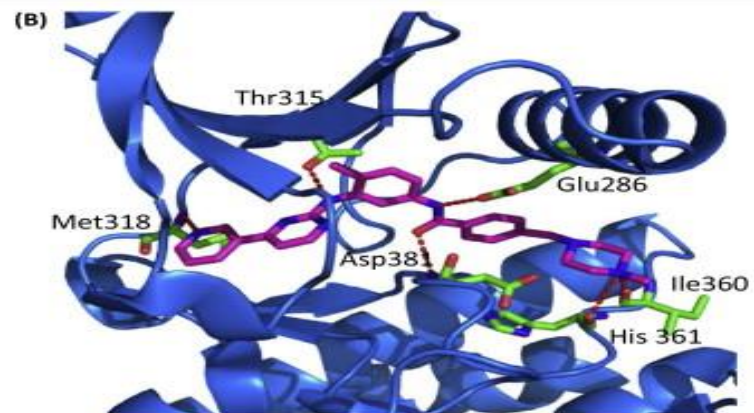
Imatinib



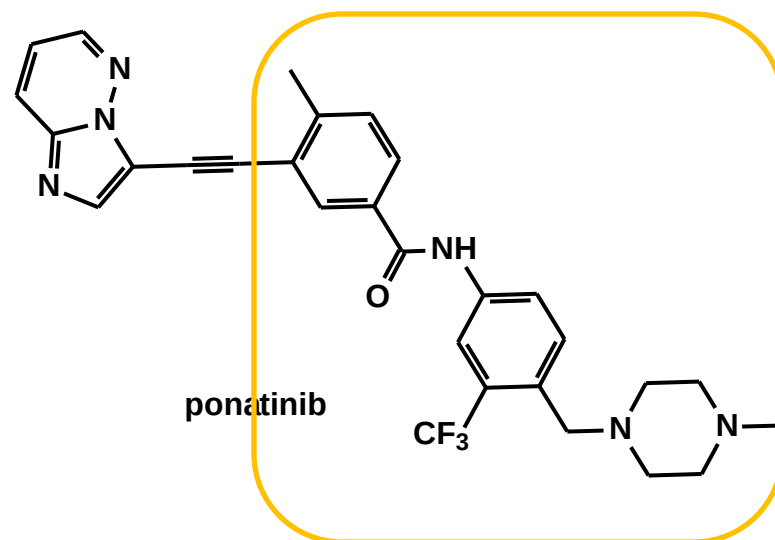
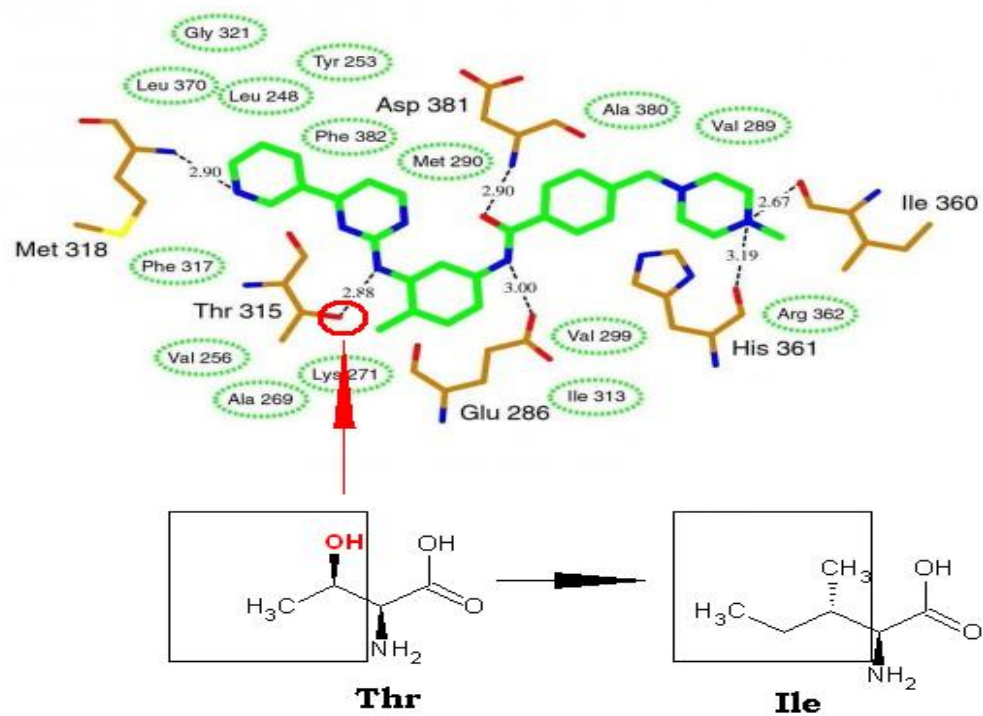
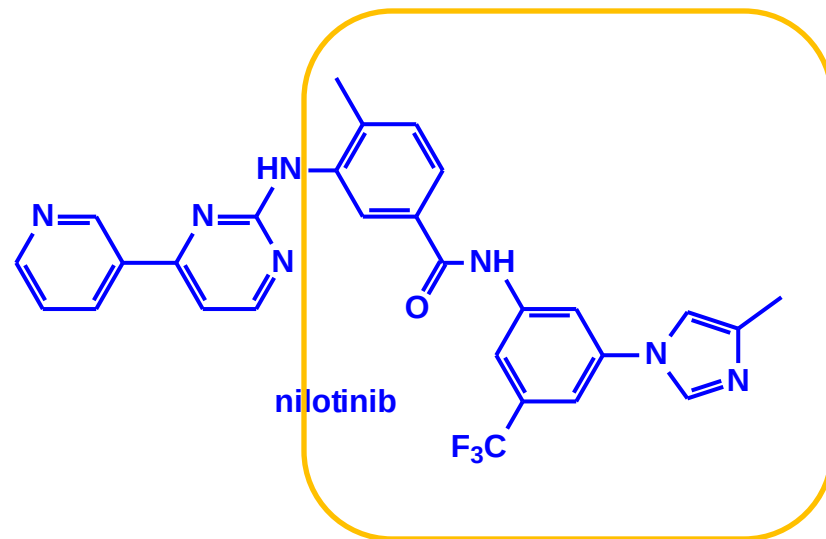
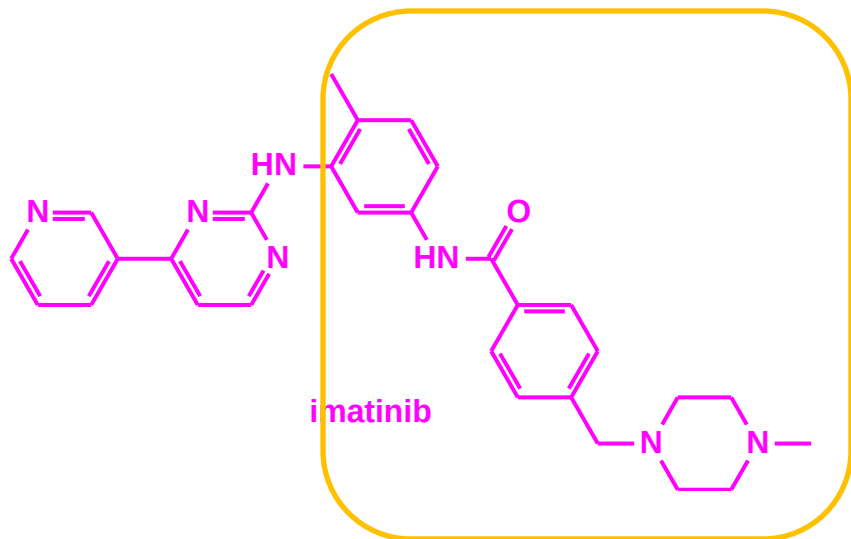
Nilotinib



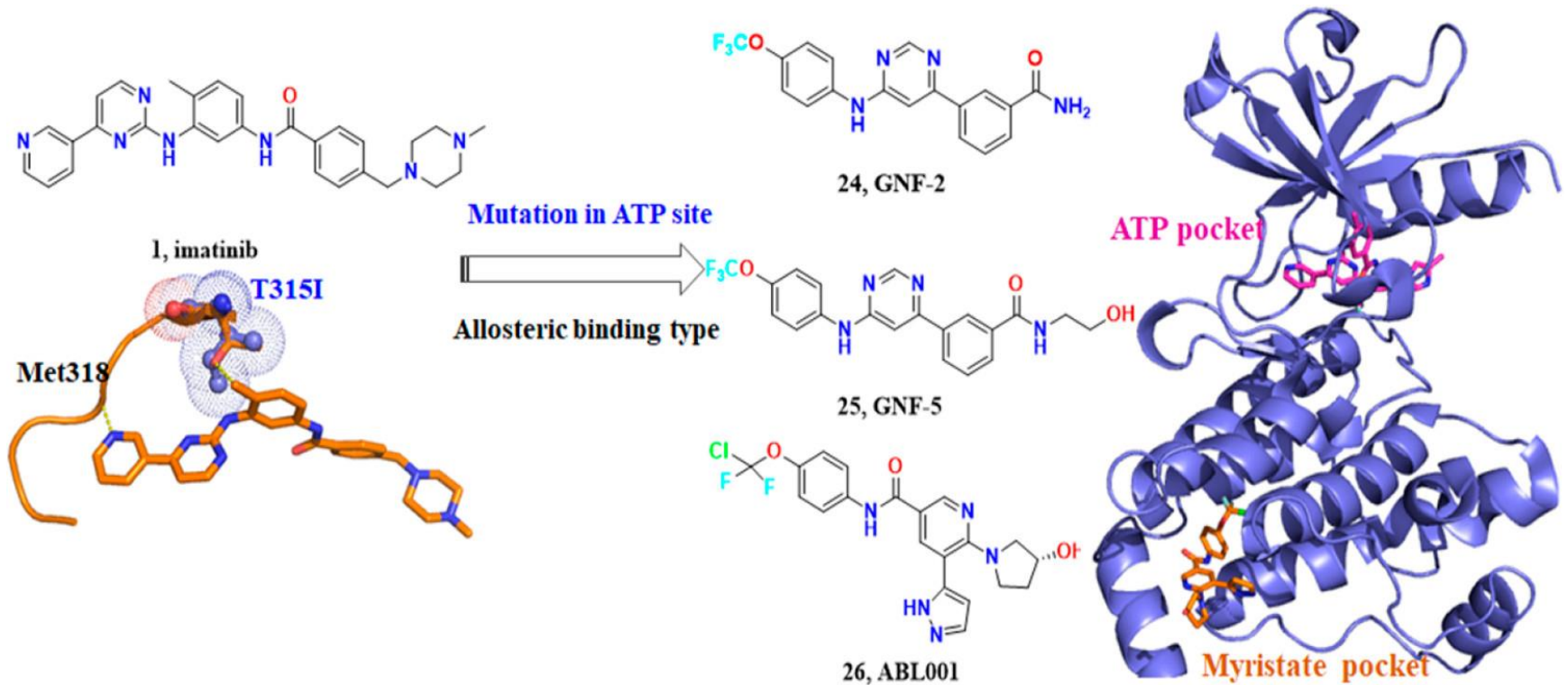
Ponatinib



TRENDS in Pharmacological Sciences



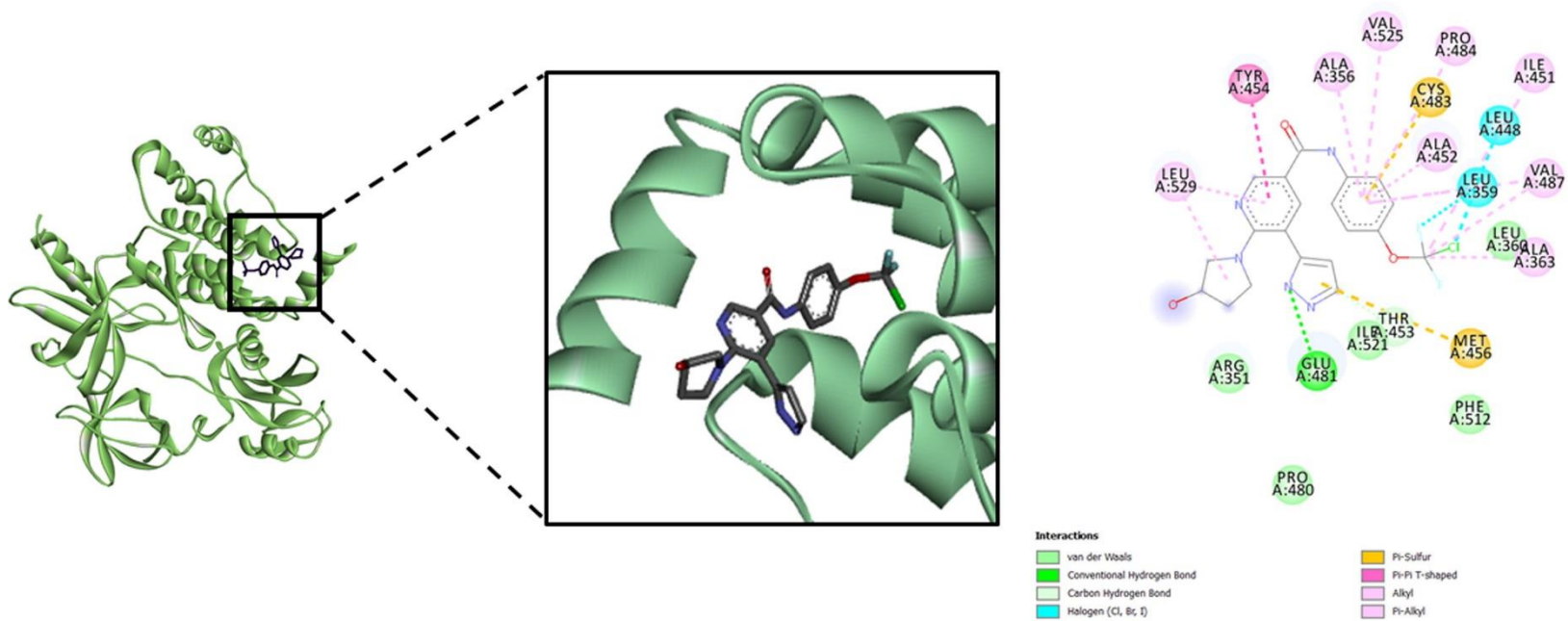
Ανάπτυξη αλλοστερικών αναστολέων τύπου IV



Το **asciminib (ABL001)** προσδένεται στη κοιλότητα πρόσδεσης του μυριστικού οξέος, μια αυτορρυθμιστική περιοχή της κινάσης. Η πρόσδεση μειώνει την ευκινησία του ενζύμου και σταθεροποιεί μια ανενεργή διαμόρφωση (αναστολέας τύπου IV). Το φάρμακο αναστέλλει ισχυρά την **wt** και **μεταλλαγμένες Bcr-Abl** κινάσες, μεταξύ αυτών και την **T315I**.

Αν και δεν είναι ATP-competitive αναστολέας, **παρουσιάζει συνέργεια με ATP-competitive αναστολείς**.

Εγκρίθηκε πρόσφατα από τον FDA ως μονοθεραπεία ή σε συγχορήγηση με το imatinib (μικρότερη πιθανότητα εμφάνισης επαγόμενων μεταλλάξεων) *J Med Chem.* 2018; 61 [18]:8120-35.



Το μυριστικό οξύ, κορεσμένο η-τετραδεκανοϊκό οξύ (14:0), αποτελεί βασικό συστατικό (10%) των λιπαρών του γάλακτος.

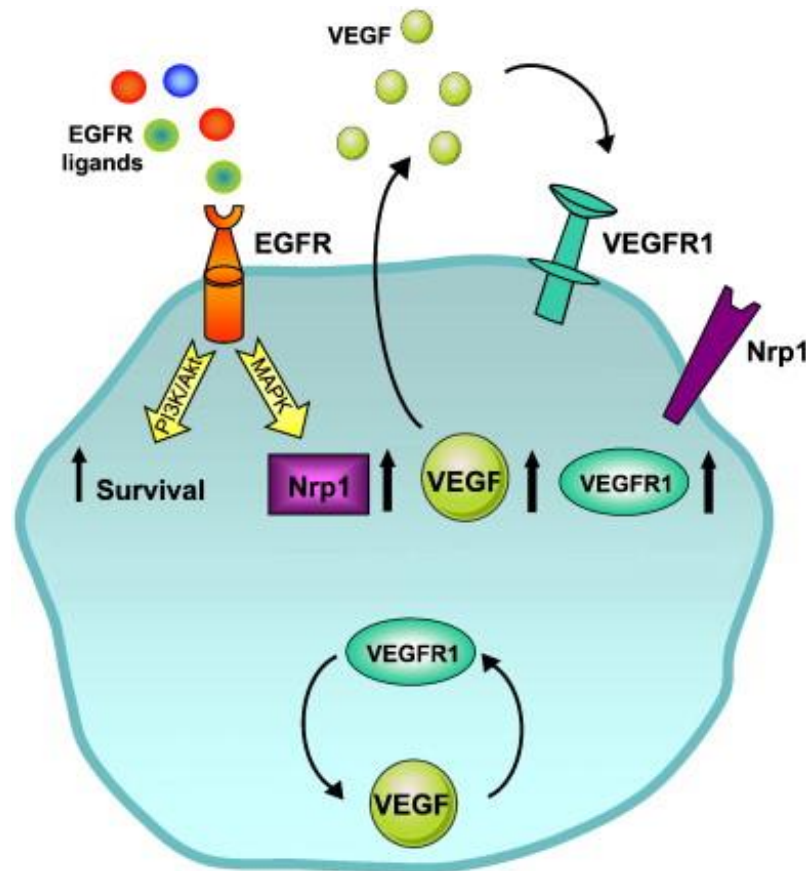
Η μυριστοϋλίωση (σχηματισμός του λιπαρού αμιδίου σε ***N-τελικό υπόλοιπο γλυκίνης***, αποτελεί **μετα-μεταφραστική τροποποίηση** ενός μικρού ποσοστού (0.5–0.8%) πρωτεϊνών του ευκαρυωτικού κυττάρου **για την διευκόλυνση του εντοπισμού τους πλησίον της κυτταρικής μεμβράνης**. Εκτός της αύξησης της συνάφειας με τη κυτταρική μεμβράνη, επηρεάζει και την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες (protein/protein interaction).

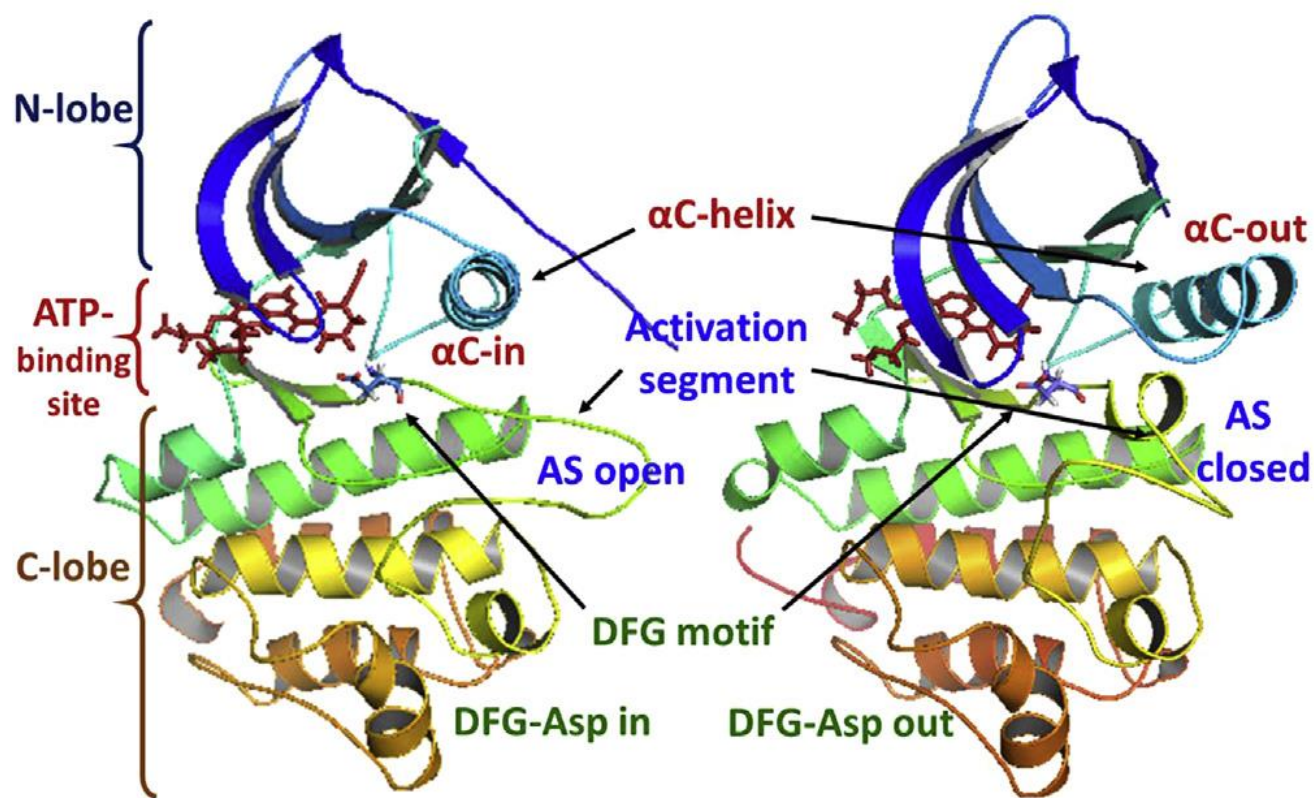
Η αντιμετώπιση της CML έγινε δυνατή μέσω της στενής συνεργασίας ερευνητών αλληλοσυμπληρούμενων θεματικών περιοχών.

Αναπτύχθηκαν πολλοί αναστολείς, πέραν αυτών που εφαρμόστηκαν κλινικά, που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των μηχανισμών ογκογένεσης σε μοριακό επίπεδο, αποτελώντας πολύτιμα εργαλεία για την ανακάλυψη αποτελεσματικότερων φαρμάκων.

