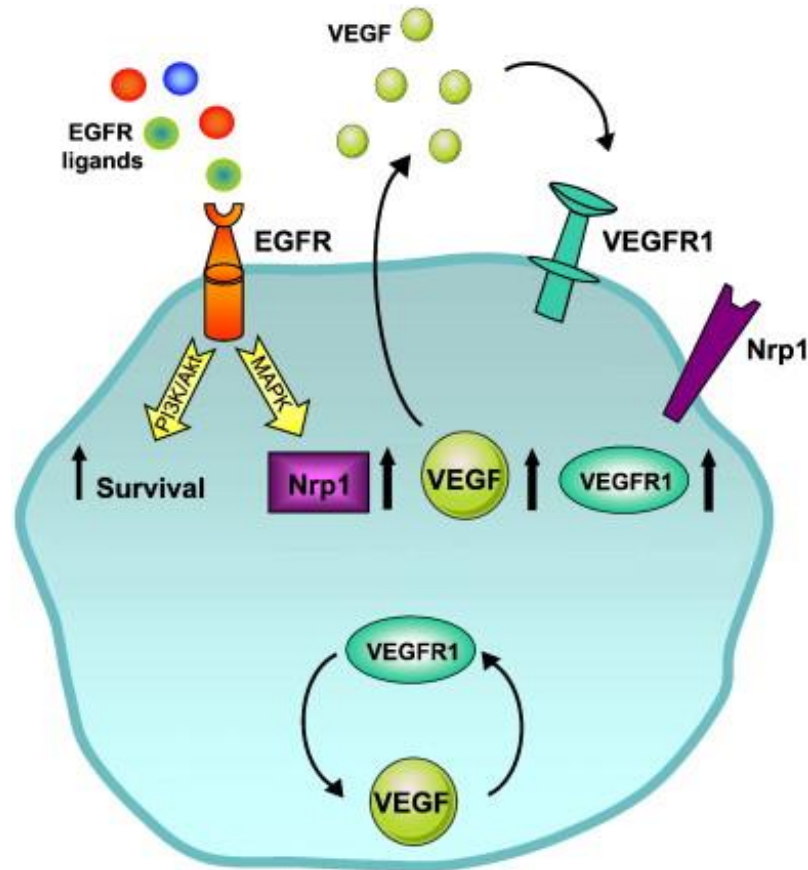
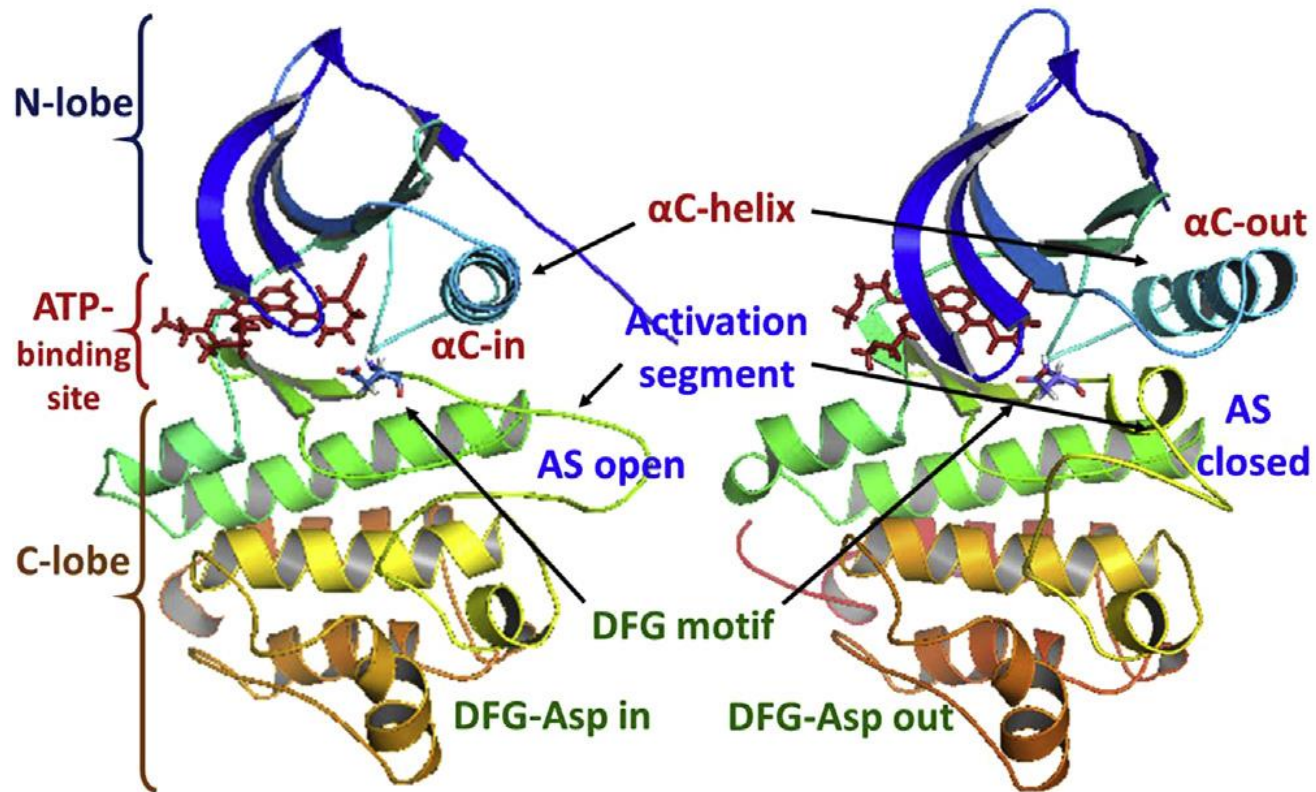


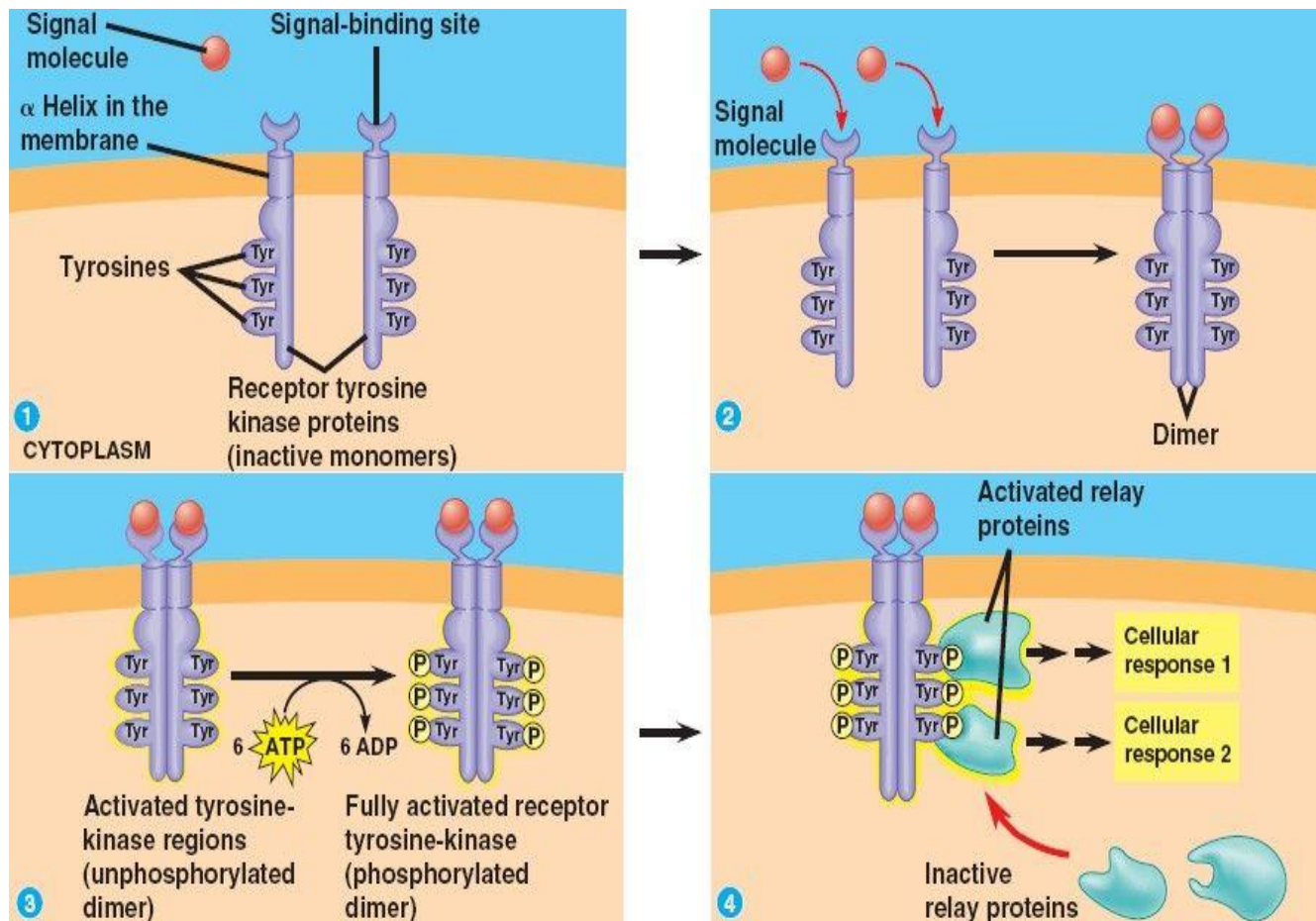
Αναστολείς υποδοχέων αυξητικών παραγόντων

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 υποδοχών λειτουργεί ως κλασική κινάση τυροσίνης.

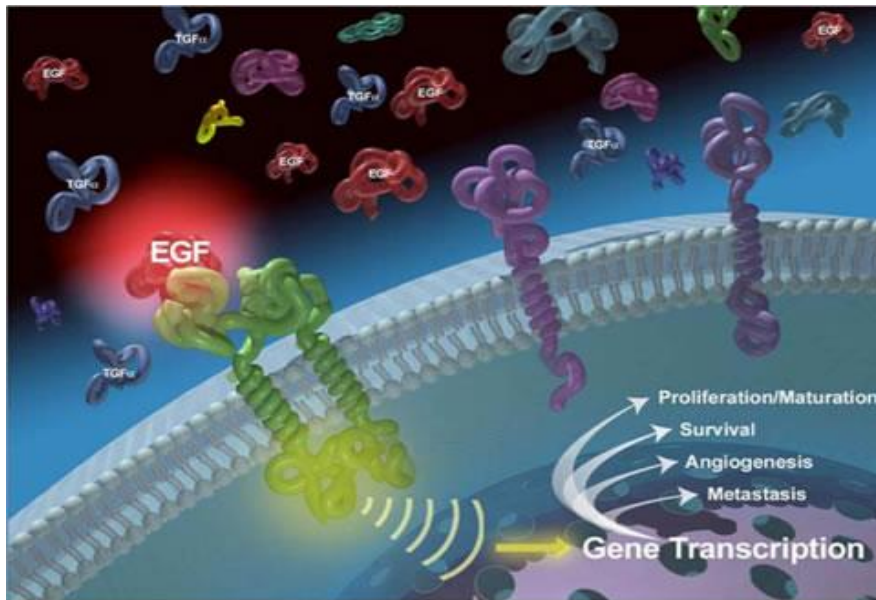


Ενδοκυτταρικά οι φωσφορυλιωμένες τυροσίνες δημιουργούν, συχνά μετά από διμερισμό τους, θέσεις υψηλής βιοχημικής συγγένειας με πρωτεΐνες που περιέχουν μια καλά συντηρημένη περιοχή ~100 αμινοξέων που απαντάται και στην Src ογκοπρωτεΐνη (Src Homology domain 2). Αυτή η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών πυροδοτεί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



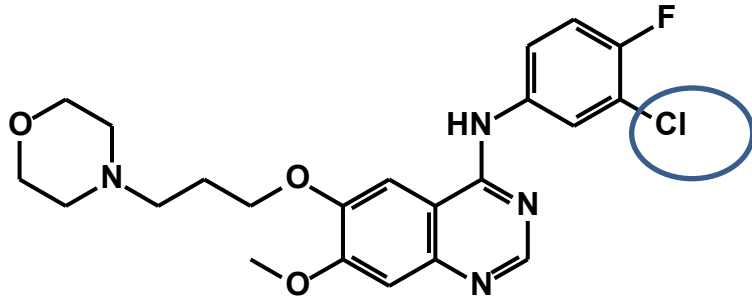
Πολλές χαρακτηριστικές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων, όπως:

- η έλλειψη επικοινωνίας με άλλα κύτταρα
- ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός
- η διαφυγή από 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 συχνά επανακάμπει μετά από ~1 έτος θεραπείας. Η δυσκολότερη επαγόμενη μετάλλαξη είναι του αμινοξέος θυρωρού **T790M**.

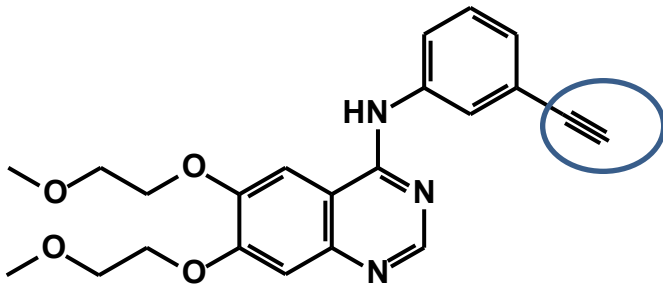


Gefitinib

Iressa (AstraZeneca)



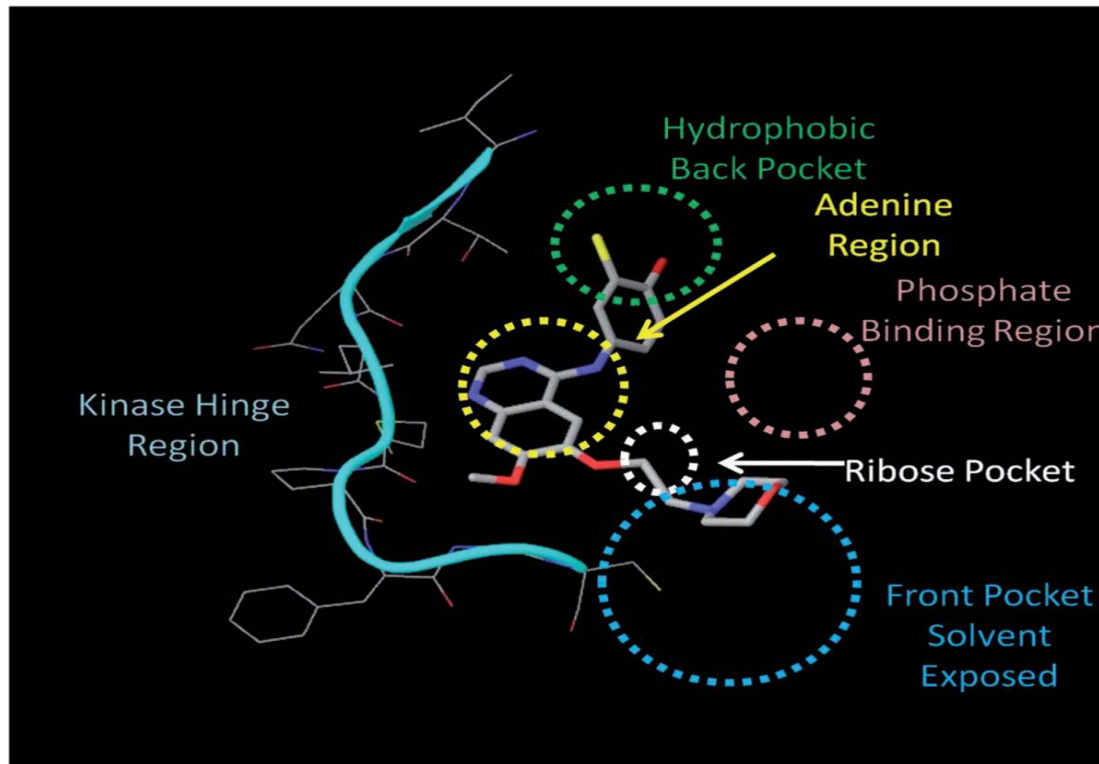
Οι πρώτοι εγκεκριμένοι αναστολείς του EGFR είναι τύπου I. Πρόκειται για παράγωγα αμινοκιναζολίνης: gefitinib και erlotinib. Ο δακτύλιος κινάζολίνης μιμείται την πουρίνη του ATP και η ανιλίνη έχει χαρακτηριστικό 3'-υποκαταστάτη, που είναι σημαντικός για την σχετικώς εκλεκτική αναστολή του EGFR.



