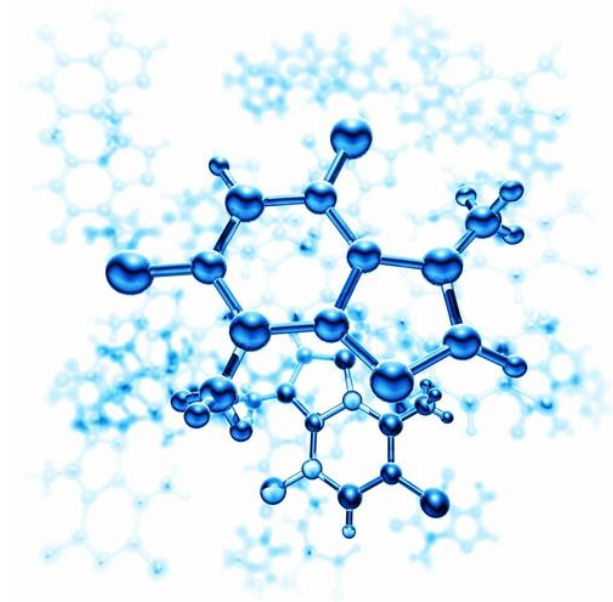
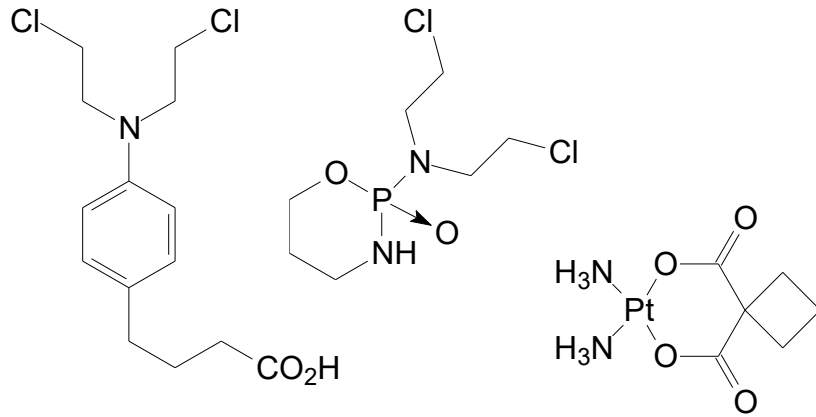


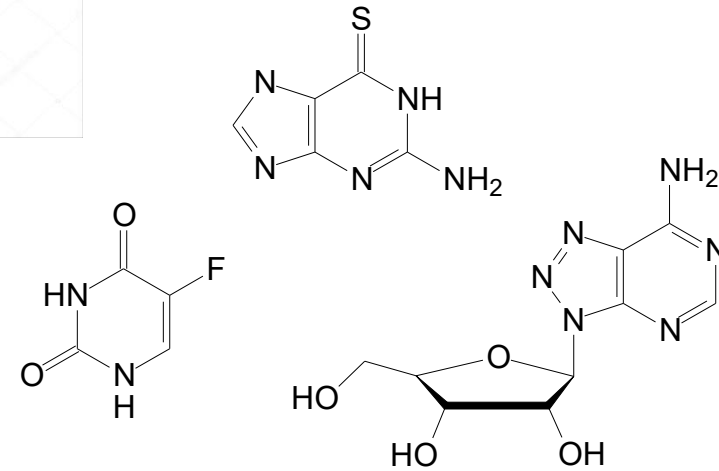
Ενζυμική αναστολή – σχεδιασμός φαρμάκων που αναστέλλουν πρωτεϊνικές κινάσες



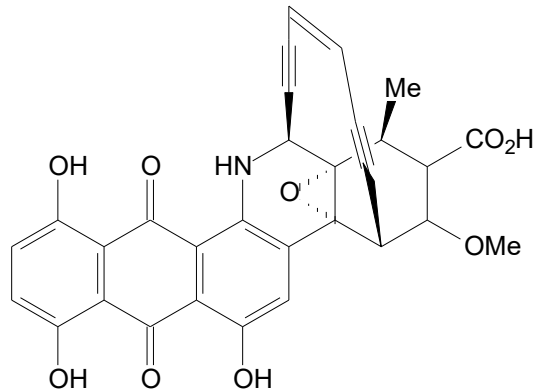
Αλκυλιωτικοί παράγοντες



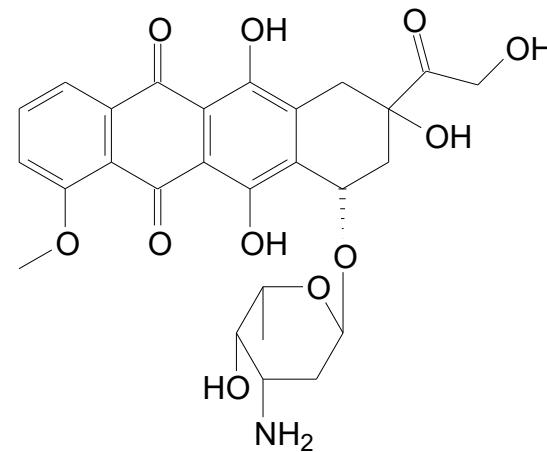
Αντιμεταβολίτες



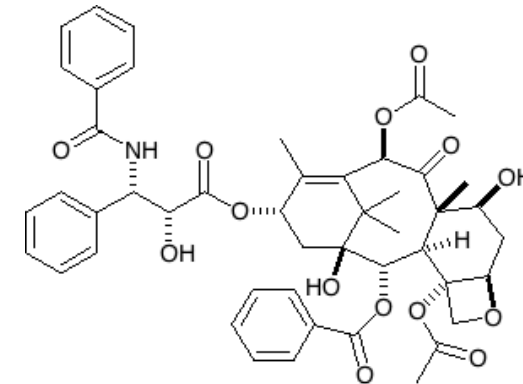
Μόρια που προκαλούν
σχάση του DNA



Ενδοπαρεμβολείς



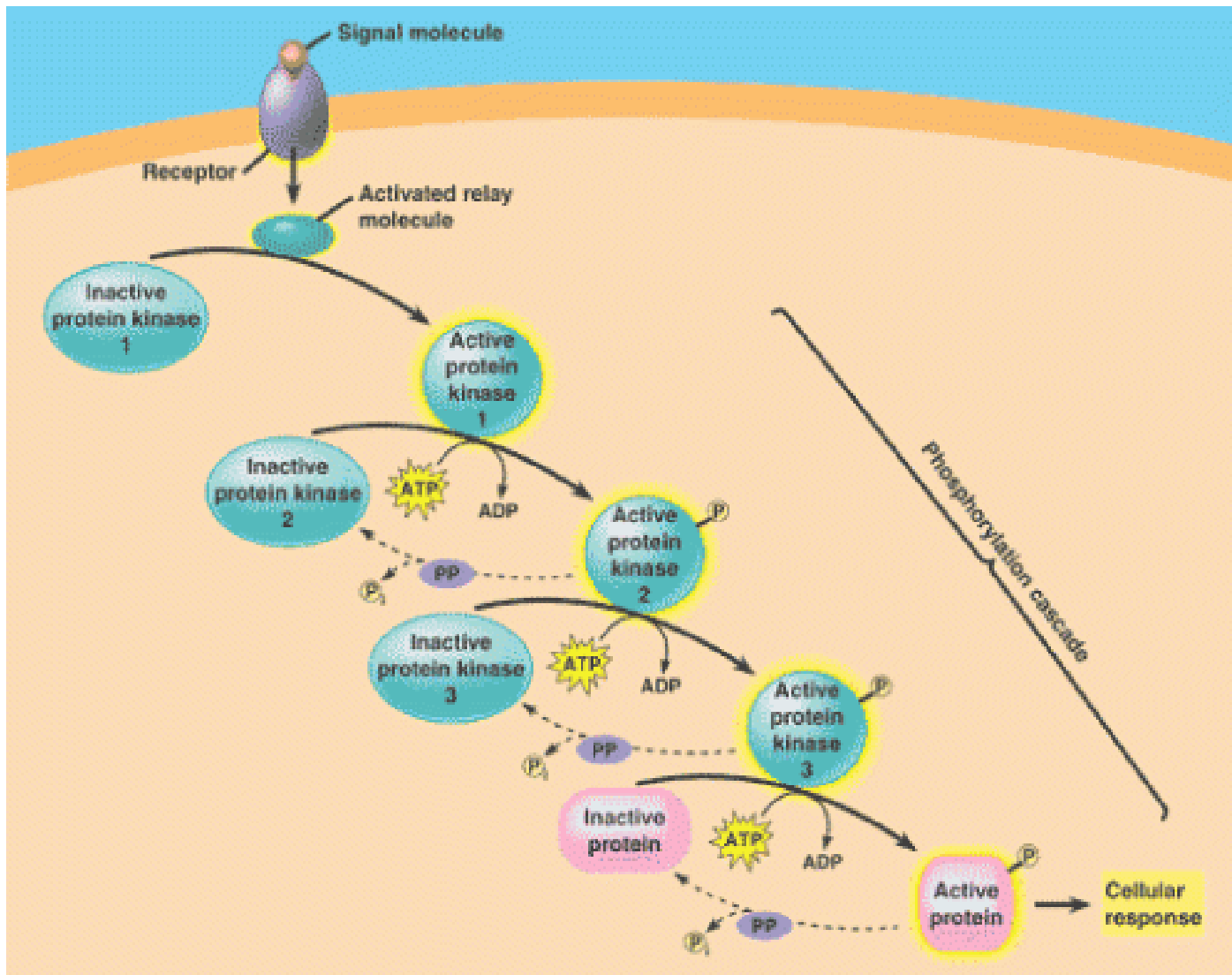
Αναστολείς κυτταρικών στοιχείων



Αντικαρκινικά φάρμακα

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

Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών 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.**

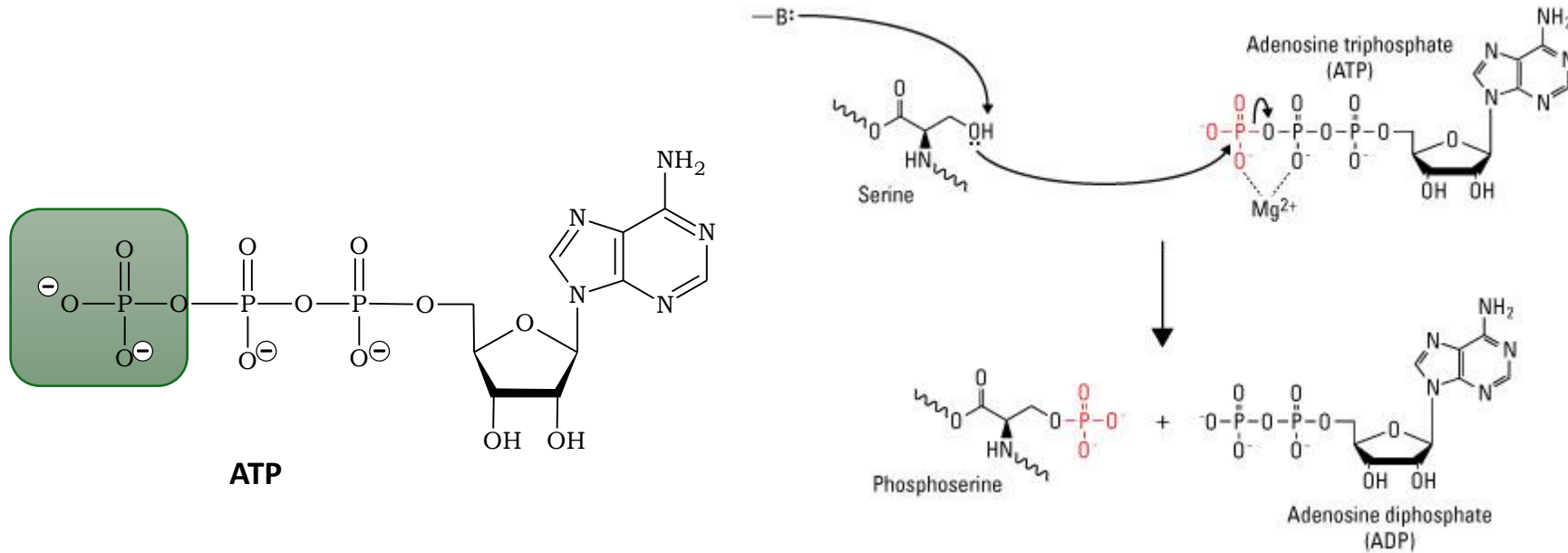


Η προσθήκη φωσφορικής ομάδας σε αμινοξικά υπόλοιπα πρωτεϊνών καταλύεται από εξειδικευμένα ένζυμα και επηρεάζει πληθώρα ιδιοτήτων, όπως:

- 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

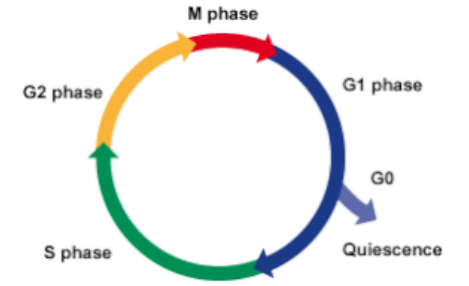
Ανεξαρτήτως της εξειδικευμένης λειτουργίας τους όλες **οι πρωτεϊνικές κινάσες καταλύουν τη μεταφορά της γ-φωσφορικής ομάδας του ATP** στο υδροξύλιο τυροσίνης, σερίνης, ή θρεονίνης (που συμμετέχουν σε δομικές πρωτεΐνες, μεταβολικά ένζυμα ή παράγοντες μεταγραφής).



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.