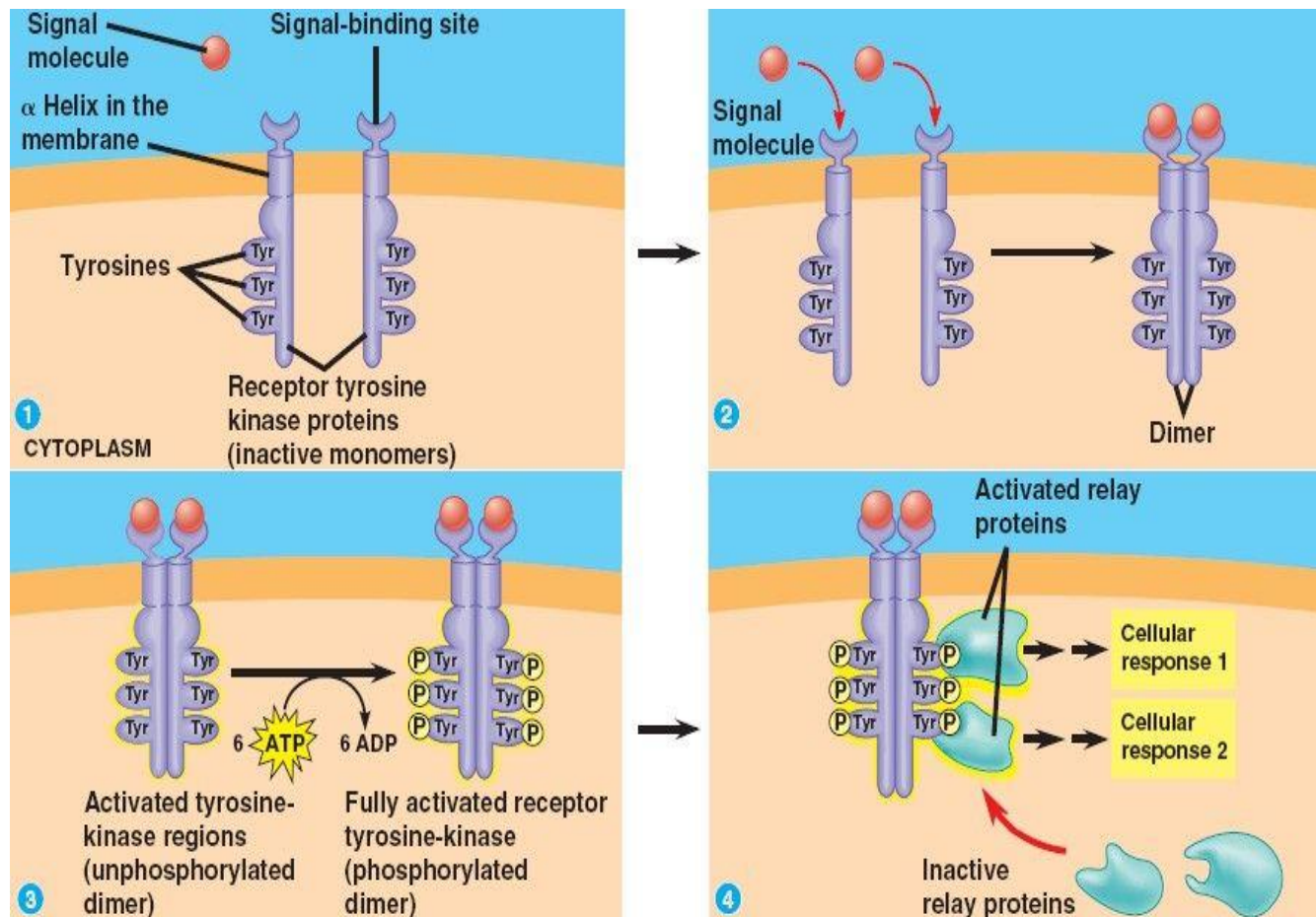
Αναστολείς υποδοχέων αυξητικών παραγόντων

Η ανάπτυξη στερεών όγκων, στους οποίους περιλαμβάνονται οι συχνά απαντώμενοι καρκίνοι του μαστού και του πνεύμονα, συσχετίζεται με την ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση διαμεμβρανικών υποδοχέων αυξητικών παραγόντων, που διαθέτουν ιδιότητες **κινασών τυροσίνης** (EGFR, VEGFR)





Το ενδοκυτταρικό τμήμα των υποδοχέων λειτουργεί ως κλασσική κινάση τυροσίνης.

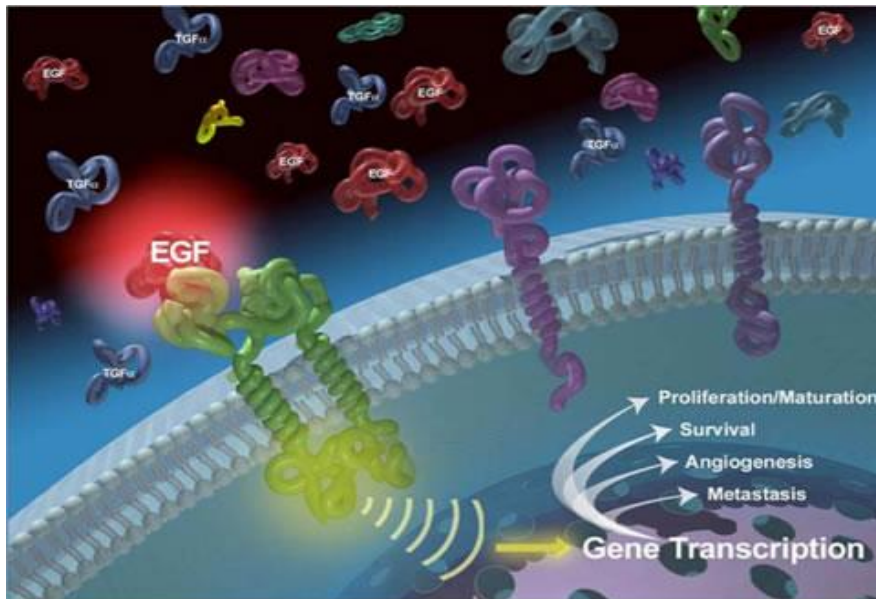


Ενδοκυτταρικά οι φωσφορυλιωμένες τυροσίνες δημιουργούν, συχνά μετά από διμερισμό τους, θέσεις υψηλής βιοχημικής συγγένειας με πρωτεΐνες που περιέχουν μια καλά συντηρημένη περιοχή ~100 αμινοξέων που απαντάται στην **Src** ογκοπρωτεΐνη (**Src Homology domain 2**, περιοχή SH2). Αυτή η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών πυροδοτεί τη μεταγωγή του σήματος.

Υπερέκφραση των αυξητικών παραγόντων, ή η παρουσία γονιδιακών μεταλλάξεων => απορρύθμιση ελεγχόμενης λειτουργίας RTKs => καρκινογένεση.

Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα



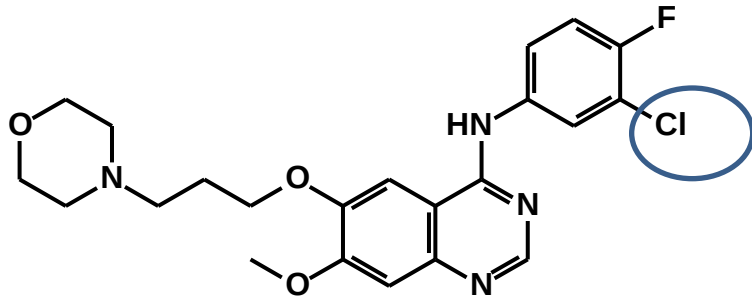
Πολλές χαρακτηριστικές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων, όπως:

- η έλλειψη επικοινωνίας με άλλα κύτταρα
- ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός
- η διαφυγή από την απόπτωση
- η ικανότητα μετάστασης και αγγειογένεσης

αποδίδονται σε διαταραχές στην έκφραση και τη λειτουργία των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων.

Μεταλλάξεις του γονιδίου του EGFR εντοπίζονται συχνά (12–47%) στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Δυο εξ αυτών (αναφέρονται συνολικά ως EGFR^{M+}) προκαλούν ανεξέλεγκτη ligand-independent EGFR ενεργοποίηση.

Οι περισσότεροι ασθενείς ανταποκρίνονται στη θεραπεία με αναστολείς κινασών πρώτης και δεύτερης γενιάς, αλλά η ασθένεια επανακάμπτει μετά από περίπου 1 έτος θεραπείας. Η δυσκολότερη επαγόμενη μετάλλαξη είναι του αμινοξέος θυρωρού **T790M**.

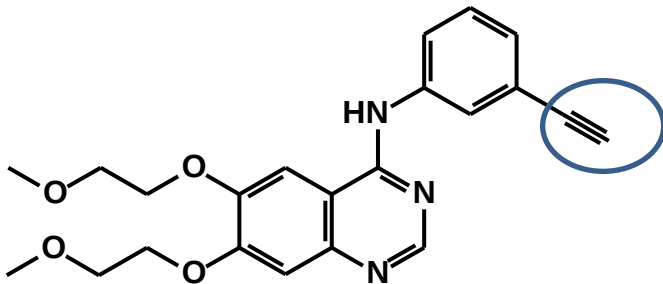


Gefitinib

Iressa (AstraZeneca)



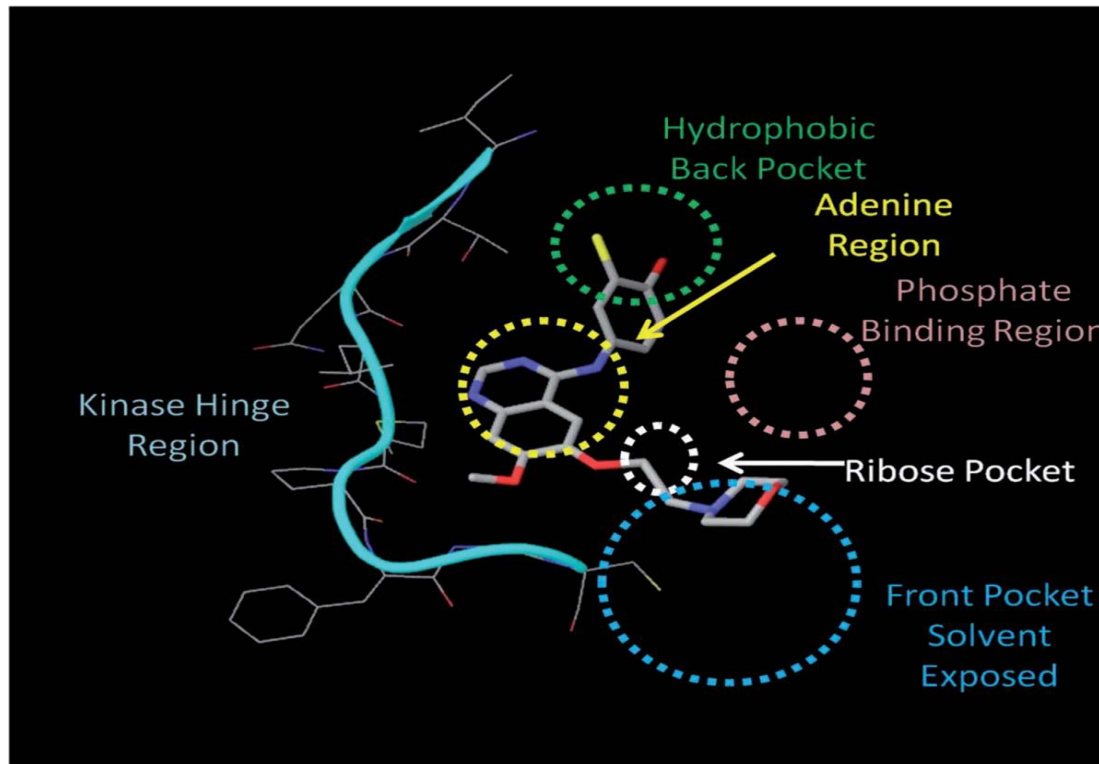
Οι πρώτοι εγκεκριμένοι αναστολείς του EGFR είναι τύπου Ι. Πρόκειται για παράγωγα αμινοκιναζολίνης: gefitinib και erlotinib. Ο δακτύλιος κινάζολίνης μιμείται την πουρίνη του ATP και η ανιλίνη έχει χαρακτηριστικό 3'-υποκαταστάτη, που είναι σημαντικός για την σχετικώς εκλεκτική αναστολή του EGFR.



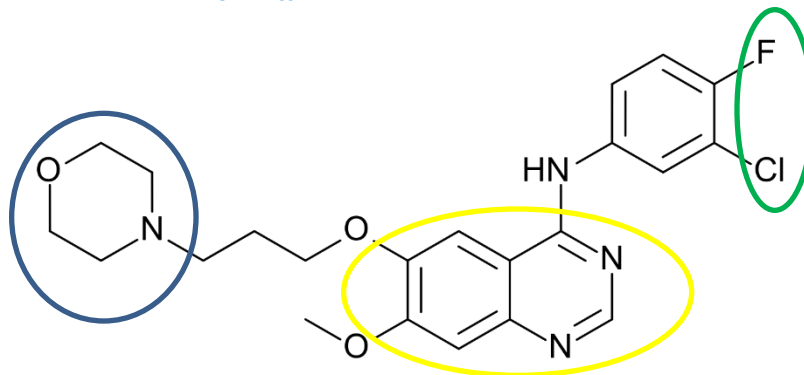
Erlotinib

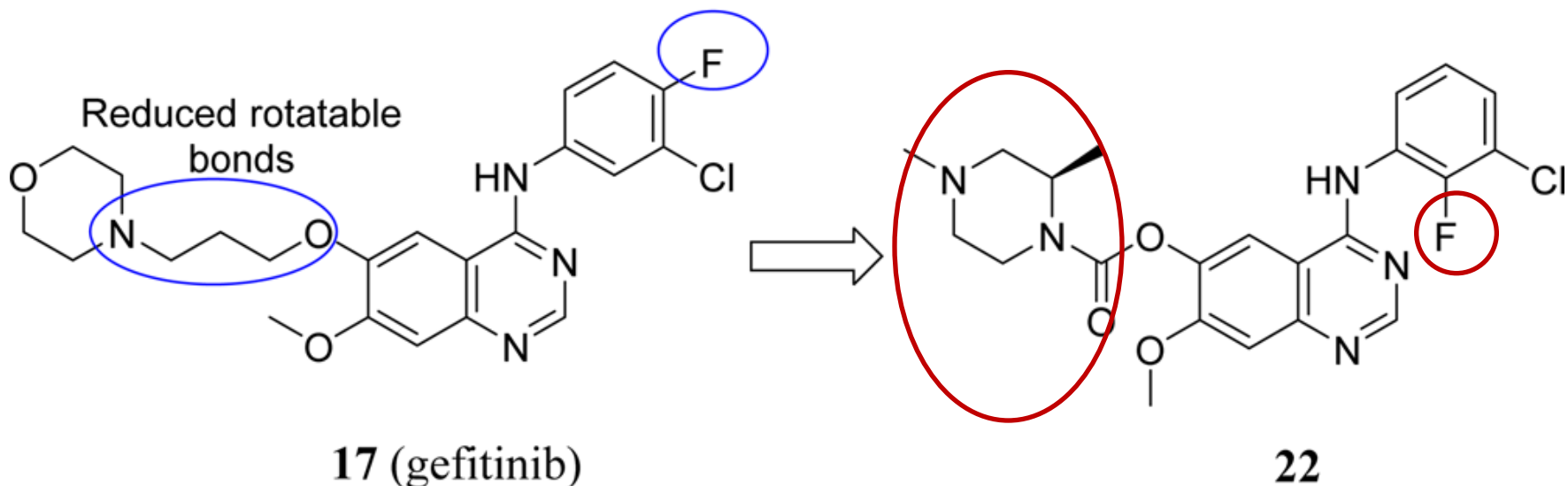
Tarceva (Genetech)





Η αντίθετη περιοχή εκτίθεται προς τον διαλύτη και επιτρέπει την εισαγωγή πολικών ομάδων (αιθέρας μορφολίνης), που χρησιμεύουν και για τη ρύθμιση των φ/χ ιδιοτήτων (εξισορρόπηση λιποφιλίας + υδατοδιαλυτότητας).





$K_{puu,brain} = 0.02$
 $K_{puu,CSF} = 0.09$
 L858R pEGFR $IC_{50} = 7$ nM

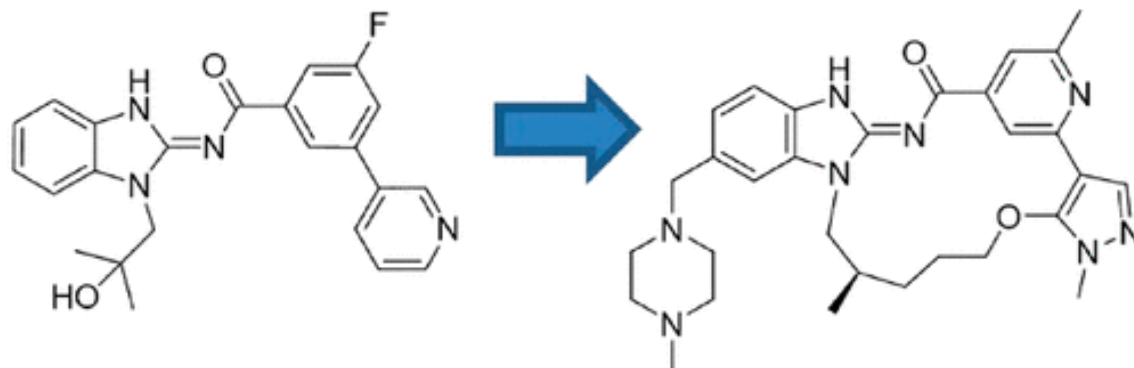
$K_{puu,brain} = 1.3$
 $K_{puu,CSF} = 1.3$
 L858R pEGFR $IC_{50} = 7$ nM

Ζητούμενο: αύξηση της διαπερατότητας των αναστολέων στο ΚΝΣ

Οι μεταστάσεις στο ΚΝΣ είναι συχνές, ενώ οι αναστολείς (πχ gefitinib) δεν διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

ΛΥΣΗ: Αύξηση στερεοχημικής ακαμψίας = εντροπικό κέρδος, με παράλληλη μείωση των διαμοριακών δH

1. Δομική τροποποίηση αναστολέα: Το 2-F του **22** σχηματίζει αντί διαμοριακών, ενδομοριακό δH με το γειτονικό N. Θεαματική βελτίωση της διαπερατότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού.



BI-4020 Potency (IC_{50} p-EGFR^{del19 T790M C797S}):

790 nM

0.6 nM

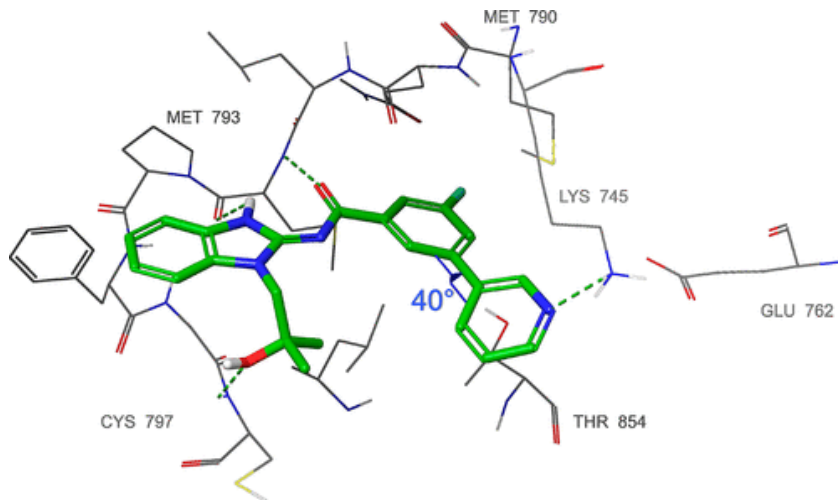
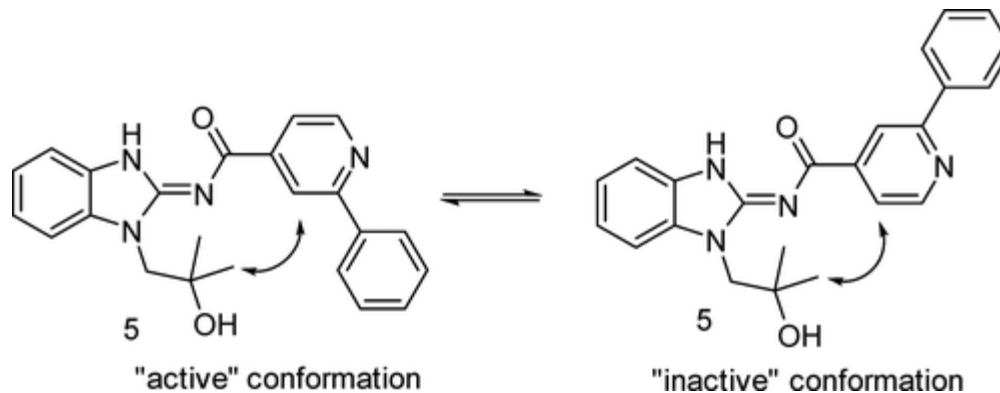
EGFR wt-sparing ratio:

>400

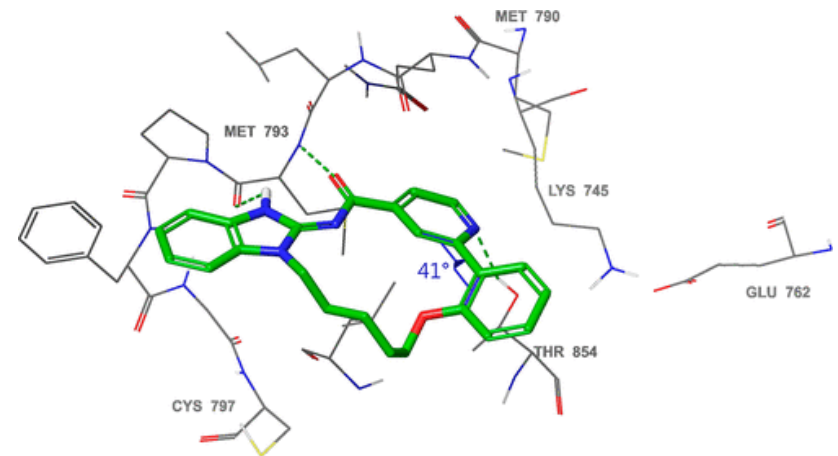
>400

Παράδειγμα με τη δομική τροποποίηση του αναστολέα με σκελετό βενζιμιδαζολίου. Ο μακροκυκλικός αναστολέας (**BI-4020**) είναι εξ ίσου δραστήσιμος με το εγκεκριμένο φάρμακο **Osimertinib** έναντι της τριπλά μεταλλαγμένης EGFR κινάσης, ενώ δεν αναστέλλει τον φυσιολογικό EGFR^{wt}

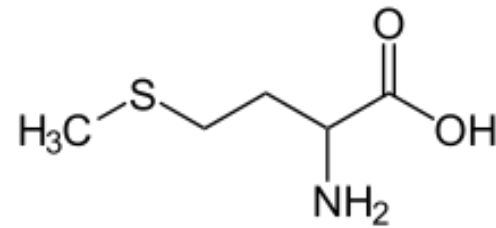
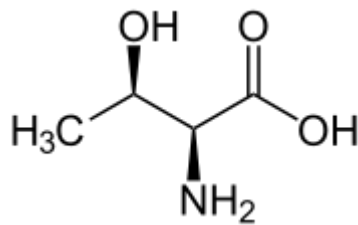
2. Μείωση της ευκινησίας με εισαγωγή μακροκυκλικής δομής: Δομική καινοτομία που μπορεί να επιφέρει βελτίωση της εκλεκτικότητας και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων, μεταξύ άλλων μπορεί να βελτιώσει και τη διαπερατότητα στο ΚΝΣ.