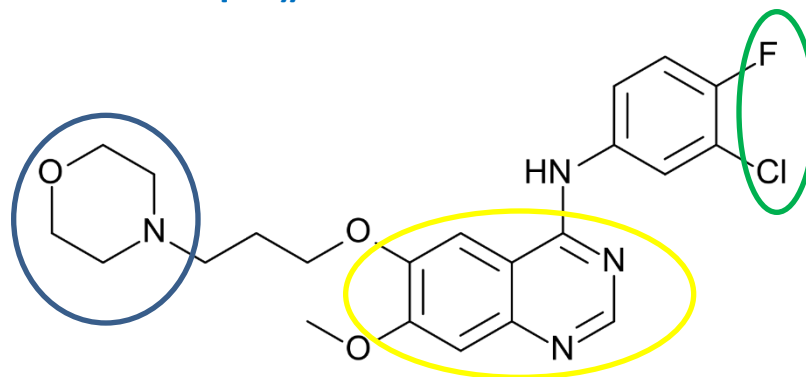
Erlotinib

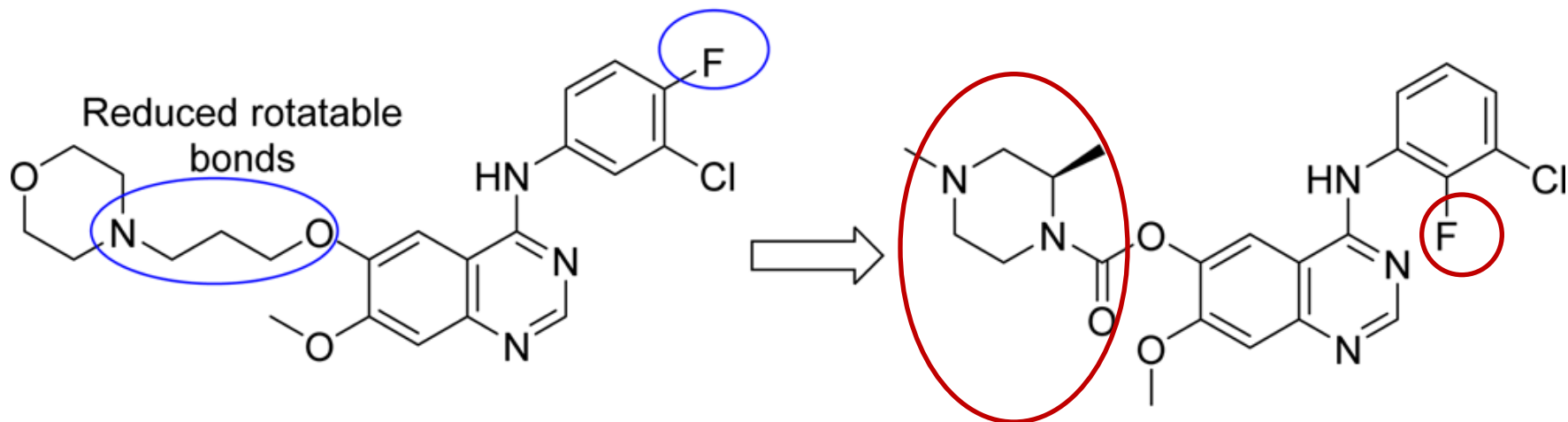
Tarceva (Genetech)





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





17 (gefitinib)

$$K_{puu,brain} = \mathbf{0.02}$$

$$K_{puu,CSF} = \mathbf{0.09}$$

$$\text{L858R pEGFR IC}_{50} = 7 \text{ nM}$$

22

$$K_{puu,brain} = \mathbf{1.3}$$

$$K_{puu,CSF} = \mathbf{1.3}$$

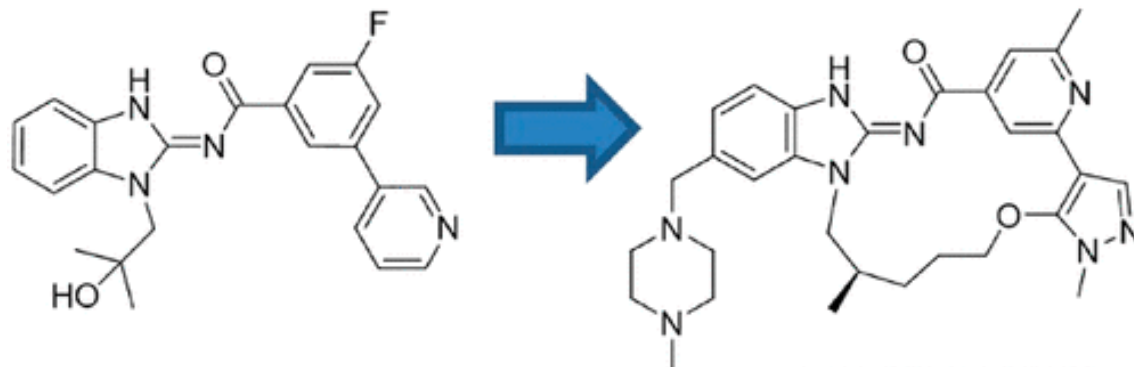
$$\text{L858R pEGFR IC}_{50} = 7 \text{ nM}$$

Βελτίωση αναστολέων: θα προκύψει με αύξηση της διαπερατότητας στο ΚΝΣ

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

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

Αύξηση στερεοχημικής ακαμψίας = εντροπικό κέρδος.



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

790 nM

0.6 nM

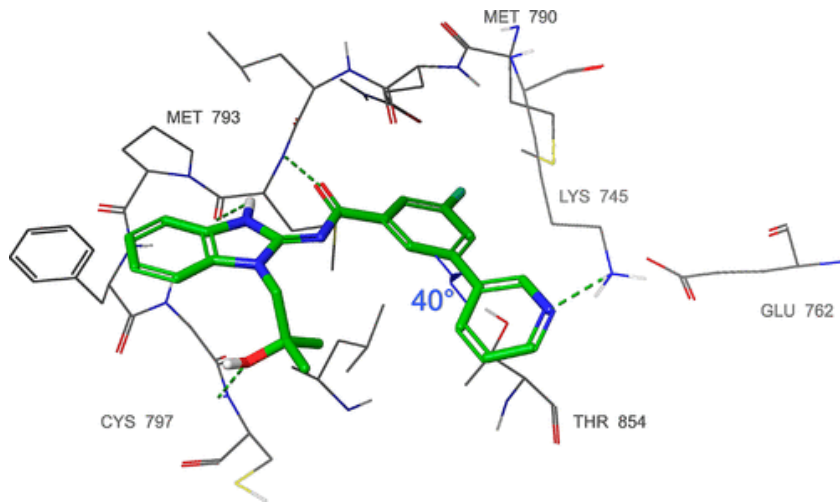
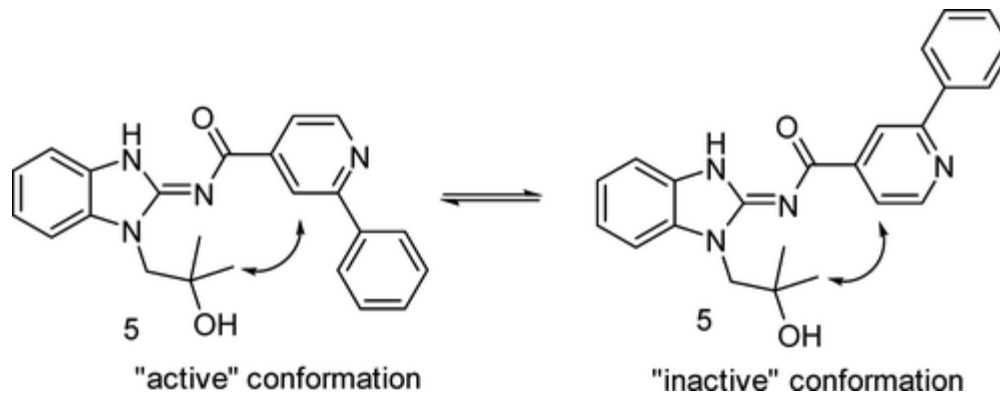
EGFR wt-sparing ratio:

>400

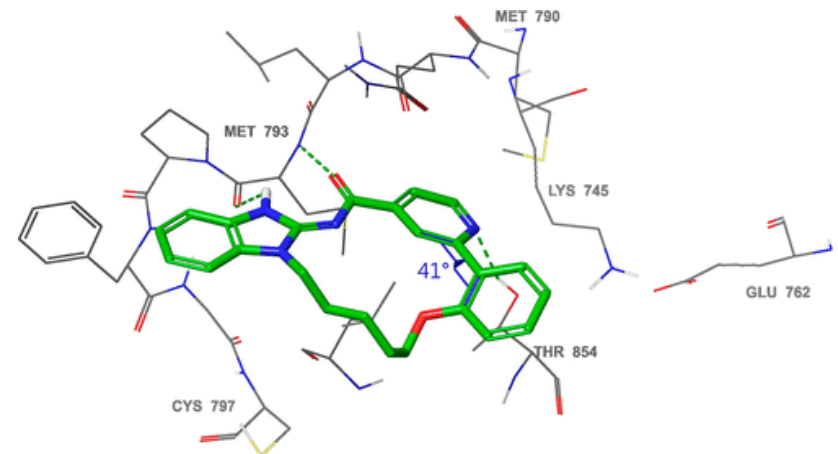
>400

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}

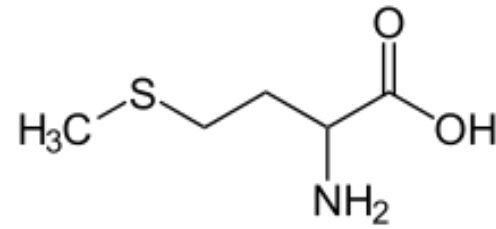
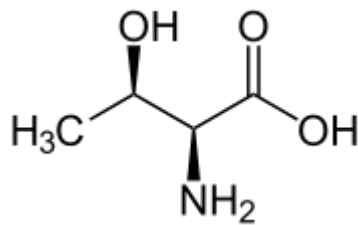
Δομική τροποποίηση αναστολέα με μείωση της ευκινησίας από την εισαγωγή μακροκυκλικής δομής: Δομική καινοτομία που μπορεί να επιφέρει βελτίωση της εκλεκτικότητας και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων, μεταξύ άλλων μπορεί να βελτιώσει σημαντικά τη διαπερατότητα στο ΚΝΣ.



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 την 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.



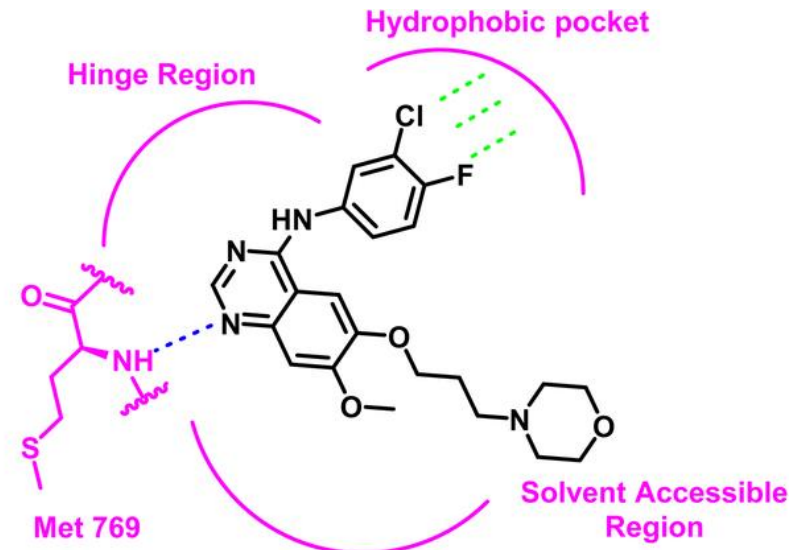
Η μεταλλαγμένη EGFR T790M κινάση παραμένει συνεχώς ενεργή.

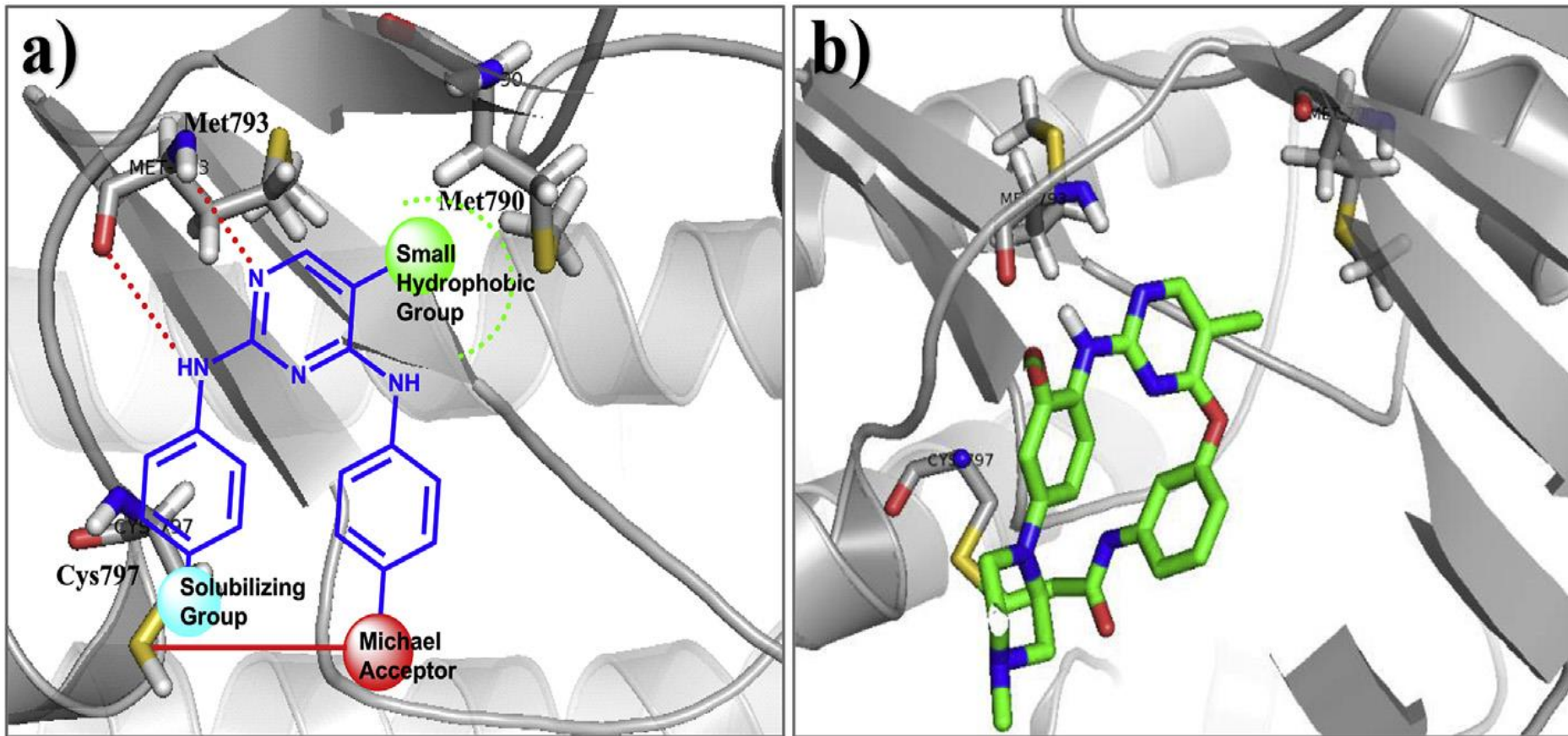
➤ **Η Met790 είναι λιπόφιλη:** και σταθεροποιεί την αC-in διαμόρφωση

➤ **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 ανταγωνίζονται αποτελεσματικά το ATP, στις συγκεντρώσεις που αντιστοιχούν στα συνήθη δοσολογικά σχήματα.

Ζητούμενο: αντιμετώπιση της επαγόμενης αντοχής στους αναστολείς της EGFR κινάσης

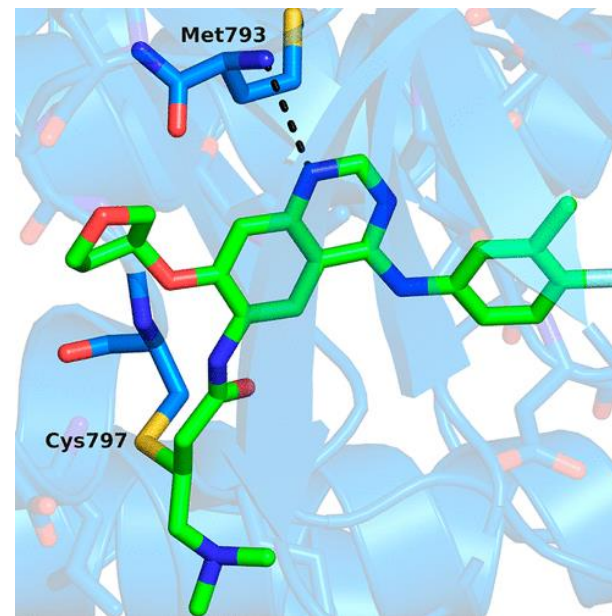
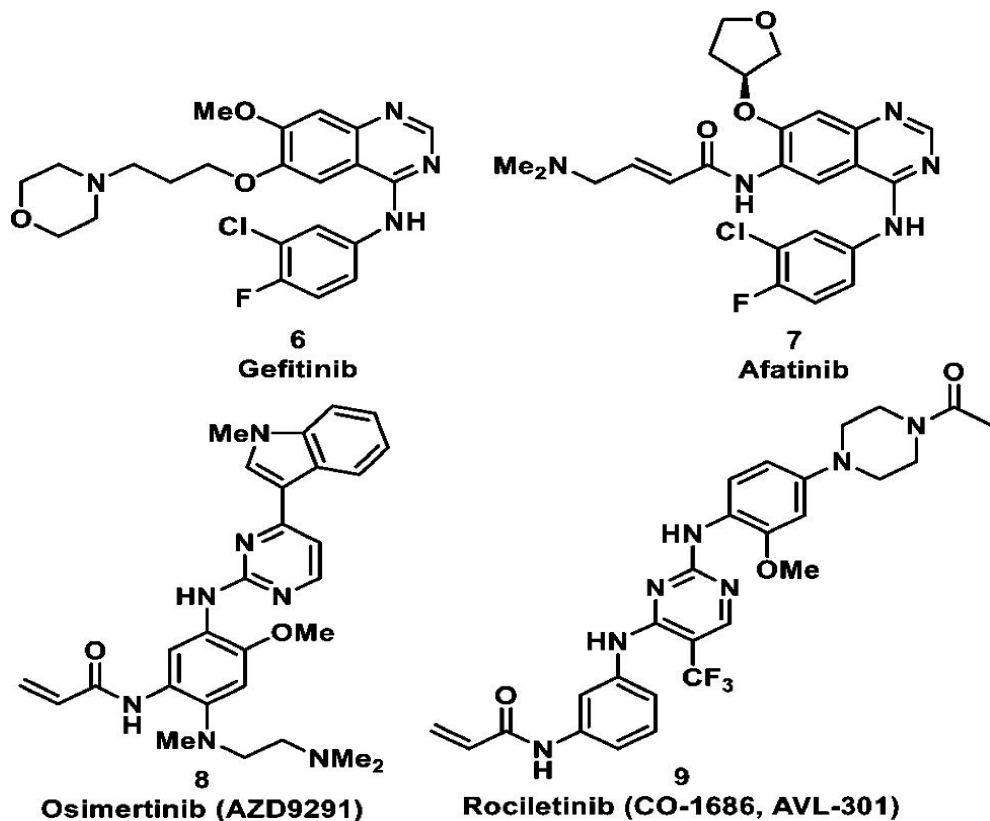
Η αντικατάσταση του αμινοξέος θυρωρού T790M ανιχνεύεται συχνά (στο ~70% των ασθενών) .