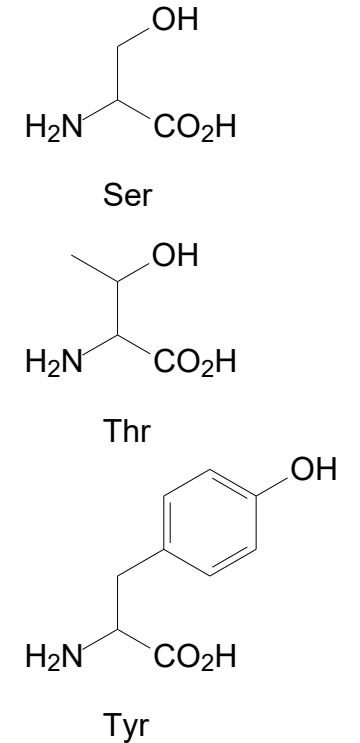
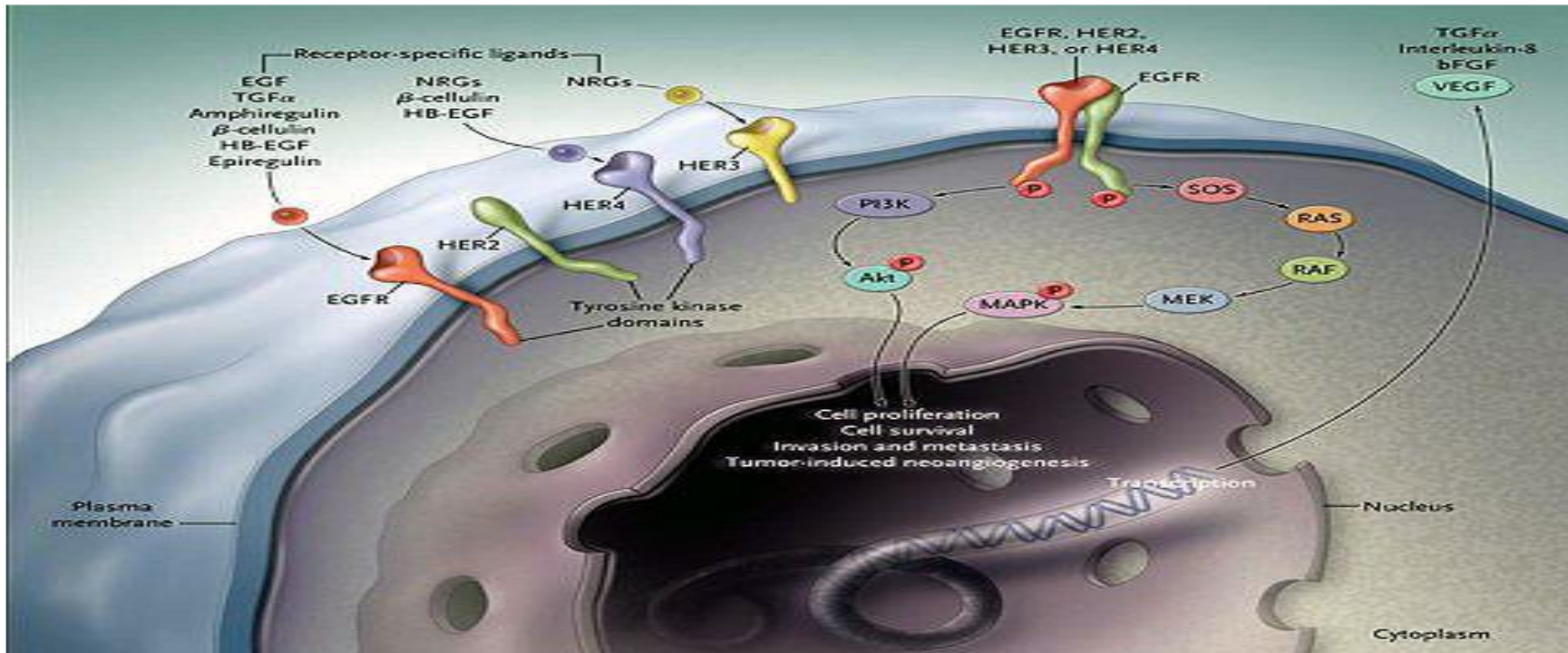
Οι κινάσες χαρακτηρίζονται με βάση το υπόστρωμα που φωσφορυλιώνουν:

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

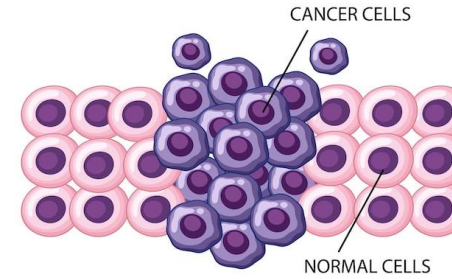


Λειτουργικά οι πρωτεϊνικές κινάσες κατατάσσονται σε:

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

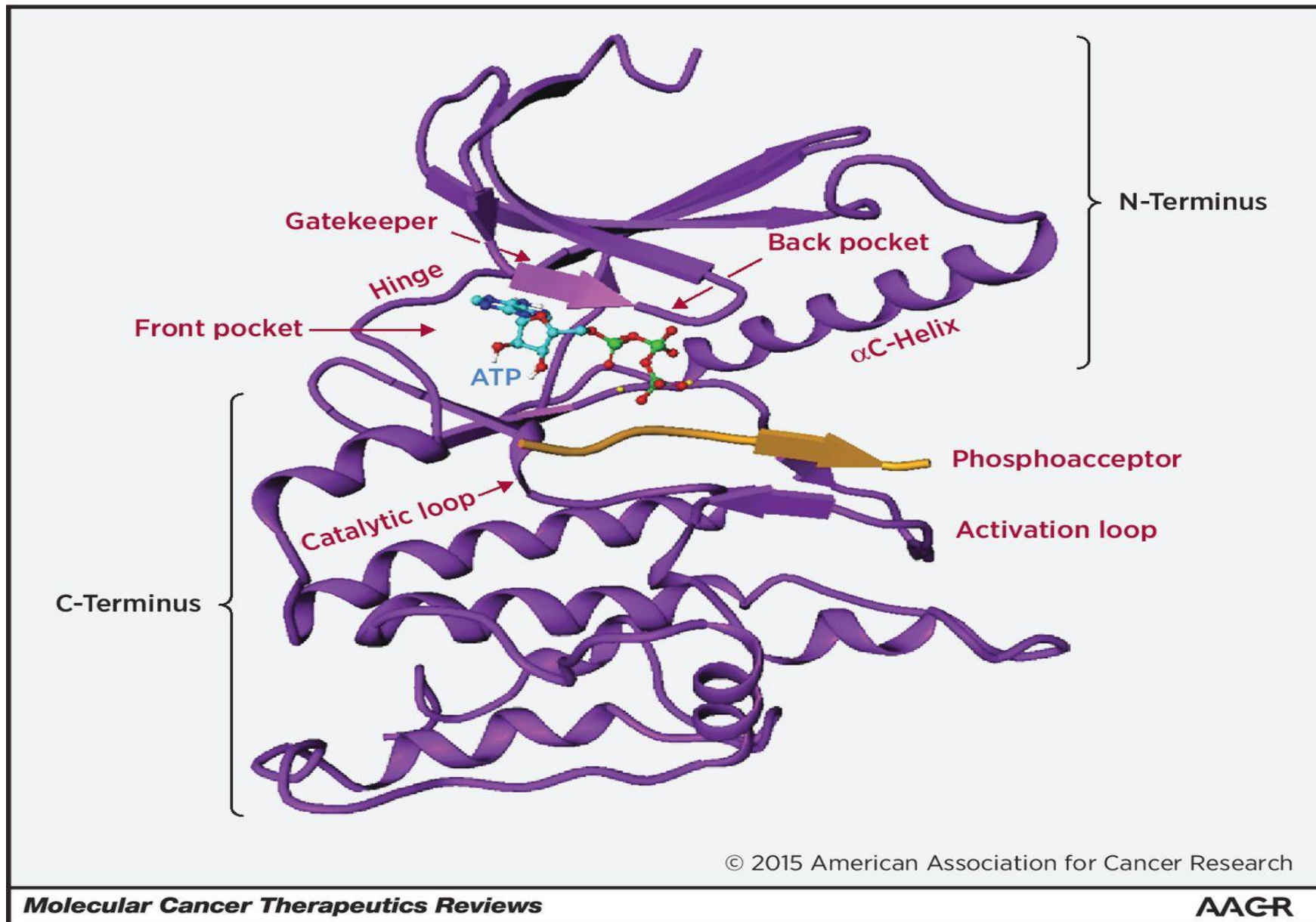


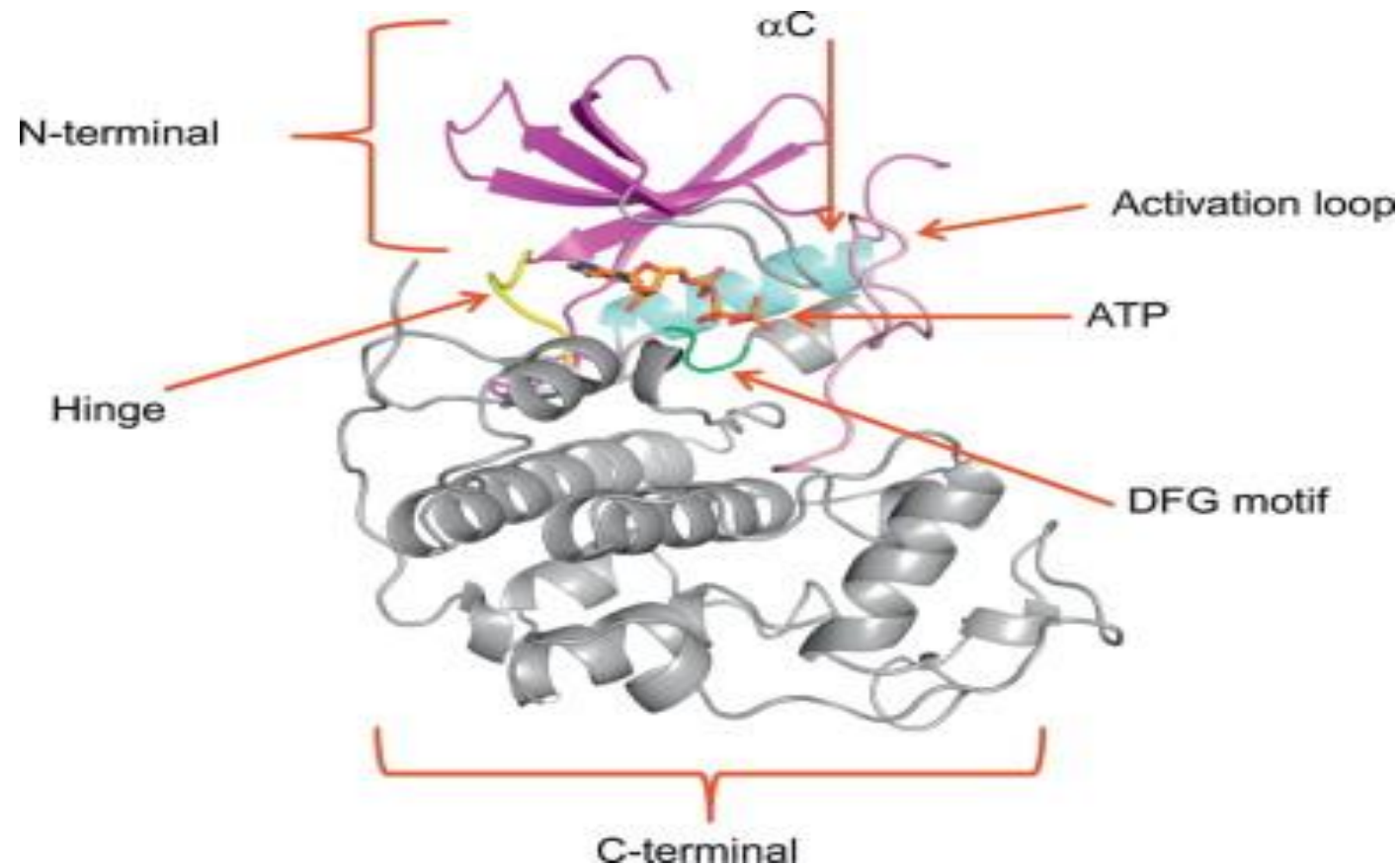
Η απώλεια ελέγχου της φυσιολογικής λειτουργίας των πρωτεϊνικών κινασών αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό του καρκινικού κυττάρου. Οι πρωτεϊνικές κινάσες προωθούν την ανάπτυξη καρκίνου με διάφορους τρόπους:



- **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



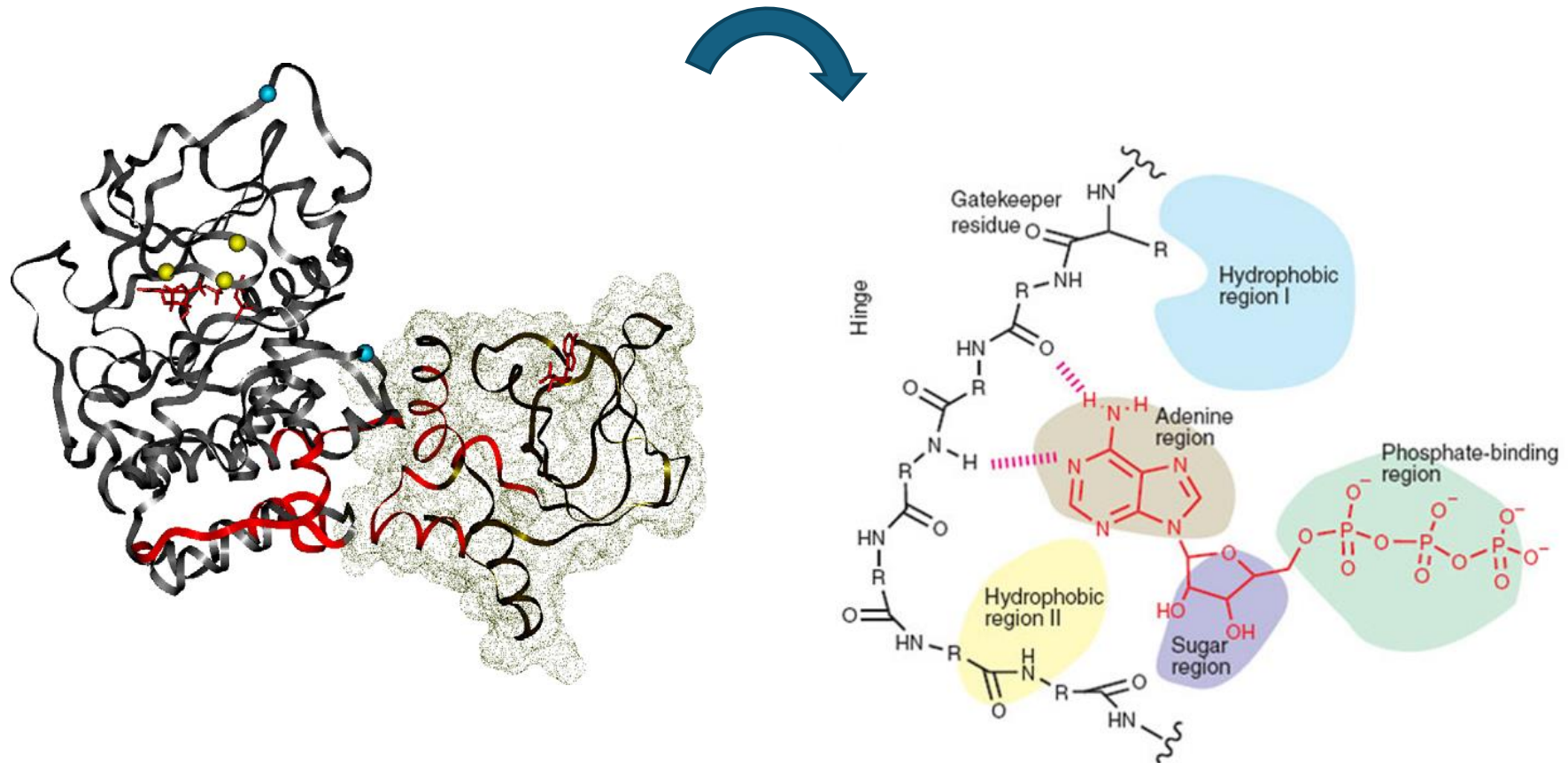


Η φωσφορυλίωση πρωτεΐνης είναι μετα-μεταφραστική τροποποίηση. Η προκύπτουσα δομική αλλαγή δημιουργεί θέση αναγνώρισης για ένα άλλο ένζυμο, ή επηρεάζει τη καταλυτική δράση της κινάσης, που σχετίζεται είτε με τη λειτουργία σηματοδοτικής οδού, είτε με την έναρξη ενός καταρράκτη σημάτων.