Η κρυσταλλική δομή του αναστολέα υποδεικνύει τη διαμόρφωση που λαμβάνει εντός του ενεργού κέντρου του μεταλλαγμένου ενζύμου: τη γωνία στροφής του διαρυλοϋποκαταστάτη, την απόσταση από γειτονικά αμινοξέα για αποφυγή παρεμπόδισης, τους σημαντικούς δΗ.



Η μακροκυκλική δομή μιμείται και σταθεροποιεί την ενεργή διαμόρφωση του αναστολέα. Η κρυσταλλογραφία επιβεβαιώνει τη προβλεπόμενη υπολογιστικά διαμόρφωση ελάχιστης ενέργειας.



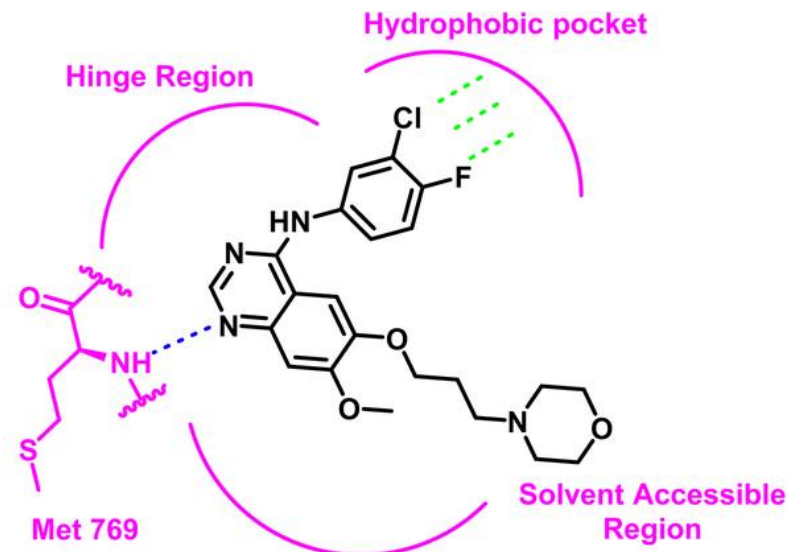
Η μεταλλαγμένη T790M κινάση παραμένει συνεχώς ενεργή.

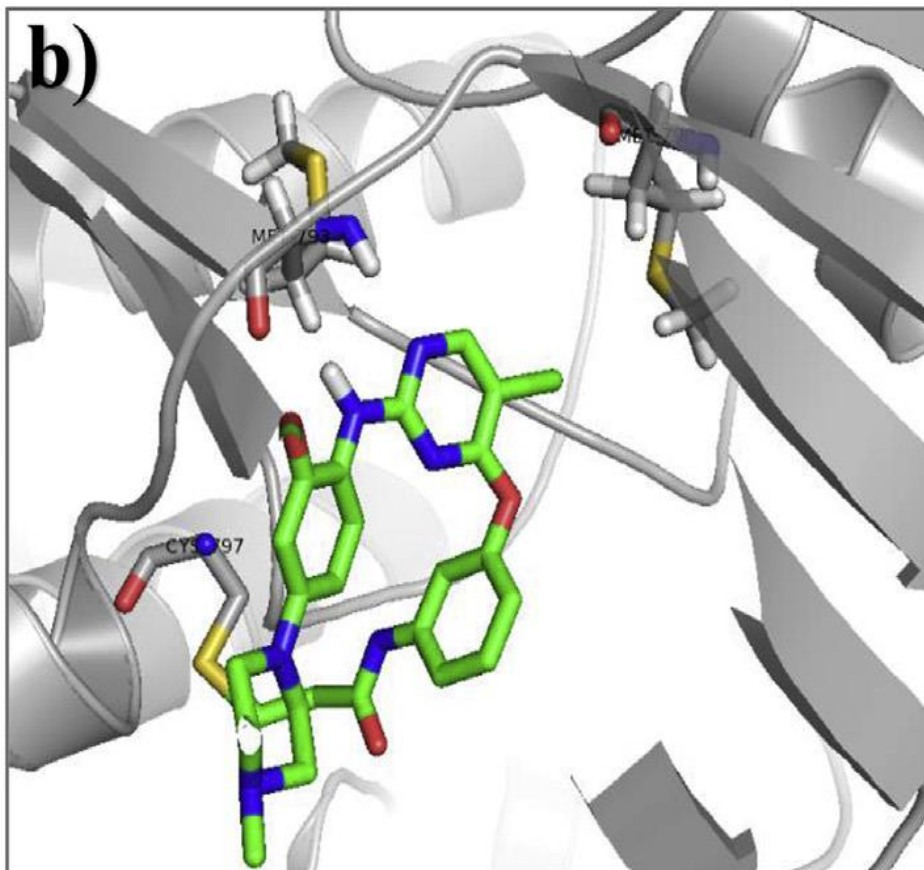
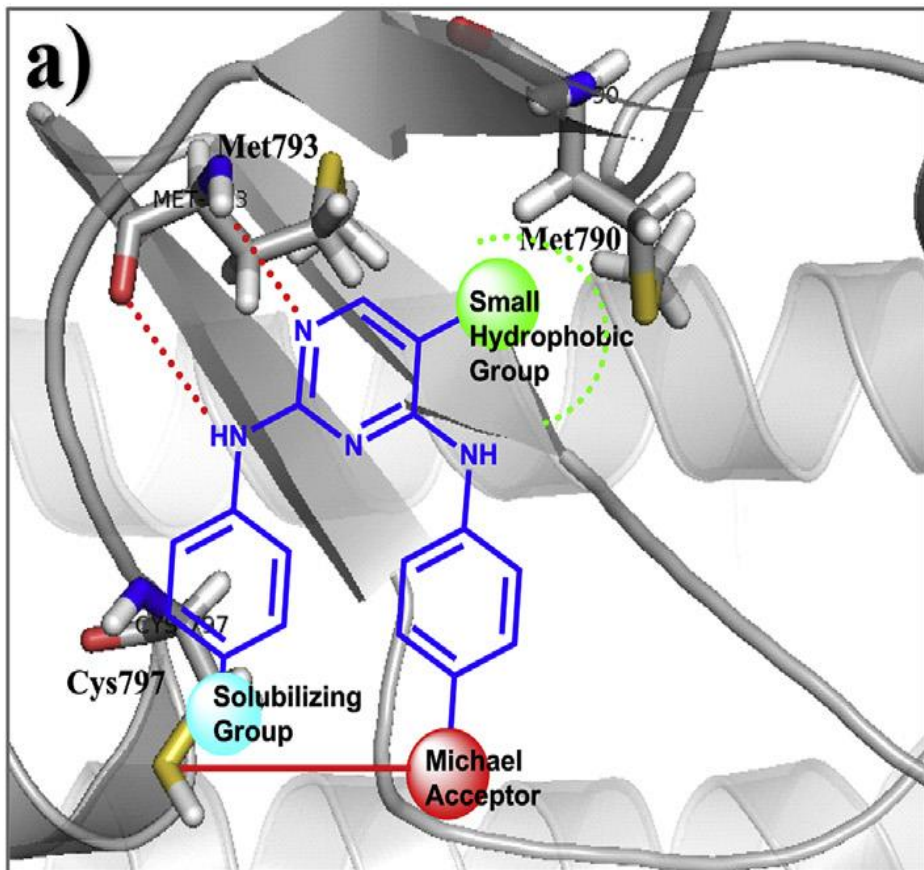
➤ Η Met790 είναι λιπόφιλη: και σταθεροποιεί την aC-in διαμόρφωση

➤ Η Met790 είναι ογκώδης: η 3-υποκατεστημένη ανιλίνη των αμινοκιναζολινών αναπτύσσει υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις κοντά στο αμινοξύ-θυρωρό. Λόγω στεreoχημικής παρεμπόδισης στο μεταλλαγμένο ένζυμο ο αναστολέας λαμβάνει μια λιγότερο ευνοούμενη διαμόρφωση, με αποτέλεσμα σημαντική μείωση της συνάφειας με τη θέση δέσμευσης. Αντίθετα, η συνάφεια του ATP, που δεν αλληλεπιδρά με το αμινοξύ-θυρωρό, όχι μόνο δεν μειώνεται, αλλά αυξάνεται, με αποτέλεσμα τα φάρμακα να μην το ανταγωνίζονται αποτελεσματικά, στις συγκεντρώσεις που αντιστοιχούν στα συνήθη δοσολογικά σχήματα.

Ζητούμενο: αντιμετώπιση της επαγόμενης αντοχής στους αναστολείς της EGFR κινάσης

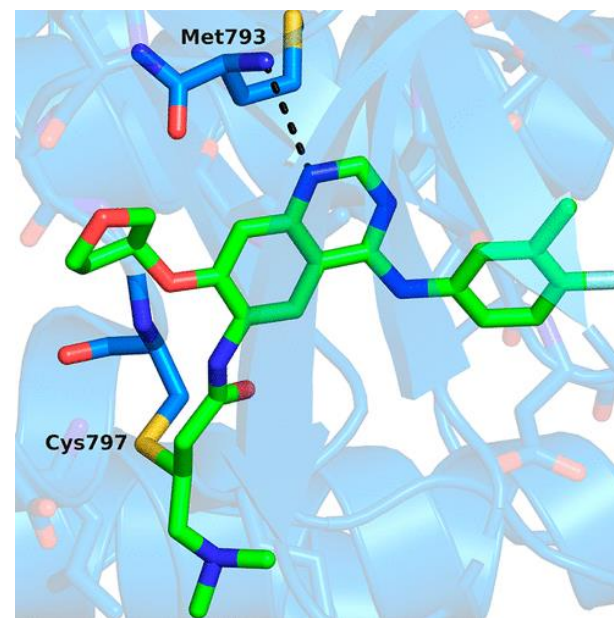
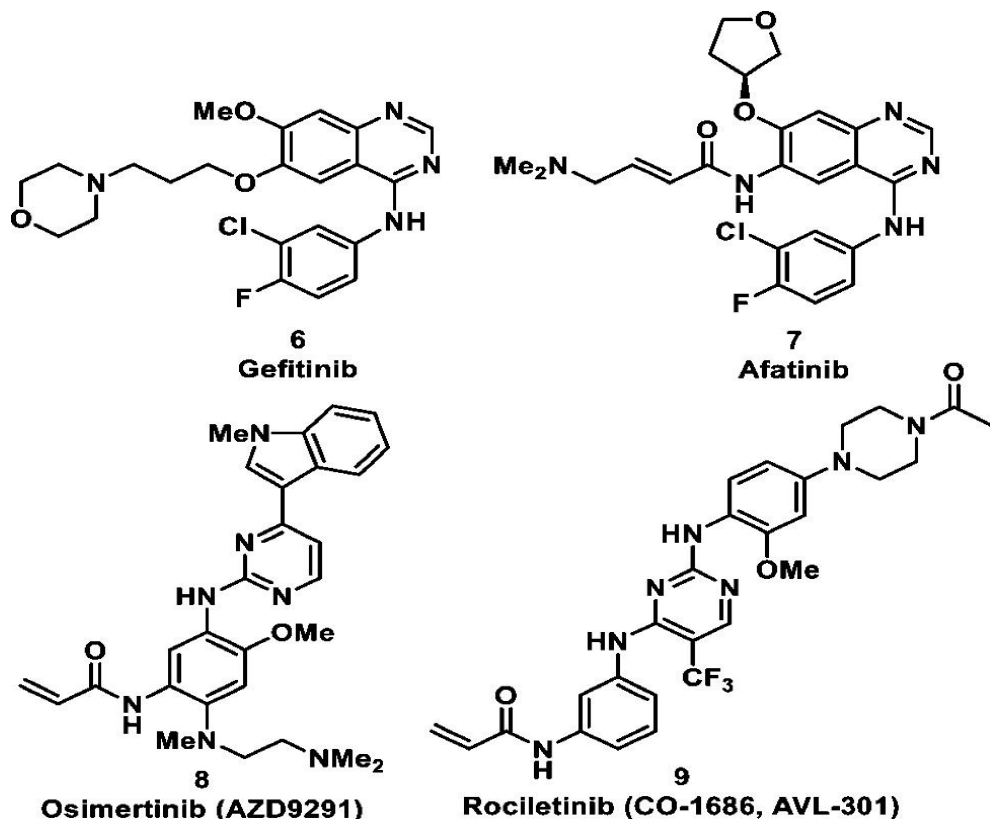
Η αντικατάσταση του αμινοξέος θυρωρού T790M ανιχνεύεται συχνά (στο ~70% των ασθενών) .





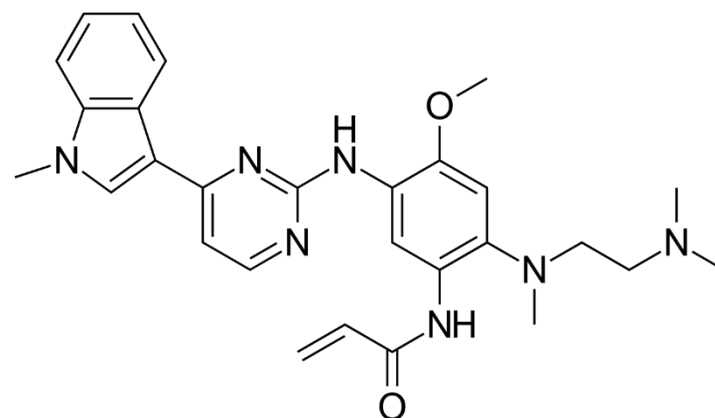
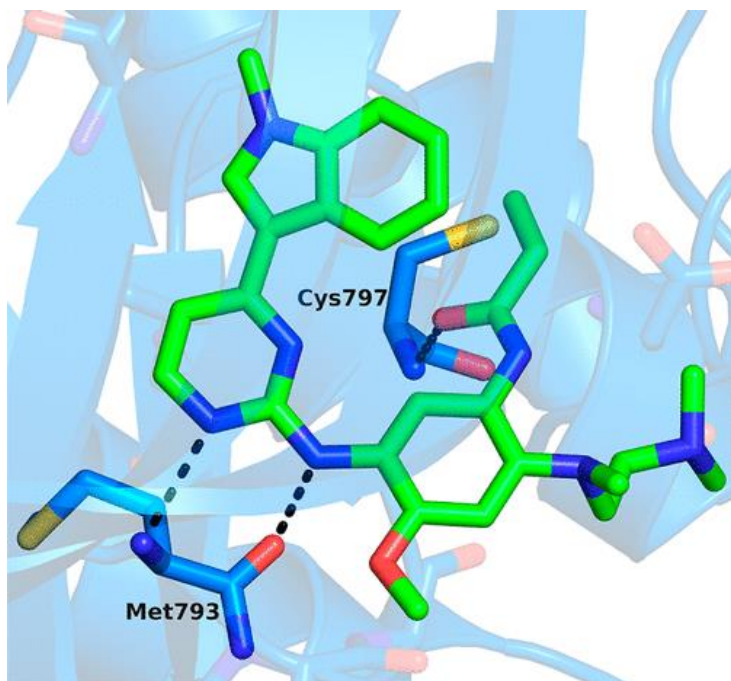
Σχεδιασμός αναστολέων 2^{ης} και 3^{ης} γενιάς

Η παρουσία υπολοίπου Cys στο ενεργό κέντρο του EGFR, σε θέση που εκτείνεται προς τον διαλύτη προσφέρει τη δυνατότητα σχεδιασμού μη αντιστρεπτών αναστολέων, που αφού προσδεθούν στη θέση του ATP (2δH με Met793 της ευκίνητης περιοχής) μπορούν να συνδεθούν μέσω ομοιοπολικού δεσμού με την Cys797 του ενεργού κέντρου.



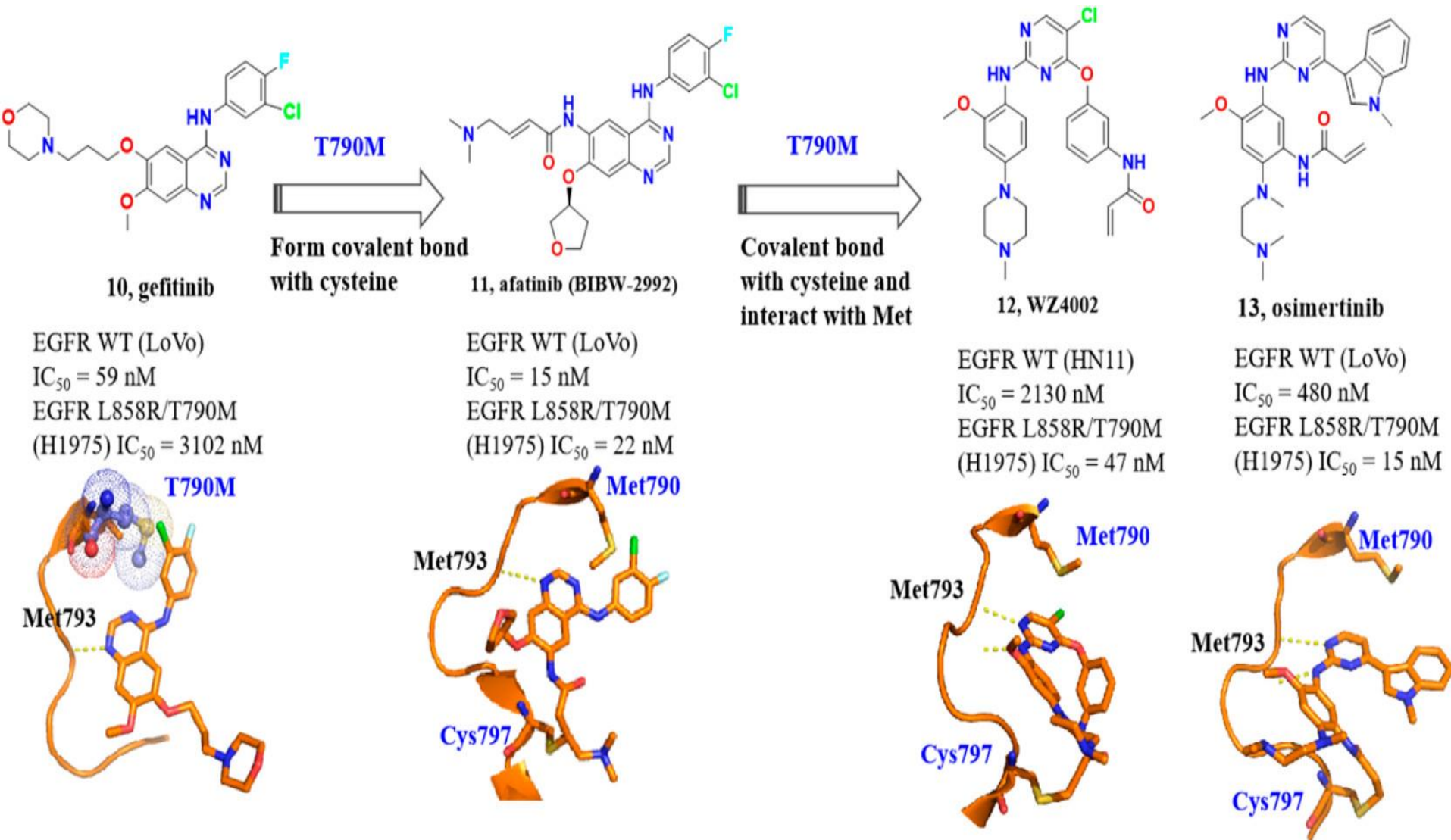
Αναστολείς 2^{ης} γενιάς: αντικατάσταση της μορφολινοπροπυλοξυομάδας του **gefitinib** με διμεθυλαμινοβουτεναμίδιο, που αντιδρά με την **Cys797 του EGFR** (επιβεβαίωση με κρυσταλλογραφία) καταλήγει στην ανακάλυψη μη αντιστρεπτού αναστολέα (**afatinib**).

Όμως, η επιτυχία στα προκλινικά μοντέλλα δεν μεταφράσθηκε σε κλινικό αποτέλεσμα: το φάρμακο είναι αποτελεσματικό μόνο σε δοσολογία που προκαλεί τοξικές παρενέργειες, που οφείλονται στην αναστολή της wtEGFR σε δέρμα και γαστρεντερικό σύστημα.