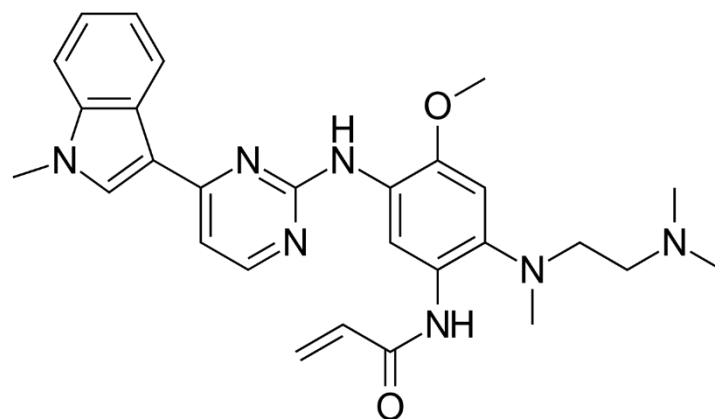
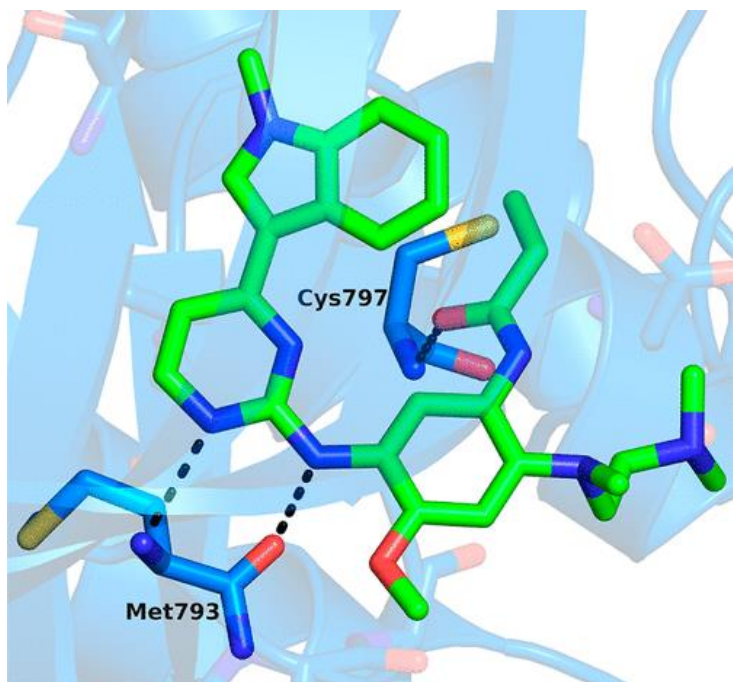
Σχεδιασμός αναστολέων 2^{ης} και 3^{ης} γενιάς

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



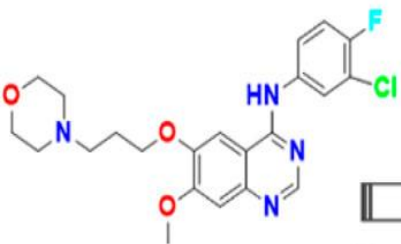
Αναστολείς 2^{ης} γενιάς: η αντικατάσταση της μορφολινοπροπυλοξυομάδας του **gefitinib** από διμεθυλαμινοβουτεναμίδιο, που αντιδρά με την **Cys797 του EGFR** (επιβεβαίωση με κρυσταλλογραφία) καταλήγει στην ανακάλυψη μη αντιστρεπτού αναστολέα (**afatinib**).

Όμως, η επιτυχία στα προκλινικά μοντέλλα δεν μεταφράστηκε σε κλινικό αποτέλεσμα: το φάρμακο είναι αποτελεσματικό μόνο σε δοσολογία που προκαλεί τοξικές παρενέργειες. Αυτές προκύπτουν από την αναστολή της wtEGFR στο δέρμα και το γαστρεντερικό σύστημα.



Στους μη αντιστρεπτούς αναστολείς υπάρχει πάντα το ενδεχόμενο ανάπτυξης τοξικότητας.

Οι αναστολείς 3^{ης} γενιάς (osimertinib) σχεδιάστηκαν 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 δH με την Met793).

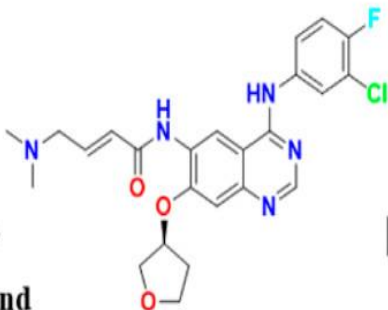


10, gefitinib

EGFR WT (LoVo)
 $IC_{50} = 59 \text{ nM}$
 EGFR L858R/T790M
 (H1975) $IC_{50} = 3102 \text{ nM}$

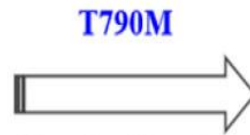


Form covalent bond
with cysteine

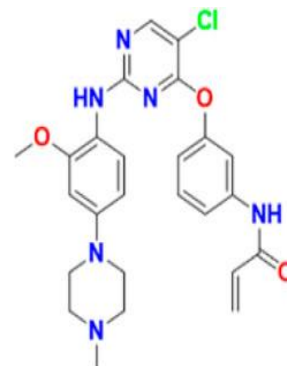


11, afatinib (BIBW-2992)

EGFR WT (LoVo)
 $IC_{50} = 15 \text{ nM}$
 EGFR L858R/T790M
 (H1975) $IC_{50} = 22 \text{ nM}$

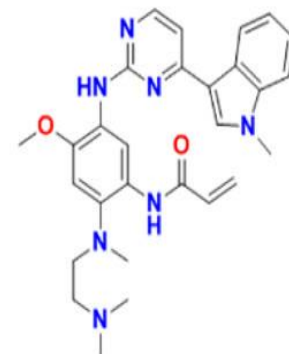


Covalent bond
with cysteine and
interact with Met



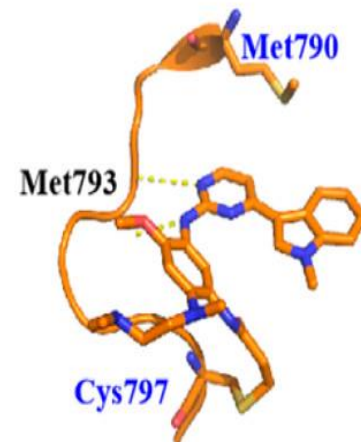
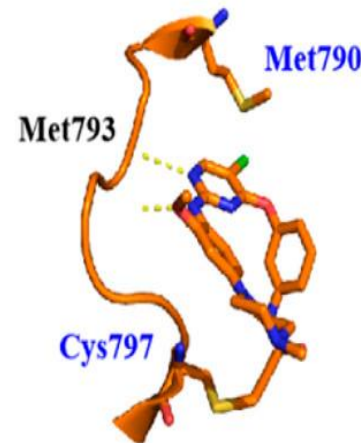
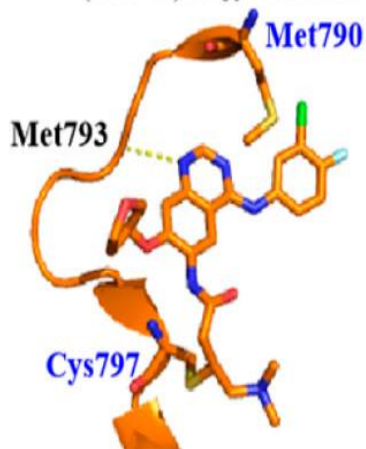
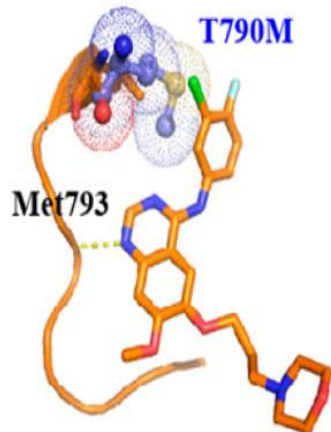
12, WZ4002

EGFR WT (HN11)
 $IC_{50} = 2130 \text{ nM}$
 EGFR L858R/T790M
 (H1975) $IC_{50} = 47 \text{ nM}$

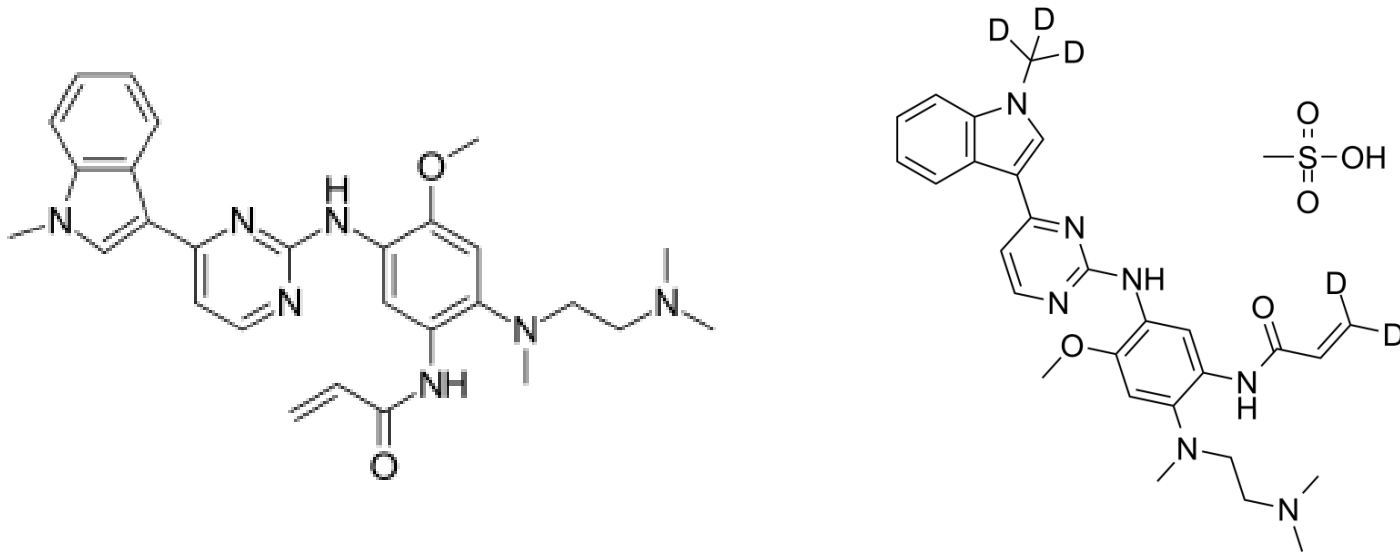


13, osimertinib

EGFR WT (LoVo)
 $IC_{50} = 480 \text{ nM}$
 EGFR L858R/T790M
 (H1975) $IC_{50} = 15 \text{ nM}$



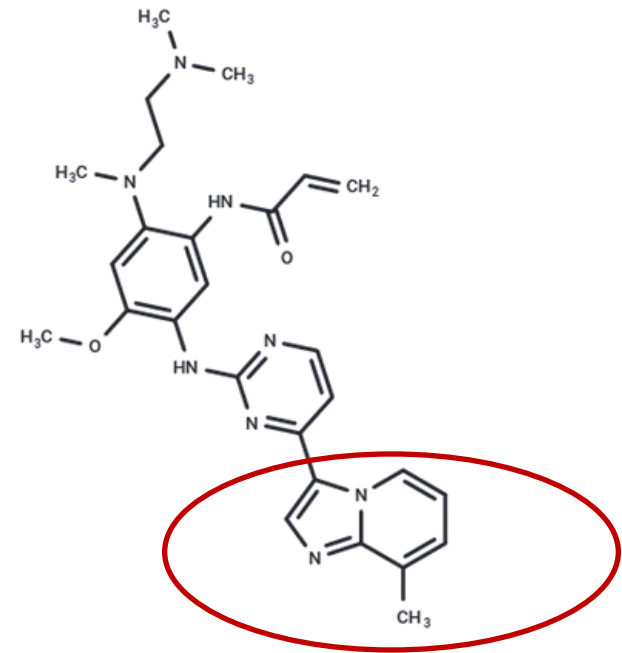
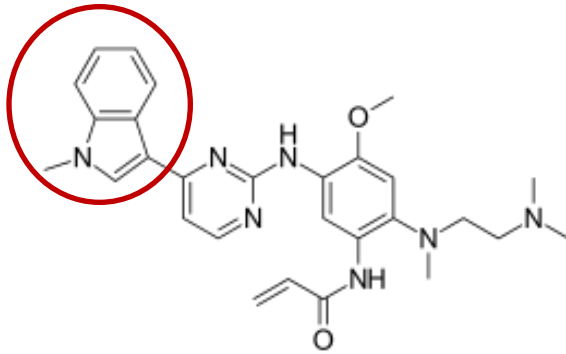
Τα **WZ4002** και **Osimertinib**, **αναστολείς υιοειδούς σχήματος**, συνδέονται ισχυρότερα στη μεταλλαγμένη κινάση (2 δH με την Met793 της ευκίνητης περιοχής και λιπόφιλες αλληλεπιδράσεις με Met793 και **Met 790**). Το ακρυλαμίδιο προσβάλεται εύκολα από την **Cys797**, αναστέλονται μη αντιστρεπτά και τα δύο ένζυμα, αλλά **σαφώς ισχυρότερα η μεταλλαγμένη κινάση**.



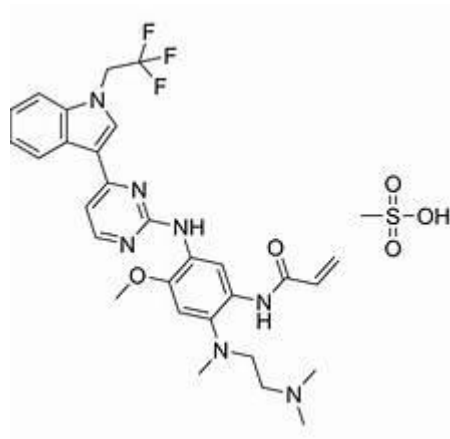
Το **osimertinib** είναι ο top-selling αναστολέας πρωτεϊνικών κινασών [\$6.58 Bn το 2024], με εφαρμογή στη θεραπεία του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα.

Από την ενζυμική N-απομεθυλίωση του ινδολίου, παράγεται σε σημαντικό ποσοστό ο πορ-μεταβολίτης που παρουσιάζει μεγαλύτερη συνάφεια με το wild-type EGFR, συνεισφέροντας σε ανεπιθύμητες ενέργειες.

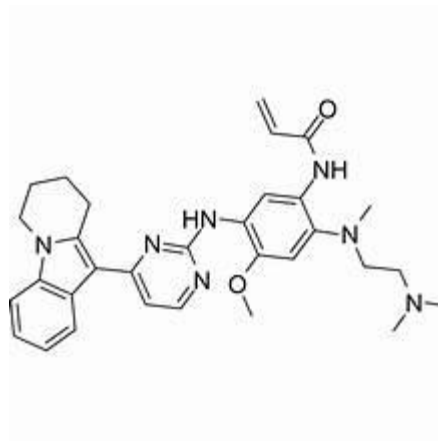
Το δευτεριωμένο ανάλογο, **dosimertinib** απομεθυλιώνεται λιγότερο από τα μικροσωμικά ένζυμα, είναι το ίδιο αποτελεσματικό με το osimertinib και προκαλεί μικρότερη μείωση του σωματικού βάρους σε πειραματόζωα (βρίσκεται σε κλινικές δοκιμές).



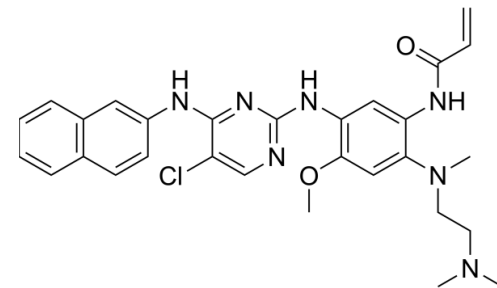
Το ιμιδαζοπυριδινικό ανάλογο ΥΚ-029Α παρακάμπτει τη μεταβολική οδό της Ν-απομεθυλίωσης (βρίσκεται επίσης σε κλινικές δοκιμές).



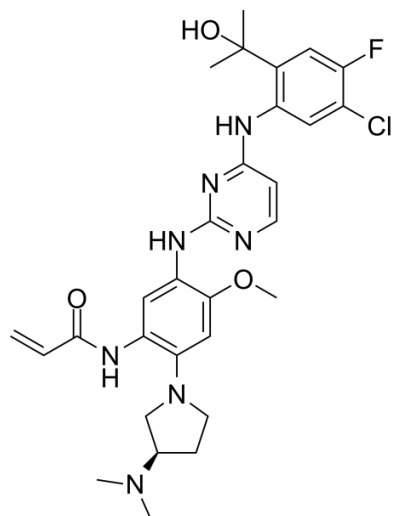
Befotertinib Appr
China 2023



Rilertinib Appr
China 2024



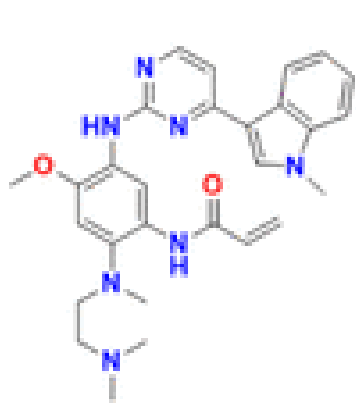
Limertinib Appr
China 2025



Sunvozertinib Appr. FDA 2025

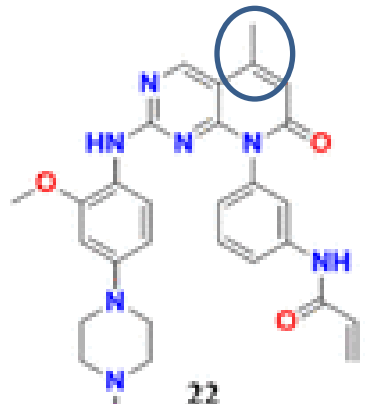
Αρκετά δομικά ανάλογα του **osimertinib** που έχουν πάρει έγκριση κυκλοφορίας παρουσιάζουν εκλεκτική αναστολή έναντι μεταλλαγμένων μορφών του υποδοχέα, με μικρή συνάφεια για τον wt.