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

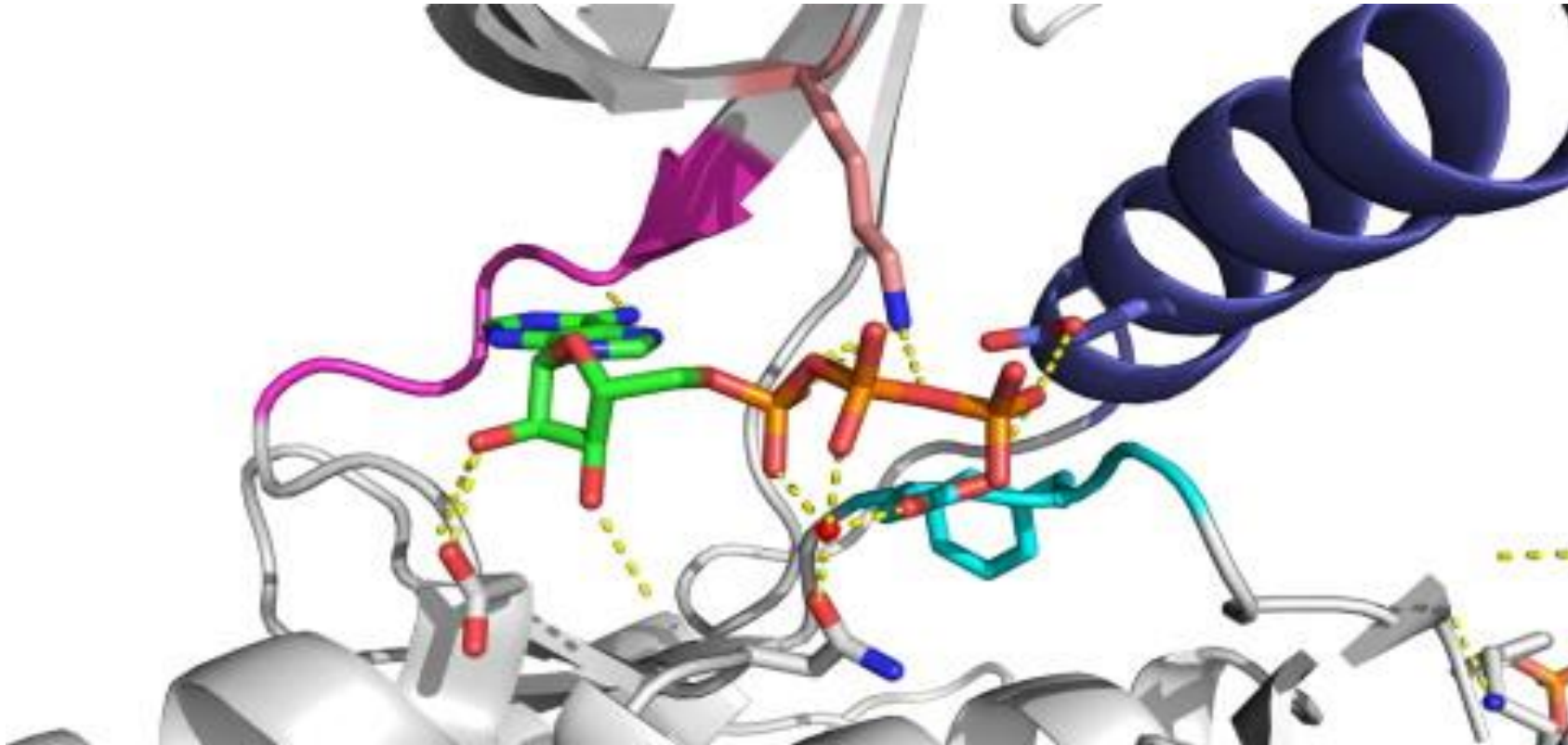
Στην αντίδραση μεταφοράς της φωσφορικής ομάδας συμμετέχουν τρεις περιοχές του ενεργού κέντρου της πρωτεϊνικής κινάσης:

- 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.

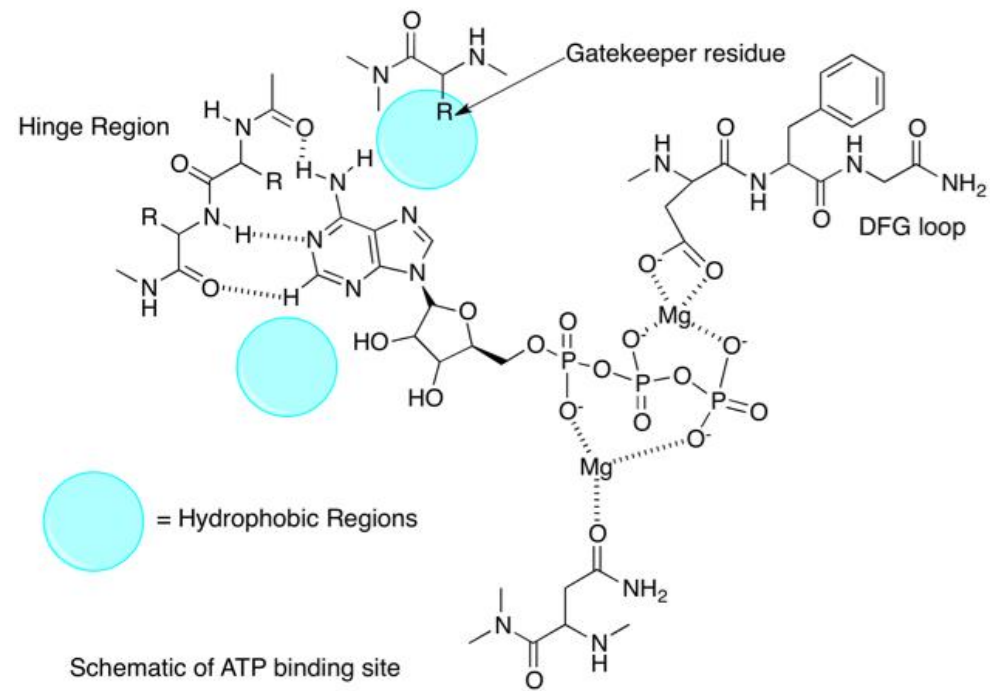
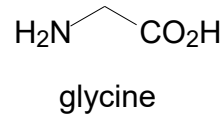
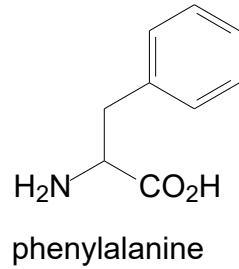
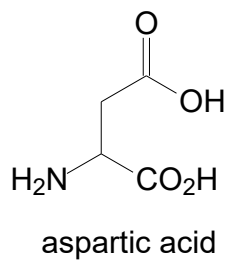


Αντισταθμιστικά Mg²⁺ (με κόκκινο) Ευκίνητη περιοχή (Hinge - μωβ), Δεσμός άλατος με λυσίνη (ροζ) DFG μοτίβο (γαλάζιο), α-C έλικας (σκούρο μπλε), δH (με κίτρινο)

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 γ-PO₄ 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 Mg²⁺ των φωσφορικών ομάδων και παίζει ενεργό ρόλο στην μεταφορά της γ-PO₄, ενώ η **Phe** τοποθετείται κάτω από την **αC-έλικα**, σταθεροποιώντας την σε κατάλληλη θέση, ως προς τον βρόγχο ενεργοποίησης.

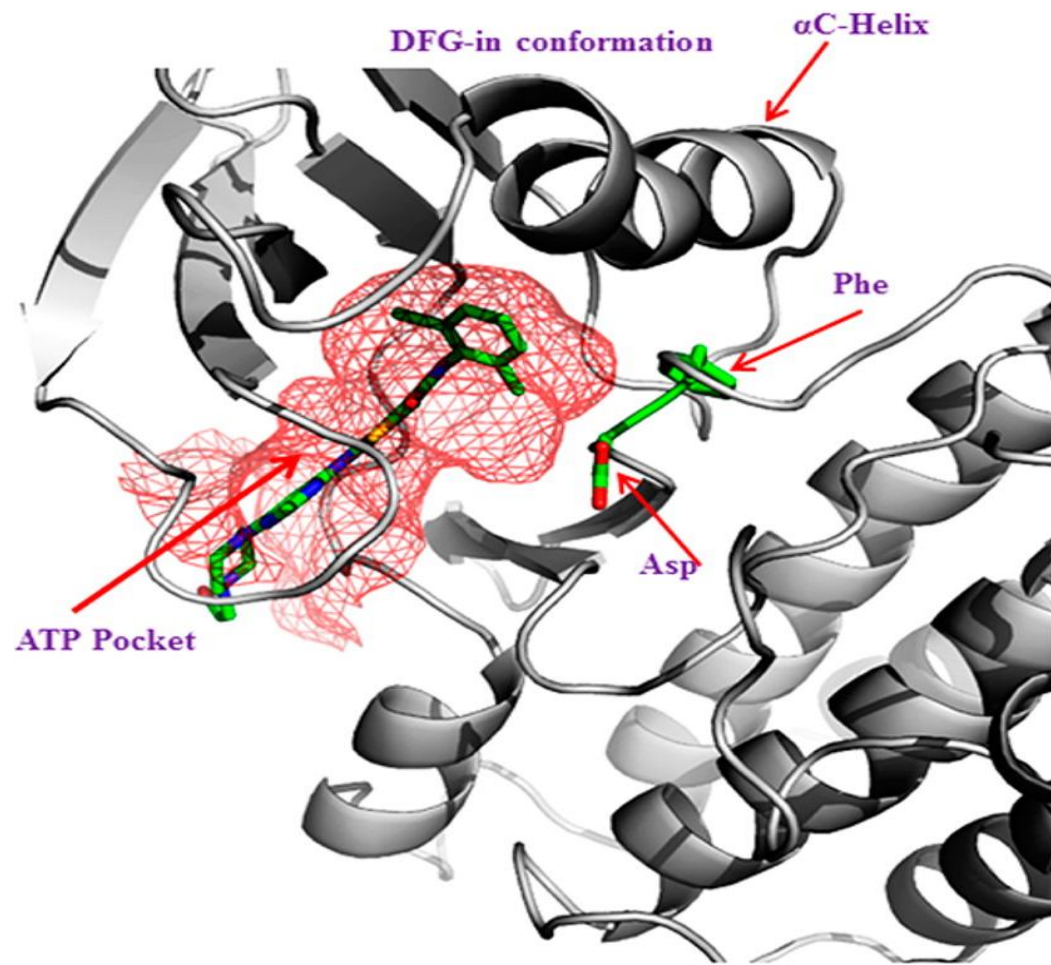


Για την κατάλυση είναι σημαντικές οι θέσεις:

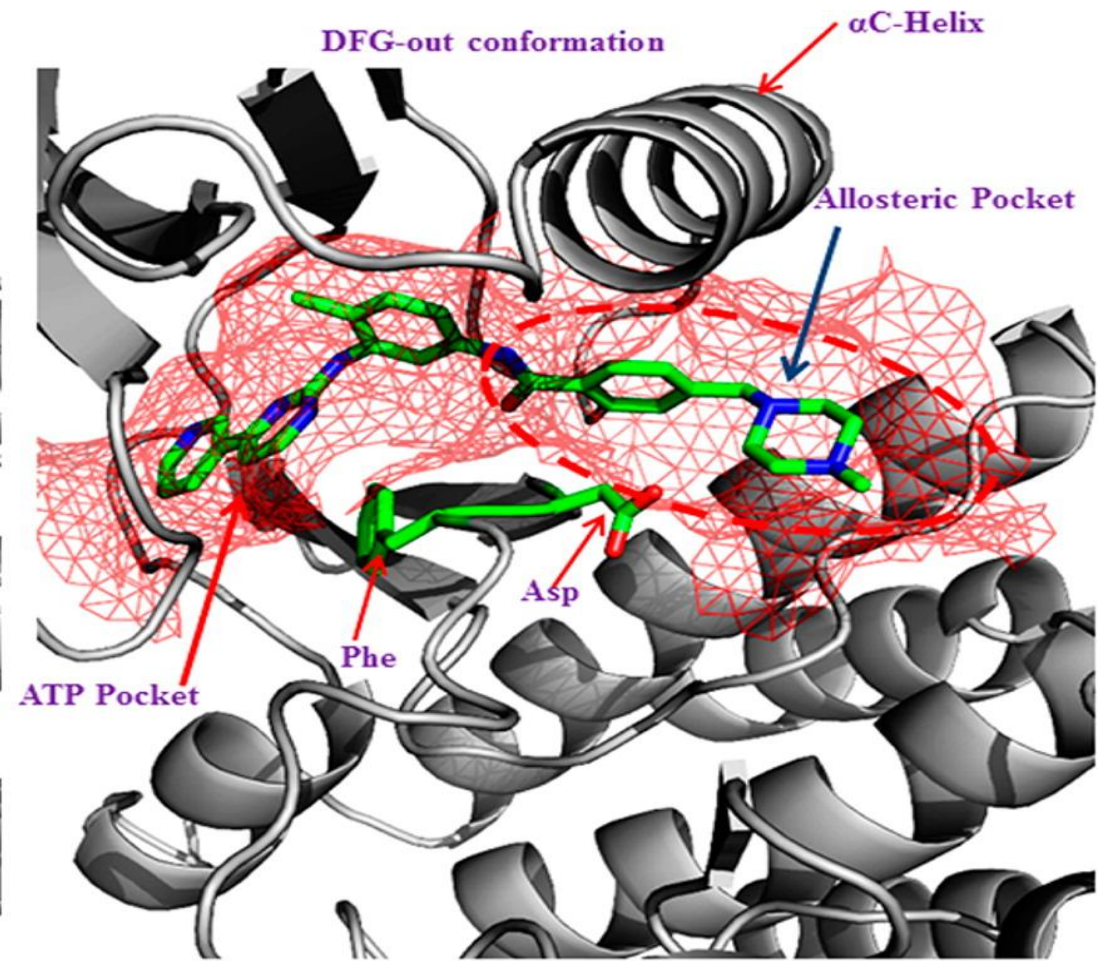
- της **αC-έλικας** (αC-in = ενεργό ένζυμο, αC-out = ανενεργό)
- του **DFG-Asp μοτίβου** (DFG-Asp in = ενεργό ένζυμο, DFG-Asp out = ανενεργό)
- του **βρόγχου ενεργοποίησης** (AS open, = ενεργό ένζυμο, AS closed = ανενεργό).

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 προσδένεται 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.