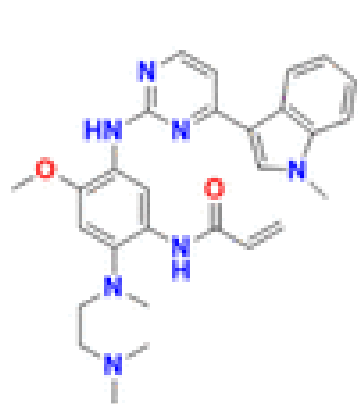
Στους μη αντιστρεπτούς αναστολείς υπάρχει πάντα το ενδεχόμενο ανάπτυξης τοξικότητας.

Οι αναστολείς 3^{ης} γενιάς (osimertinib) σχεδιάσθηκαν με σκοπό την **εκλεκτική αναστολή της μεταλλαγμένης κινάσης**. Πρόκειται για ευκίνητα παράγωγα αμινοπυριμιδίνης, που δεν ενοχλούνται από τη παρουσία του ογκώδους αμινοξέος-θυρωρού και χαρακτηρίζονται από **μείωση της συγγένειας για την wtEGFR** και **αύξηση της συγγένειας για την EGFR T790M** (ανάπτυξη 2 δΗ με την Met793).



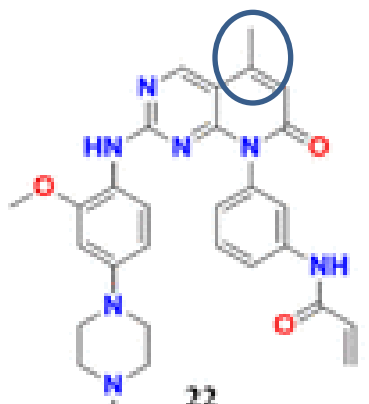
Τα **WZ4002** και **Osimertinib**, **αναστολείς υιοειδούς σχήματος**, συνδέονται ισχυρά με την ανάπτυξη 2 δΗ με την **Met793** της ευκίνητης περιοχής και λιπόφιλων αλληλεπιδράσεων (με τις **Met793** και 790). Το ακρυλαμίδιο προσβάλεται εύκολα από την **Cys797**, με αποτέλεσμα να **αναστέλουν** μη αντιστρεπτά και τα δύο ένζυμα, αλλά **σαφώς ισχυρότερα τη μεταλλαγμένη κινάση**.

Αναστολείς 4^{ης} γενιάς Η αντικατάσταση της κυστεΐνης από τη λιγότερο πυρηνόφιλη σερίνη (EGFR C797S/T790), αποτελεί κοινό μηχανισμό ανάπτυξης αντοχής στους μη αντιστρεπτούς αναστολείς 3^{ης} γενιάς. Οι αναστολείς 4^{ης} γενιάς μπορεί να είναι αντιστρεπτοί ή μη αντιστρεπτοί, αλλά διατηρούν ισχυρές αλληλεπιδράσεις με τα μεταλλαγμένα ένζυμα: το 5-CH₃, και το 6-χλωροφθοροβενζόλιο στο 23 αλληλεπιδρούν με τη Met 790.



21, osimertinib

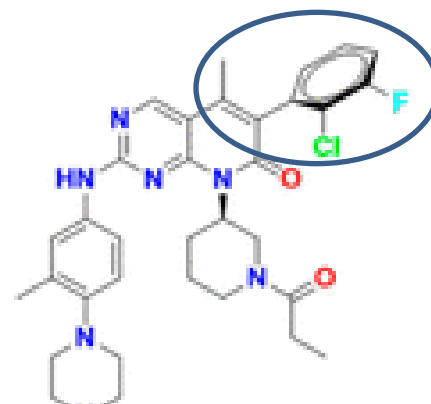
EGFR L858R/T790M/C797S IC₅₀ = 27.5 nM



22

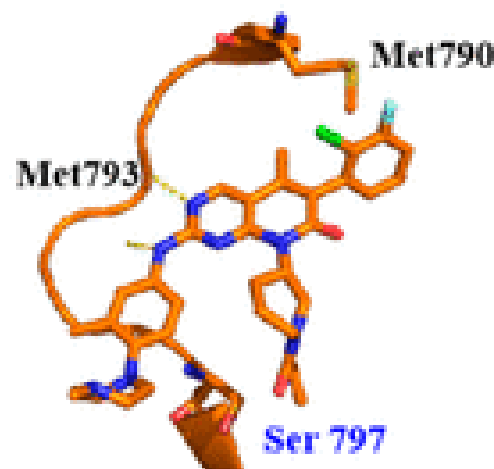
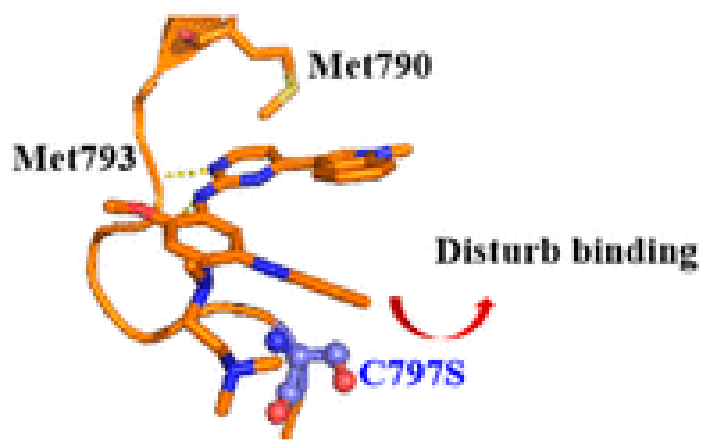
C797S

Reversible binding type

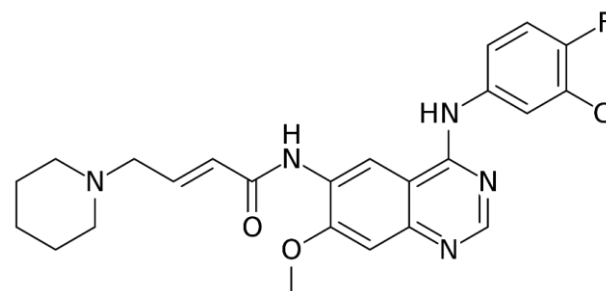
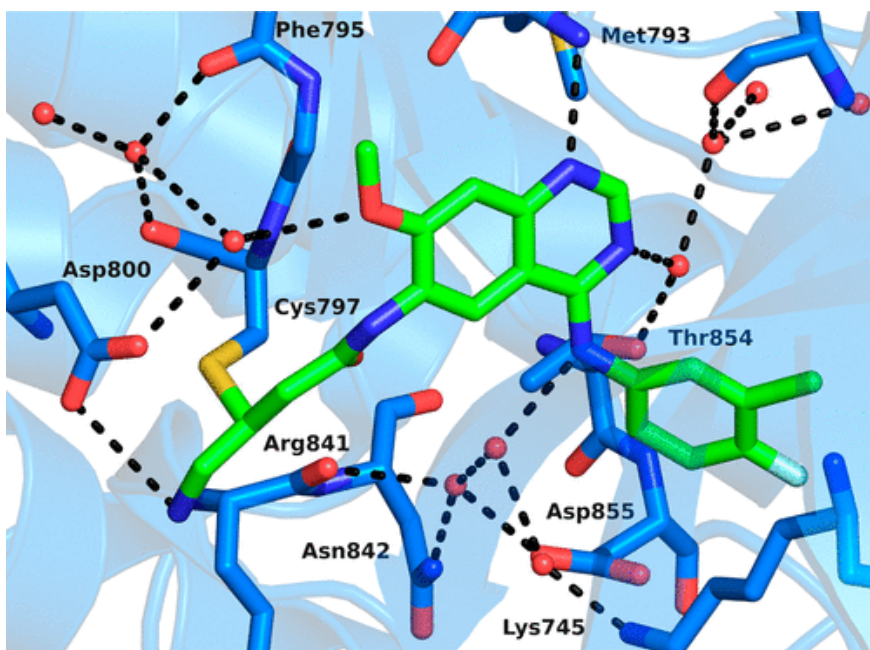


23

EGFR L858R/T790M/C797S IC₅₀ = 27.5 nM

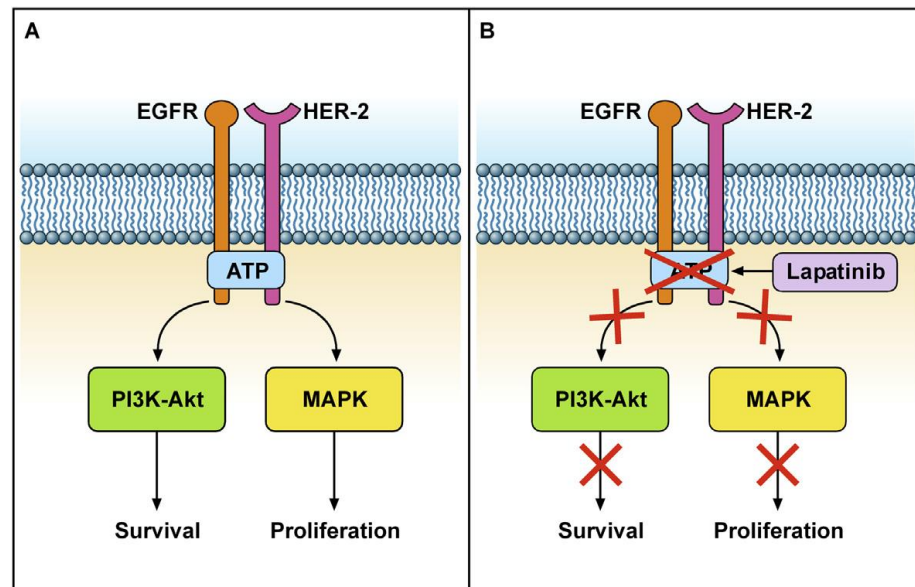
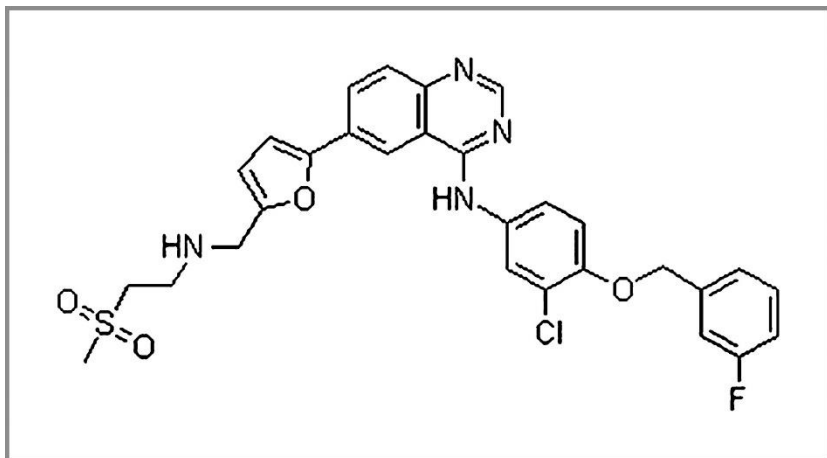


Μη αντιστρεπτός αναστολέας 4^{ης} γενιάς: Dacomitinib. Αναστέλλει όλα τα μέλη της οικογένειας HER και πολύ εκλεκτικά τον μεταλλαγμένο EGFR. Δρα αρχικά ως αναστολέας τύπου II, που σταθεροποιεί τη ανενεργό διαμόρφωση της κινάσης. Διακρίνεται ο τρόπος σύνδεσης στην ευκίνητη περιοχή, με τη συμμετοχή μορίων νερού (κόκκινες σφαίρες).



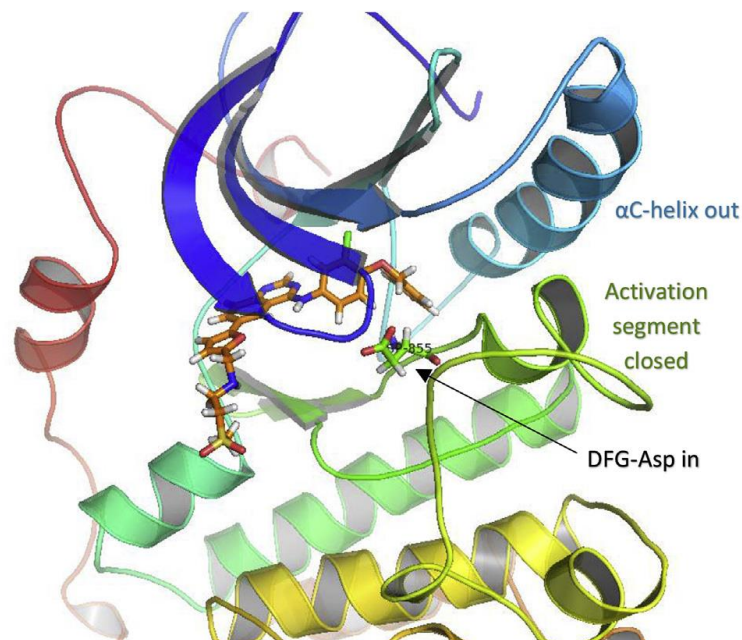
Όλοι οι αναστολείς 4^{ης} γενιάς ελέγχονται για την αποτελεσματικότητά τους σε ασθενείς, σε συνάρτηση με το **θεραπευτικό εύρος**: θεωρούνται ασφαλή τα φάρμακα αν παρουσιάζουν περιορισμένες και μη σημαντικές παρενέργειες (περιορισμένο ερύθημα, διάρροια).

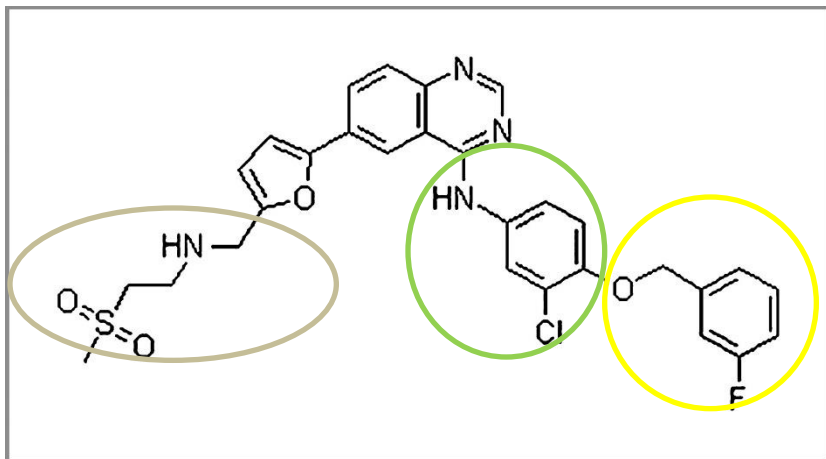
Άλλες λύσεις: αλλοστερικοί αναστολείς, PROTACS, συνδυαστικά σχήματα. Αντιμετώπιση της ενεργοποίησης άλλων μιτωτικών μονοπατιών (activation of by-pass RTK signalling).



Η οικογένεια EGFR σχηματίζει συχνά κατά την ενεργοποίηση της ασύμμετρα διμερή, στα οποία το ένα πρωτομερές παίζει το ρόλο ενεργοποιητή, ενώ το δεύτερο δέχεται την ενεργοποίηση. Ο αC-έλικας τοποθετείται κοντά στη μεσεπιφάνεια του διμερούς και παίζει βασικό ρόλο στην αλληλεπίδραση.

Το **Lapatinib**, είναι διπλός EGFR/HER2 αναστολέας, που εγκρίθηκε για τη θεραπεία καρκίνων μαστού.





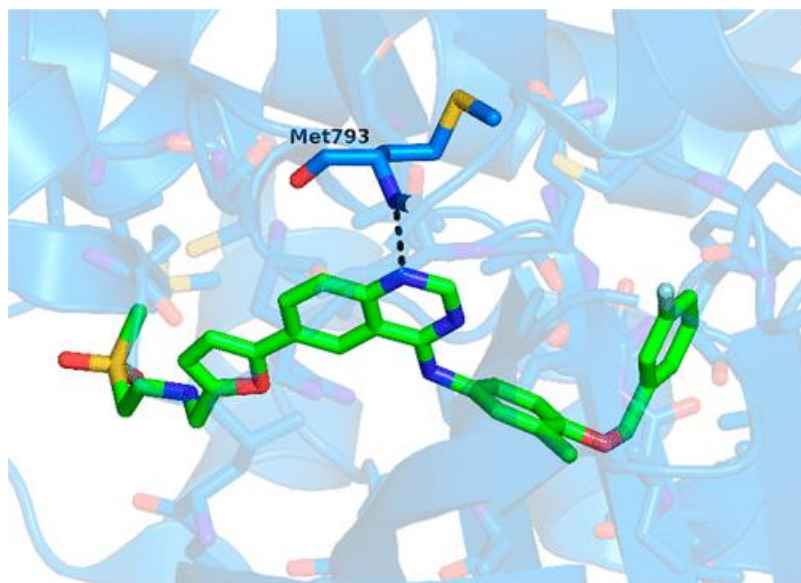
Το **Lapatinib** είναι **αναστολέας τύπου I1/2**.

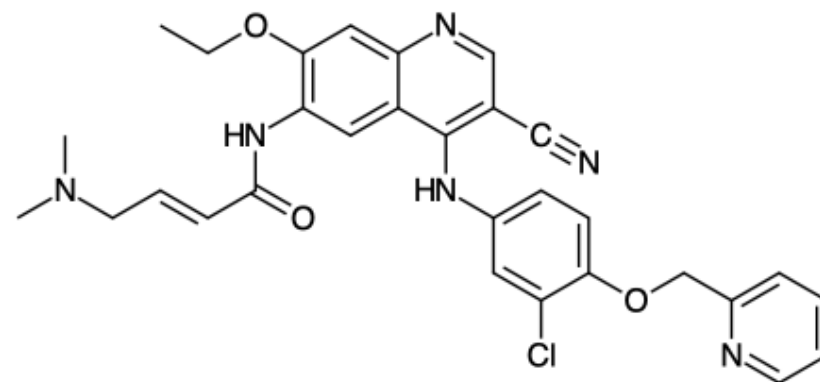
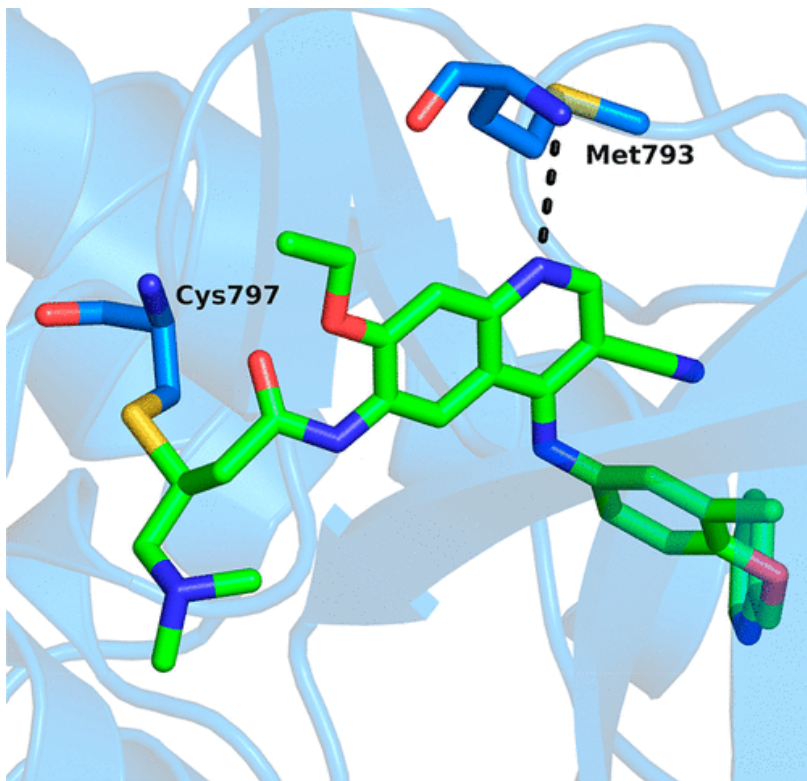
Το κιναζολινικό N1 σχηματίζει δH με το NH της Met793.

Ο ογκώδης 3-φθοροβενζυλοξυ-υποκαταστάτης δεσμεύεται στη δευτερεύουσα λιπόφιλη κοιλότητα και σταθεροποιεί την ανενεργή διαμόρφωση (DFG-in, αC-out) της κινάσης.

Δεν είναι ξεκάθαρο αν η πρόσδεση του φαρμάκου μετατοπίζει την αC έλικα, ή αν απλώς σταθεροποιεί την ανενεργή αC-out διαμόρφωση της (πιθανότερο το δεύτερο).

Η πολική μεθυλοσουλφονυλαιθυλμίνη εκτείνεται προς τον διαλύτη και συνεισφέρει στην υδατοδιαλυτότητα.



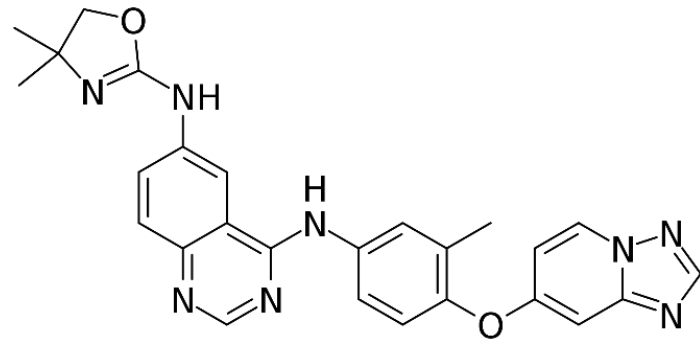


Neratinib

Neratinib Μη αντιστρεπτός HER2 αναστολέας που παρουσιάζει δομικά χαρακτηριστικά των αναστολέων T790M του EGFR. Εκτός του EGFR αναστέλλει και τον HER2 σταθεροποιώντας την ανενεργή μορφή της κινάσης και σχηματίζοντας ομοιοπολική σύνδεση με την Cys805 κοντά στην HER2 θέση πρόσδεσης του ATP.