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

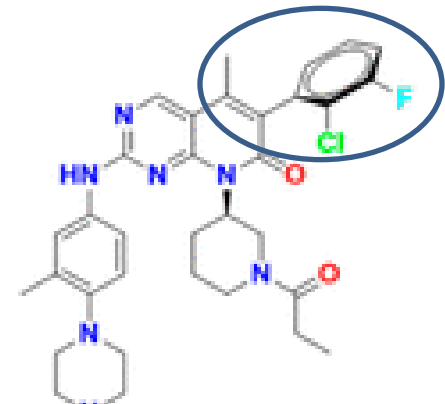
EGFR L858R/T790M/C797S IC₅₀ = 27.5 nM



22

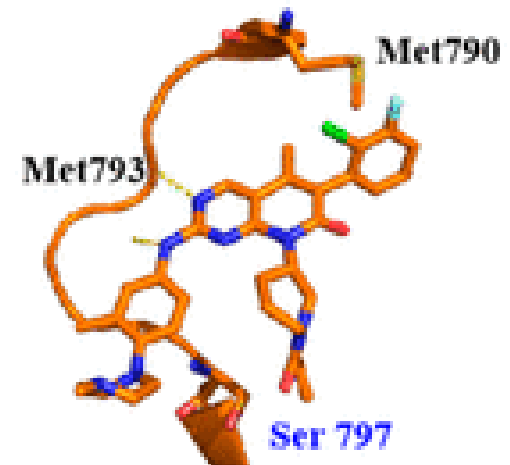
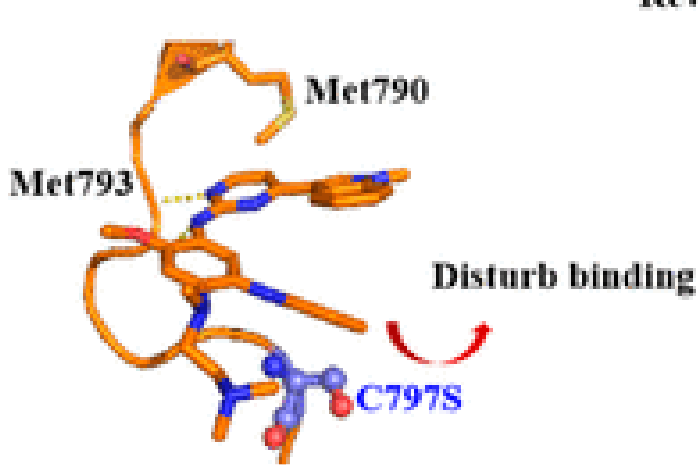
C797S

Reversible binding type

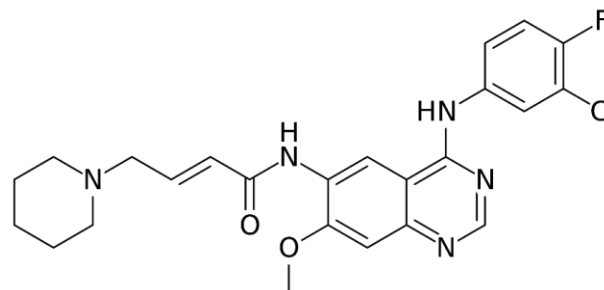
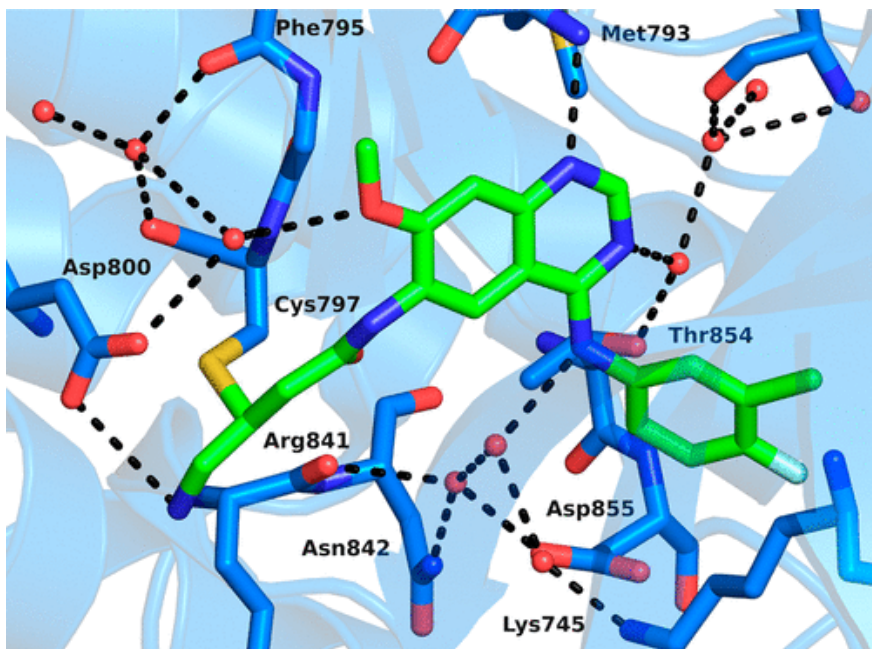


23

EGFR L858R/T790M/C797S IC₅₀ = 27.5 nM

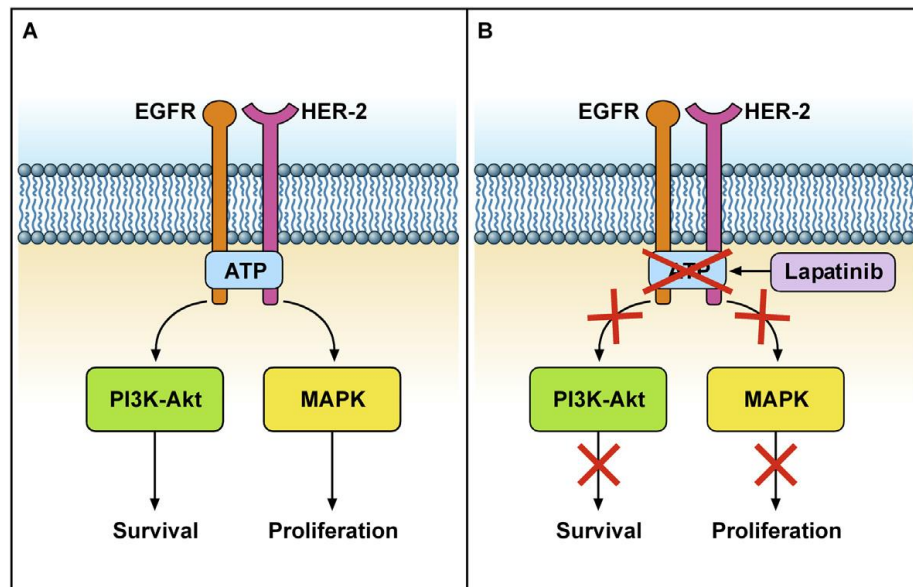
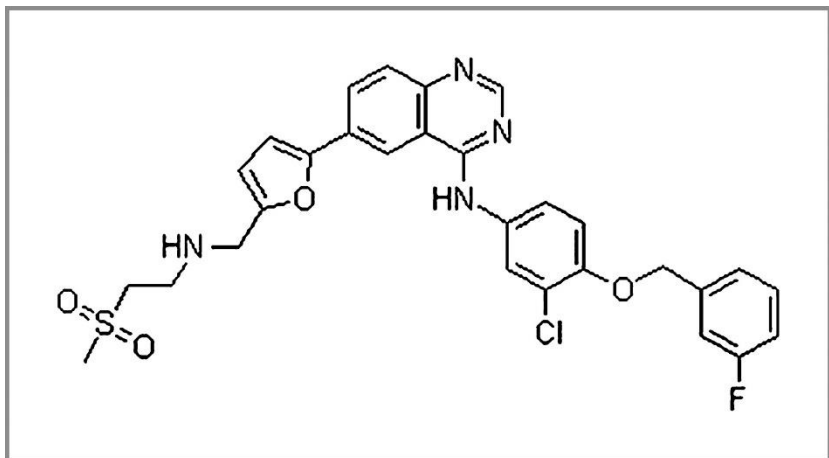


Μη αντιστρεπτός αναστολέας 4^{ης} γενιάς: Dacomitinib. Αναστέλλει όλα τα μέλη της οικογένειας HER και πολύ εκλεκτικά τον μεταλλαγμένο EGFR. Δρα αρχικά ως αναστολέας τύπου II, που σταθεροποιεί τη ανενεργό διαμόρφωση της κινάσης. Διακρίνεται ο τρόπος σύνδεσης στην ευκίνητη περιοχή, με τη συμμετοχή μορίων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



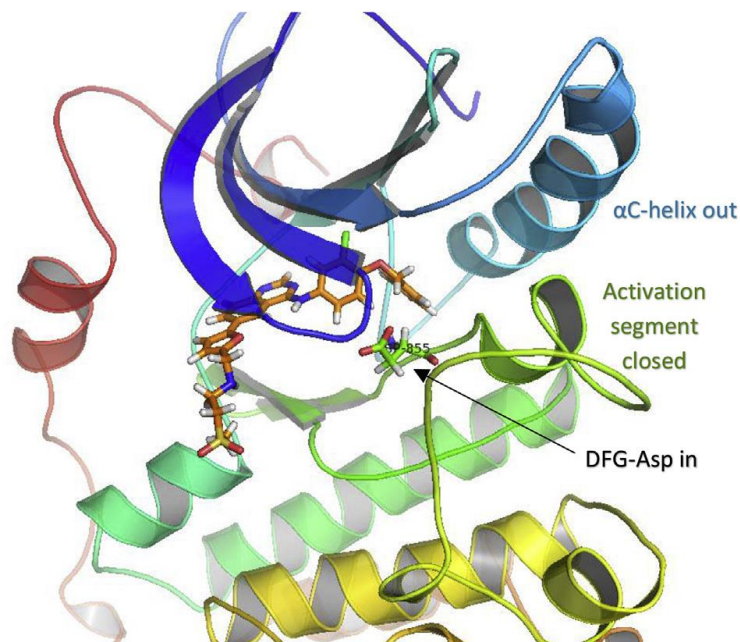
Όλοι οι αναστολείς 4^{ης} γενιάς ελέγχονται για την αποτελεσματικότητά τους σε ασθενείς, σε συνάρτηση με το **θεραπευτικό εύρος**: θεωρούνται ασφαλή τα φάρμακα αν παρουσιάζουν περιορισμένες και μη σημαντικές παρενέργειες (περιορισμένο ερύθημα, διάρροια).

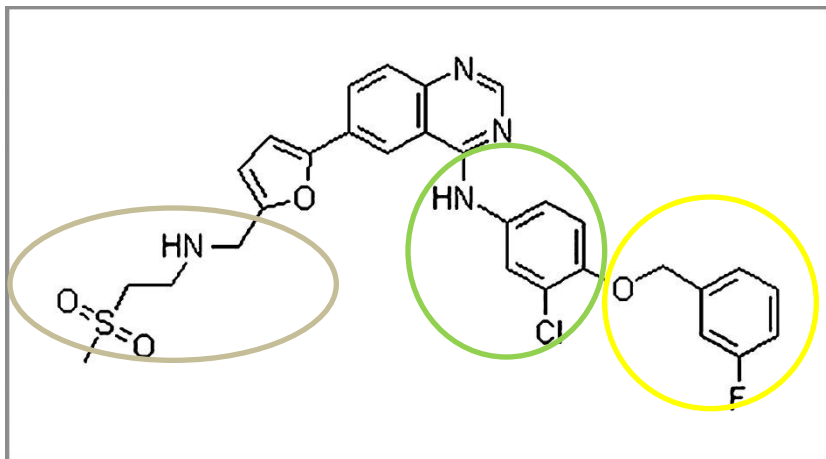
Άλλες λύσεις: αλλοστερικοί αναστολείς, PROTACS, συνδυαστικά σχήματα. Αντιμετώπιση της ενεργοποίησης άλλων μιτωτικών μονοπατιών (activation of by-pass RTK signalling).



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.





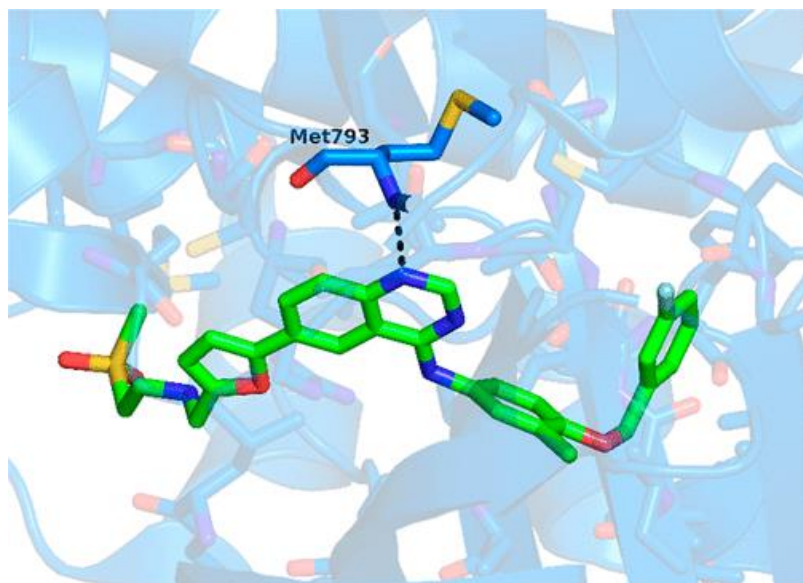
Το **Laratinib** είναι **αναστολέας τύπου I1/2**.

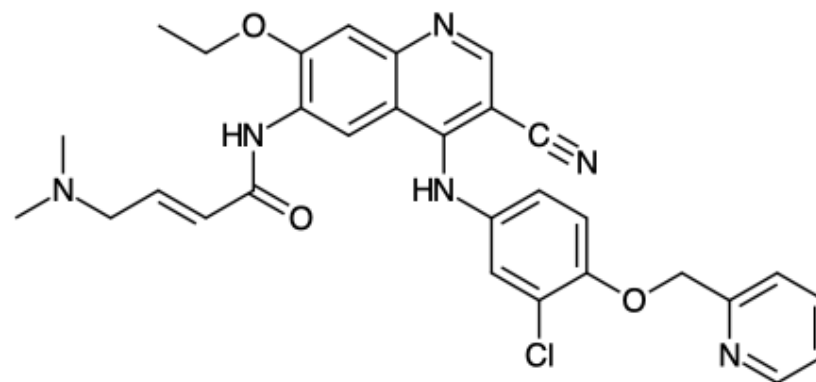
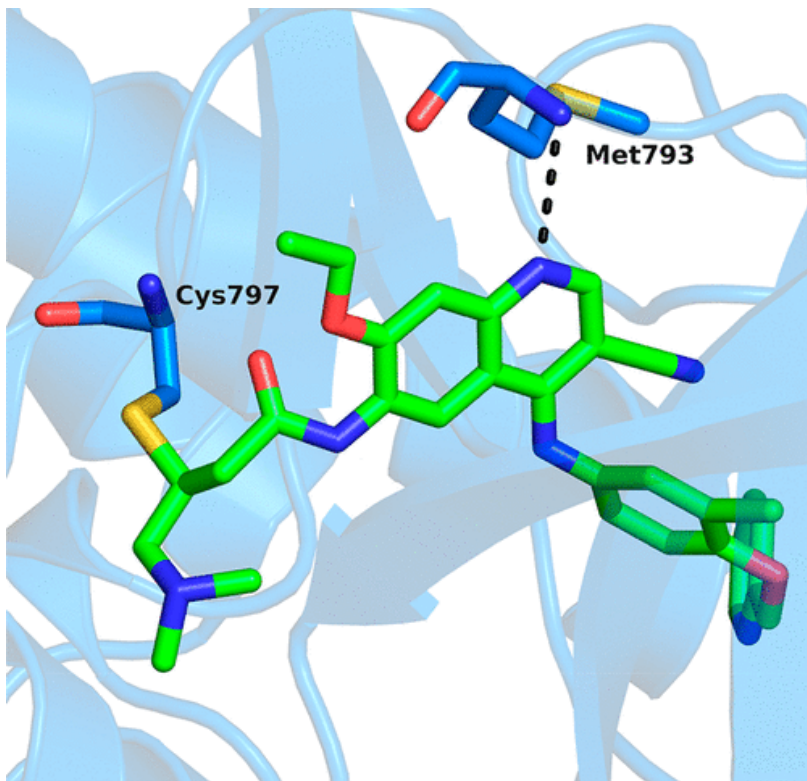
Το κιναζολινικό N1 σχηματίζει δH με το NH της Met793.

Ο ογκώδης 3-φθοροβενζυλοξυ-υποκαταστάτης δεσμεύεται σε 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.



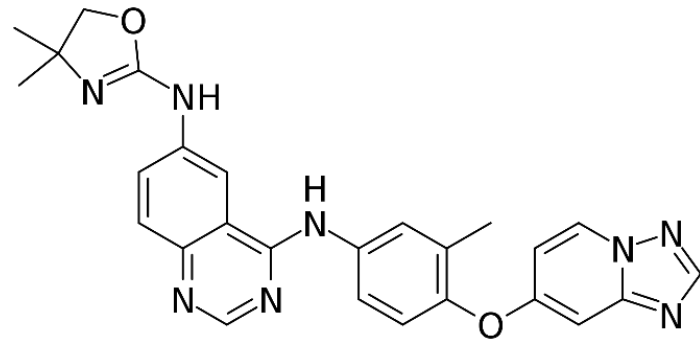


Neratinib

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 στην HER2 θέση πρόσδεσης του ATP.

Tucatinib Εκλεκτικός αναστολέας του HER2 (IC50 = 6.9 nM), αναστέλλει λιγότερο ισχυρά τον EGFR (IC50 = 449 nM).

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



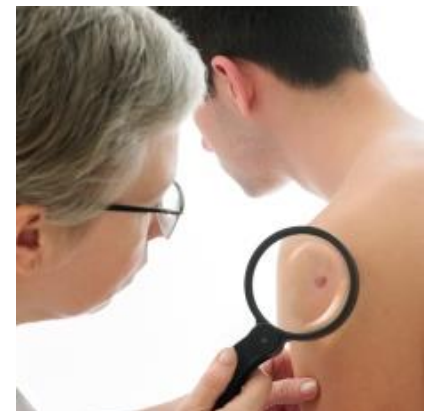
Η εκλεκτική αναστολή του HER2 προκαλεί σημαντική μείωση του μεγέθους των όγκων σε πειραματόζωα, ενώ μειώνονται σημαντικά και οι παρενέργειες (ναυτία, διάρροια, κόπωση, ερύθημα κλπ)

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

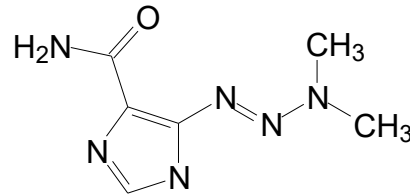
Κατάταξη σε στάδια I-IV ανάλογα με την μακροσκοπική εικόνα, το βαθμό διείσδυσης/διάχυσης στο δέρμα και της εξάπλωσης στους ιστούς.



Η χειρουργική αντιμετώπιση είναι αποτελεσματική σε εστιασμένη περιοχή του δέρματος.