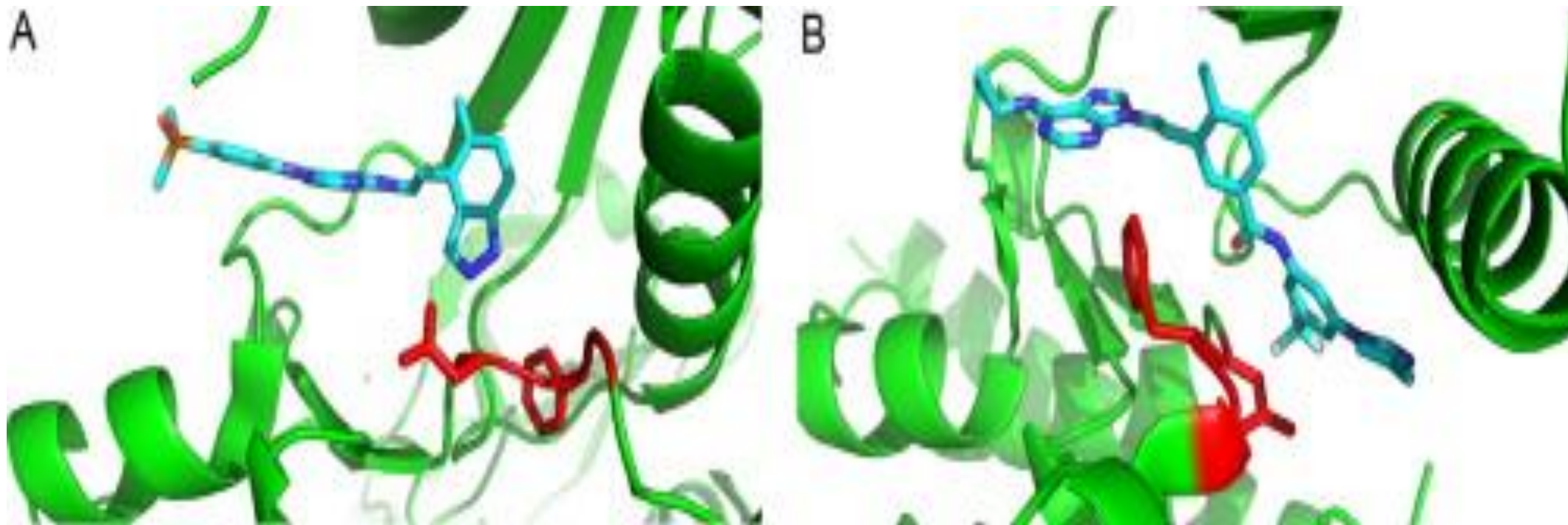


Ενεργή διαμόρφωση ABL κινάσης με αναστολέα



Ανενεργή διαμόρφωση ABL κινάσης με αναστολέα

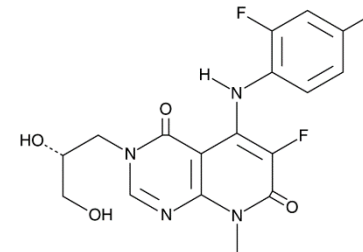
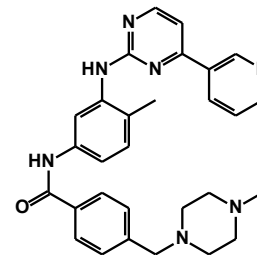
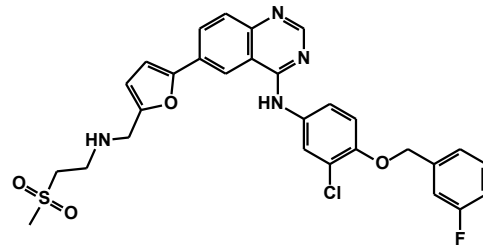
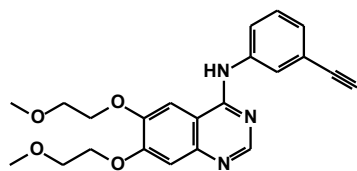
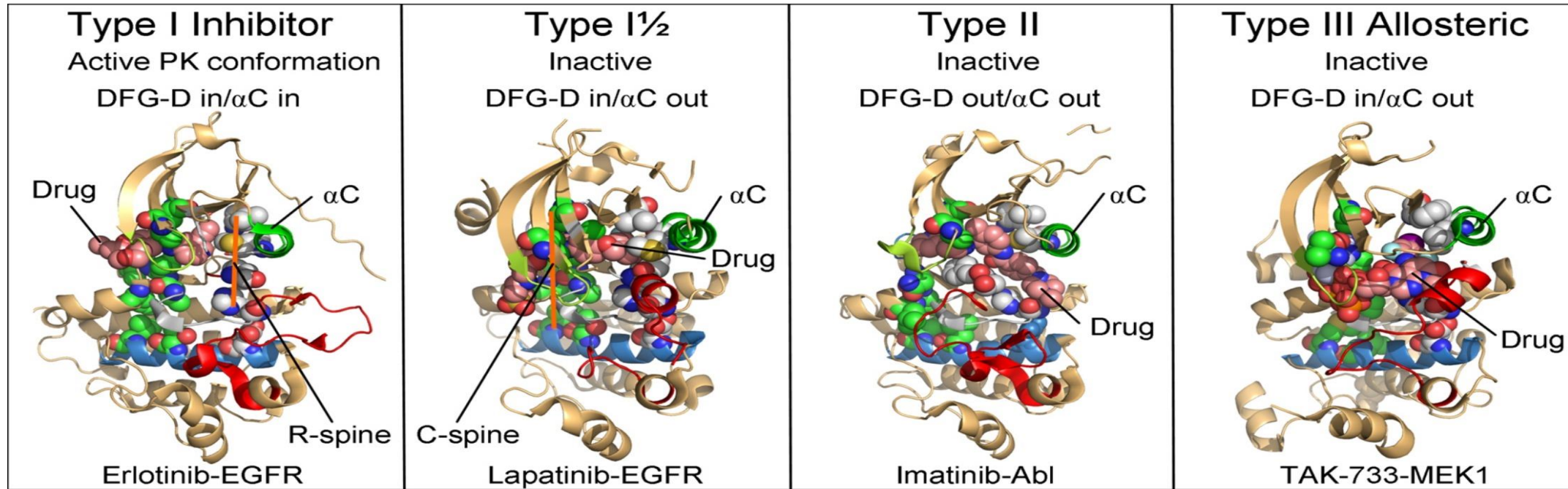
Η αναστολή του ενζύμου μπορεί να γίνει από παράγωγο που ανταγωνίζεται το ATP και καταλαμβάνει τη θέση του στην ενεργή διαμόρφωση του ενζύμου (**αναστολέας τύπου I**), ή από παράγωγο που σταθεροποιεί την ανενεργή του διαμόρφωση (**αναστολέας τύπου II**).



(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.

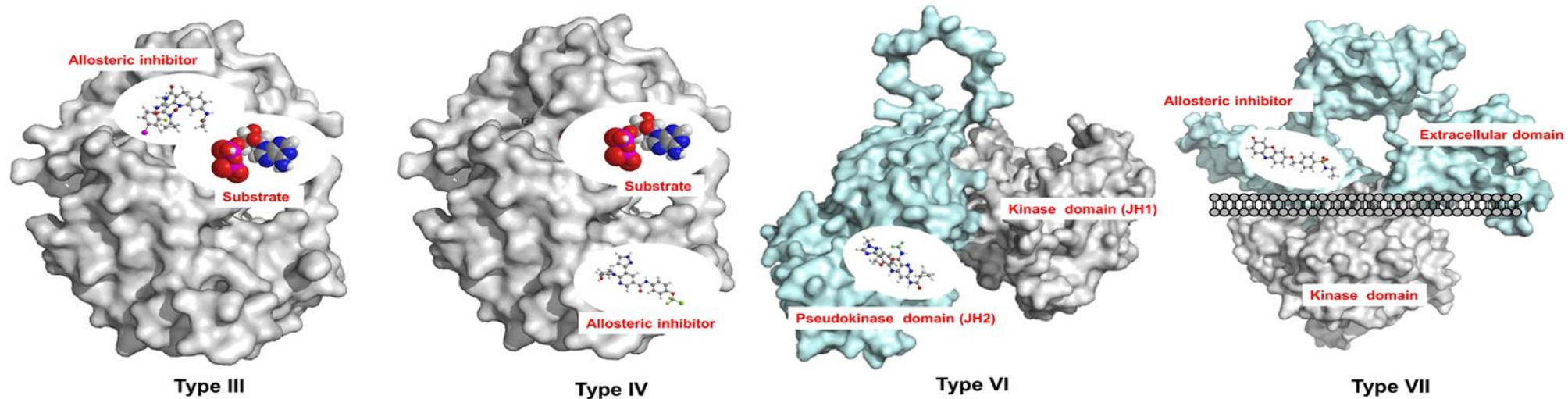
(B) Για τη πρόσδεση αναστολέα τύπου II, η ίδια κινάση λαμβάνει την διαμόρφωση DFG-out. Η φαινυλαλανίνη γυρίζει προς τη περιοχή δέσμευσης του ATP, αποκαλύπτοντας τη δευτερεύουσα υδρόφοβη κοιλότητα που είναι προσβάσιμη για τον αναστολέα.

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 I $\frac{1}{2}$ 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.

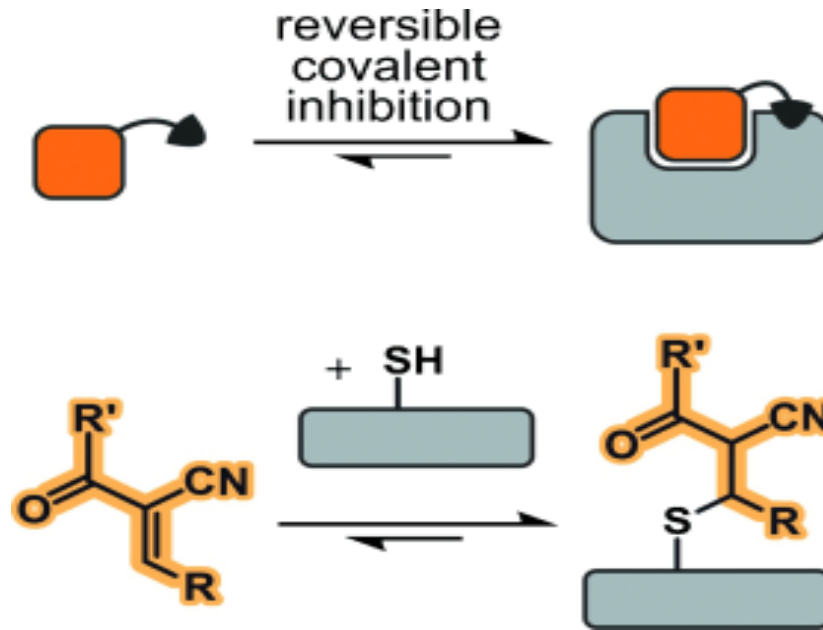
Στόχευση της περιοχής ψευδοκινάσης – αναστολείς τύπου VI

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 ονομάστηκαν 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.

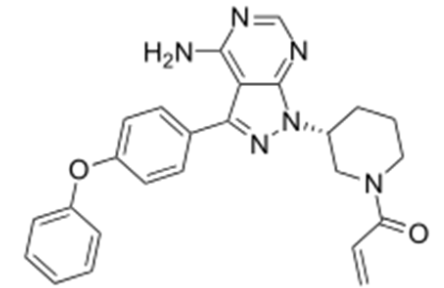
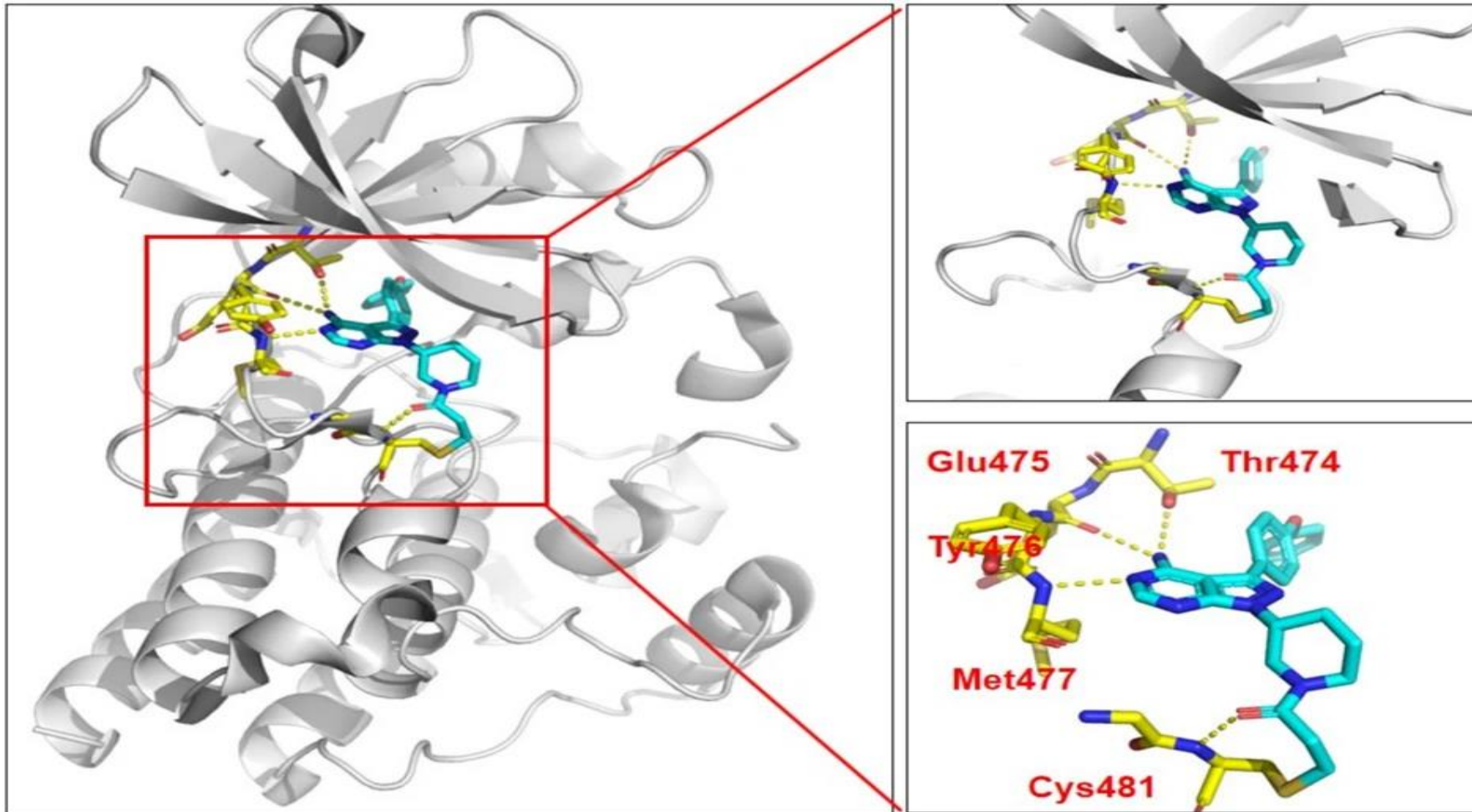
Μη αντιστρεπτοί αναστολείς (τύπου V)



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.

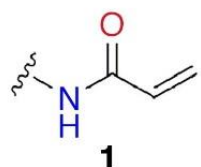


Ibrutinib

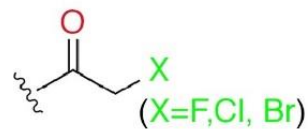
Παράδειγμα μη αντιστρεπτού αναστολέα: η δέσμευση του **ibrutinib** στην κινάση BTK. Το πυριμιδινικό N και η $-NH_2$ της πυραζολοπυριμιδίνης σχηματίζουν 3 δ.Η (με **Glu475**, **Tyr476** και **Thr474**). Το καρβονύλιο σχηματίζει δ.Η με την **Cys481** η οποία στη συνέχεια θα κάνει πυρηνόφιλη προσβολή τύπου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

(a)