Tucatinib Εκλεκτικός αναστολέας του HER2 ($IC_{50} = 6.9 \text{ nM}$), αναστέλλει λιγότερο ισχυρά τον EGFR ($IC_{50} = 449 \text{ nM}$).

Χορηγείται από το στόμα και πλεονεκτεί έναντι των **lapatinib** και **neratinib** που αναστέλλουν εξ ίσου τις κινάσες HER2 and EGFR.



Η εκλεκτική αναστολή του HER2 προκαλεί σημαντική μείωση του μεγέθους των όγκων σε πειραματόζωα, ενώ μειώνονται σημαντικά και οι παρενέργειες (ναυτία, διάρροια, κόπωση, ερύθημα κλπ)

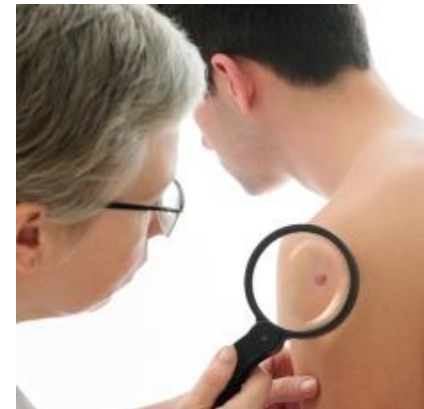
Θεραπευτική αντιμετώπιση του κακοήθους μελανώματος

Ανάπτυξη του Vemurafenib

Προέρχεται από μελανοκύτταρα και είναι υπεύθυνο για το 75% των θανάτων από δερματικούς καρκίνους

160.000 νέα κρούσματα κατ' έτος

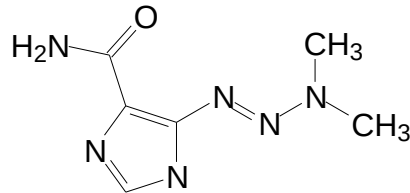
Κατάταξη σε στάδια I-IV ανάλογα με την μακροσκοπική εικόνα, το βαθμό διείσδυσης/διάχυσης στο δέρμα και της εξάπλωσης στους ιστούς.



Η χειρουργική αντιμετώπιση είναι αποτελεσματική σε εστιασμένη περιοχή του δέρματος.

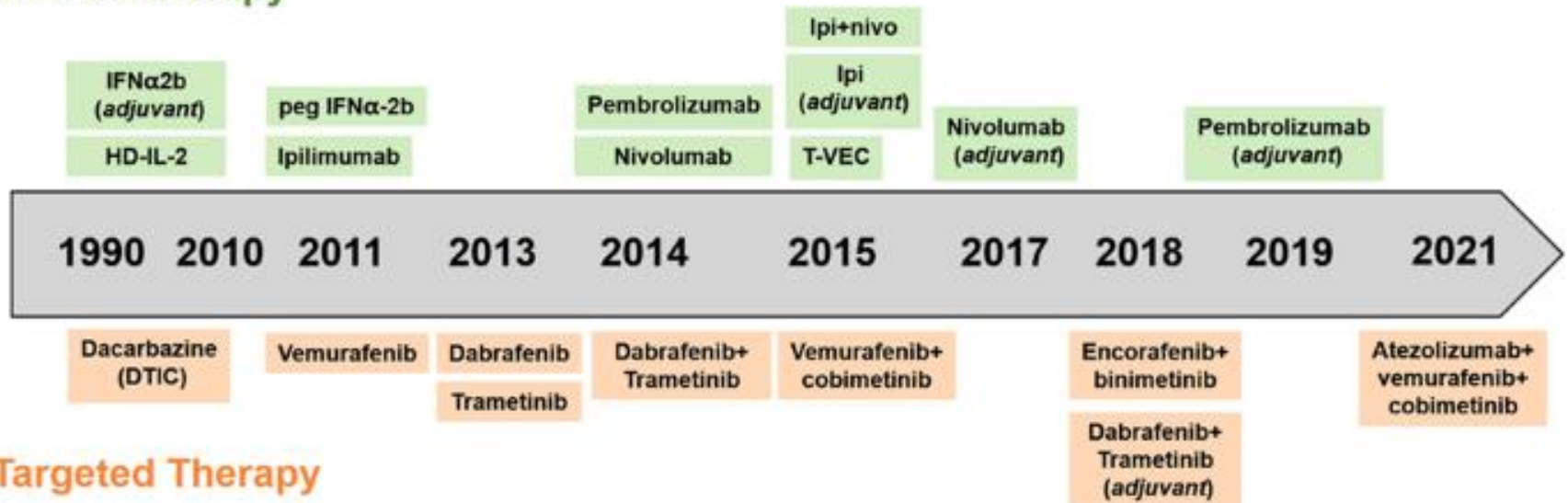
Η φαρμακευτική αγωγή ποικίλει, ανάλογα με το στάδιο της ασθένειας.

dacarbazine

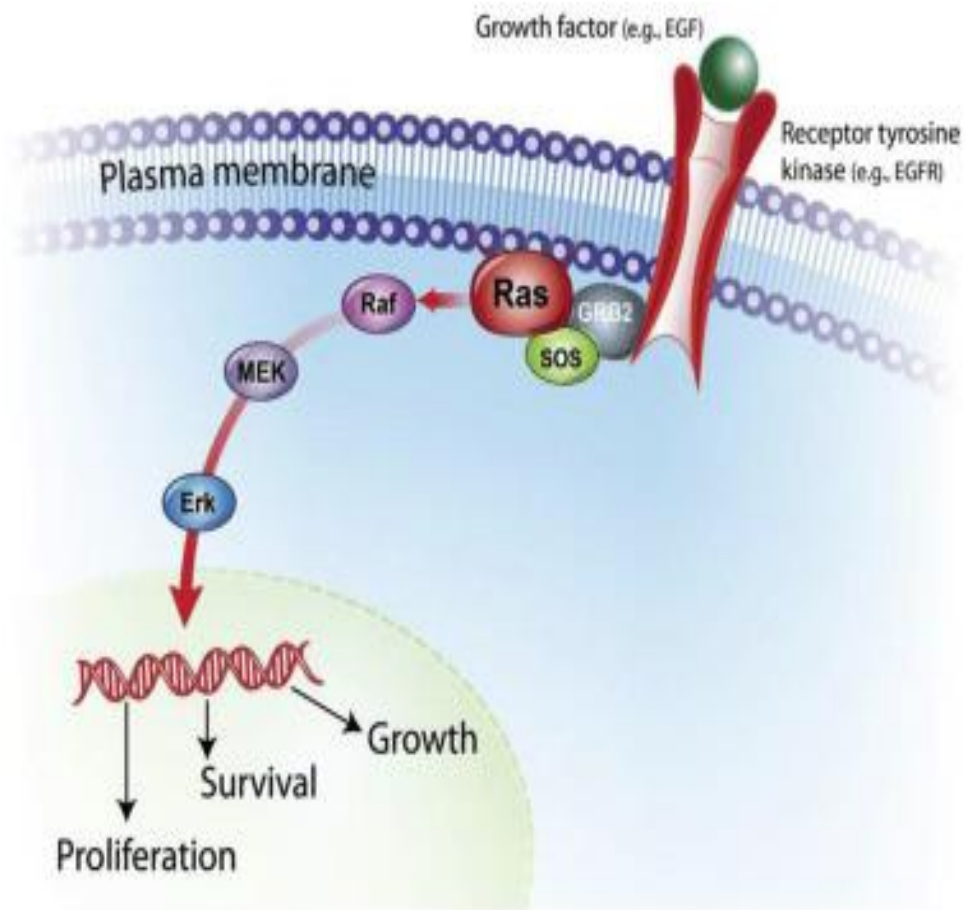


Η θεραπευτική αντιμετώπιση βασίζεται στην ταυτοποίηση μεταλλάξεων σε γονίδια, που κωδικοποιούν κυρίως τη σηματοδότηση μέσω MAPKs (επαγόμενη αύξηση της κυτταρικής διαίρεσης, διαφυγή απόπτωσης κλπ) και την εφαρμογή κατάλληλων αναστολέων.

Immunotherapy



Το σηματοδοτικό μονοπάτι των μιτωτικών κινάσεων MAPK (mitogen-activated protein kinases) RAS-RAF-MEK-ERK ελέγχει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η δέσμευση του προσδέματος σε υποδοχείς (RTKs) ενεργοποιεί τις πρωτείνες SOS και τη πρόσδεση GTP στις Ras GTPάσες. Η ενεργοποίηση αυτή **μετακινεί τα ετεροδιμερή RAF/MEK προς τη κυτταρική μεμβράνη, όπου σχηματίζονται προσωρινά τετραμερή, με τον διμερισμό των RAF να διευκολύνει τον ομοδιμερισμό των MEK.** Ακολούθως, οι RAF ενεργοποιούν τις κινάσες MEK και ακολούθως τις ERK, και τους downstream στόχους.

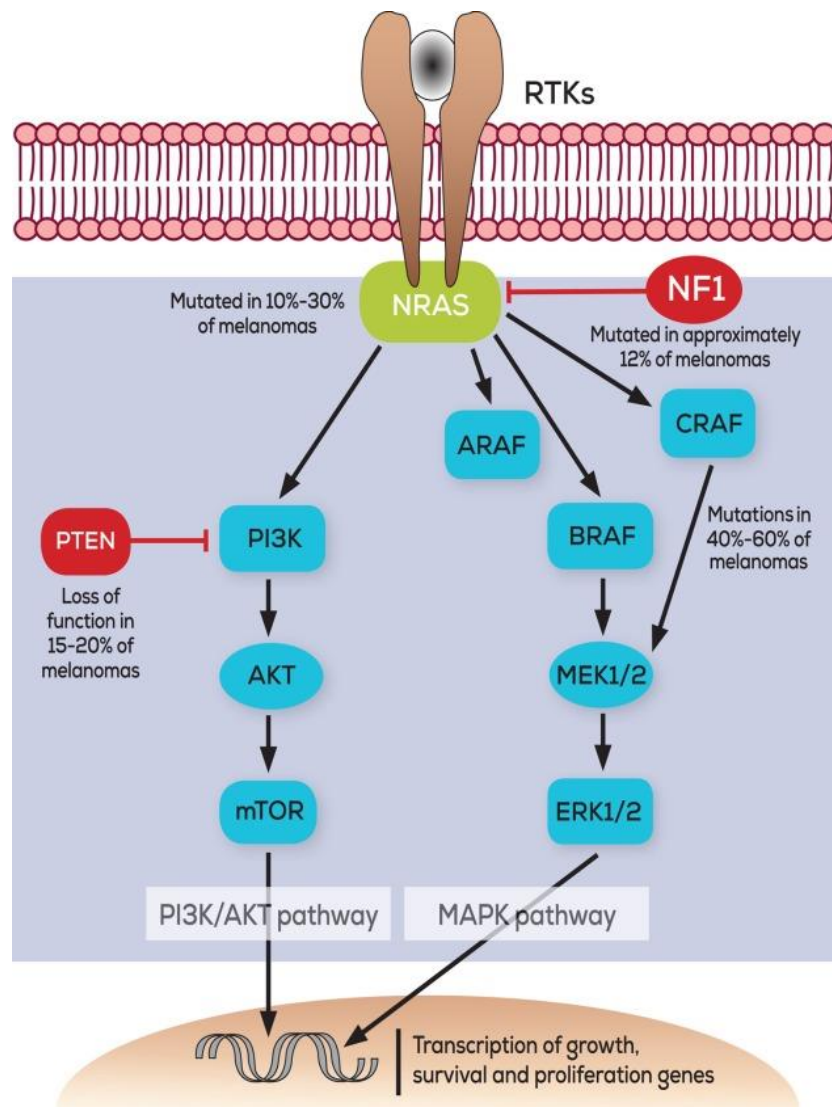


Η **RAF** (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma) είναι κινάση σερίνης/θρεονίνης που ανακαλύφθηκε ως **ογκογόνος κινάση** ρετροϊών, που προκαλεί σάρκωμα μαλακών μορίων.

Όταν ενεργοποιηθεί ομο- ή ετεροδιμερίζεται.

Γενετικές αλλαγές στο μελάνωμα κατατάσσονται σε 4 κατηγορίες

mutations on
NRAS
MAPK
PI3K/AKT



mutations on
c-KIT

PI3K/AKT

mutations on

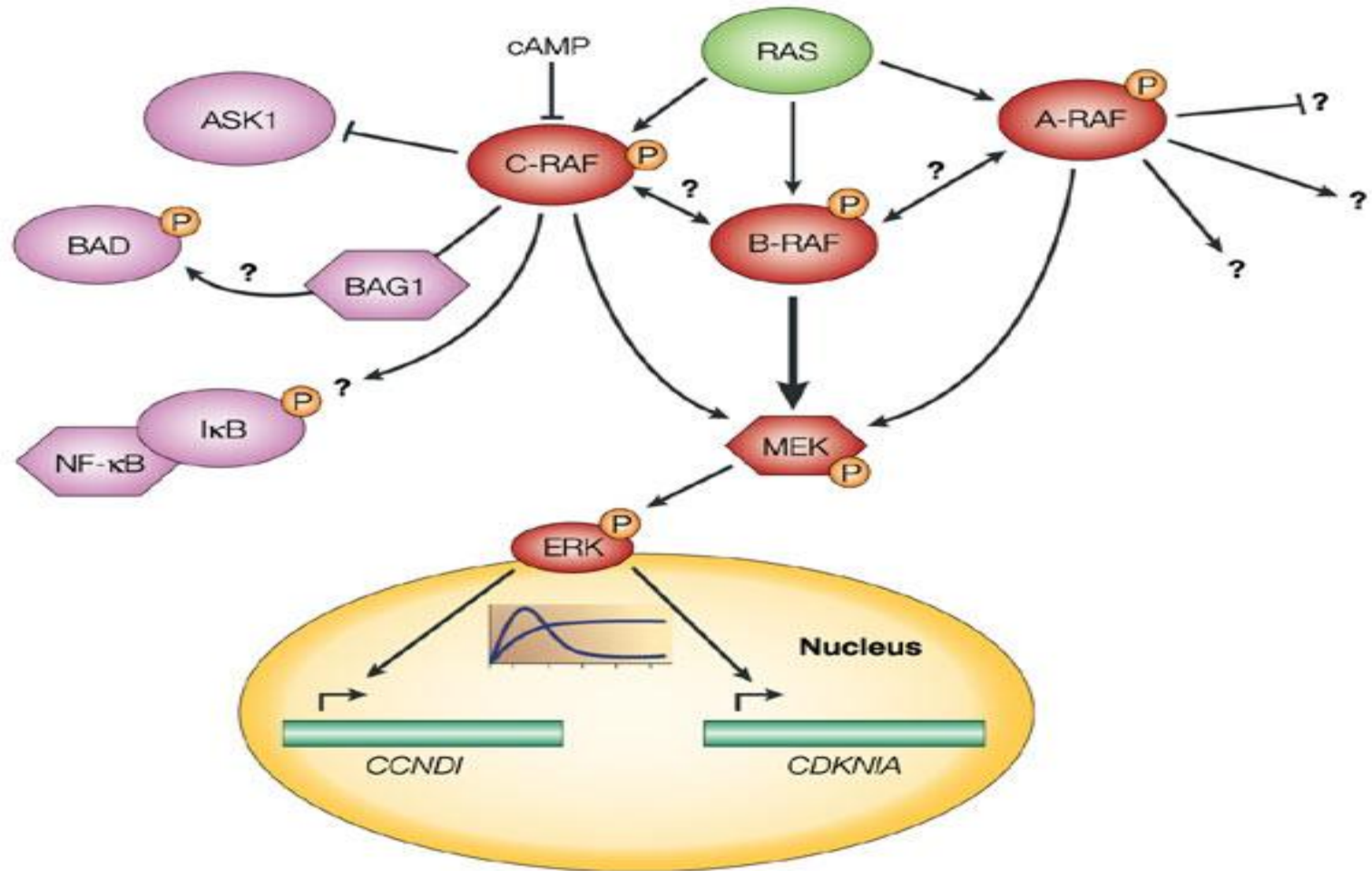
NF1

MAPK

mutations on
MAPK

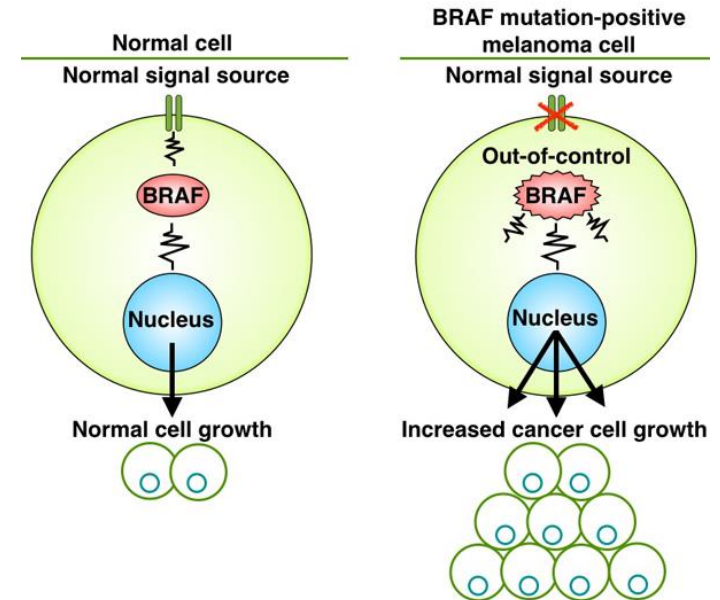
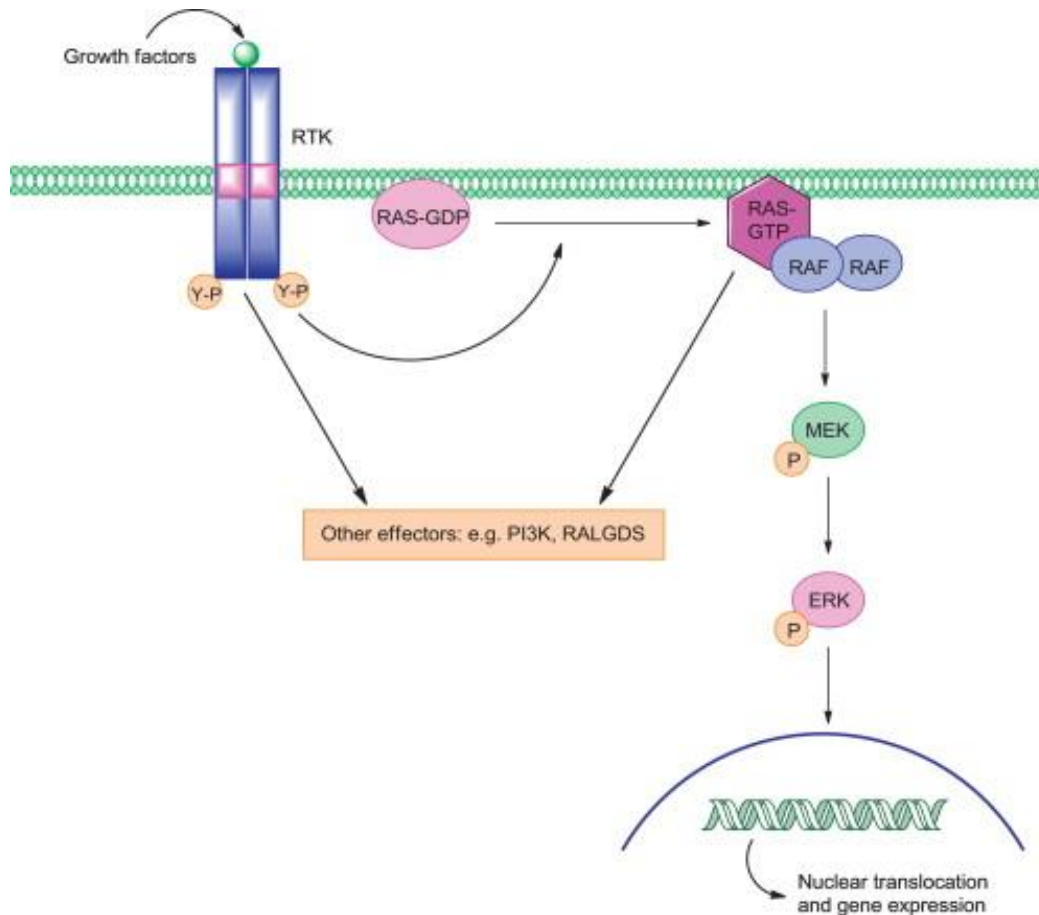
RAS/RAF/MEK/ERK

Η αναστολή της RAS είναι δύσκολος στόχος. Η οικογένεια RAF περιλαμβάνει τρεις ισομορφές, A-, B- και C-RAF. Συχνότερα μεταλλάσσονται οι B-RAF.



Μεταλλάξεις του γονιδίου της B-Raf κινάσης αναγνωρίστηκαν στο 70% των περιστατικών μελανώματος.

Η ογκογόνος μεταλλαγμένη B-Raf παρουσιάζεται, με χαμηλότερη συχνότητα και σε άλλους τύπους καρκίνου, θυρεοειδούς (30-50%), παχέος εντέρου (5-20%) και ωοθηκών (~30%).