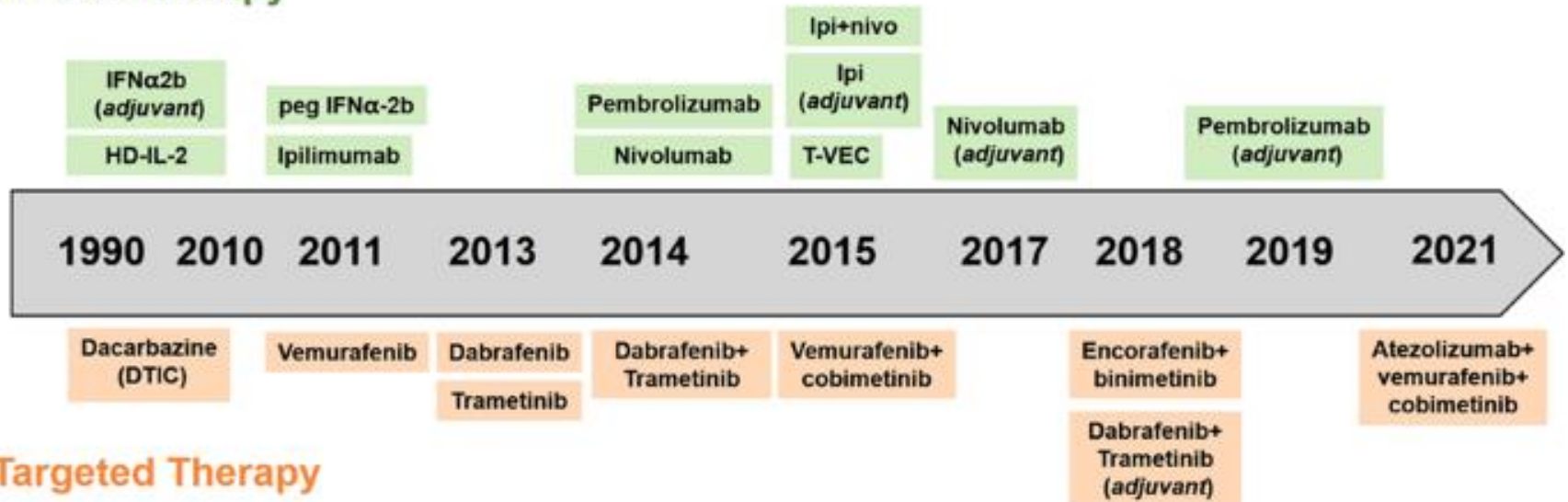
Η φαρμακευτική αγωγή ποικίλει, ανάλογα με το στάδιο της ασθένειας.

dacarbazine



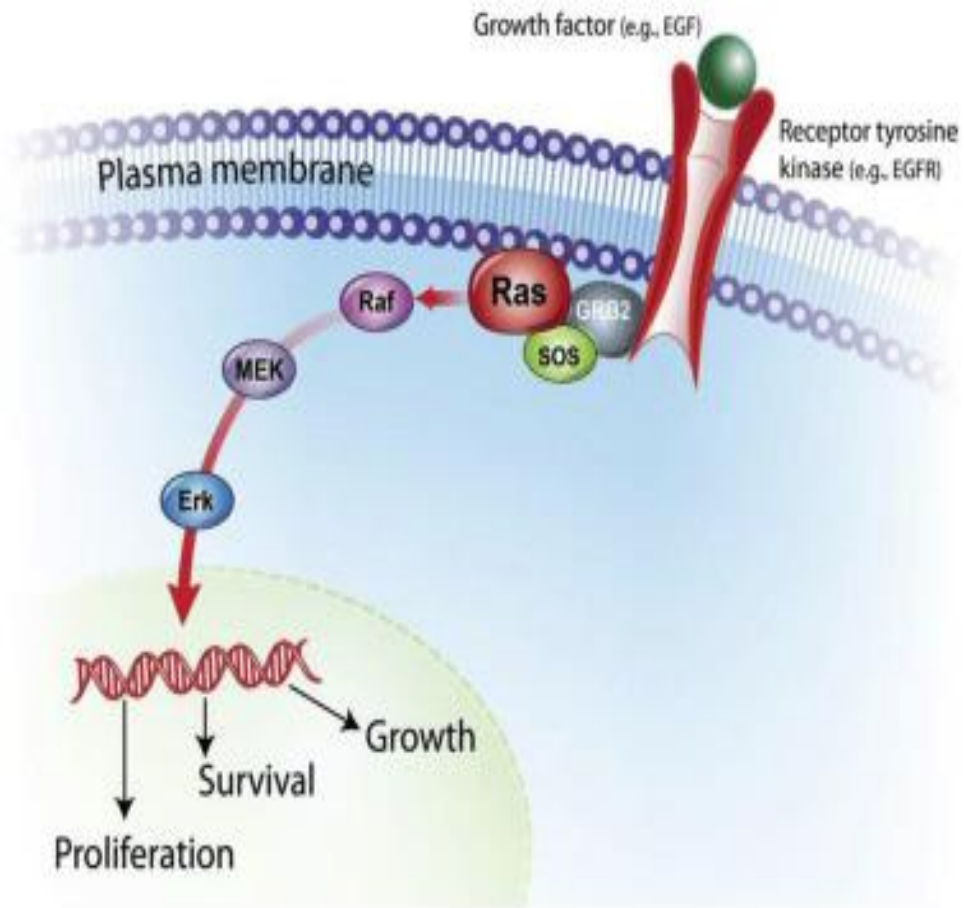
Η θεραπευτική αντιμετώπιση είναι στοχευμένη: βασίζεται στην ταυτοποίηση μεταλλάξεων σε γονίδια, που κωδικοποιούν κυρίως τη σηματοδότηση μέσω MAPKs και την εφαρμογή κατάλληλων αναστολέων.

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.

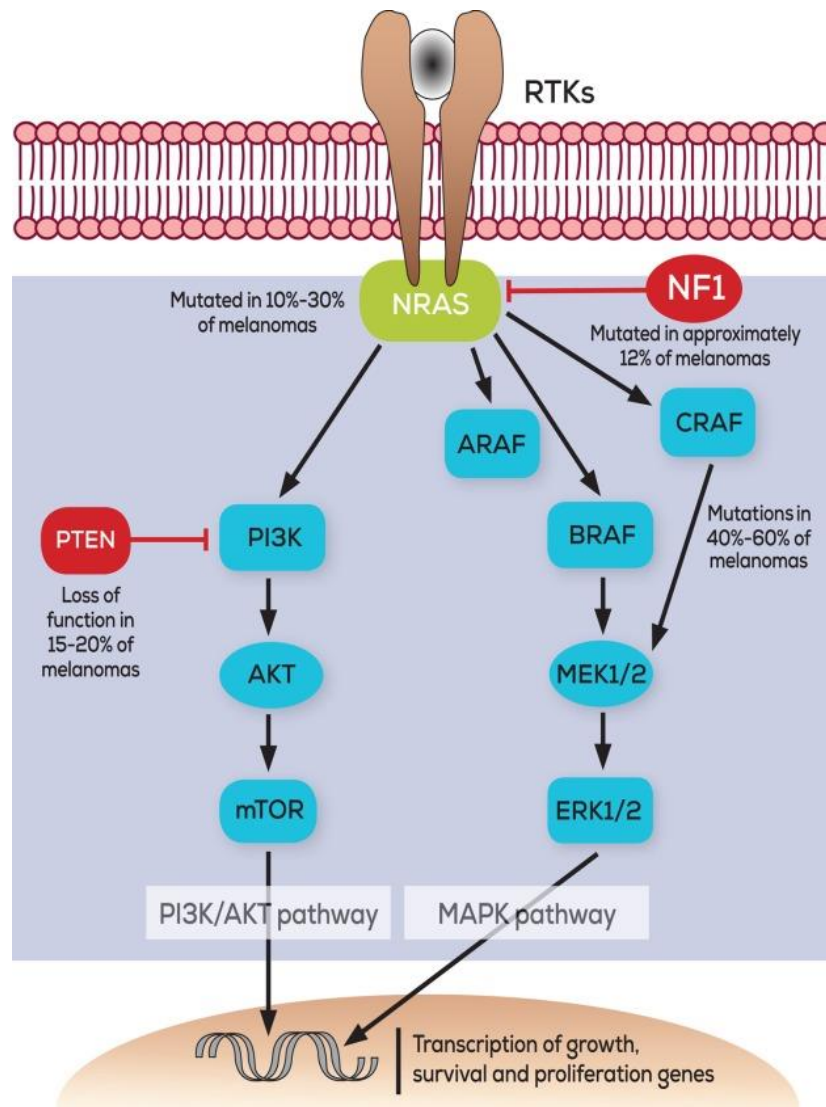


Η **RAF** (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma) είναι κινάση σερίνης/θρεονίνης που ανακαλύφθηκε ως **ογκογόνος κινάση** ρετροϊών, που προκαλεί σάρκωμα μαλακών μορίων.

Όταν ενεργοποιηθεί ομο- ή ετεροδιμερίζεται.

Γενετικές αλλαγές στο μελάνωμα κατατάσσονται σε 4 κατηγορίες

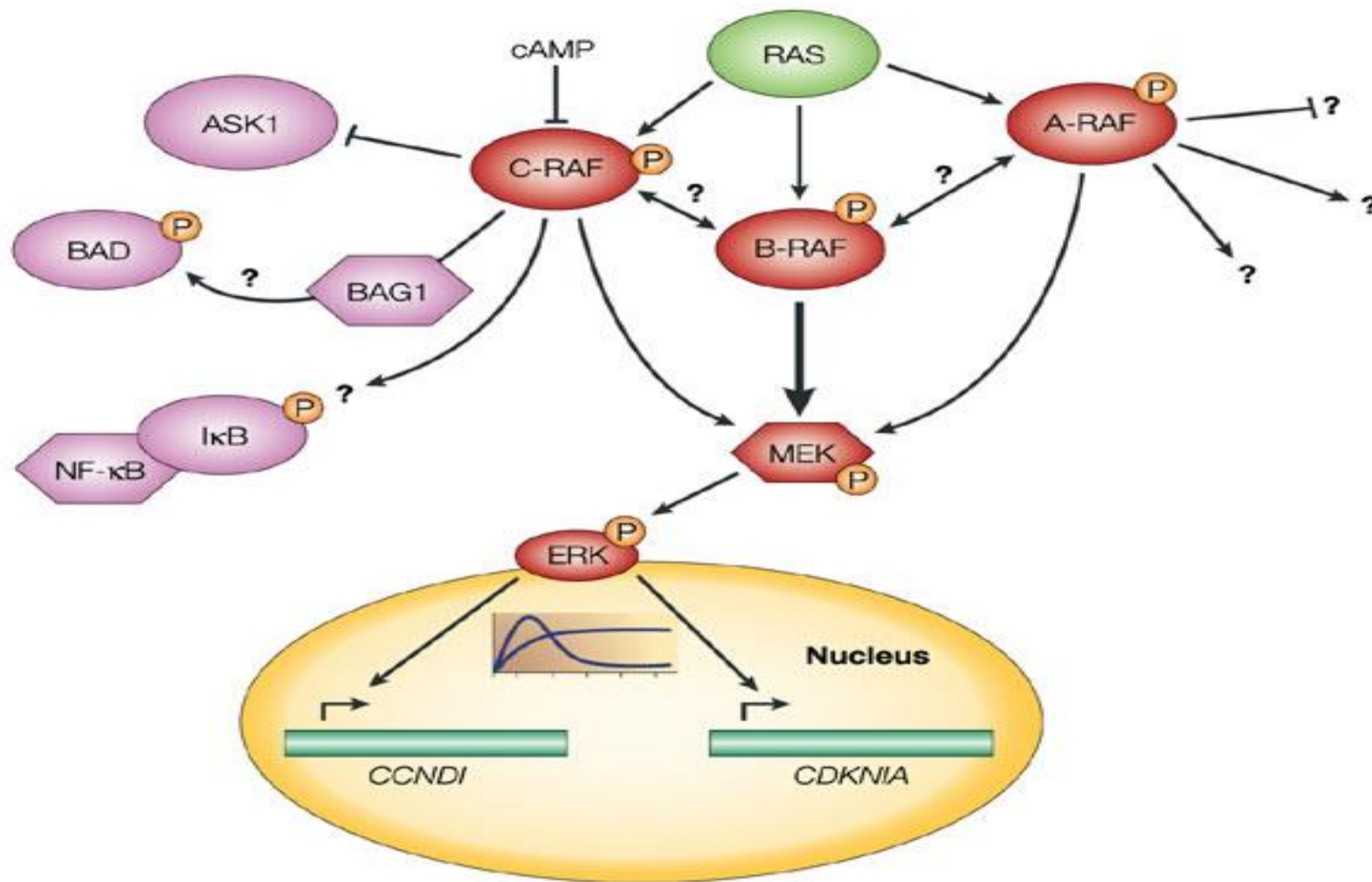
mutations on
NRAS
MAPK
PI3K/AKT



mutations on
c-KIT
PI3K/AKT
mutations on
NF1
MAPK

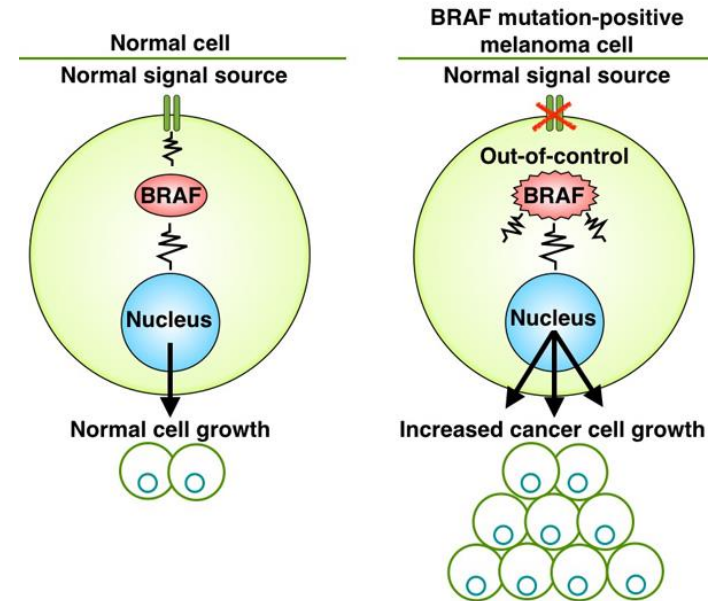
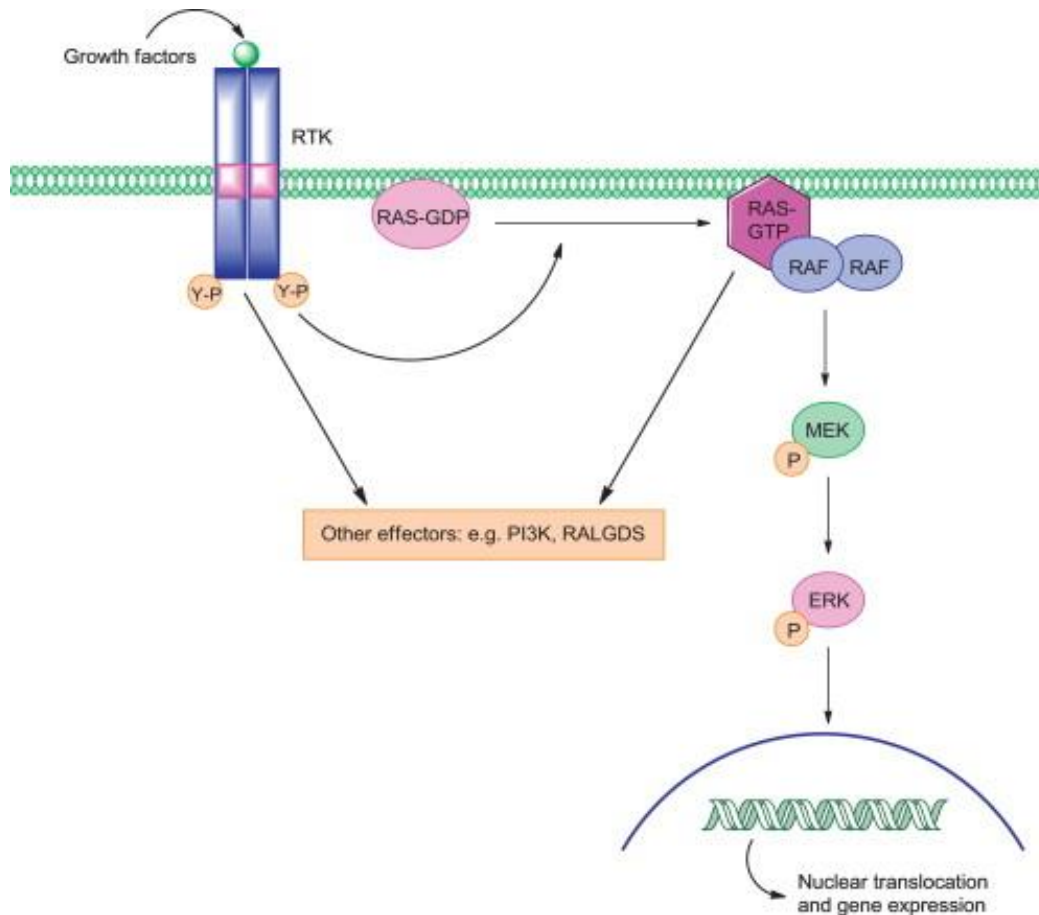
mutations on
MAPK
RAS/RAF/MEK/ERK

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 ωθηκών (~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**:

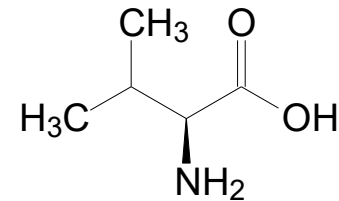
Η μετάλλαξη εμποδίζει τη λήψη ανενεργής διαμόρφωσης, με αποτέλεσμα **τη μόνιμη ενεργοποίηση της κινάσης** = φωσφορυλίωση των downstream κινασών ERK1 και ERK2, επαγωγή του κυττ. πολλαπλασιασμού και αποφυγή απόπτωσης

Λιγότερο συχνές μεταλλάξεις (απαντούν στο μελάνωμα):

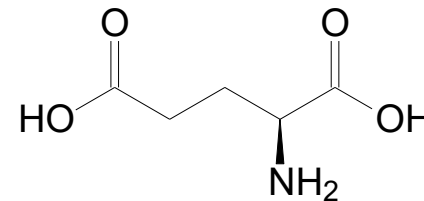
V600K (λυσίνη, ~15%)

V600R (αργινίνη ~3%)

V600D (ασπαρτικό οξύ, ~3%)



valine

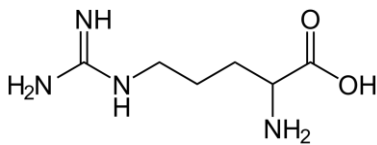
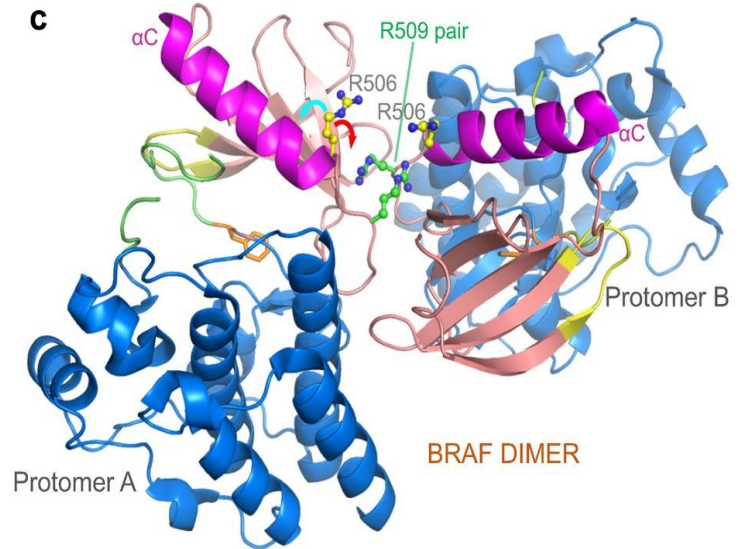
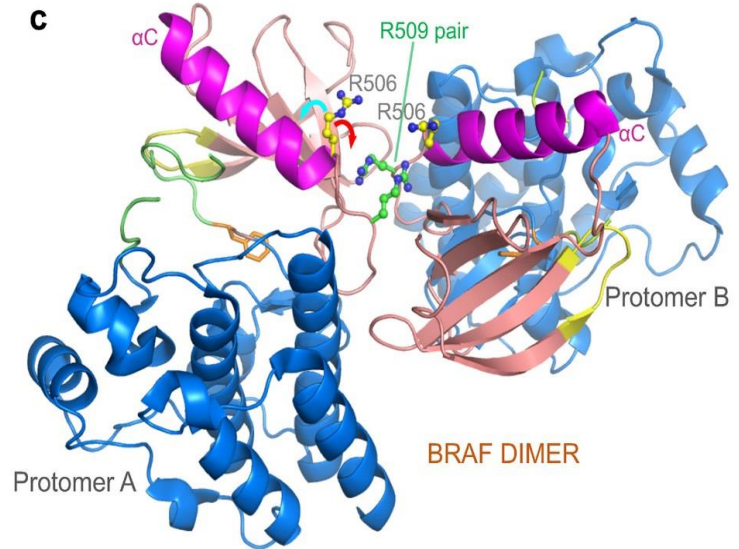
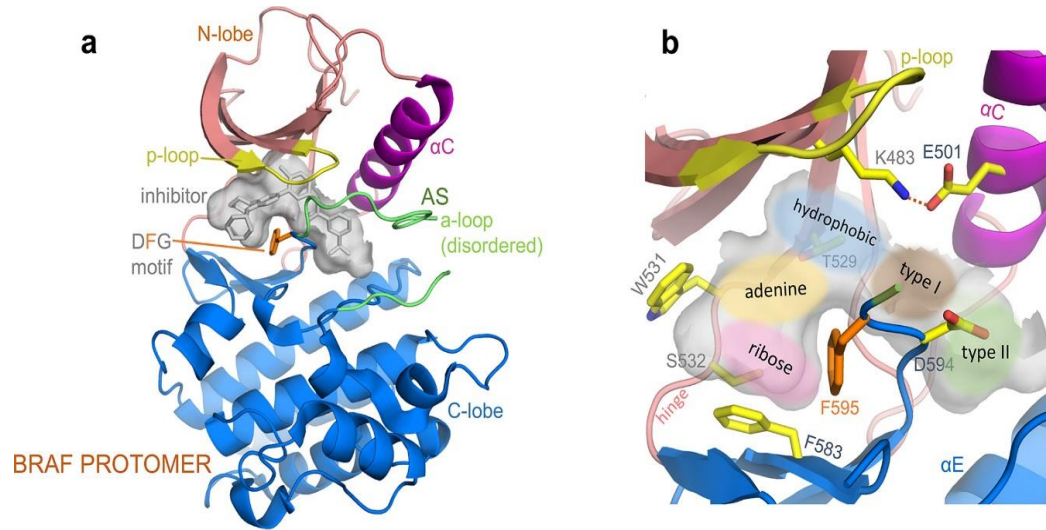