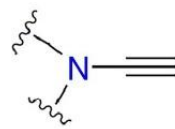
■ Cysteine targeted



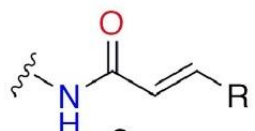
1



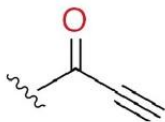
5



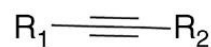
10



2

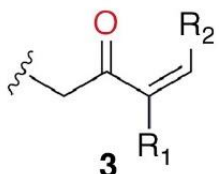


6

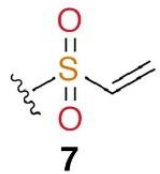


11

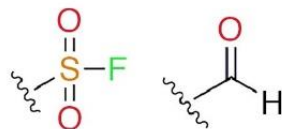
■ Lysine targeted



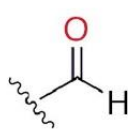
3



7

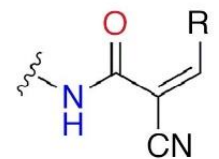


12

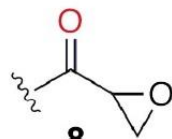


13

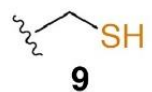
■ Aspartic acid targeted



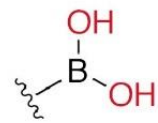
4



8

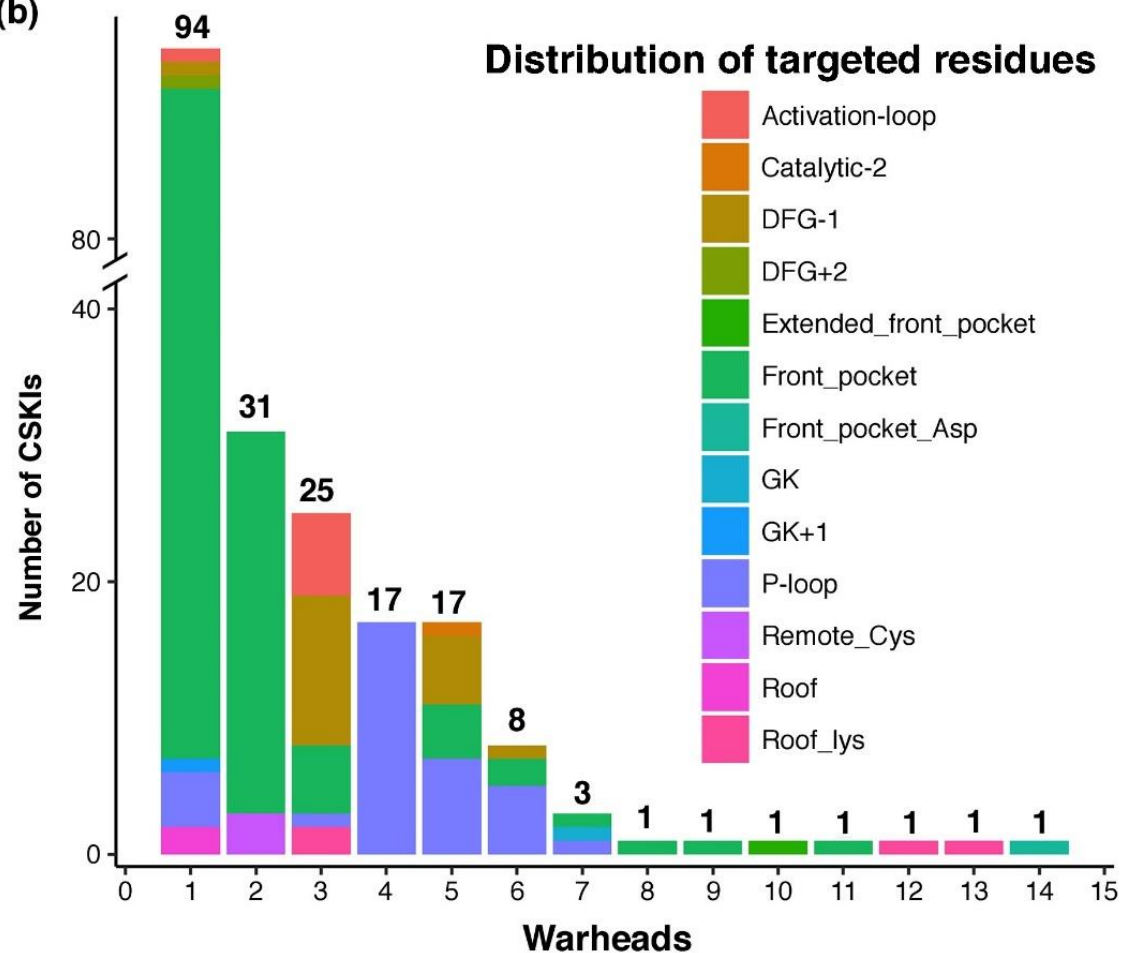


9

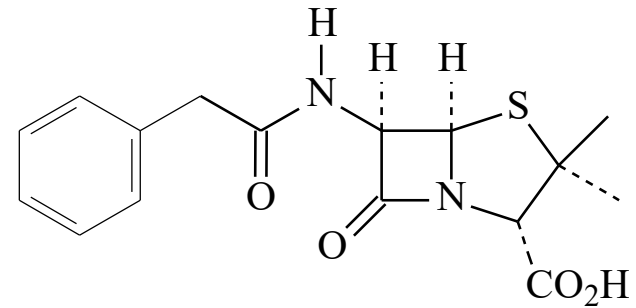
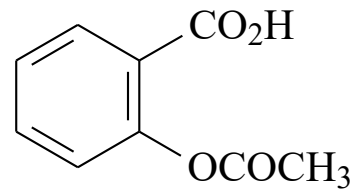


14

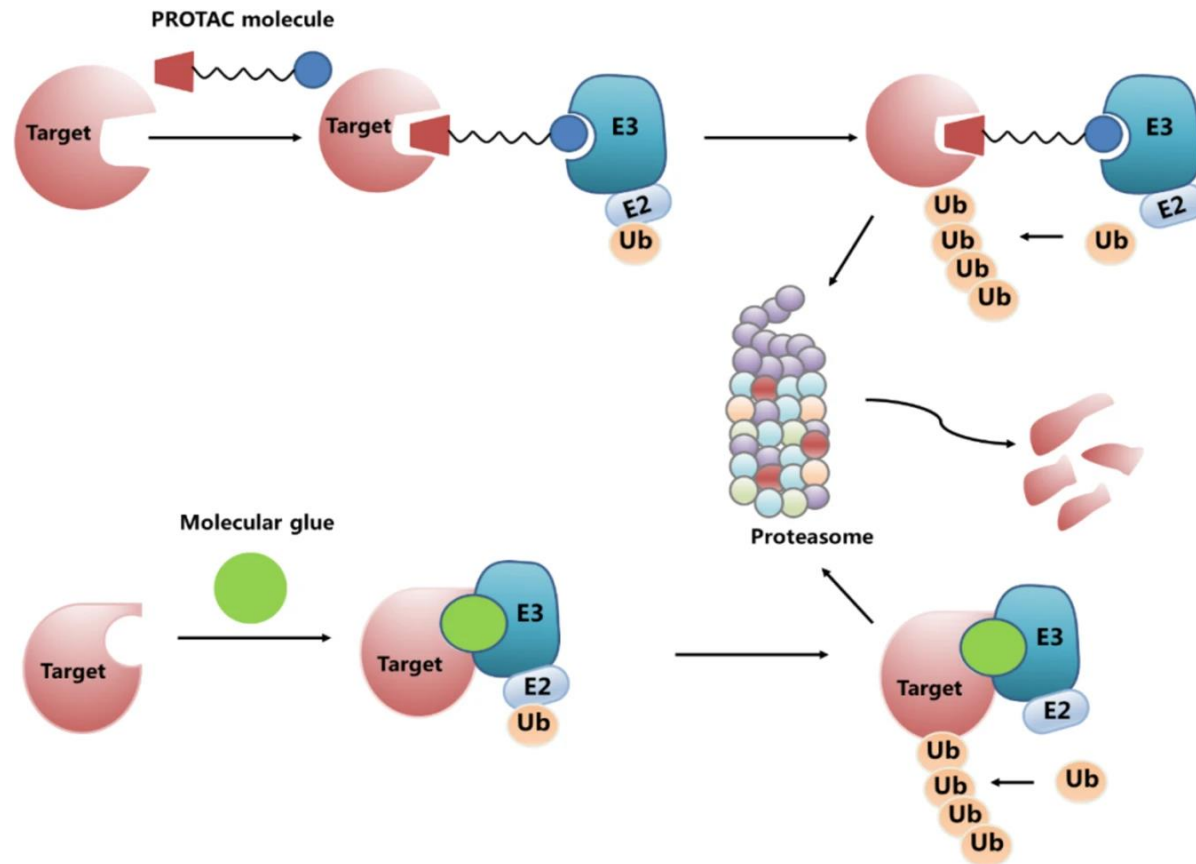
(b)



Σημαντικά φάρμακα που δρουν ως μη αντιστρεπτοί αναστολείς ενζύμων.



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

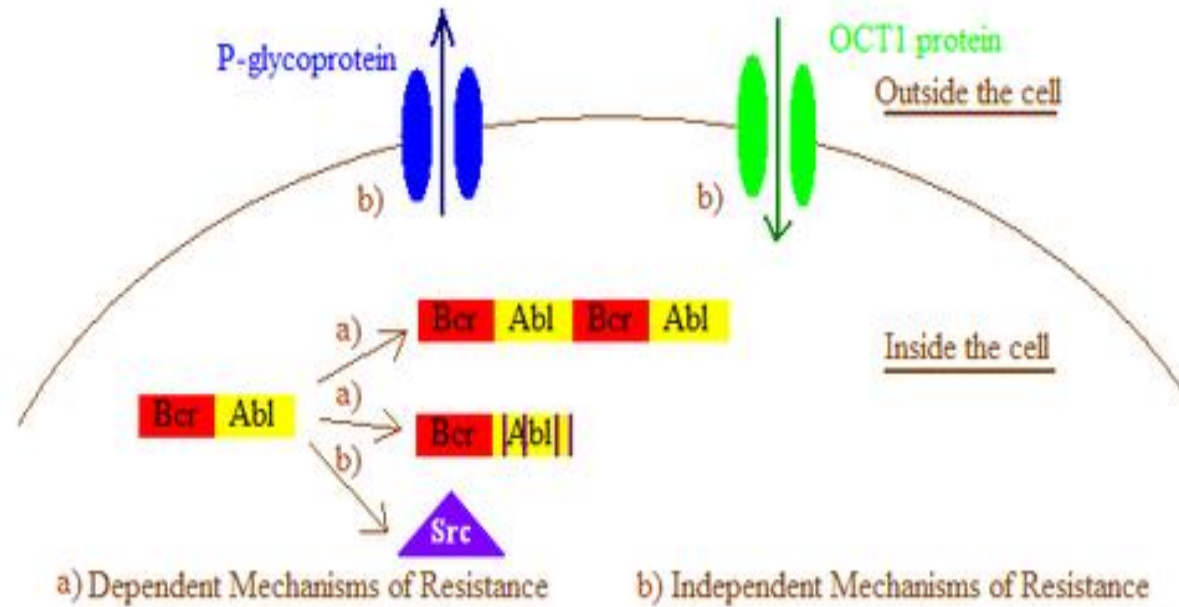


ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΝΕΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ - proteolysis targeting chimeras (PROTAC)- molecular glue

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

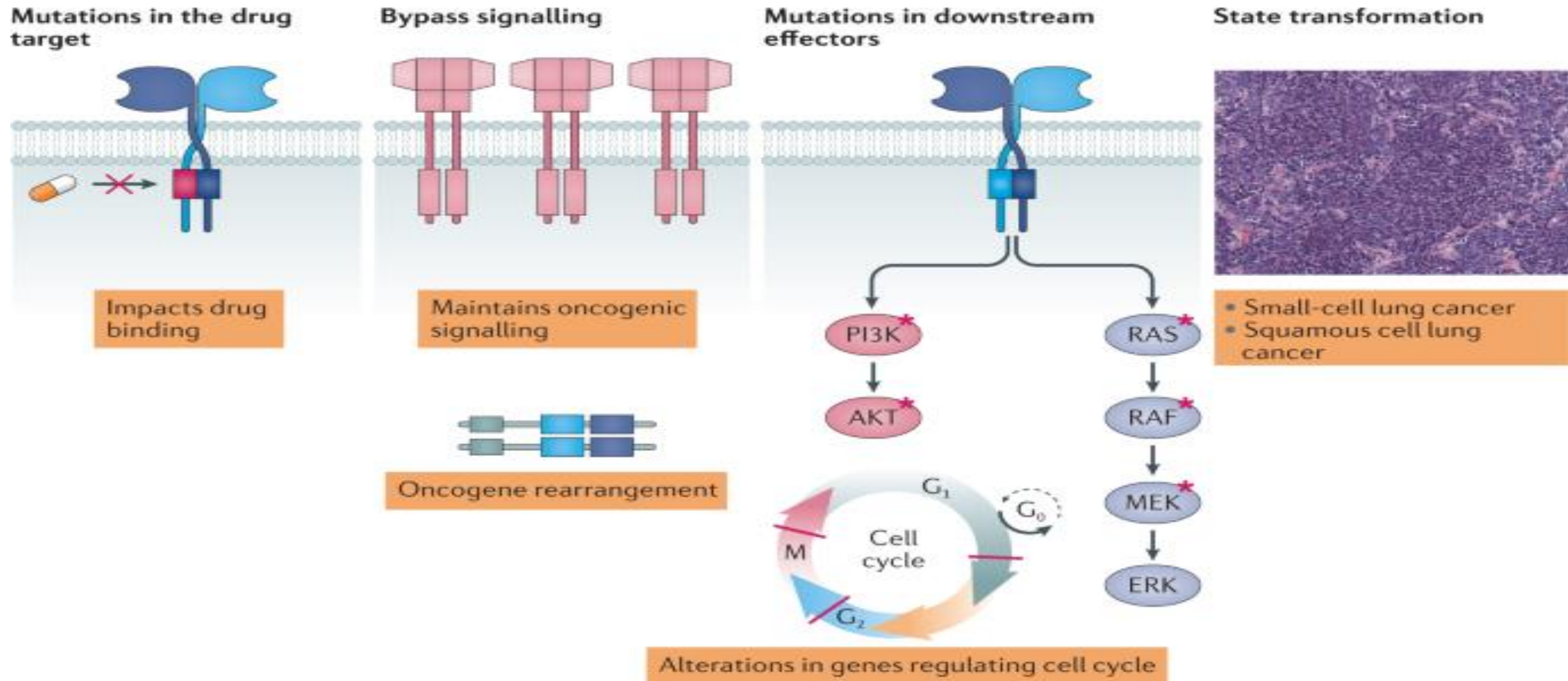


Η αντοχή μπορεί να οφείλεται και σε ποικιλία μηχανισμών, όπως:

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

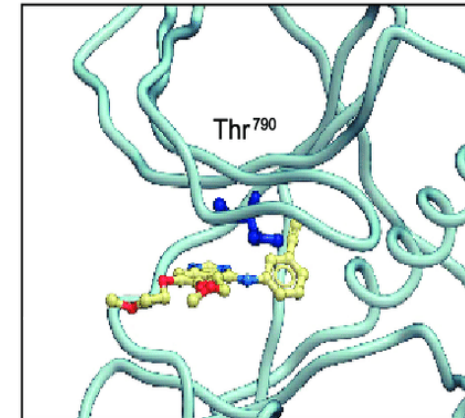
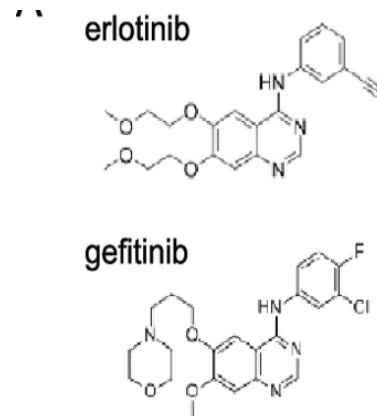
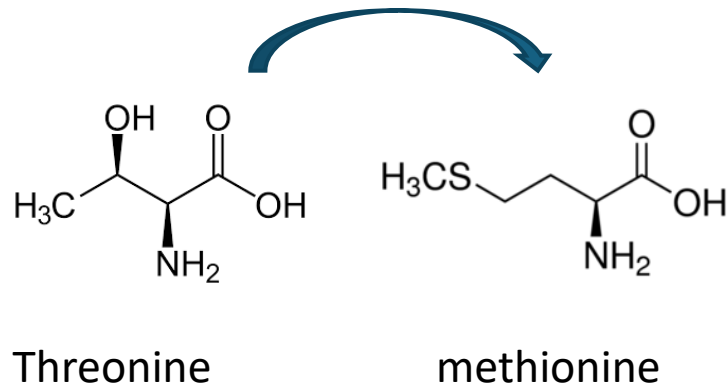


3) Η ενίσχυση εναλλακτικών μονοπατιών ή των επόμενων βημάτων της σηματοδότησης μέσω της επαγωγής μεταλλάξεων, μπορεί να οδηγήσει στην επαναφορά της λειτουργίας της οδού, παρά την αποτελεσματική διακοπή ενός βήματος.