Braf^{wt} → B-Raf^{V600E} Η πιο συχνή μετάλλαξη (στο 90% των ενεργοποιητικών παρεκκλίσεων της B-Raf) αφορά την αντικατάσταση της **υδρόφοβης βαλίνης 600** από το **υδρόφιλο γλουταμινικό οξύ**:

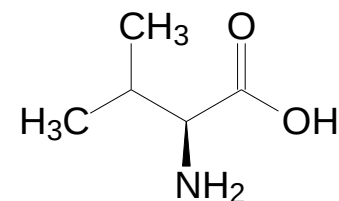
Η μετάλλαξη εμποδίζει τη λήψη ανενεργής διαμόρφωσης, με αποτέλεσμα **τη μόνιμη ενεργοποίηση της κινάσης** = φωσφορυλίωση των downstream κινασών ERK1 και ERK2, επαγωγή του κυττ. πολλαπλασιασμού και αποφυγή απόπτωσης

Λιγότερο συχνές μεταλλάξεις (απαντούν στο μελάνωμα):

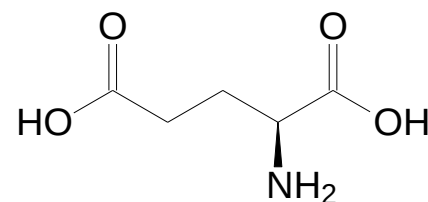
V600K (λυσίνη, ~15%)

V600R (αργινίνη ~3%)

V600D (ασπαρτικό οξύ, ~3%)



valine

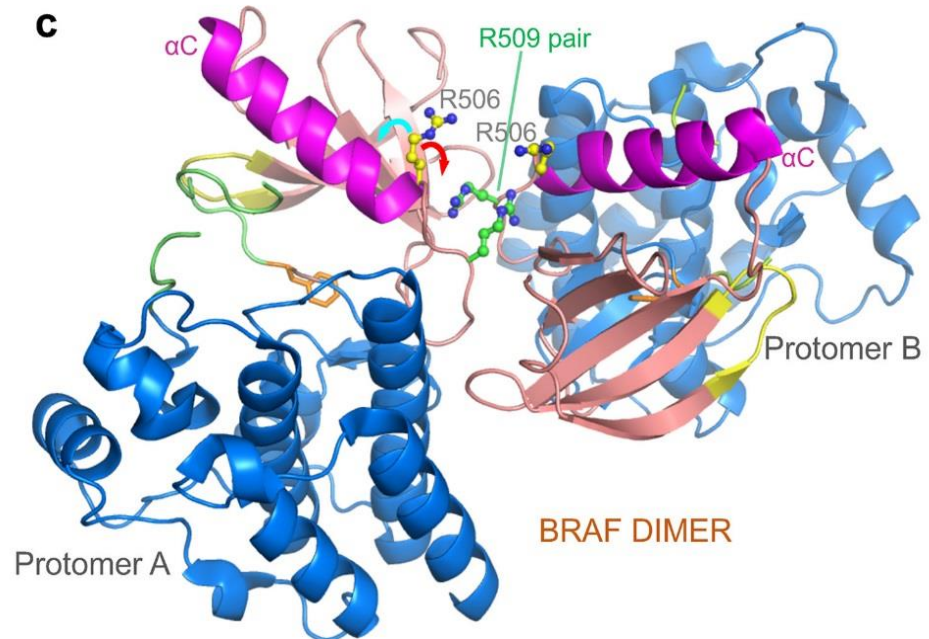
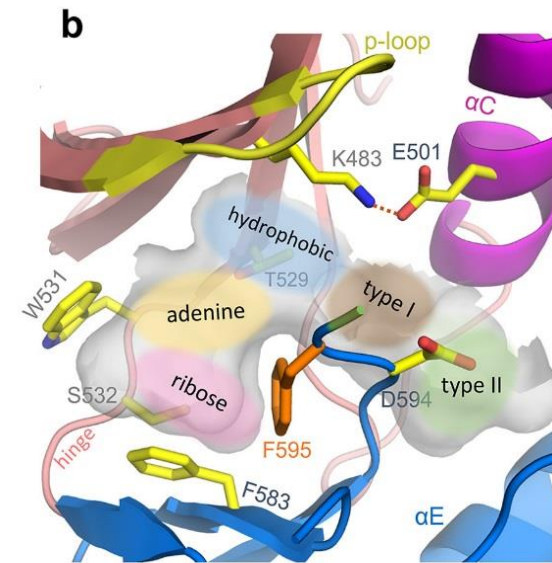
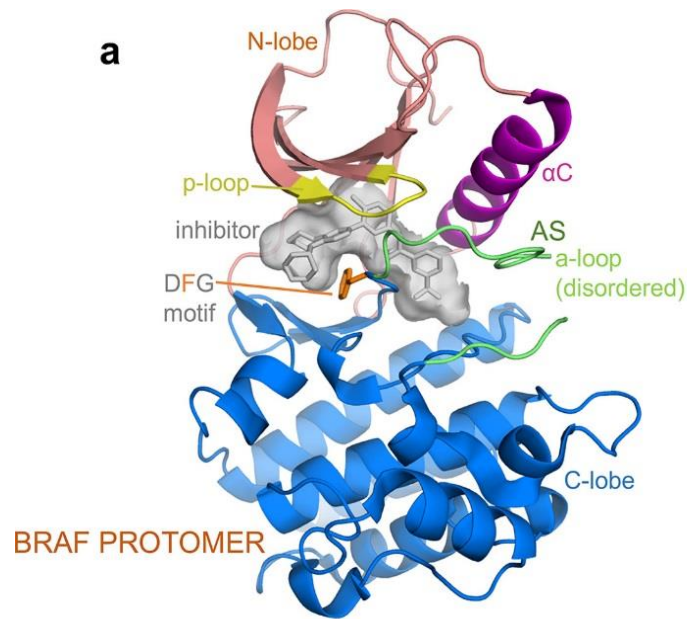


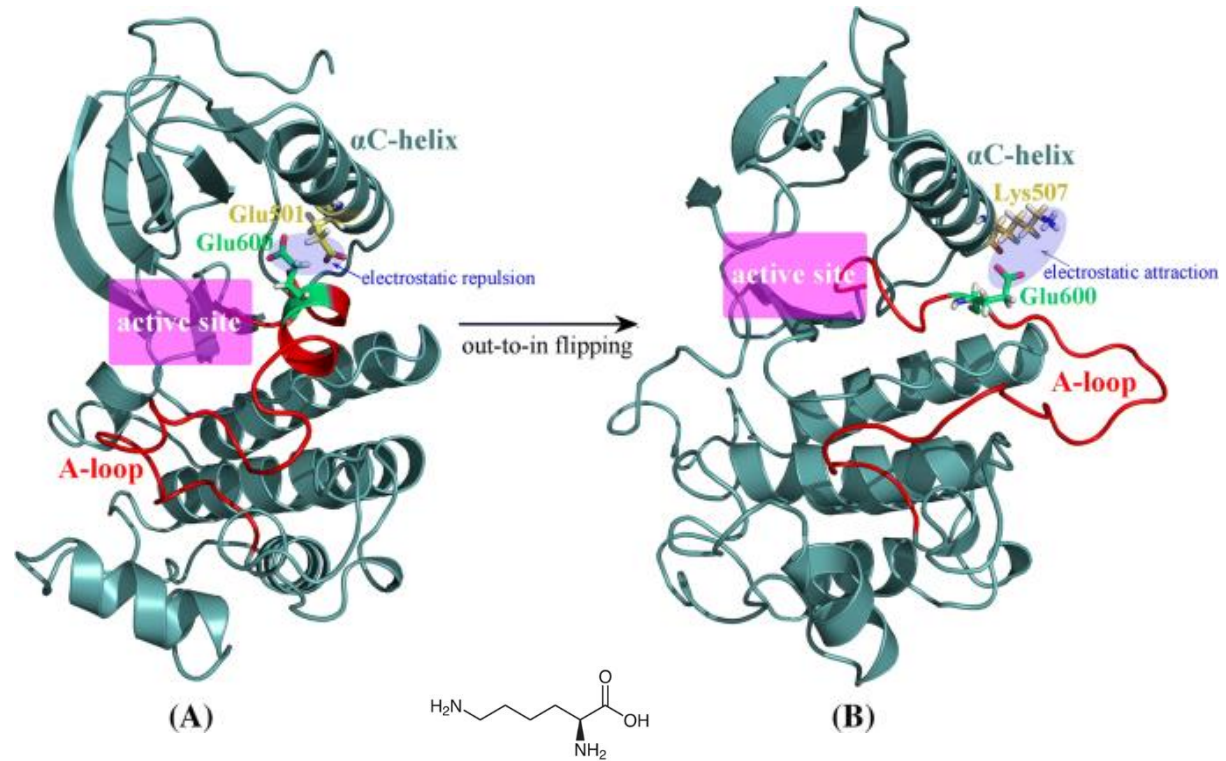
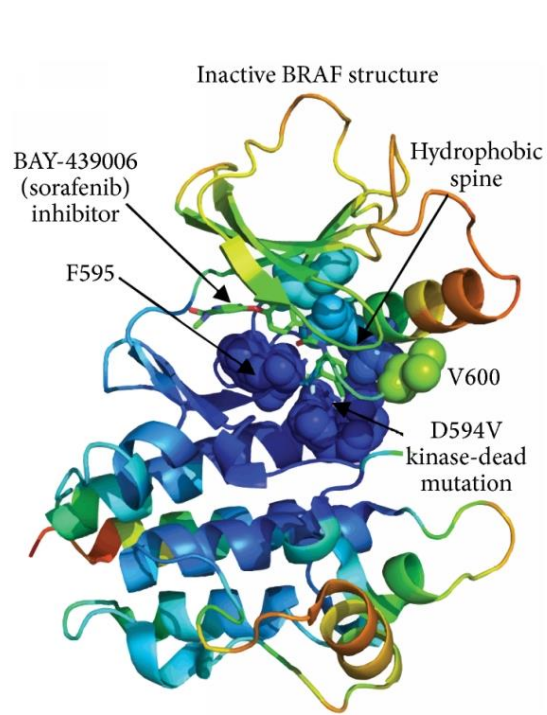
glutamic acid

Η αναστολή της μεταλλαγμένης B-Raf^{V600E} αποτελεί παράδειγμα **στοχευμένης θεραπευτικής προσέγγισης**.

Η **BRAF^{WT}** ενεργοποιείται μετά από αλληλεπίδραση με την RAS και διμερισμό της: σχηματίζει **ομοδιμερή BRAF:BRAF** ή **ετεροδιμερή BRAF:CRAF**, που σταθεροποιούνται με ισχυρές αλληλεπιδράσεις τύπου Van der Waals κυρίως μεταξύ δύο υπολοίπων αργινίνης (R506 και R509) των καρβοξυτελικών άκρων.

Αντίθετα, η μεταλλαγμένη κινάση **BRAF^{V600E}** μπορεί να σηματοδοτήσει και ως μονομερές σε κύτταρα με χαμηλά επίπεδα RAS σημάτων και μάλιστα χωρίς negative feedback έλεγχο από τις ERK.



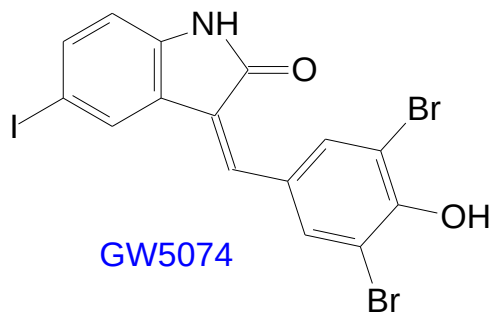


Στην $BRAF^{WT}$ η V600 σχηματίζει ισχυρές λιπόφιλες αλληλεπιδράσεις που σταθεροποιούν την ανενεργή αC-out διαμόρφωση. Για να ενεργοποιηθεί η κινάση πρέπει να φωσφορυλιωθεί το OH της Ser599, που σχηματίζει ισχυρό δεσμό άλατος με μια θετικά φορτισμένη λυσίνη (Lys507) του αC έλικα σταθεροποιώντας την ενεργή διαμόρφωση, οπότε ακολουθεί ο διμερισμός του ενζύμου και η φωσφορυλίωση της MEK.

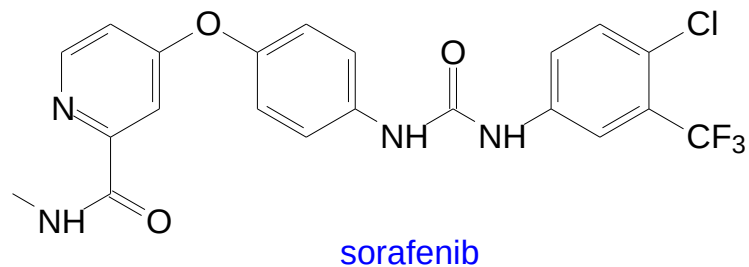
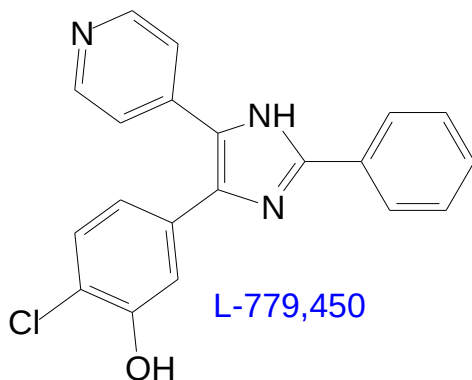
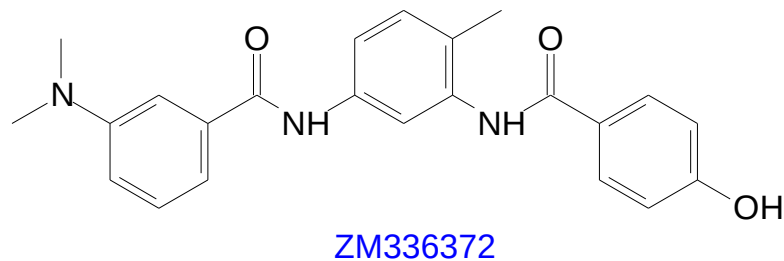
Στην $BRAF^{V600E}$ η Val600 αντικαθίσταται από το φορτισμένο στο φυσιολογικό pH Glu που μιμείται επιτυχώς τη φωσφορική ομάδα της Ser 599 και ευνοεί τη λήψη ενεργής αC-in διαμόρφωσης.

Σημαντικότεροι RAF αναστολείς προ του 2005

p/s CRAF inhibitor
(IC₅₀: 9nM)

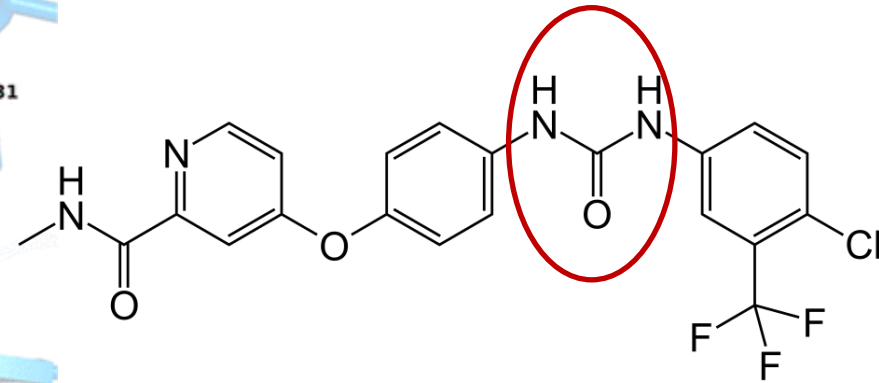
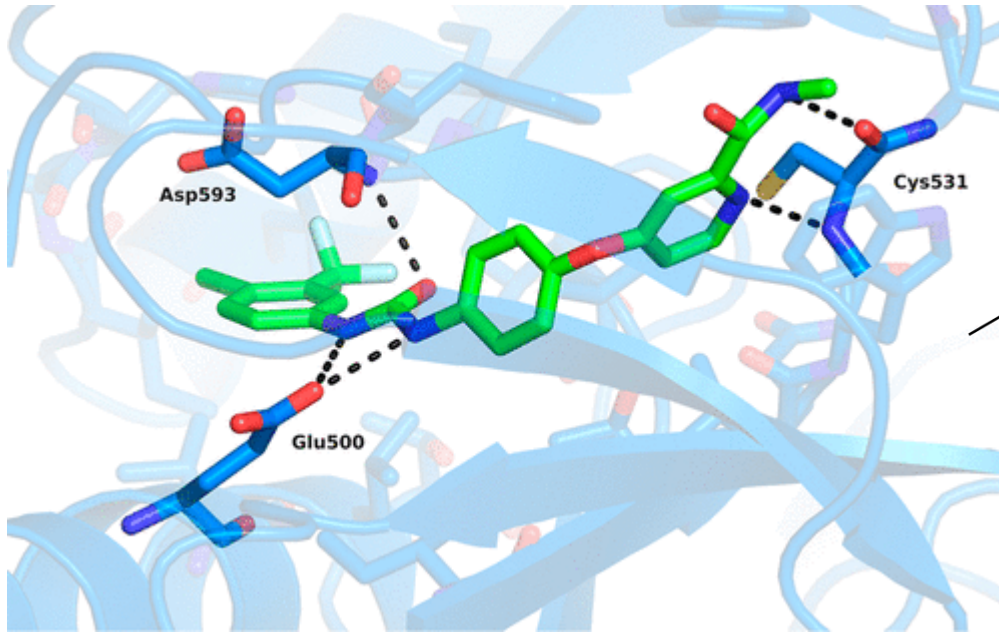


p/s CRAF inhibitor
(IC₅₀: 70nM)



p ARAF inhibitor
(IC₅₀: 10nM)

multikinase αναστολέας
τύπου II
(mutant BRAF IC₅₀: 38nM)



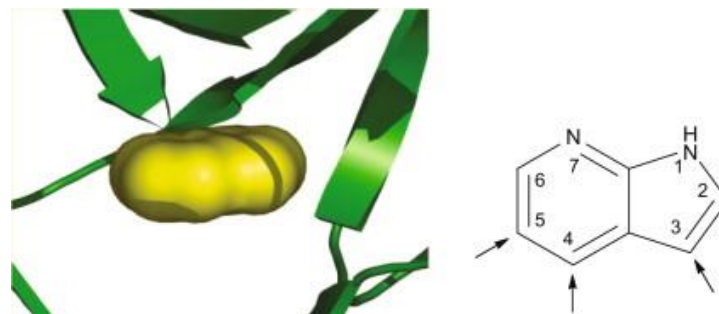
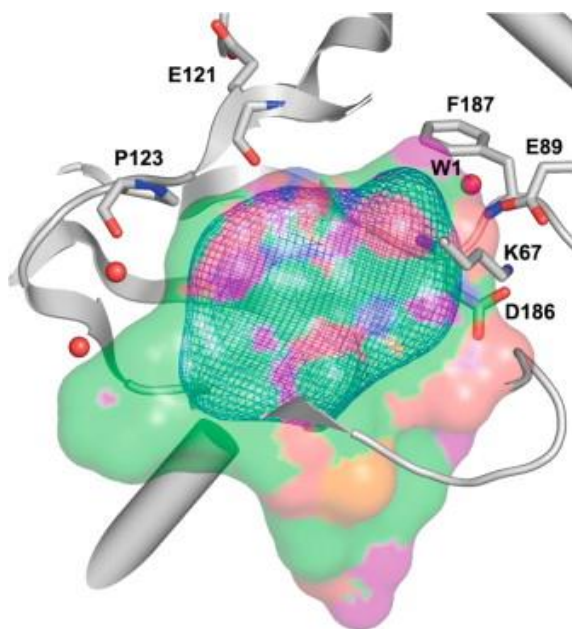
Η ομάδα ουρίας του **Sorafenib** αλληλεπιδρά με τη θέση πρόσδεσης του ATP και με το **DGF-Asp593** ενώ ο πυριδινικός δακτύλιος εισέρχεται στη δευτερεύουσα κοιλότητα σταθεροποιώντας την ανενεργή **DFG out** διαμόρφωση.

fragment-based approaches τακτική που βασίζεται στον συνδυασμό δύο ξεχωριστών τμημάτων που δεν δεσμεύονται πολύ ισχυρά στο ένζυμο, με σκοπό τη λήψη ενός μεγαλύτερου παραγώγου με βελτιωμένες θερμοδυναμικές παραμέτρους.

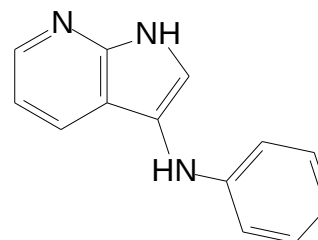
scaffold-based approach παρεμφερής τρόπος σχεδίασης που χρησιμοποιεί μεγαλύτερα από τα συνηθισμένα fragments και χημικά scaffolds στα οποία προσθέτει functional groups ικανά για την ανάπτυξη αλληλεπιδράσεων με τη πρωτεΐνη-στόχο

Βιοχημικός έλεγχος 20.000 μορίων σε υψηλές συγκεντρώσεις, έναντι αρκετών μελών μιας συγκεκριμένης οικογένειας κινασών και κατόπιν συγκρυστάλλωση των δραστικών μορίων με τις μελετώμενες πρωτεΐνες.

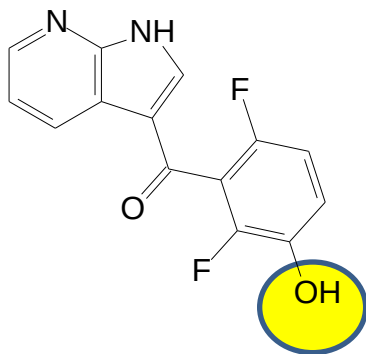
Ανακάλυψη του 7-αζαϊνδολίου ως ένωσης-οδηγού για **scaffold-based approach** συγκρυστάλλωση με την Pim-1.