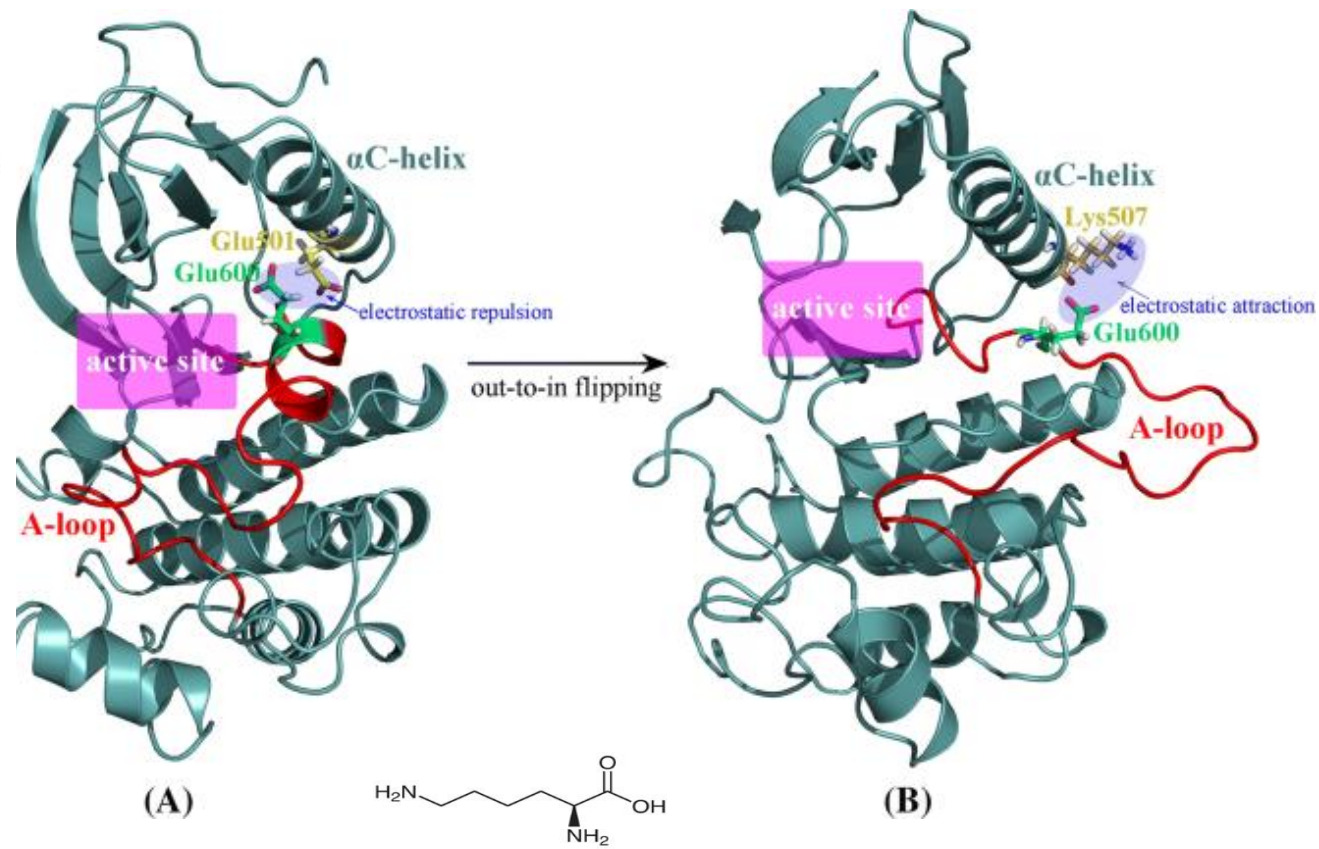
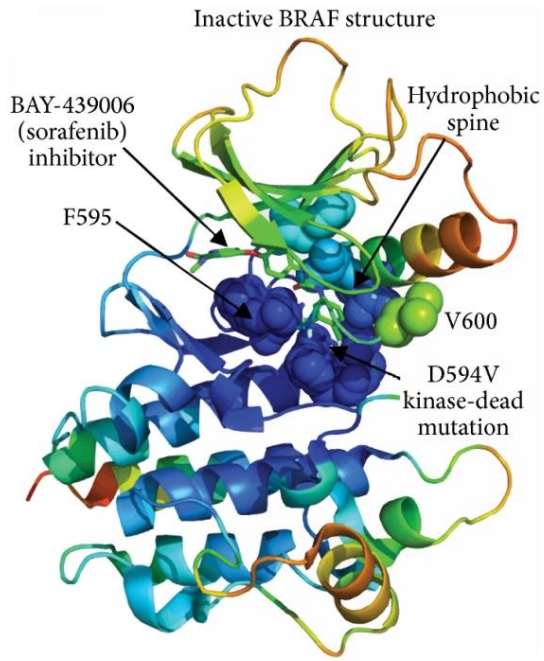
glutamic acid

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.



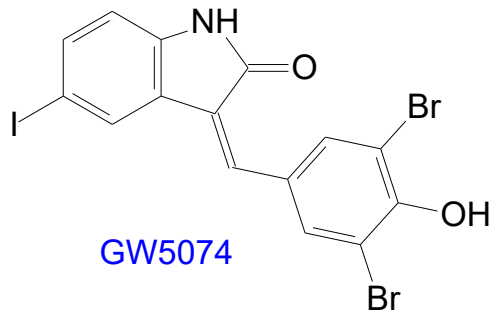


Στην $BRAF^{WT}$ η V600 σχηματίζει ισχυρές λιπόφιλες αλληλεπιδράσεις που σταθεροποιούν την ανενεργή α C-out διαμόρφωση. Για να ενεργοποιηθεί η κινάση πρέπει να φωσφορυλιωθεί το OH της Ser599, που σχηματίζει ισχυρό δεσμό άλατος με μια θετικά φορτισμένη λυσίνη (Lys507) του α C έλικα σταθεροποιώντας την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

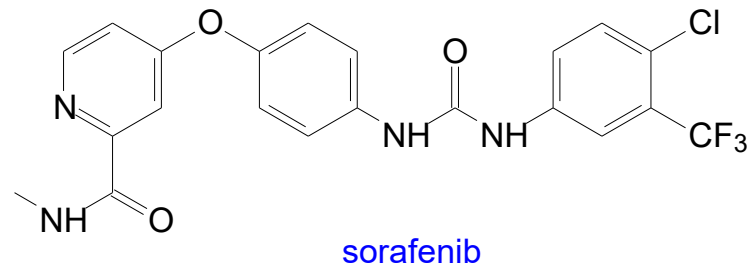
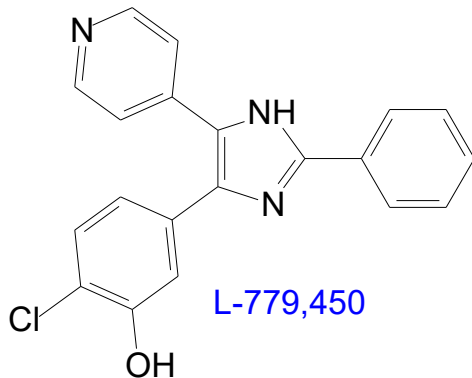
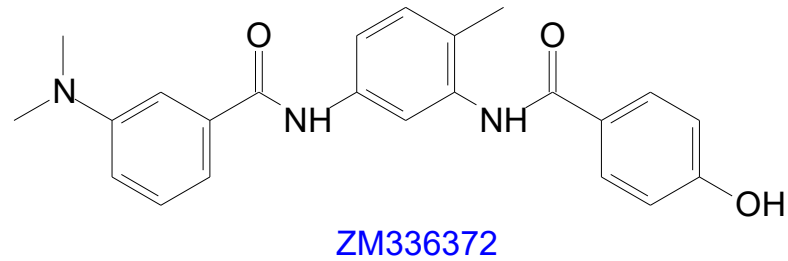
Στην $BRAF^{V600E}$ η Val600 αντικαθίσταται από το φορτισμένο στο φυσιολογικό pH Glu που μιμείται επιτυχώς τη φωσφορική ομάδα της Ser 599 και ευνοεί τη λήψη ενεργής α C-in διαμόρφωσης.

Σημαντικότεροι RAF αναστολείς προ του 2005

p/s CRAF inhibitor
(IC₅₀: 9nM)

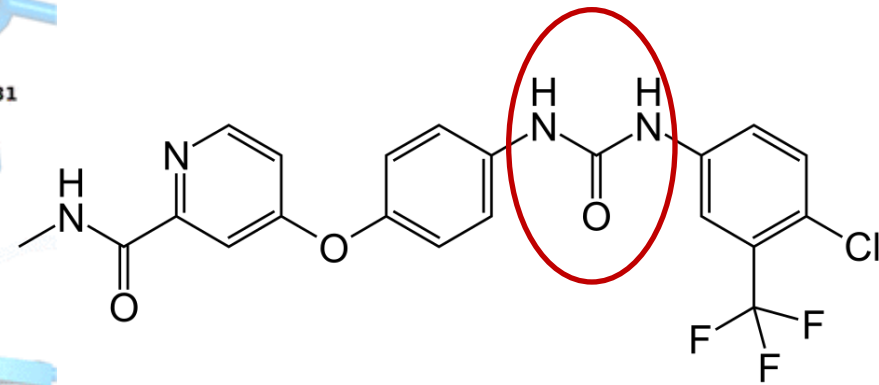
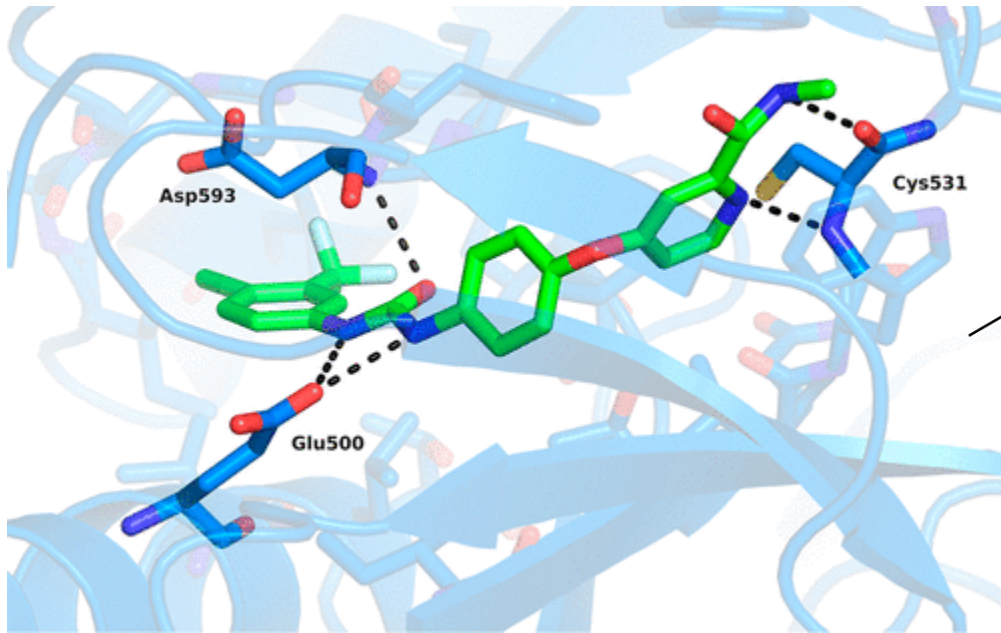


p/s CRAF inhibitor
(IC₅₀: 70nM)



p ARAF inhibitor
(IC₅₀: 10nM)

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

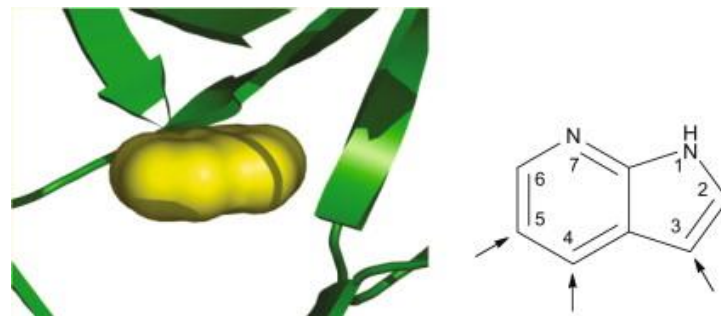
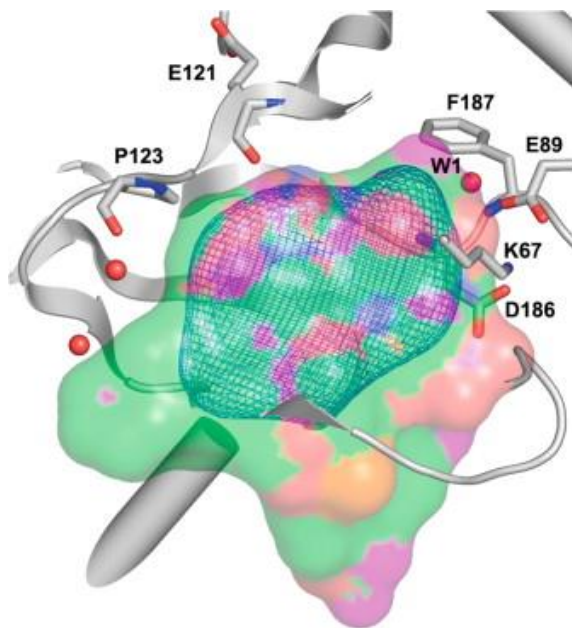


Η ομάδα ουρίας του **Sorafenib** αλληλεπιδρά με τη θέση πρόσδεσης του ATP και με το **DGF-Asp593** ενώ ο πυριδινικός δακτύλιος εισέρχεται στη δευτερεύουσα κοιλότητα σταθεροποιώντας την ανενεργή DFG out διαμόρφωση.

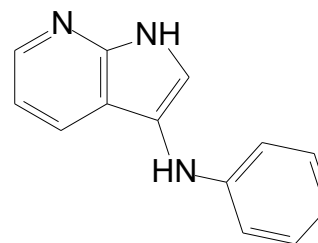
- **fragment-based approach** τακτική που βασίζεται σε συνδυασμούς δύο ξεχωριστών τμημάτων που δεν δεσμεύονται πολύ ισχυρά στο ένζυμο, με σκοπό τη λήψη ενός μεγαλύτερου παραγώγου με βελτιωμένες θερμοδυναμικές παραμέτρους.
- **scaffold-based approach** παρεμφερής τρόπος σχεδίασης που χρησιμοποιεί μεγαλύτερα fragments και χημικά scaffolds στα οποία προσθέτει συγκεκριμένες λειτουργικές ομάδες για την ανάπτυξη δικτύου αλληλεπιδράσεων με τη πρωτεΐνη-στόχο

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

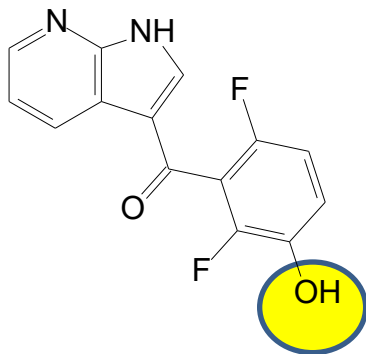
Εντοπισμός του 7-αζαϊνδολίου ως βασικής ένωσης-οδηγού για **scaffold-based approach**
Συγκρουσάλλωση παραγώγου του με την Pim-1.