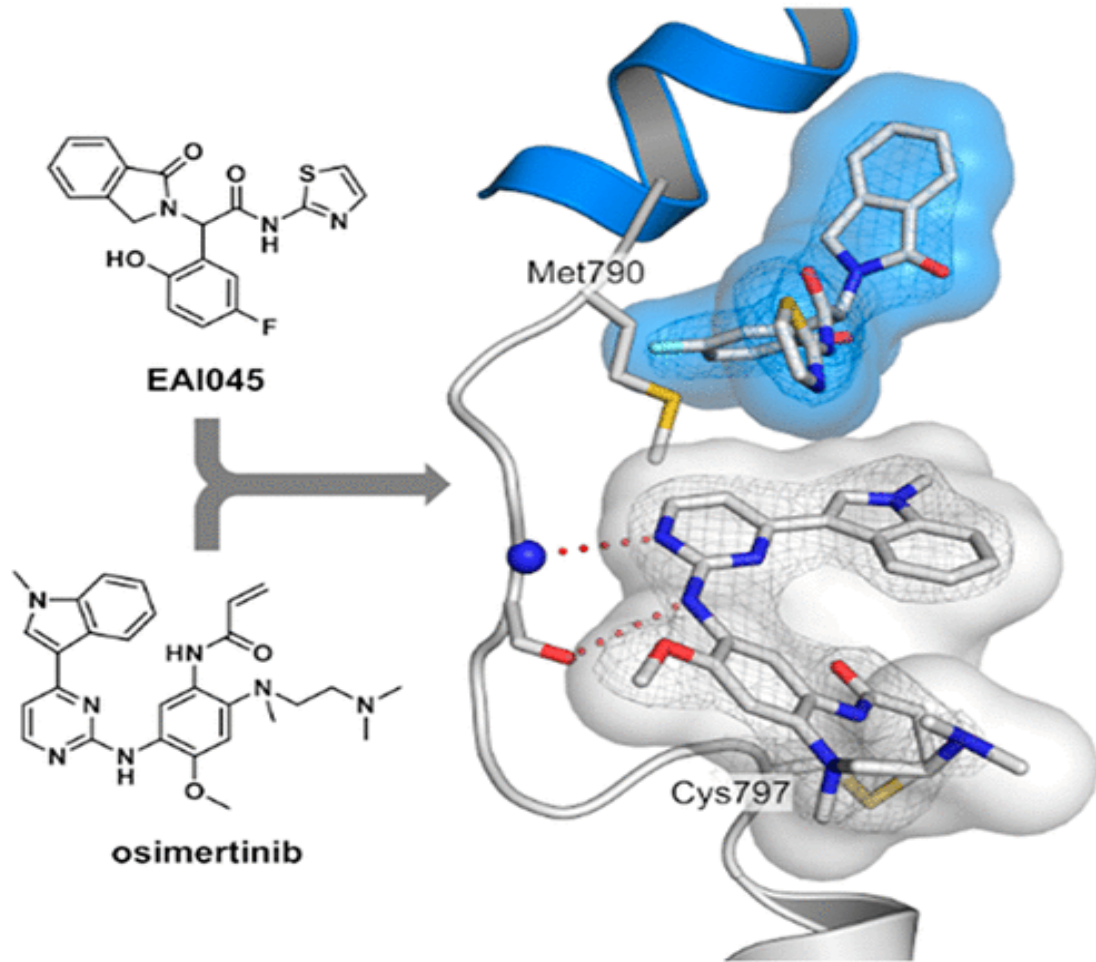
Επαγόμενη ανάπτυξη αντοχής προς τους αναστολείς κινασών

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 συνήθως λιπόφιλα και προσδιορίζονται κυρίως από τον όγκο τους.



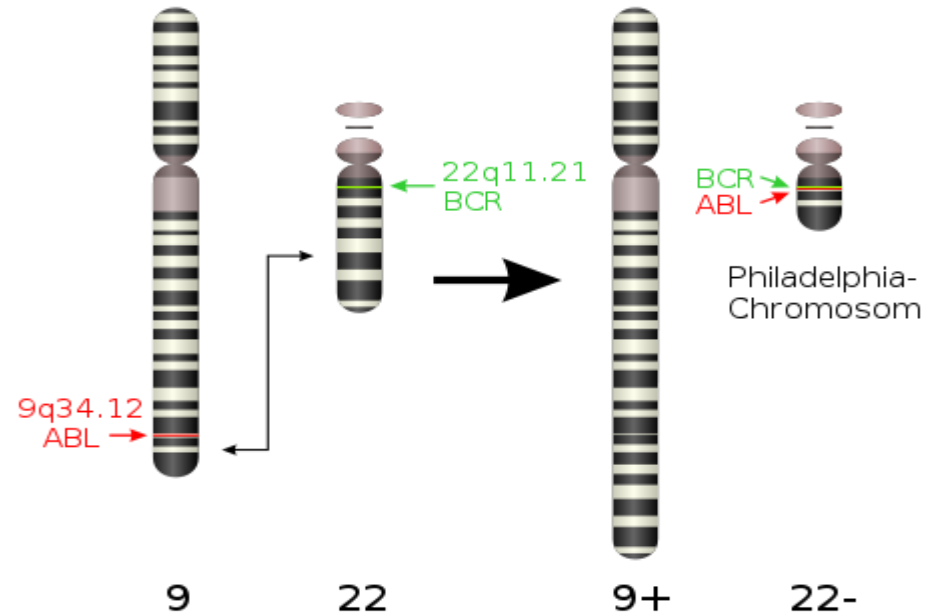
Για να αντιμετωπιστεί η αντοχή, αναπτύσσονται **αναστολείς επόμενης γενιάς**, οι οποίοι μπορεί να:

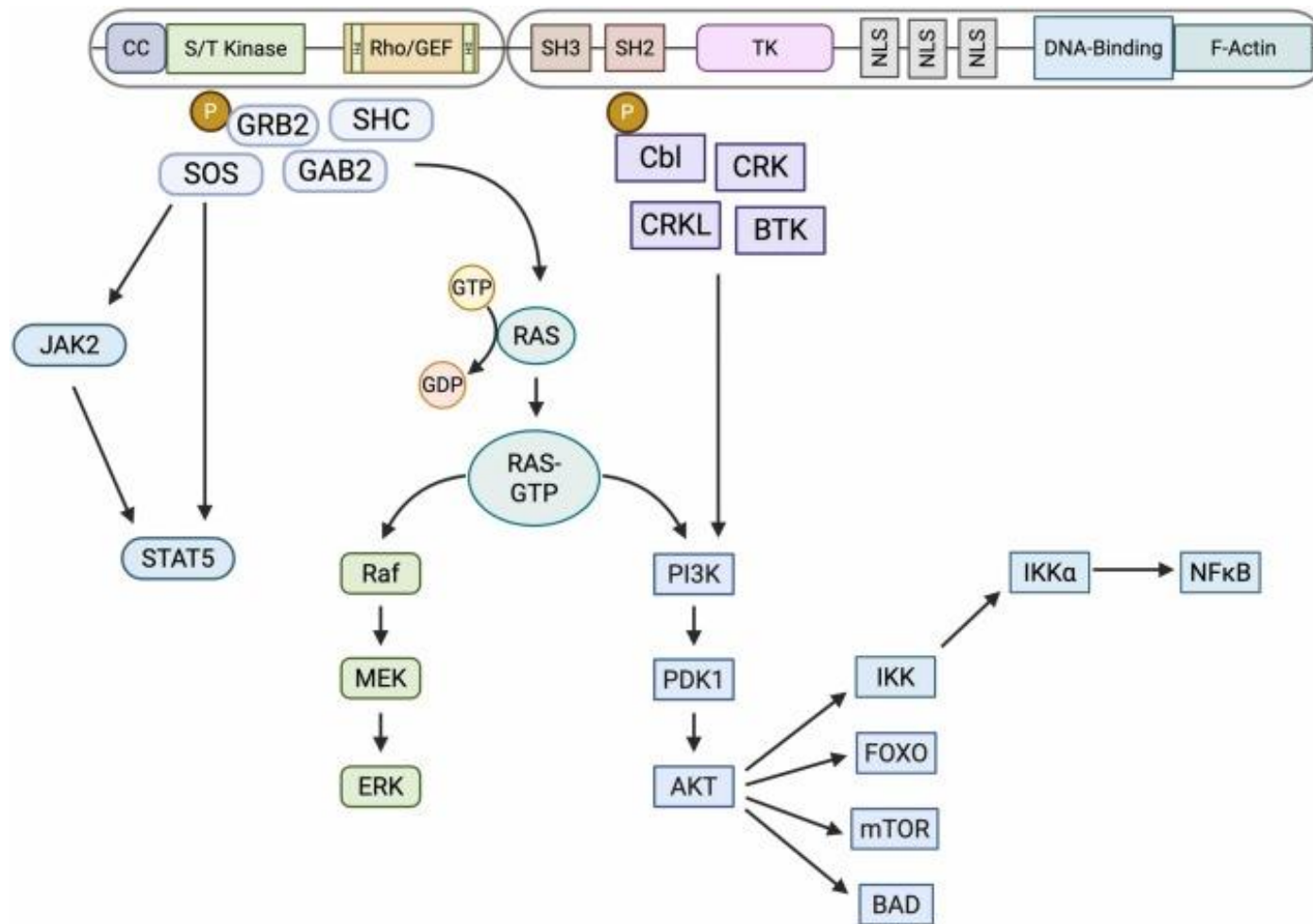
- Υπερβαίνουν την μετάλλαξη του αμινοξέος «θυρωρού»
- Συνδέονται ομοιοπολικά στην ATP περιοχή
- Συνδέονται εκτός της ATP περιοχής (αλλοστερικοί αναστολείς)
- Στοχεύουν ταυτόχρονα ένα σύνολο κινασών (multitargeting) σε ένα ή περισσότερα σηματοδοτικά μονοπάτια

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.

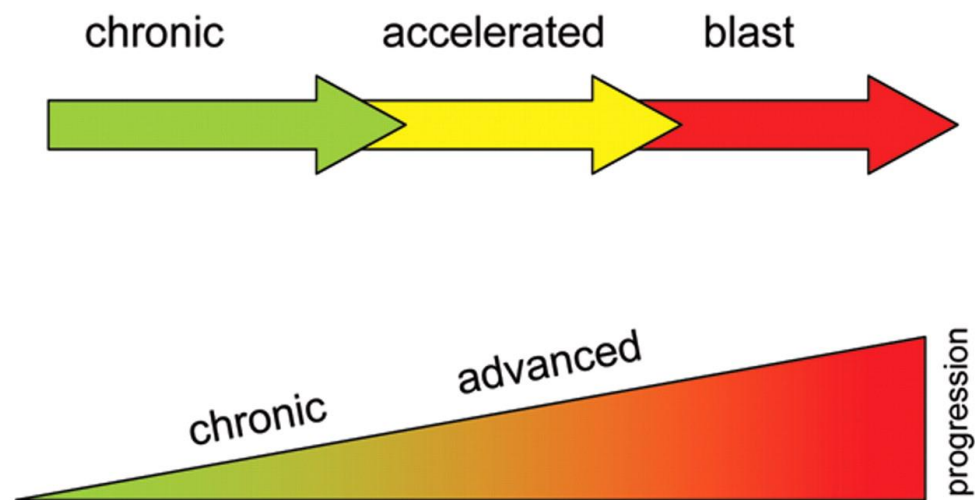
Το γονίδιο Abl (χρωμόσωμα 9) κωδικοποιεί την κινάση τυροσίνης Abl (Abelson). Συντήκεται με το γονίδιο Bcr (breakpoint cluster region protein, του χρωμοσώματος 22) και παράγει τη χιμαιρική πρωτεΐνη Bcr-Abl που δρα ως μονίμως ενεργοποιημένη κινάση τυροσίνης (με αυτοφωσφορυλίωση) αφού έχει απωλέσει τη ρυθμιστική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

Ασθένεια μέσης ηλικίας (± 65 έτη). Στο 85% των περιπτώσεων η διάγνωση γίνεται κατά τη χρόνια φάση.

Θεραπεία χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (CML)

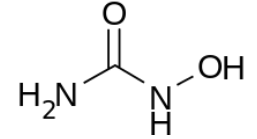
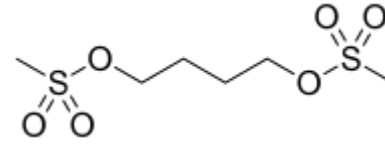
Busulfan (1953)

Hydroxyurea (1964)

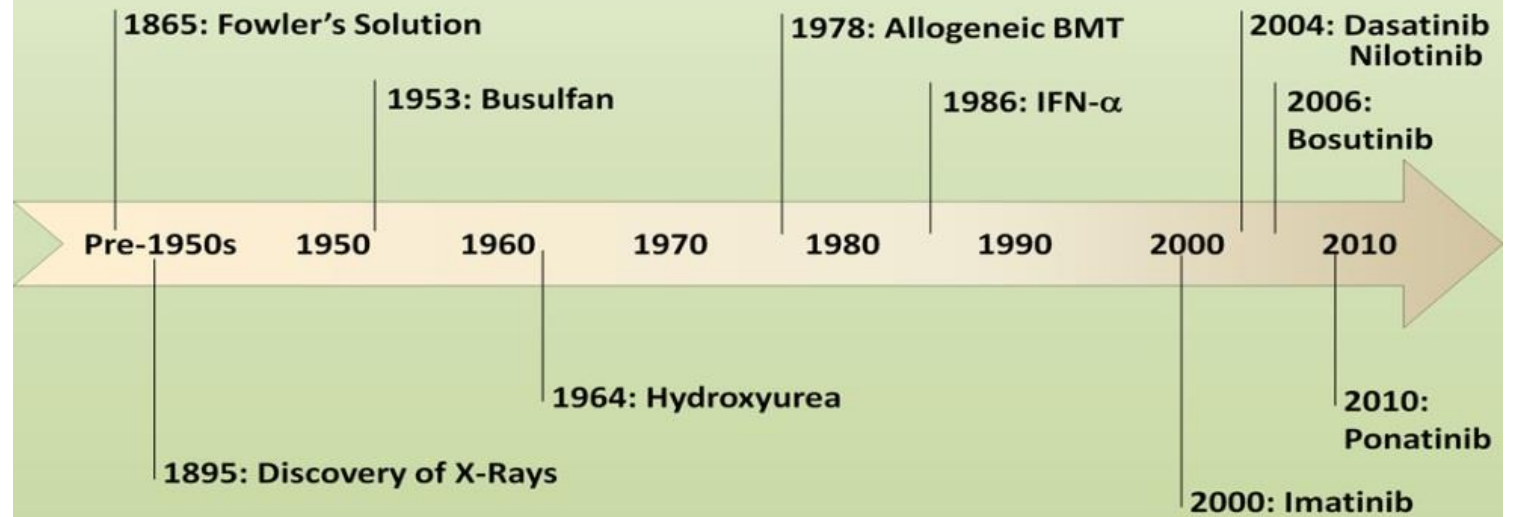
IFN-α (1986)

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)

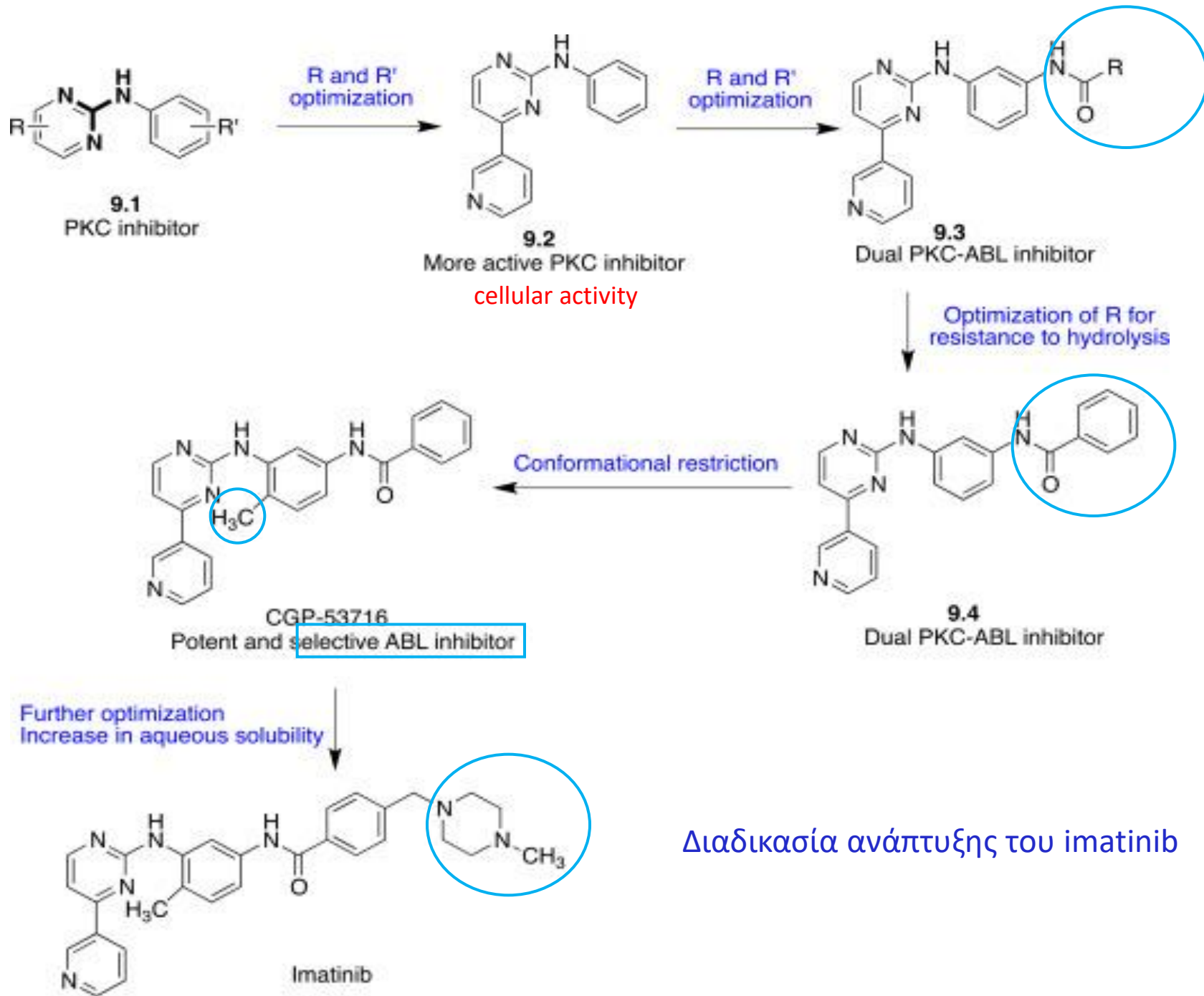
Η ανταπόκριση των ασθενών φθάνει στο 85% αν χορηγηθεί στη χρόνια φάση. Το προσδόκιμο επιβίωσης από 3-5 έτη, πλησιάζει σήμερα αυτό των υγιών ατόμων.