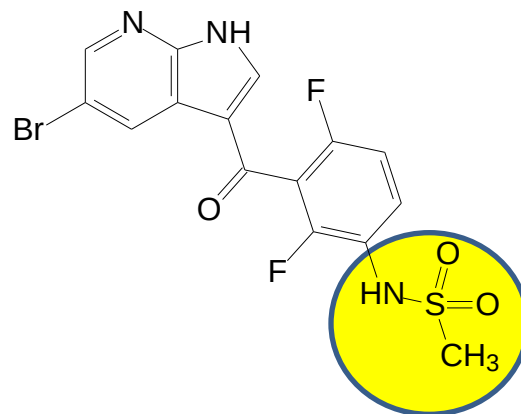
Pim-1 $IC_{50} > 200 \mu M$



Pim-1 $IC_{50} \sim 100 \mu M$

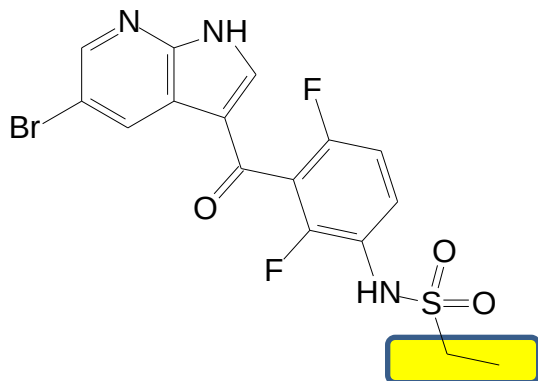


διφθοροφαινόλη
Δημιουργία δ.Η με ATP binding pocket

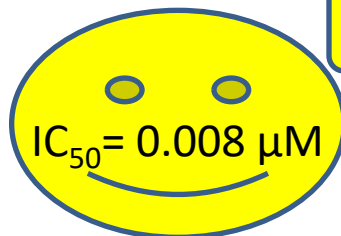
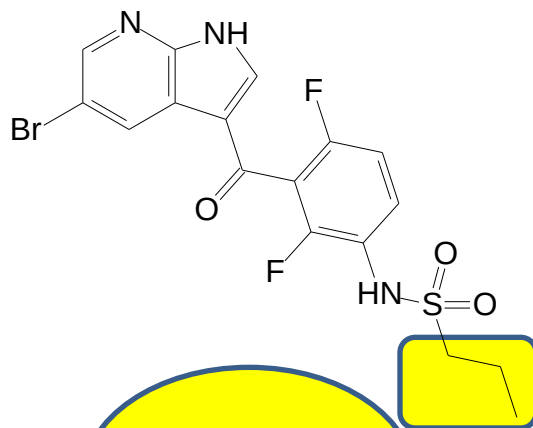


Μεταβολική σταθεροποίηση
Βιοϊσοστερής αλλαγής ($IC_{50} = 0.22 \mu M$)

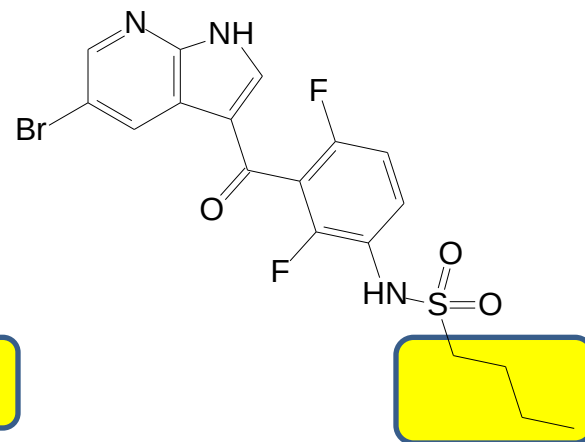
Lead optimization



$IC_{50} = 0.11 \mu M$

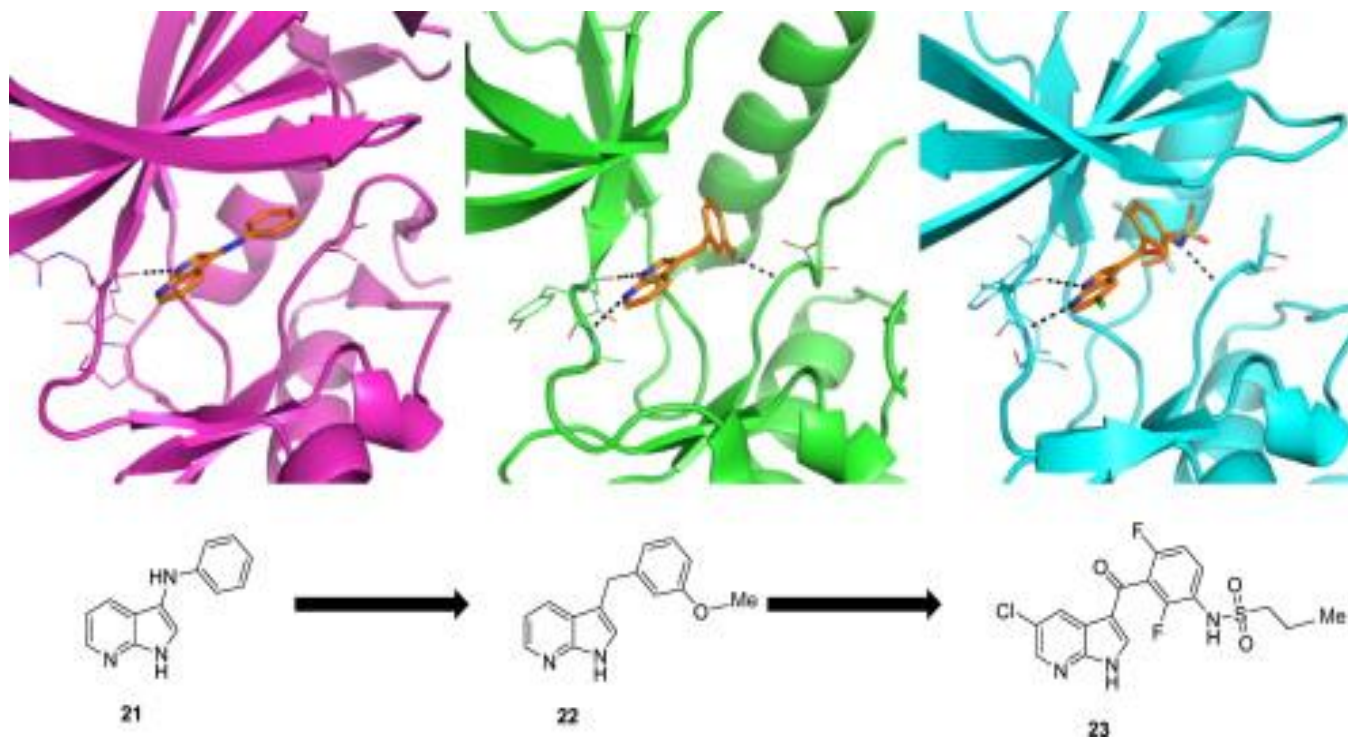


$IC_{50} = 0.008 \mu M$

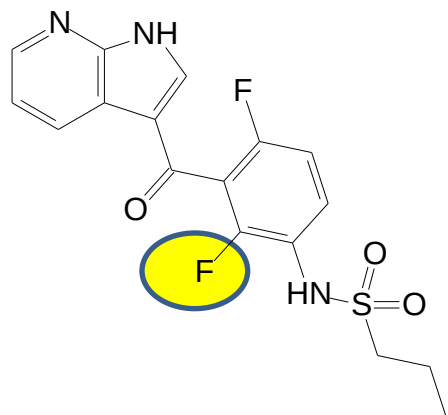


$IC_{50} = 0.02 \mu M$

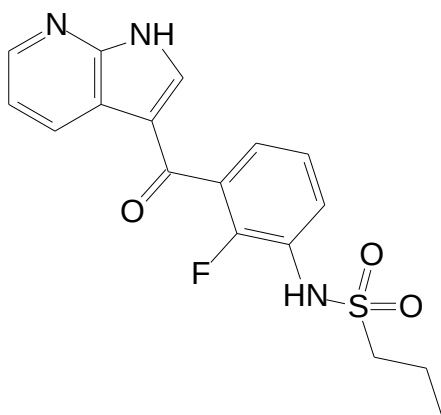
Οι σχέσεις δομής-δράσης επαληθεύονται με κρυσταλλογραφία



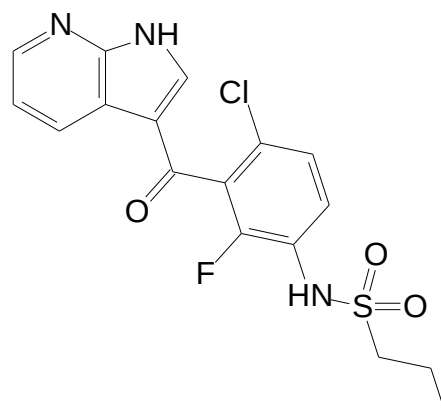
(A) Κρυσταλλογραφική απεικόνιση του 3-αμινοφαινυλο-7-αζαινδολίου (**21**) εντός της PIM-1 κινάσης. (B) Κρυσταλλογραφική απεικόνιση του 3-(3-μεθοξυβενζυλο)-7-αζαινδολίου (**22**) εντός της κινάσης FGFR1. (C) Κρυσταλλογραφική απεικόνιση του PLX4720 (**23**) εντός της B-Raf κινάσης.



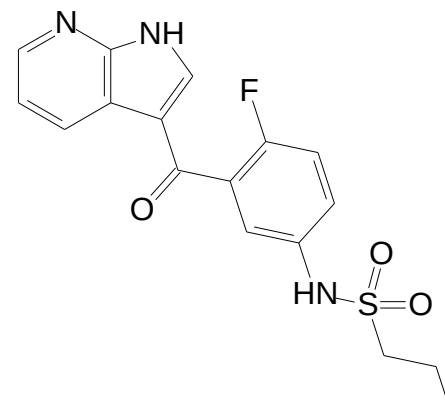
$IC_{50} = 0.11 \mu M$



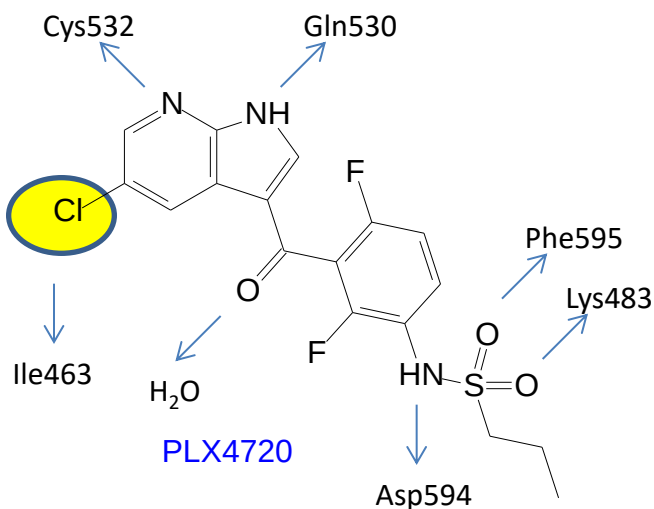
$IC_{50} = 0.68 \mu M$



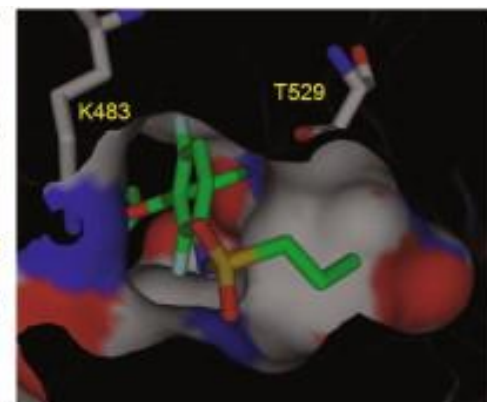
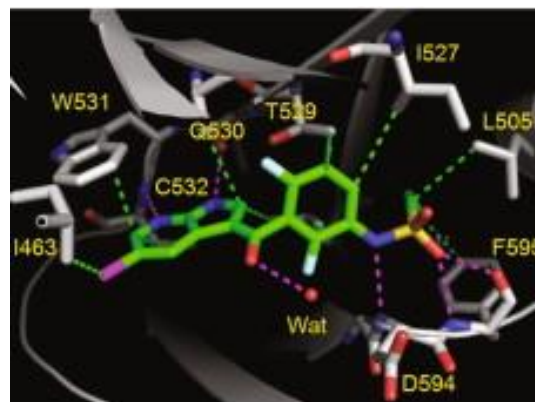
$IC_{50} = 0.24 \mu M$



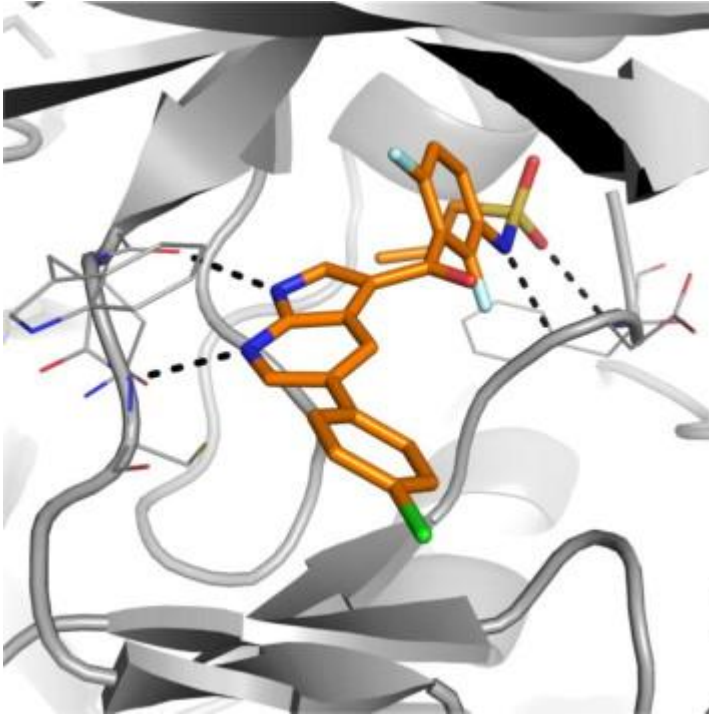
$IC_{50} > 10 \mu M$



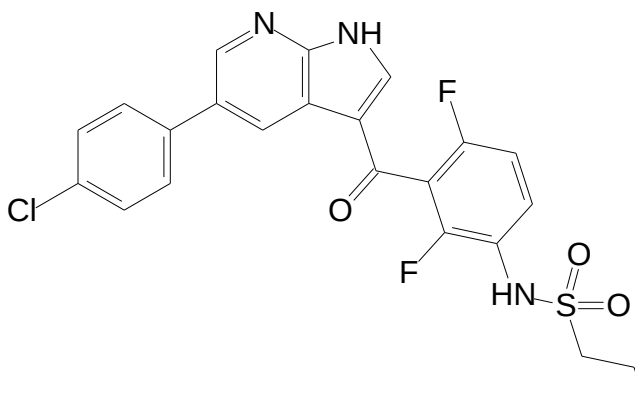
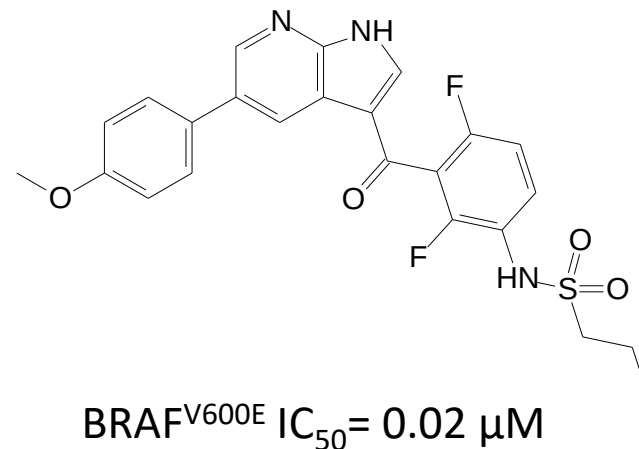
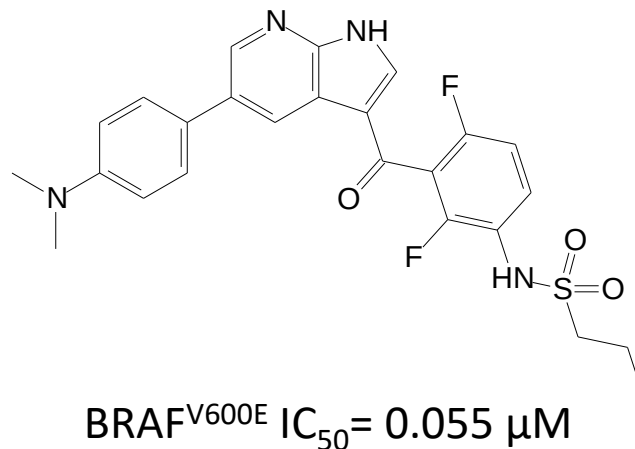
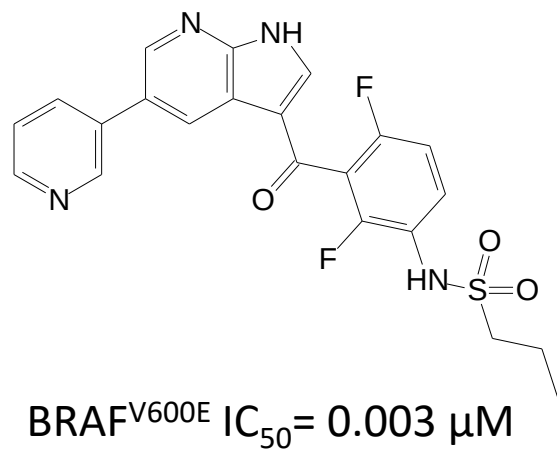
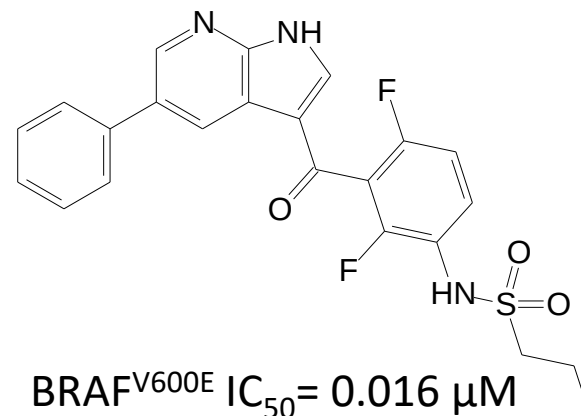
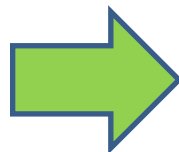
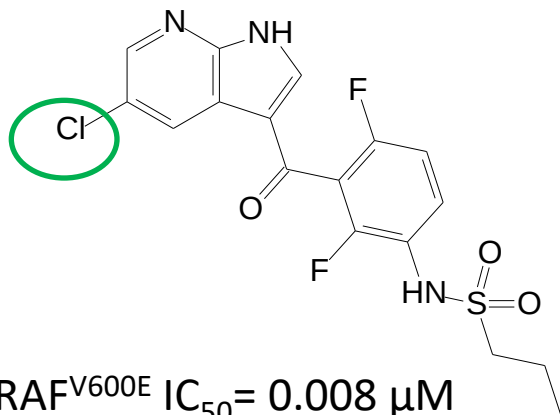
$IC_{50} = 0.008 \mu M$ έναντι B-Raf^{V600E}
 10πλασια εξειδίκευση έναντι WTB-Raf
 100πλασια εξειδίκευση έναντι 70
 κινασών



Ο 3-υποκαταστάτης αλληλεπιδρά με το αμινοξύ-
 θυρωρό (Thr529) και με το μοτίβο DFG (**DFG-in**
διαμόρφωση), ενώ η προπυλομάδα μπαίνει σε
 μικρή λιπόφιλη κοιλότητα που υπάρχει μόνο στην
 οικ RAF



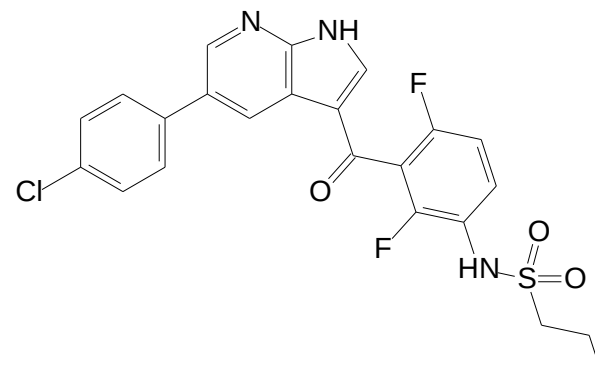
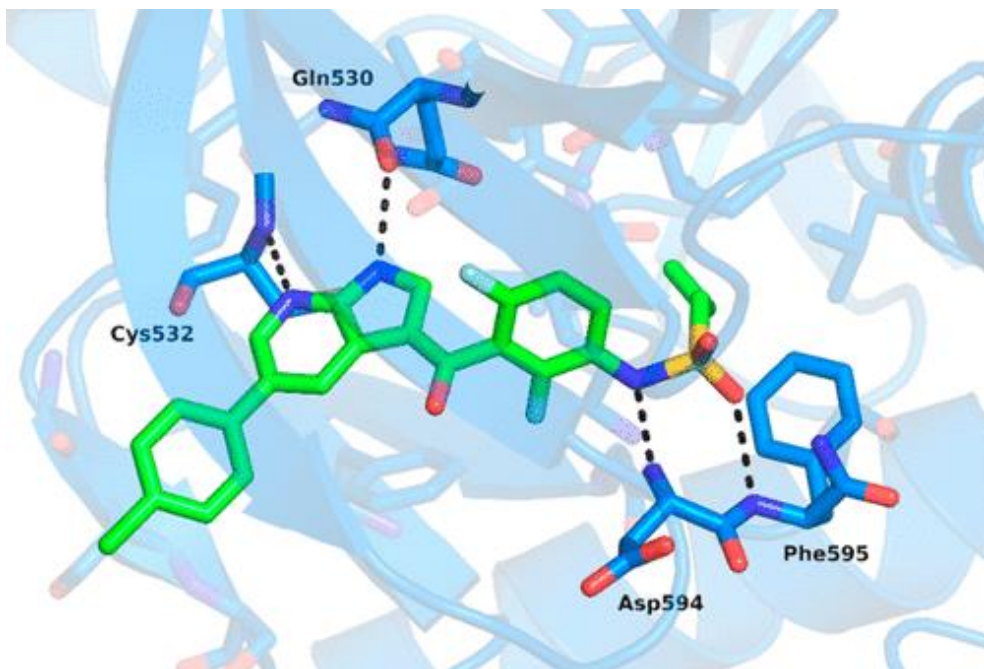
Διακρίνεται η αλληλεπίδραση του N του σουλφοναμιδίου με το μοτίβο DFG καθώς και η είσοδος της προπυλομάδας στην Raf-selective κοιλότητα.