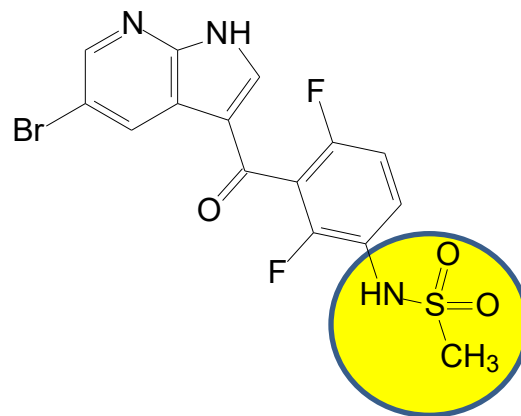
Pim-1 $IC_{50} > 200 \mu M$



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

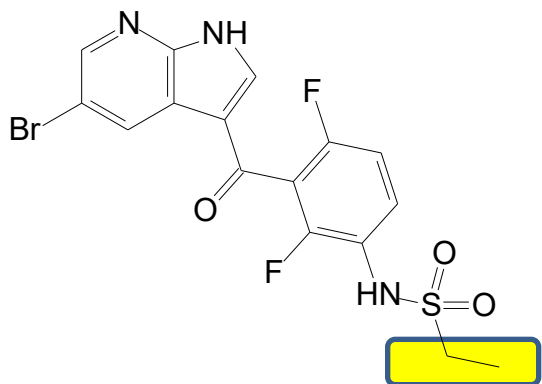


διφθοροφαινόλη
 Δημιουργία δ.Η με ATP binding pocket

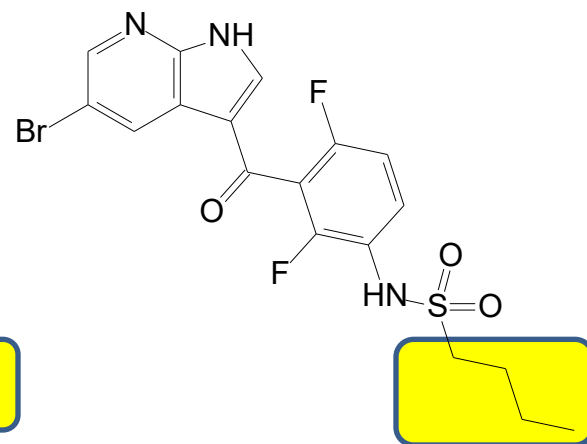
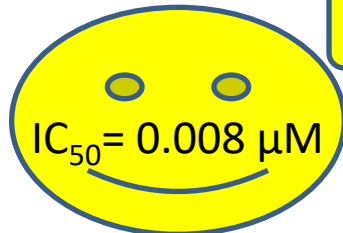
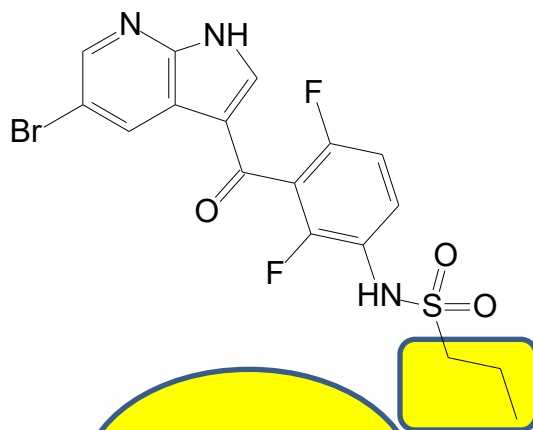


Μεταβολική σταθεροποίηση
 Βιοϊσοστερής αλλαγής (IC₅₀= 0.22 μM)

Lead optimization

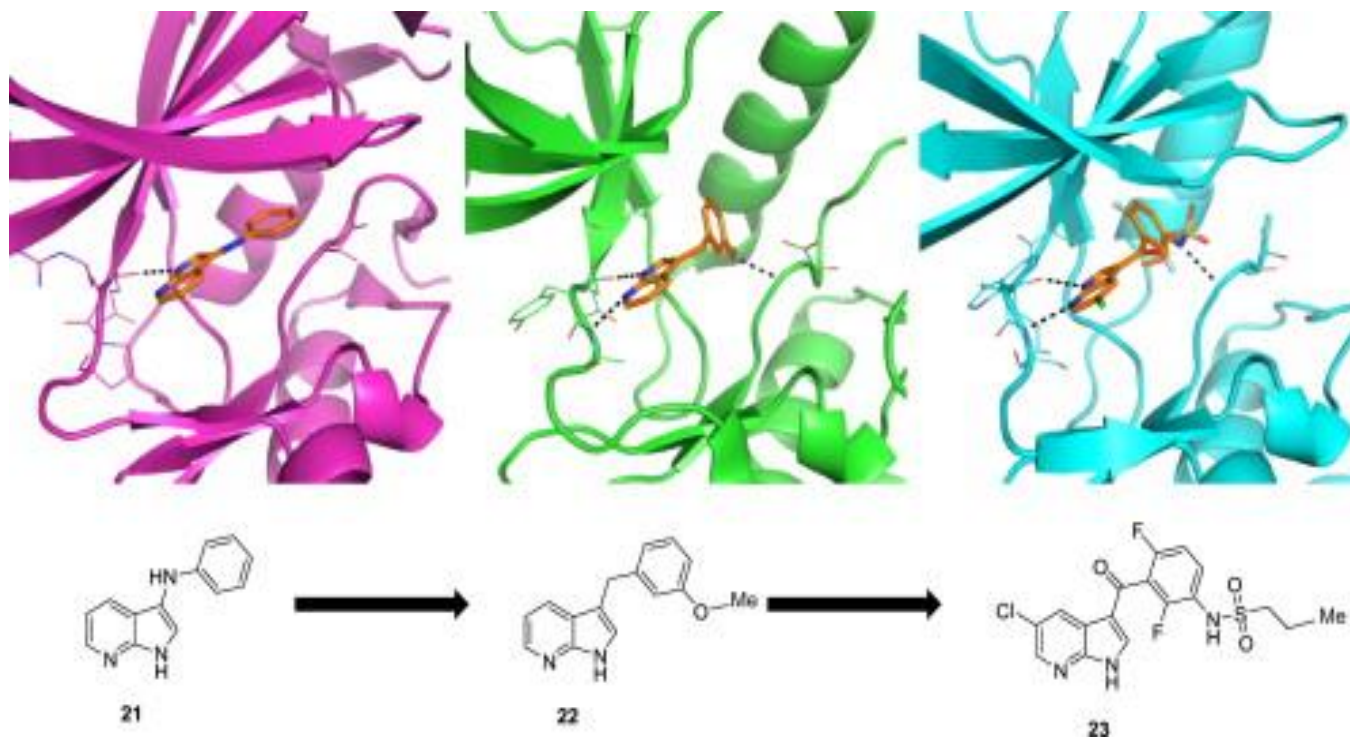


IC₅₀= 0.11 μM

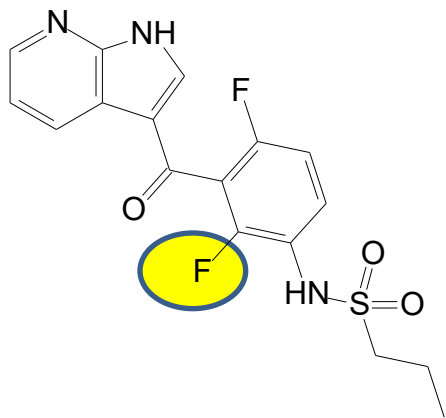


IC₅₀= 0.02 μM

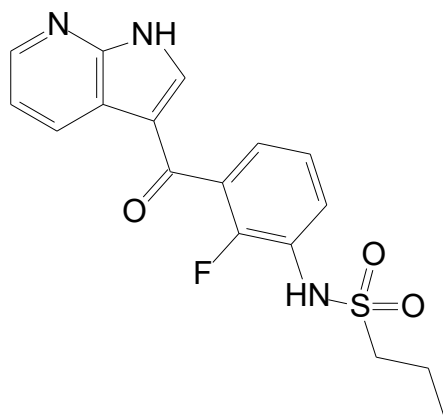
Οι σχέσεις δομής-δράσης επαληθεύονται με κρυσταλλογραφία



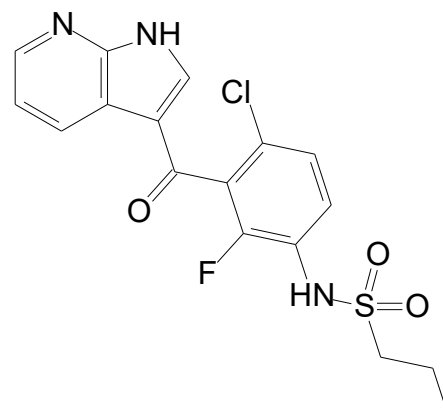
(A) Κρυσταλλογραφική απεικόνιση του 3-αμινοφαινυλο-7-αζαινδολίου (**21**) εντός της PIM-1 κινάσης. (B) Κρυσταλλογραφική απεικόνιση του 3-(3-μεθοξυβενζυλο)-7-αζαινδολίου (**22**) εντός της κινάσης FGFR1. (C) Κρυσταλλογραφική απεικόνιση του PLX4720 (**23**) εντός της B-Raf κινάσης.



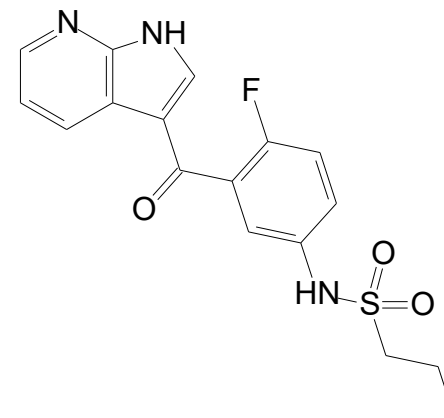
$IC_{50} = 0.11 \mu M$



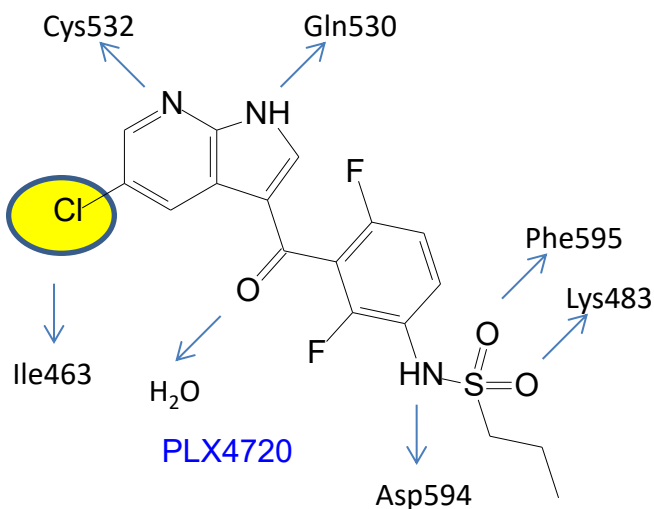
$IC_{50} = 0.68 \mu M$



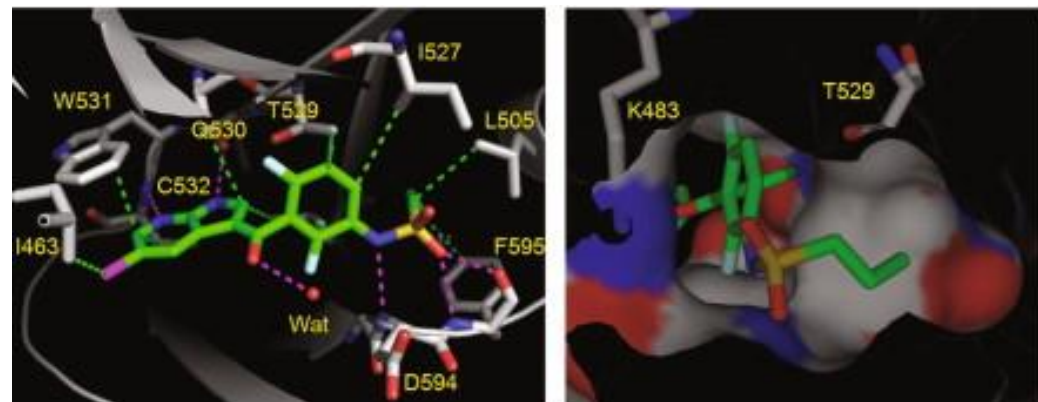
$IC_{50} = 0.24 \mu M$



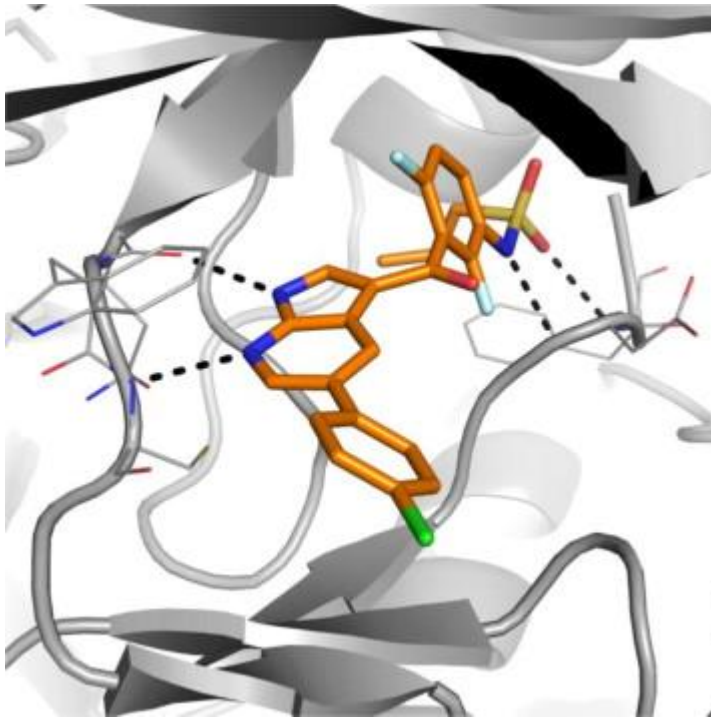
$IC_{50} > 10 \mu M$



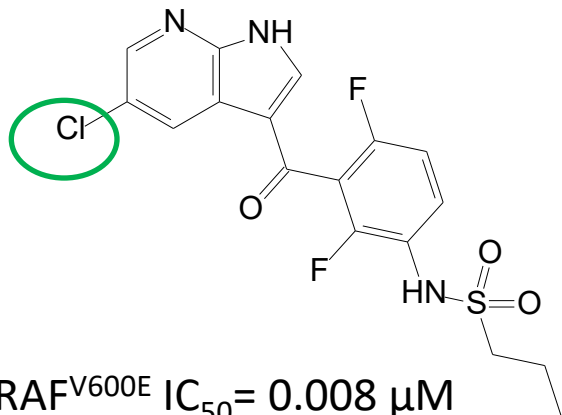
$IC_{50} = 0.008 \mu M$ έναντι B-Raf^{V600E}
 10πλασια εξειδίκευση έναντι WT B-Raf
 100πλασια εξειδίκευση έναντι 70
 κινασών



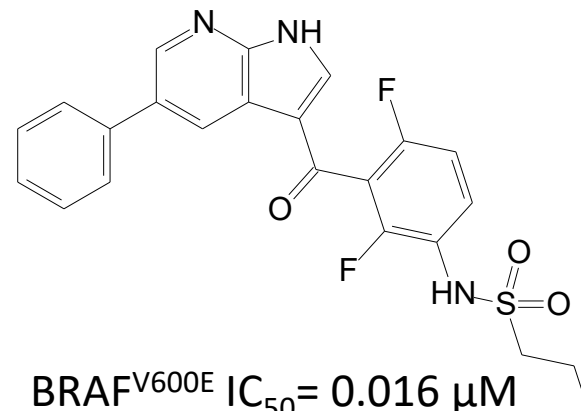
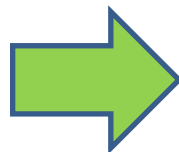
Ο 3-υποκαταστάτης αλληλεπιδρά με το αμινοξύ-
 θυρωρό (Thr529) και με το μοτίβο DFG (**DFG-in**
διαμόρφωση), ενώ η προπυλομάδα μπαίνει σε
 μικρή λιπόφιλη κοιλότητα που υπάρχει μόνο στην
 οικ RAF



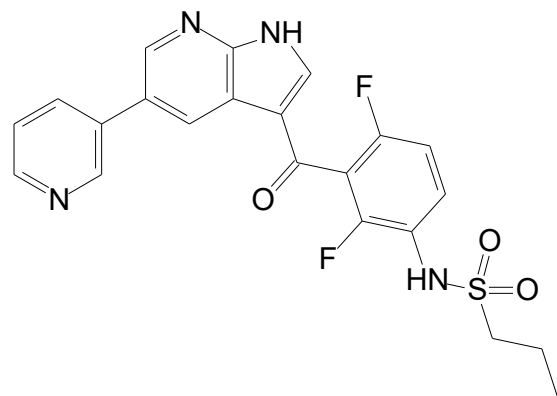
Διακρίνεται η αλληλεπίδραση του N του σουλφοναμιδίου με το μοτίβο DFG καθώς και η είσοδος της προπυλομάδας στην Raf-selective κοιλότητα.



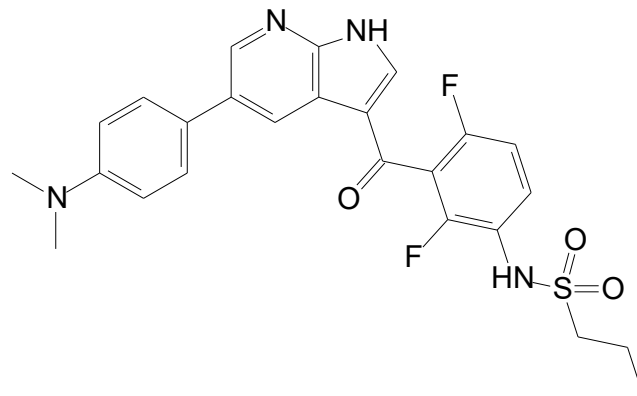
BRAF^{V600E} IC₅₀ = 0.008 μM



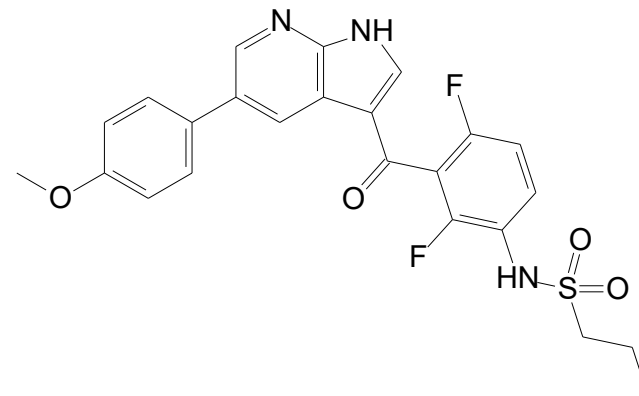
BRAF^{V600E} IC₅₀ = 0.016 μM



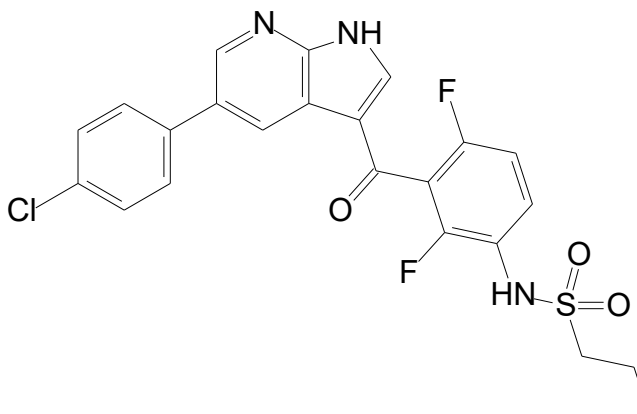
BRAF^{V600E} IC₅₀ = 0.003 μM



BRAF^{V600E} IC₅₀ = 0.055 μM



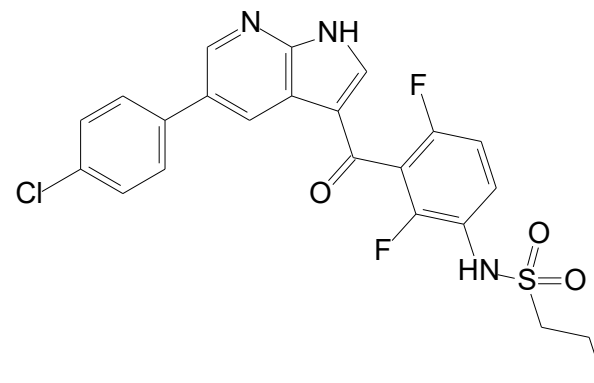
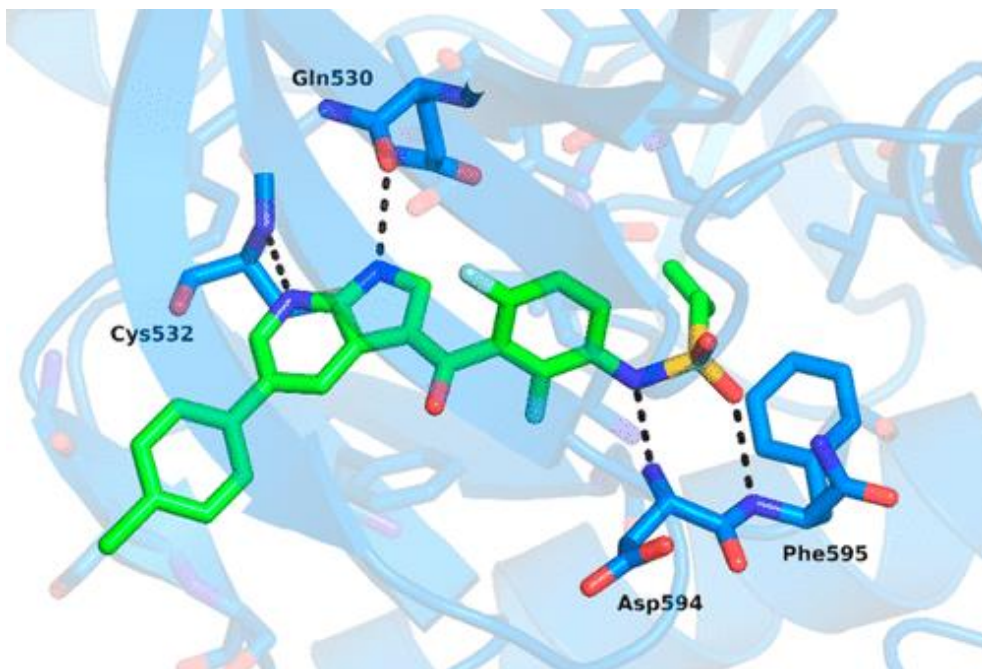
BRAF^{V600E} IC₅₀ = 0.02 μM