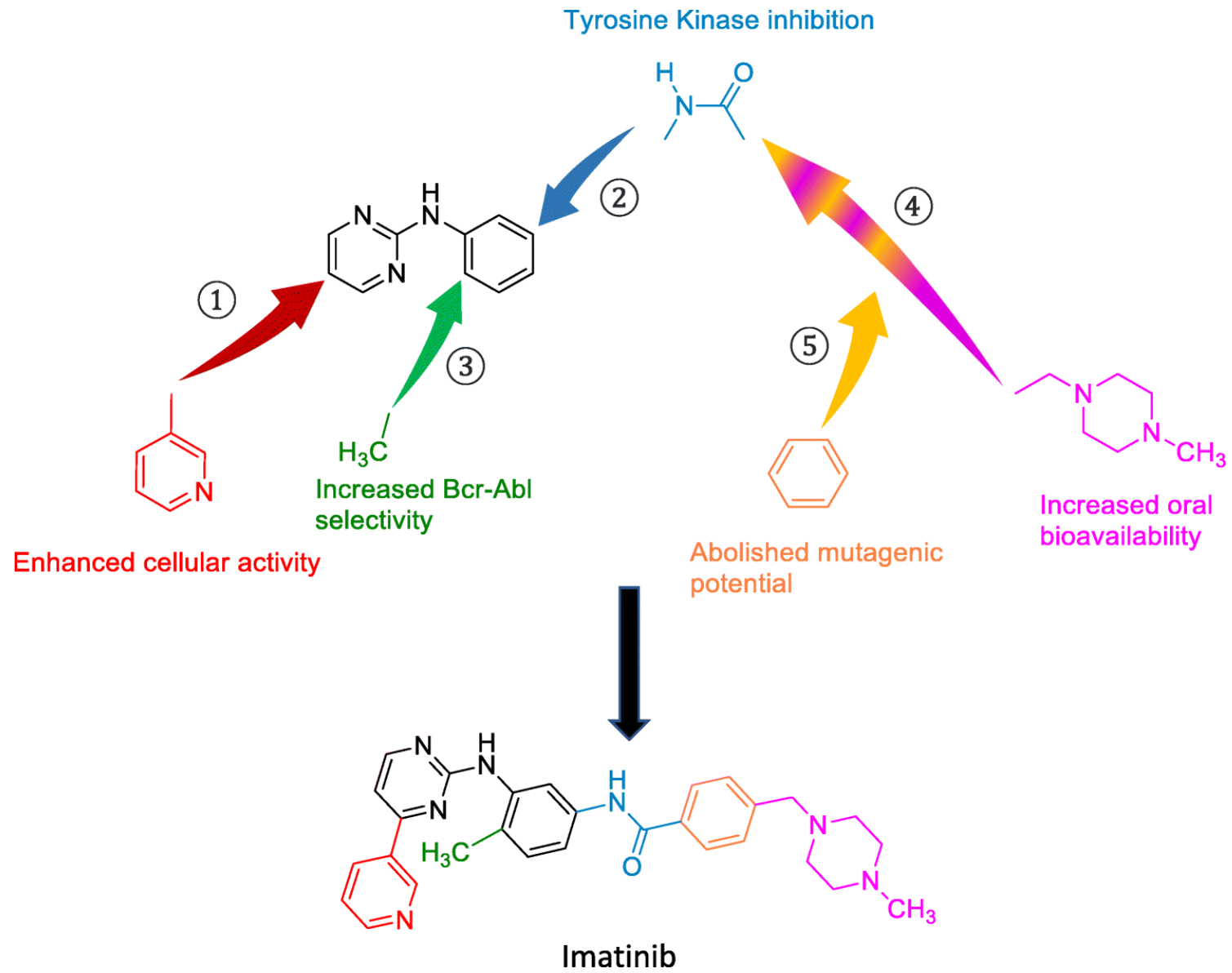
Εκ των υστέρων εκτίμηση: στην επιτυχία συμβάλλουν η έγκαιρη διάγνωση λόγω υγρής βιοψίας και η πολυφαρμακολογία του αναστολέα = αναστολή κ.α. κινασών.

Αύξηση του εμπορικού ενδιαφέροντος. Παρά τα χαμηλά ποσοστά εμφάνισης της ασθένειας, τουλάχιστον 100.000 ασθενείς εξαρτούν την επιβίωση 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.

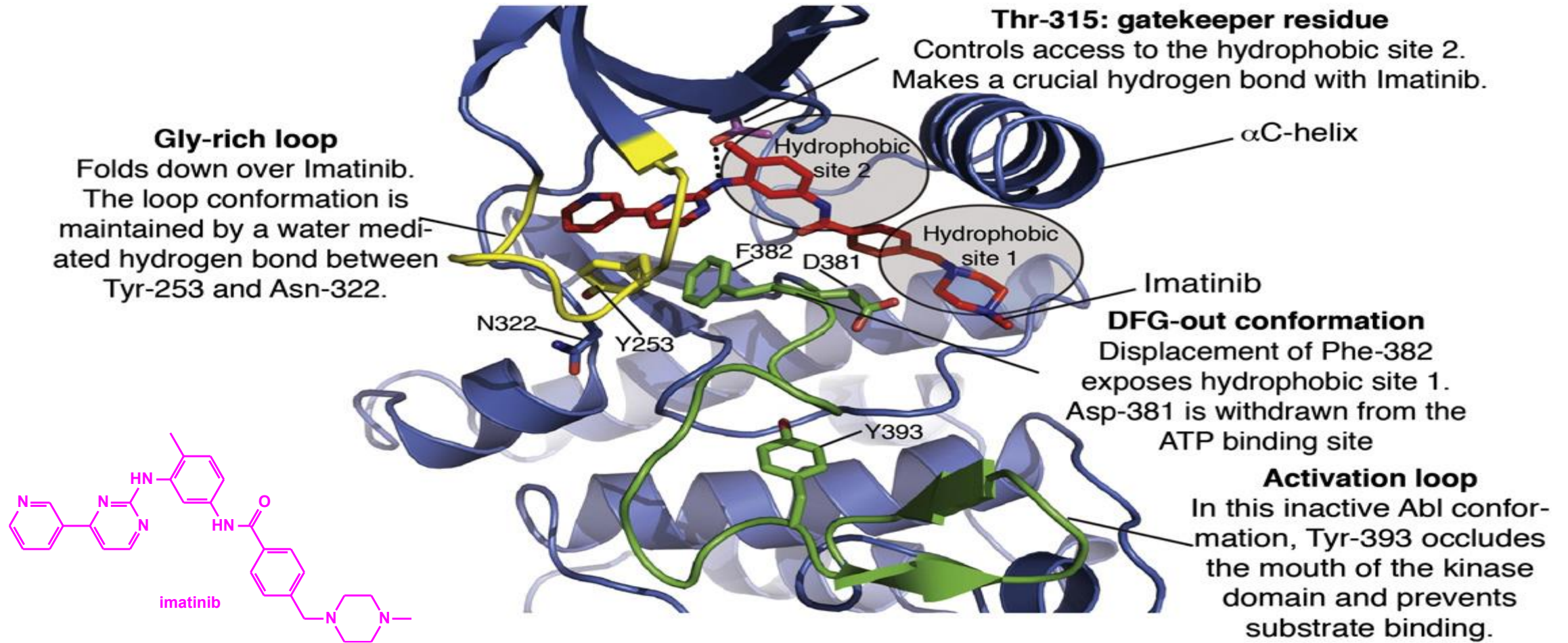


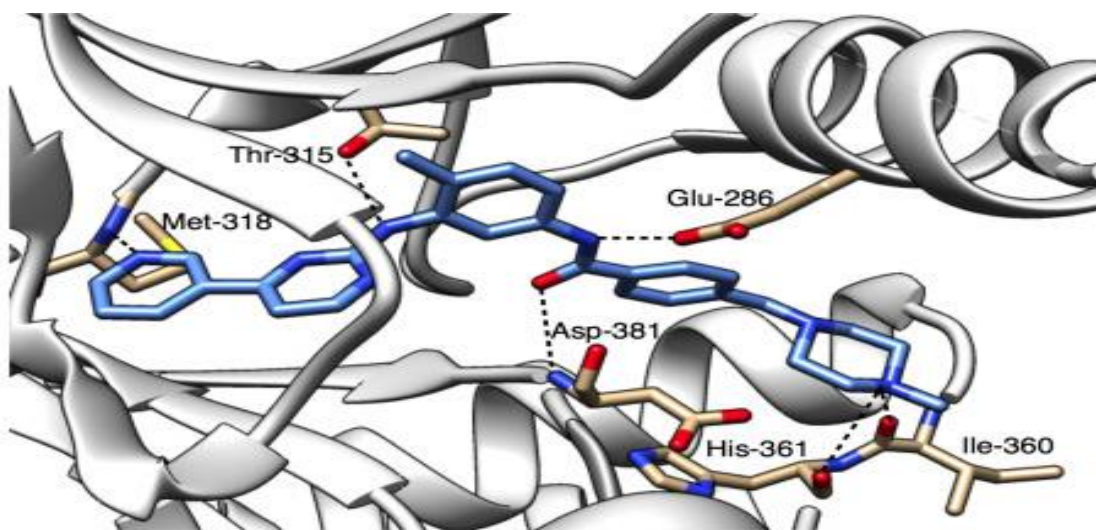
Διαδικασία ανάπτυξης του imatinib



Σχέσεις δομής/δράσης

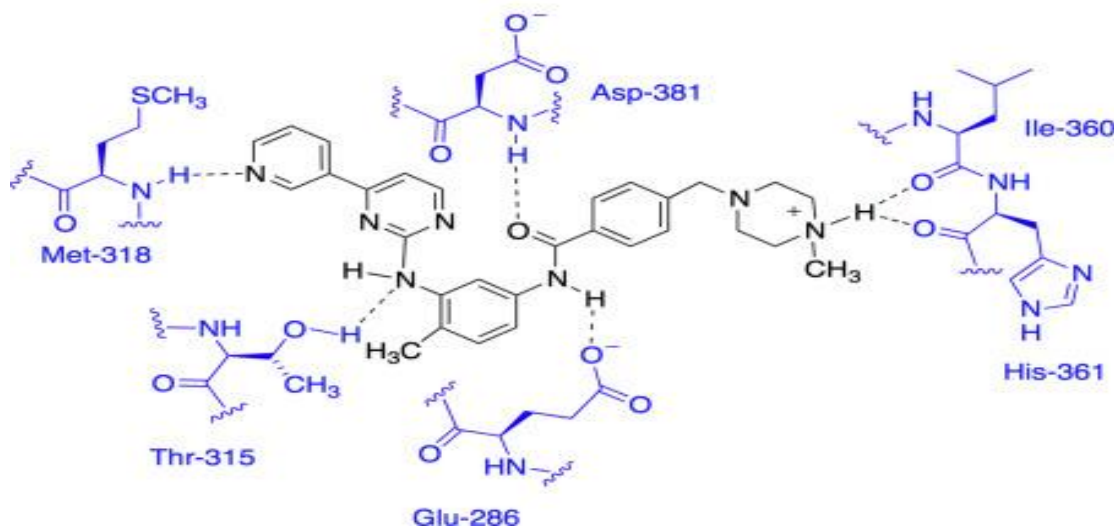
Η **CML** παρουσιάζει απλούστερη παθογένεση από άλλες μορφές καρκίνου και προσφέρει σαφή φαρμακευτικό στόχο: η ανακάλυψη του **imatinib** αποτελεί καλό παράδειγμα, σχετικά με τη σημασία που έχει η γνώση του βιολογικού υπόβαθρου, για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων



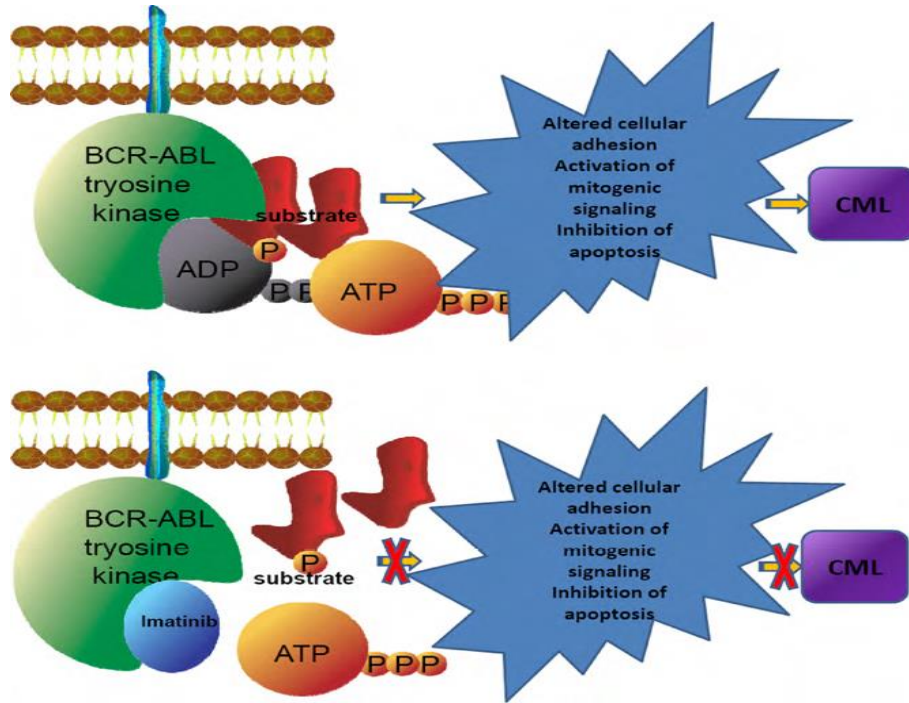


Το **DFG μοτίβο** της κινάσης: **Asp381-Phe382-Gly383**.

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.