BRAF^{V600E} IC₅₀ = 0.031 mM

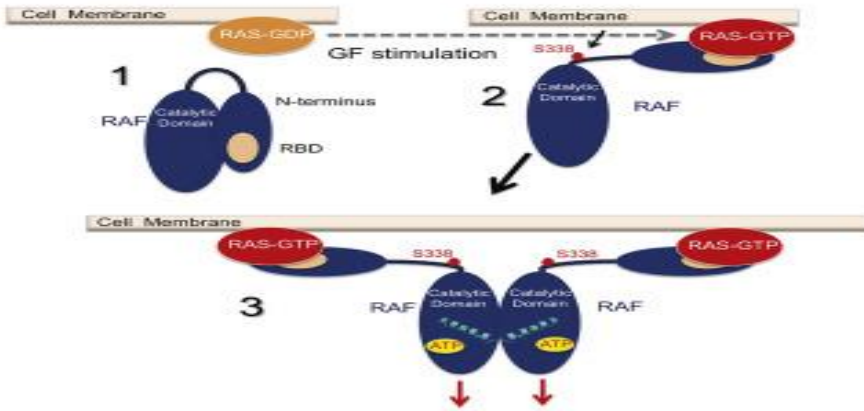
Η βελτίωση των
φ/κ παραμέτρων
είναι επίσης
σημαντική

Vemurafenib (PLX4032)
V600E mutated BRAF
inhibition

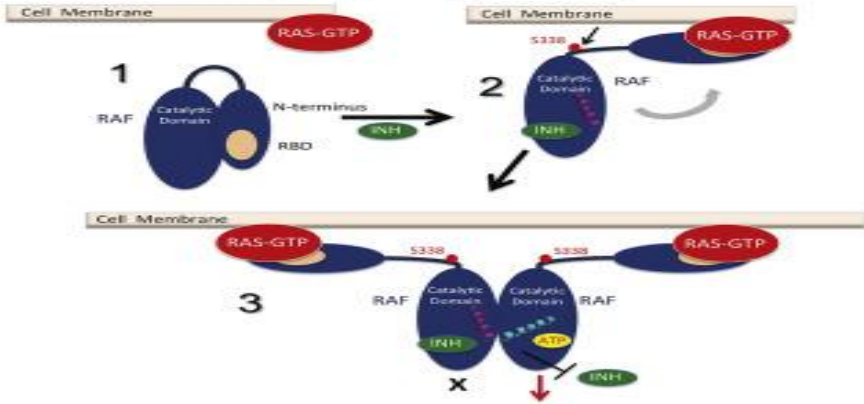


Το vemurafenib είναι αναστολέας τύπου I1/2. Προσδένεται και σταθεροποιεί την (DFG-in αC-out ανενεργή διαμόρφωση) Το σουλφοναμίδιο αλληλεπιδρά ισχυρά με τα Asp594 και Phe595 του DFG μοτίβου προκαλώντας μετατόπιση της αC-έλικας σε (αC-out διαμόρφωση) και παρεμποδίζεται ο διμερισμός της RAF. Η πυρρολοπυριδίνη ως ανάλογο πουρίνης αλληλεπιδρά με την ευκίνητη περιοχή, ενώ το 4-χλωροφαινύλιο εκτείνεται προς τον διαλύτη.

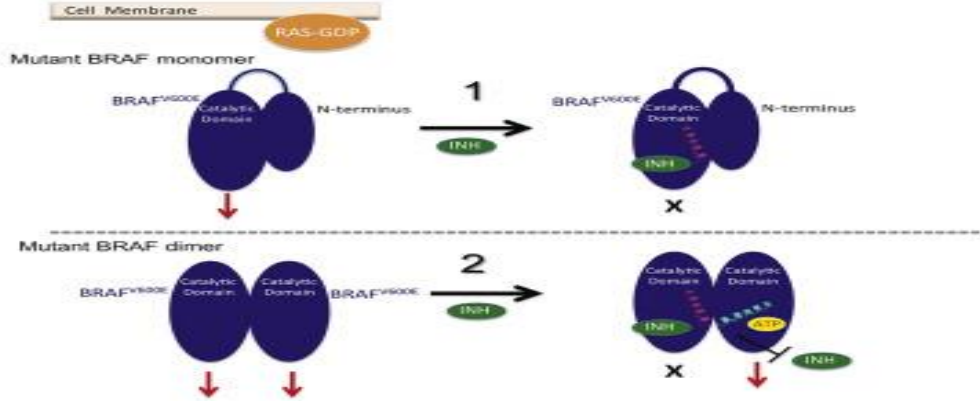
A Growth factor – induced RAF activation



B RAF inhibitor-induced RAF priming and negative allostery



C Mutant BRAF dimerization and negative allostery

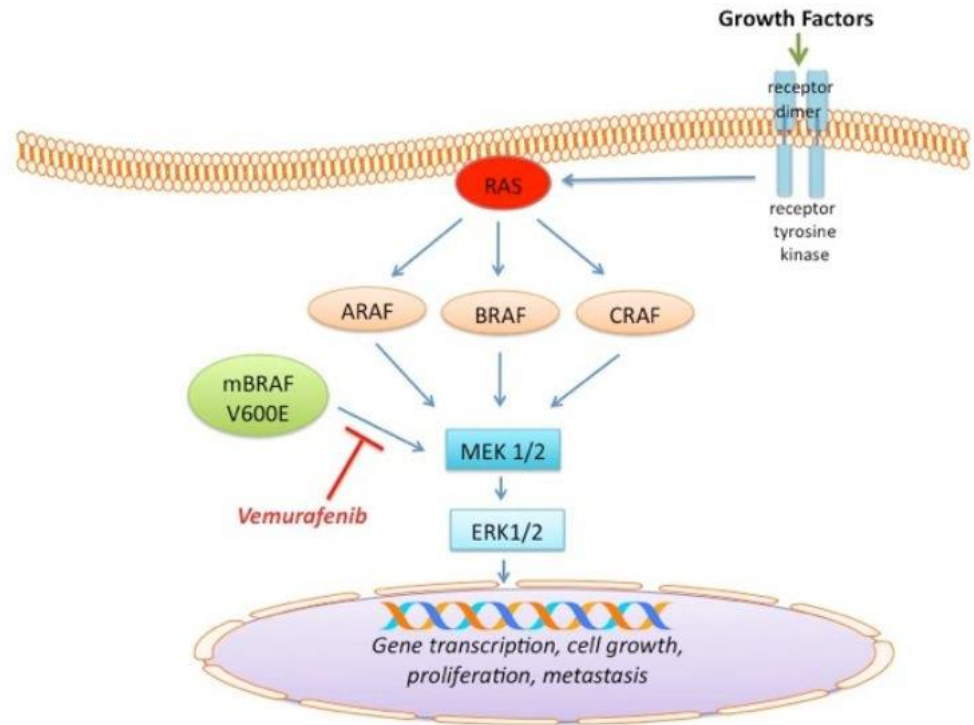


Σχηματισμός του ασύμμετρου διμερούς: Η πρόσδεση του vemurafenib στο 1^ο πρωτομερές υποχρεώνει την αC έλικα να λάβει την αC-out διαμόρφωση. Όμως, η αC έλικα του 2^{ου} πρωτομερούς λαμβάνει υποχρεωτικά αC-in διαμόρφωση **(αρνητική αλλοστερική επίδραση)** και εμποδίζεται η πρόσδεση 2^{ου} μορίου vemurafenib: το φάρμακο αναστέλλει τη μονομερή μορφή της BRAF αλλά όχι τη διμερή.

Φάρμακο ειδικό για κακοήθειες που οφείλονται στη παρουσία της μεταλλαγμένης κινάσης, που σηματοδοτεί ως μονομερές, όπως η BRAF^{V600E} στο μελάνωμα.



Είναι το πρώτο φάρμακο εξατομικευμένης θεραπείας που εγκρίθηκε από FDA-EMEA που βελτιώνει την επιβίωση ασθενών με τον συγκεκριμένο τύπο μεταστατικού μελανώματος.



Medscape

Source: Access Medicine © 2012 McGraw Hill Companies



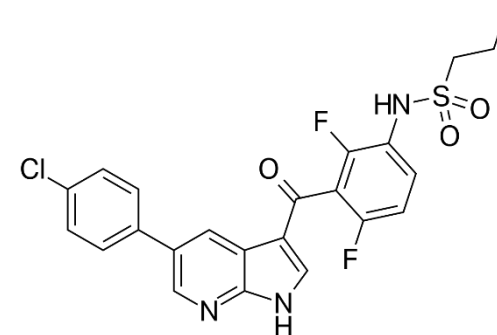
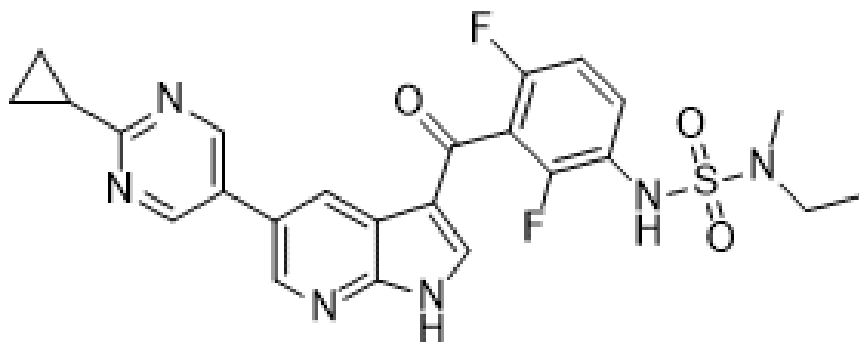
Το διαγνωστικό τεστ εγκρίθηκε ταυτόχρονα με το vemurafenib.

Πλεονεκτήματα

Μεγάλο θεραπευτικό εύρος

Μειονεκτήματα

- Στα κύτταρα που εκφράζεται η BRAF^{WT} η **παρουσία του φαρμάκου επάγει τον διμερισμό RAF/MEK**, ενώ το 2^ο πρωτομερές κλειδώνει στην αC-in διαμόρφωση. Συνεπώς, ενεργοποιείται η σηματοδότηση ERK (**παράδοξη ενεργοποίηση**) και η **ανάπτυξη δευτερογενών καρκίνων** (υπερκεράρωση, κερατοακάνθωμα, squamous-cell καρκινώματα). Εμφανίζονται επίσης αλωπεκία και αρθραλγίες.
- Ανάπτυξη αντοχής μετά από ~1 χρόνο θεραπείας.
- Δεν αντιμετωπίζονται αντίστοιχες κακοήθειες του θυρεοειδούς, παγκρέατος, ωοθηκών, παχέος εντέρου, όπου η αC-in διαμόρφωση είναι υποχρεωτική, λόγω της παρουσίας και άλλων μεταλλάξεων.



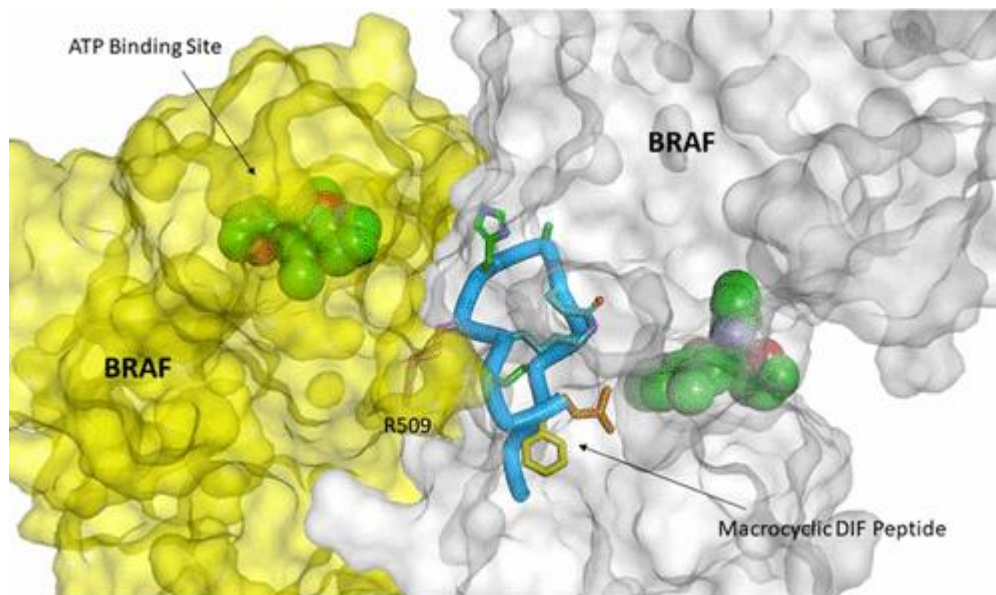
ΛΥΣΕΙΣ

- “paradox breakers”

Αναστολείς που αναστέλλουν το διμερισμό ή αναστολείς της αC-in/αC-in διμερούς BRAF (υπό ανάπτυξη). Το εικονιζόμενο παράγωγο PLX7904 αναστέλλει την φωσφορυλίωση των ERK1/2 παρουσία της μεταλλαγμένης BRAF.

Κλινικά αποτελεσματικό - δραστικό σε κύτταρα ανθεκτικά στο vemurafenib.

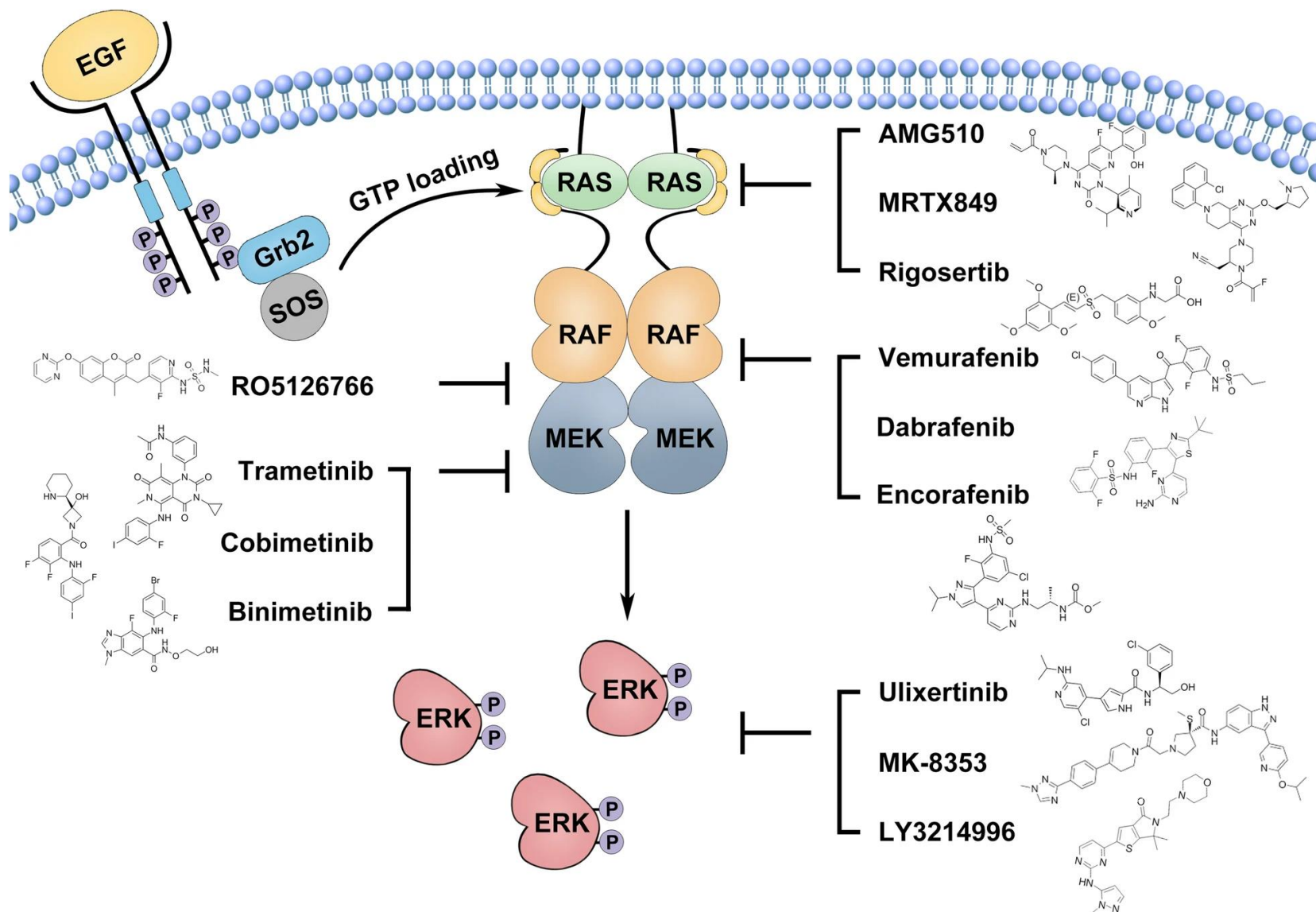
- Αλλοστερικοί αναστολείς

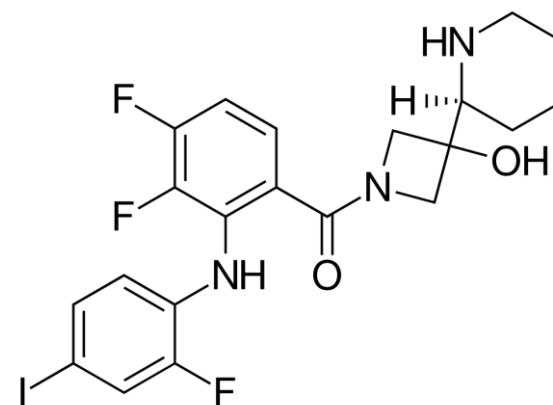
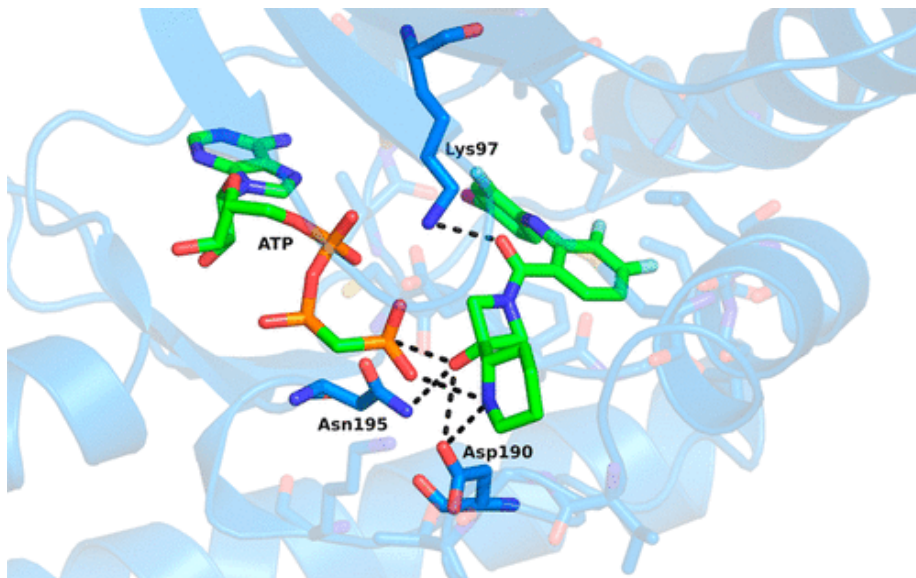


Αλλοστερικοί αναστολείς του διμερισμού τύπου IV

Η πρόσδεση μορίων στη μεσεπιφάνεια των δύο πρωτομερών μπορεί να αναστείλει το διμερισμό της BRAF και την παράδοση ενεργοποίηση (μακροκυκλικοί αναστολείς τύπου IV- σε προκλινική ανάπτυξη).

- Ανάπτυξη αναστολέων της MEK για συνδυαστικό σχήμα.





Το **Cobimetinib** είναι **αλλοστερικός αναστολέας τύπου III των MEK1/2**: προσδένεται κοντά στη θέση πρόσδεσης του ATP. Το αμιδικό καρβονύλιο σχηματίζει δH με τη **β3-Lys97**, ενώ το αλκυκλικό τμήμα του μορίου πλησιάζει τη καταλυτική περιοχή της κινάσης με την αζετιδίνη να συνδέεται μεταξύ άλλων και με τη γ-φωσφορική ομάδα του ATP σταθεροποιώντας μια ανενεργή διαμόρφωση που δεν επιτρέπει τη μεταφορά της προς το υπόστρωμα.

Ο συνδυασμός **vemurafenib+cobimetinib** αποδείχθηκε πολύ αποτελεσματικός κλινικά, **χωρίς συμπτώματα παράδοξης ενεργοποίησης**, με σχετικά ήπιες παρενέργειες και μικρή πιθανότητα εμφάνισης νέων μεταλλάξεων (έναντι της μονοθεραπείας με vemurafenib).

Επίσης αποτελεσματικοί έναντι μελανώματος είναι και άλλοι συνδυασμοί BRAF-V600E αναστολέα + αναστολέα τύπου III των MEK **encorafenib + binimetinib** και **dabrafenib + trametinib**.

Συνολικά:

Η ανάπτυξη της συνδυαστικής θεραπείας στο μελάνωμα με μετάλλαξη στην B Raf βελτίωσε αρκετά την αποτελεσματικότητα της φαρμακευτικής αγωγής.

Υπάρχουν παρενέργειες από το καρδιαγγειακό σύστημα, συστηματική υπέρταση, αρρυθμίες κλπ οι μηχανισμοί των οποίων διερευνώνται, ώστε να ελαχιστοποιηθούν.



Είμαστε ακόμη στην αρχή της
θεραπευτικής αξιοποίησης των
κινασών

Η έρευνα διαρκώς.....

ανακαλύπτει

ανανεώνει

αναθεωρεί

*Small molecule kinase inhibitor drugs
(FDA approvals 1999-2021)*