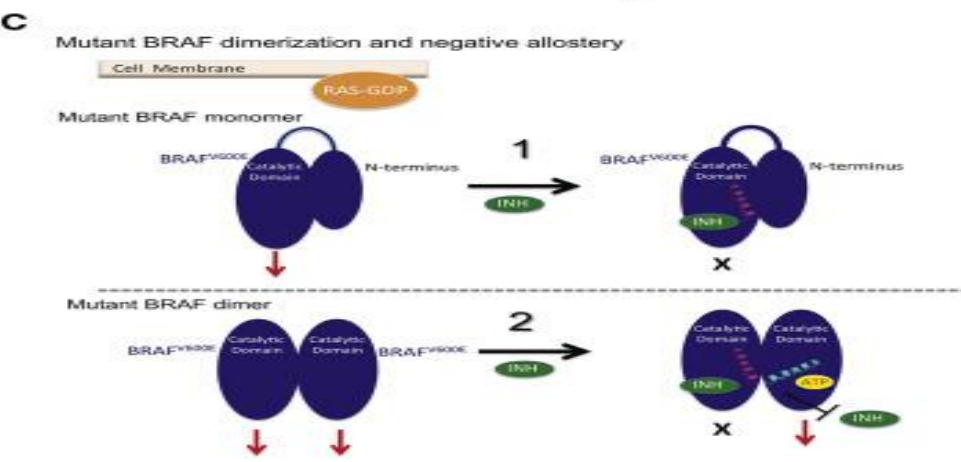
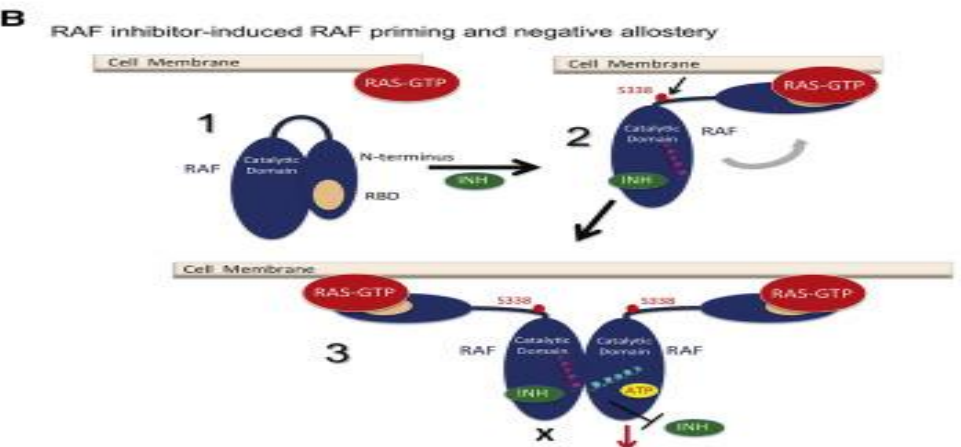
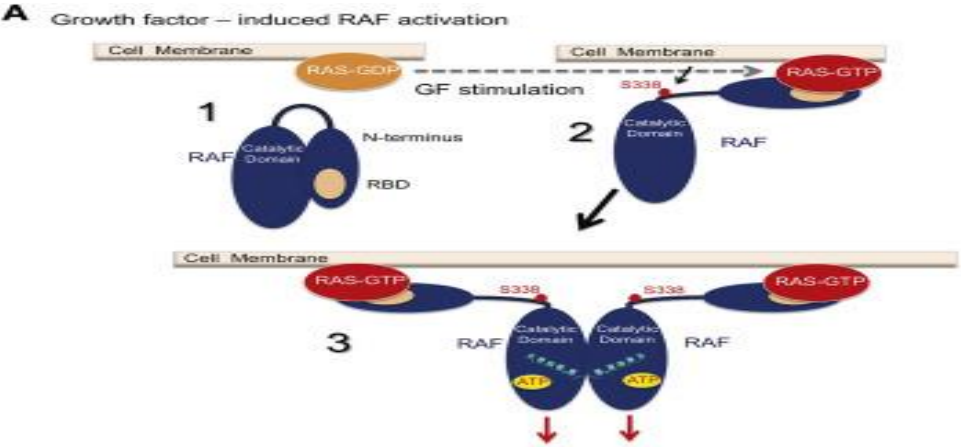
BRAF^{V600E} IC₅₀ = 0.031 mM

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.

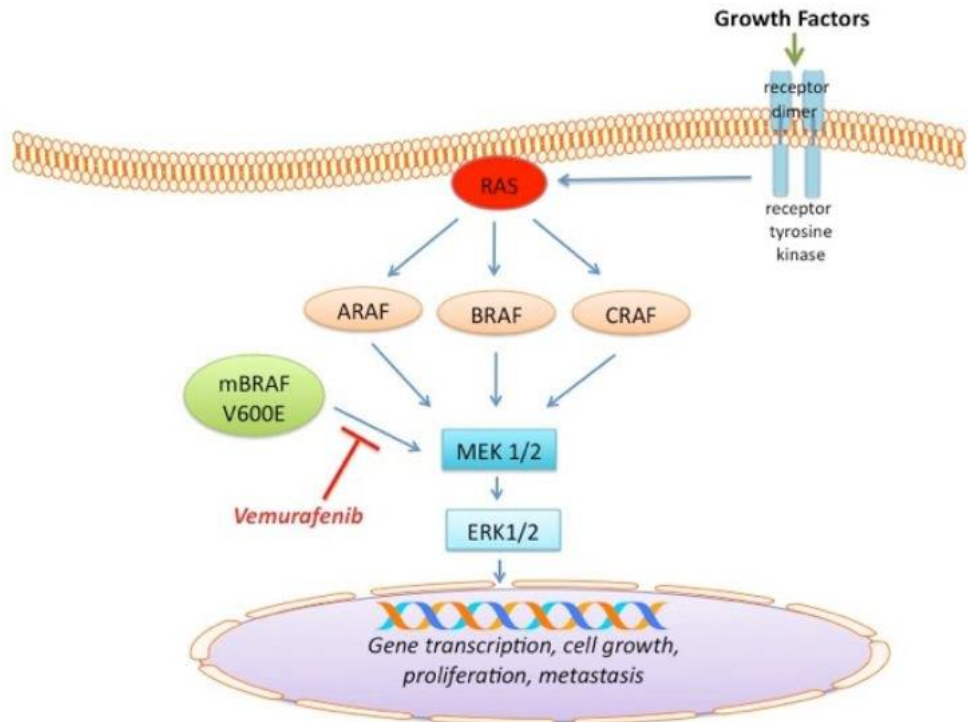


Σχηματισμός του ασύμμετρου διμερούς: Η πρόσδεση του vemurafenib στο 1^ο πρωτομερές υποχρεώνει την αC έλικα να λάβει την αC-out διαμόρφωση. Όμως, η αC έλικα του 2^{ου} πρωτομερούς λαμβάνει υποχρεωτικά αC-in διαμόρφωση (αρνητική αλλοστερική επίδραση) και εμποδίζεται η πρόσδεση 2^{ου} μορίου vemurafenib: 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



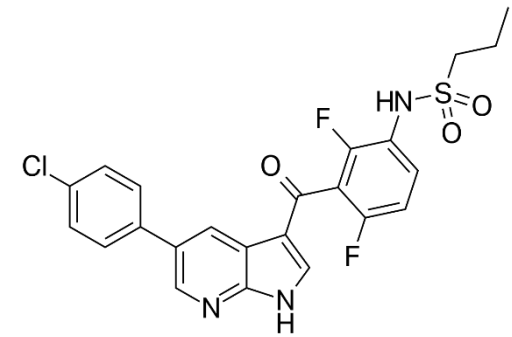
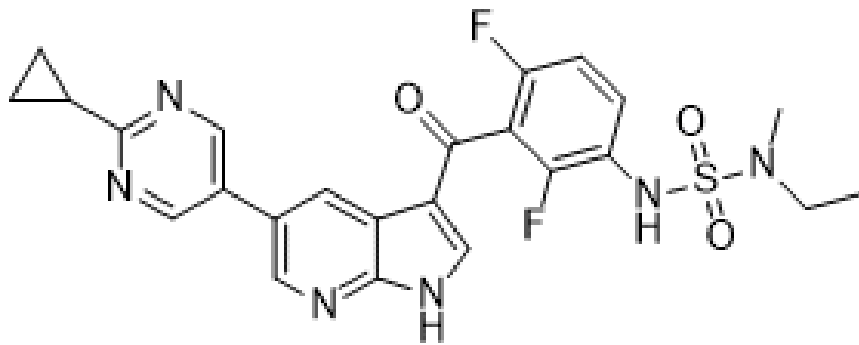
Το διαγνωστικό τεστ εγκρίθηκε ταυτόχρονα με το vemurafenib.

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.



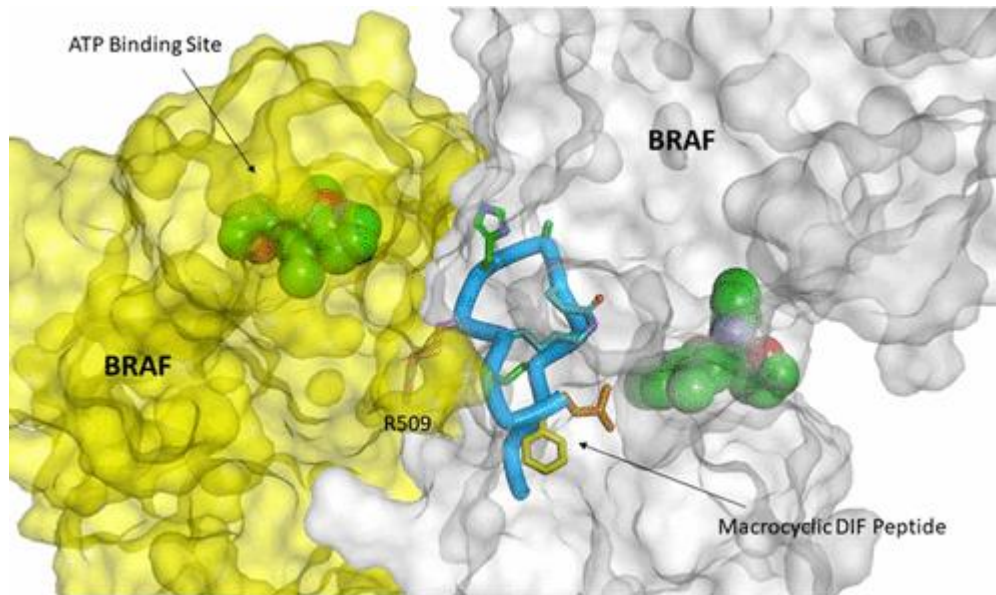
ΛΥΣΕΙΣ

- “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.

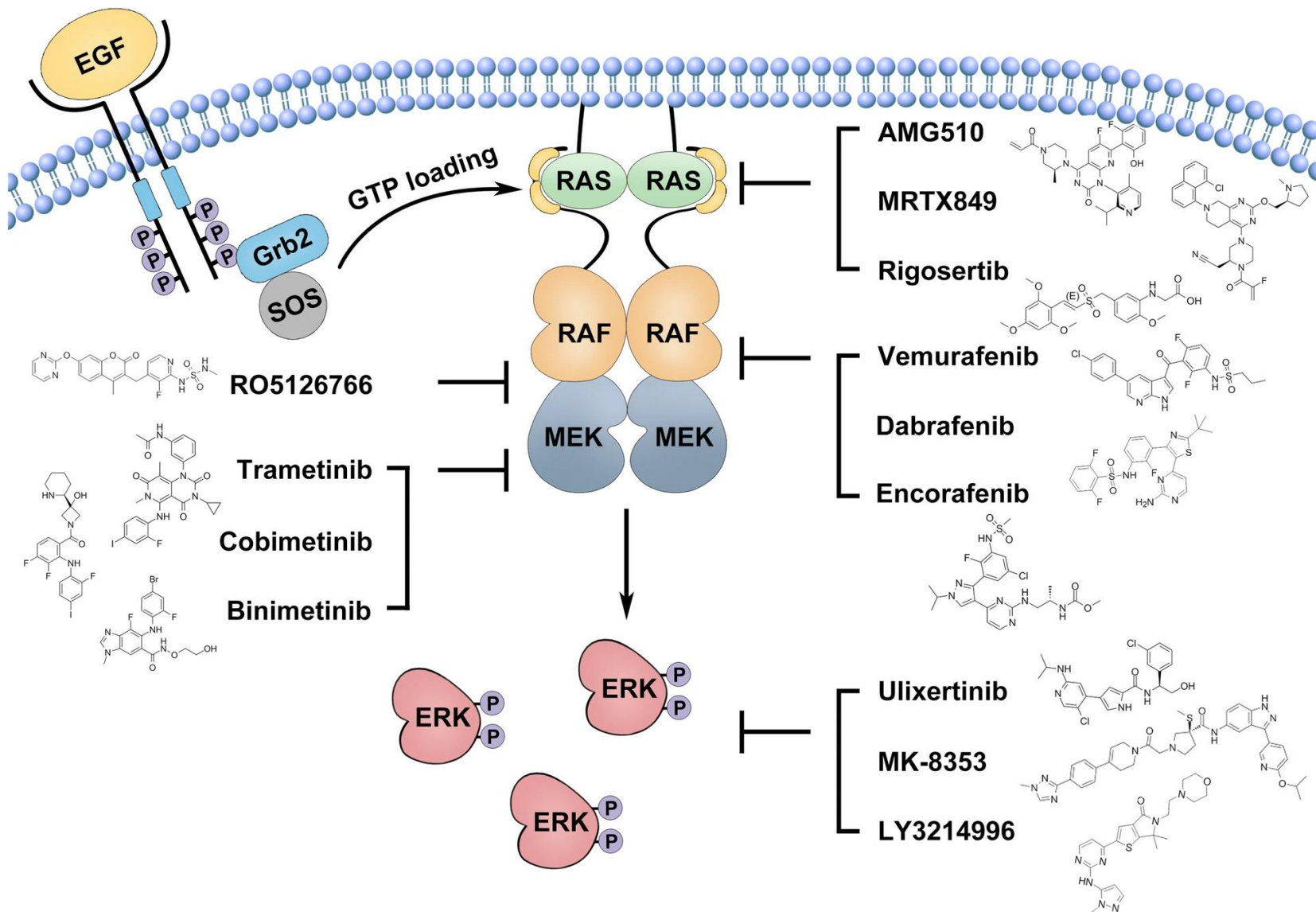
- Αλλοστερικοί αναστολείς

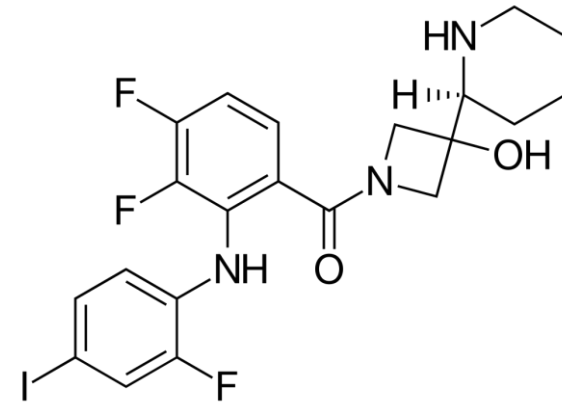
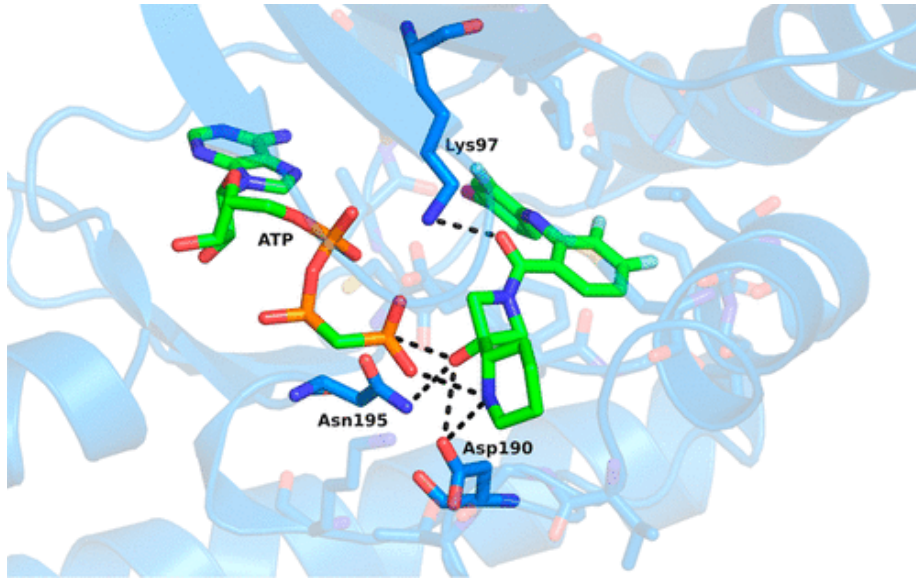


Αλλοστερικοί αναστολείς του διμερισμού τύπου IV

Η πρόσδεση μορίων στη μεσεπιφάνεια των δύο πρωτομερών μπορεί να αναστείλει το διμερισμό της BRAF και την παράδοξη 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**: προσδέεται 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)*