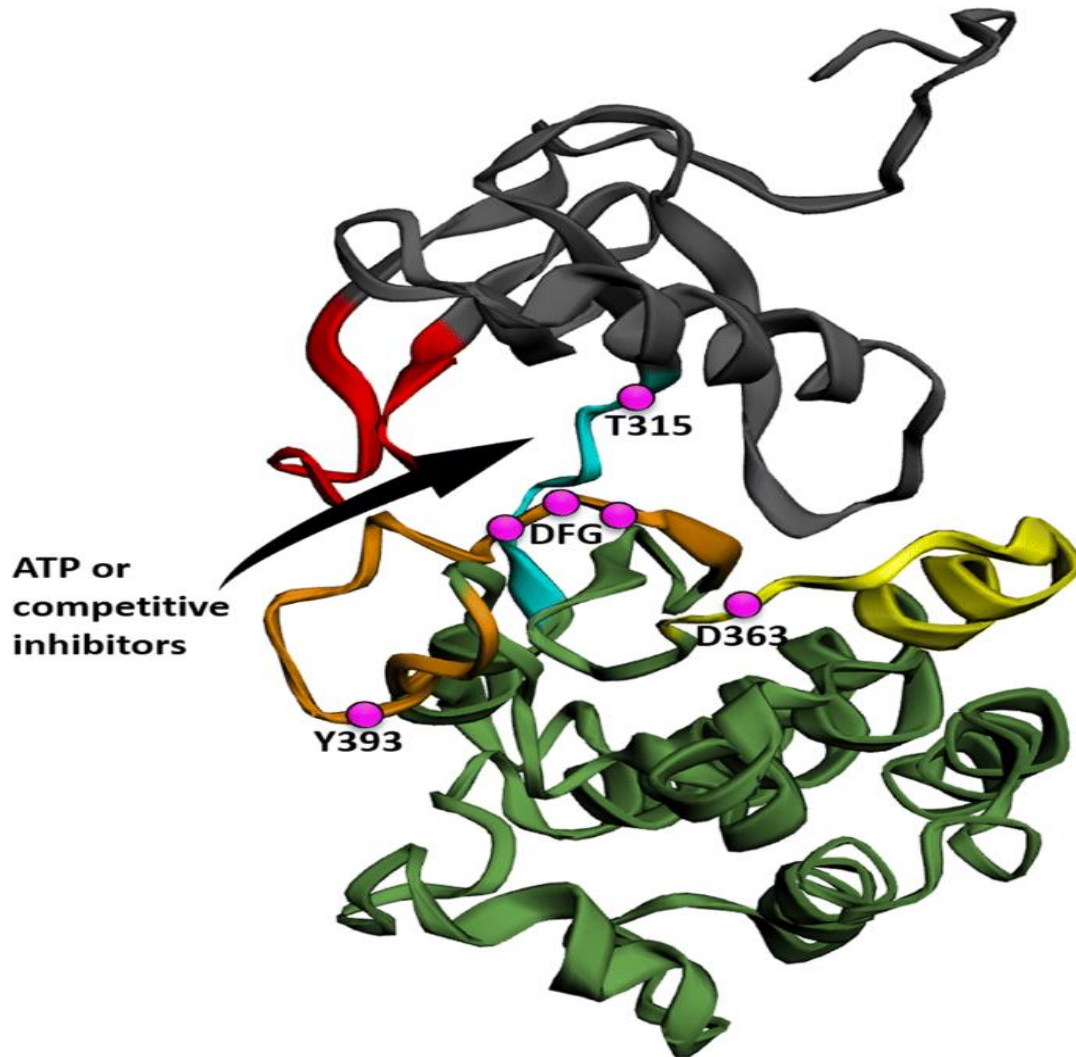
Τα σημαντικά αμινοξικά υπόλοιπα σημειώνονται με έντονο ροζ χρώμα.

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 αποδέκτης της φωσφορικής ομάδας (αυτοφωσφορυλίωση) και ρυθμίζει την περαιτέρω ενεργοποίηση της κινάσης.

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



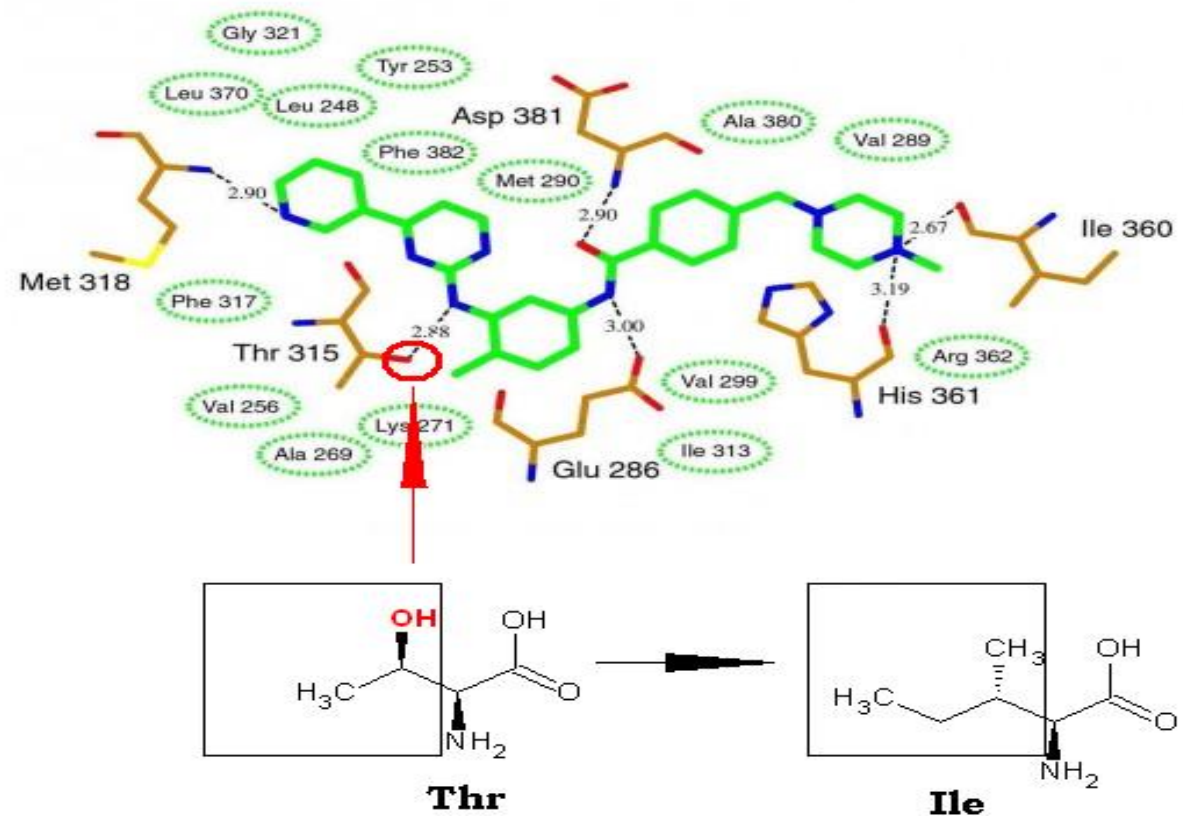
First-in-class versus next generation inhibitors

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).**

Το ATP εισέρχεται κανονικά στο ενεργό κέντρο.

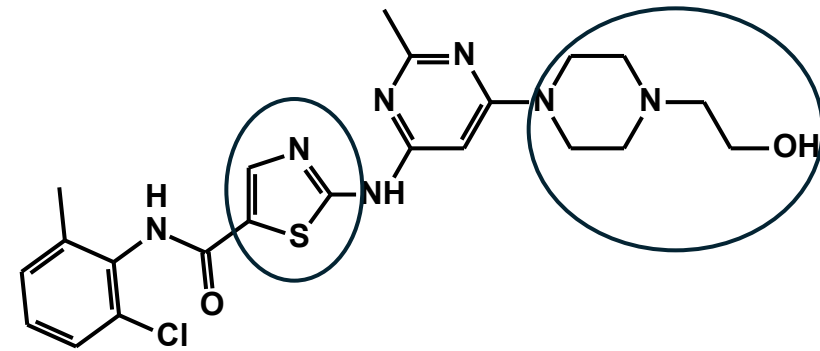
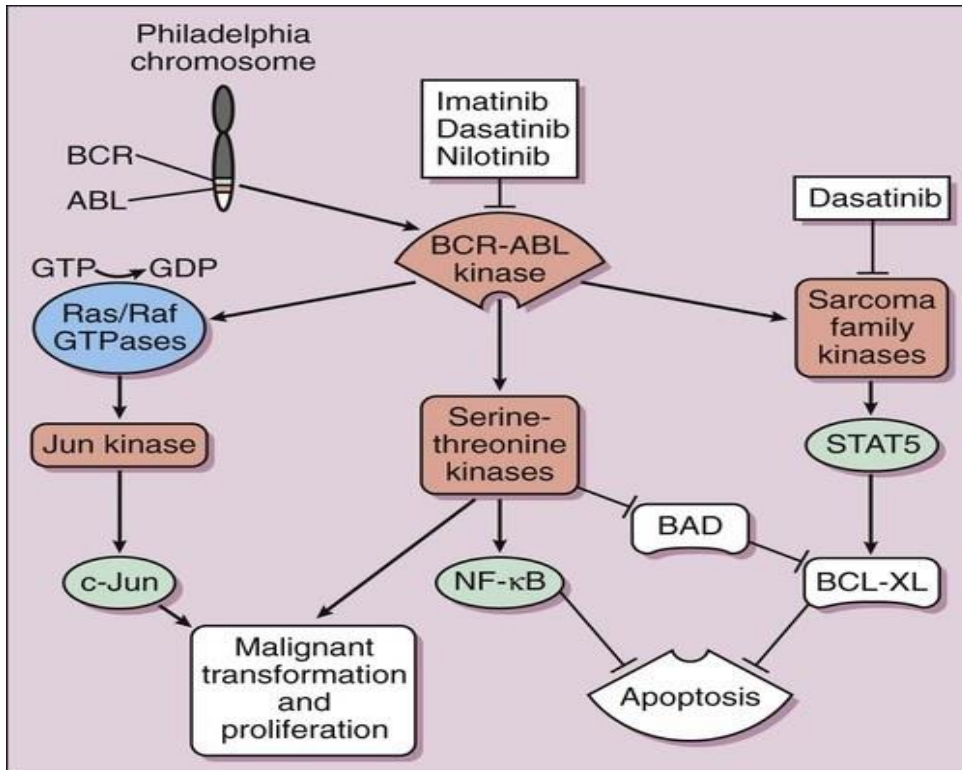
Αντίθετα, η είσοδος του αναστολέα δεν είναι πλέον εύκολη, ενώ η απώλεια ενός σημαντικού δH (της αμινοπυριμιδίνης με το -OH της θρεονίνης) εξασθενεί την αλληλεπίδραση.



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 ισχυρότερα (325 φορές) από το imatinib την Bcr-Abl κινάση και 32/33 μεταλλαγμένες μορφές της, εκτός της T315I. Αναστέλλει κ.α. κινάσες, μεταξύ των την Src κινάση.



Dasatinib

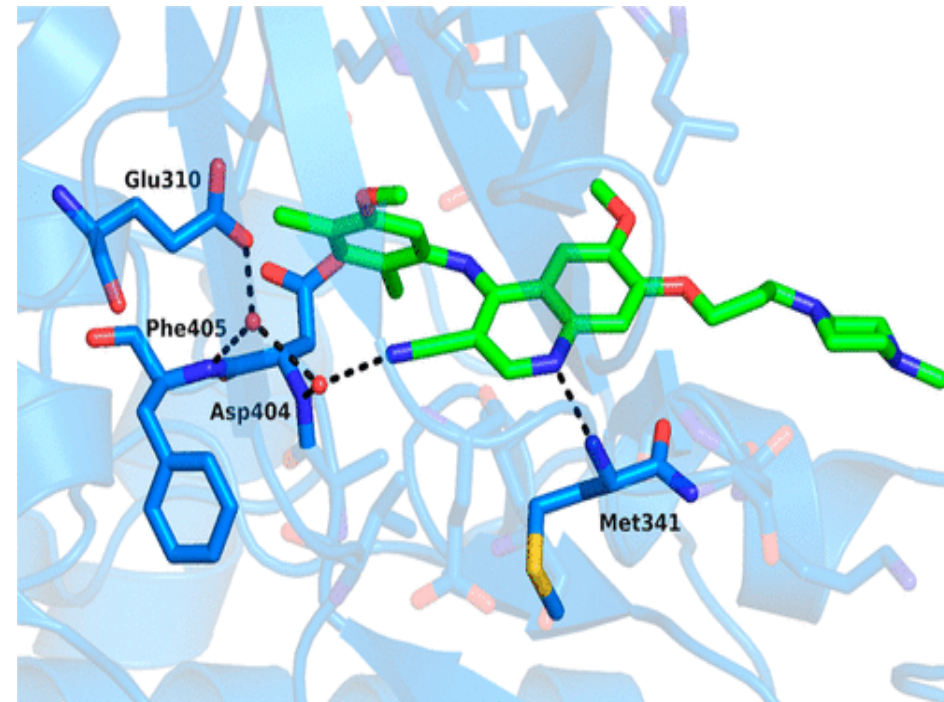
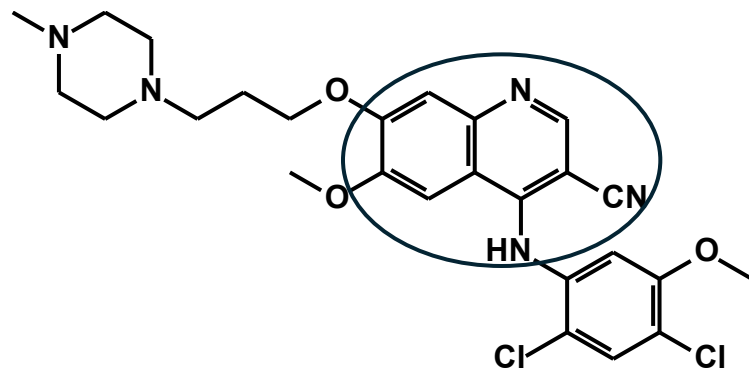
Sprycel (Bristol-Myers Squibb)

Η υψηλή εκλεκτικότητα δεν είναι απαραίτητη

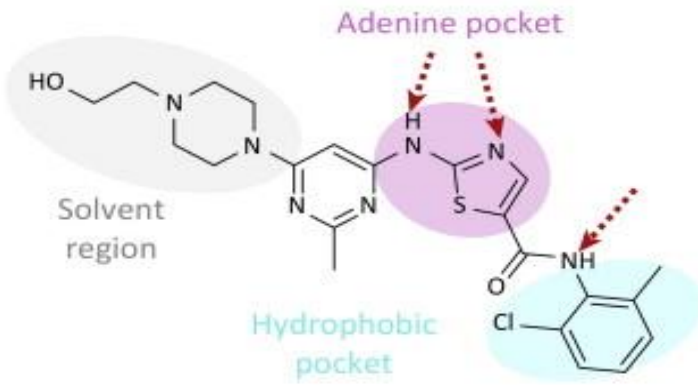
Το **Bosutinib** (Bosulif, Pfizer) αποτελεί θεραπεία πρώτης γραμμής, επειδή είναι **πολύ καλά ανεκτό από τους ασθενείς = αύξηση του χρόνου επιβίωσης.**

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

Δεν αντιμετωπίζει την μετάλλαξη T315I.

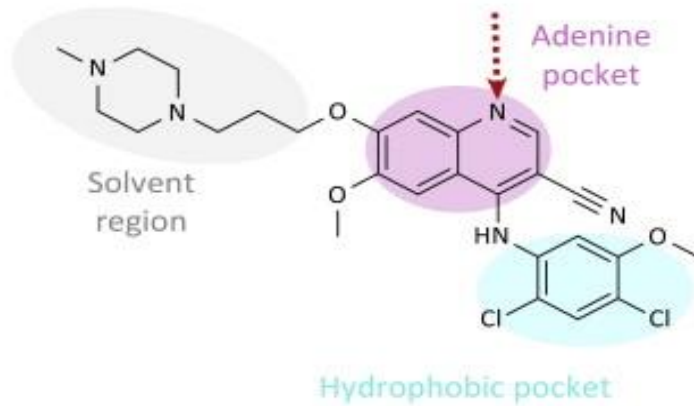


(A)



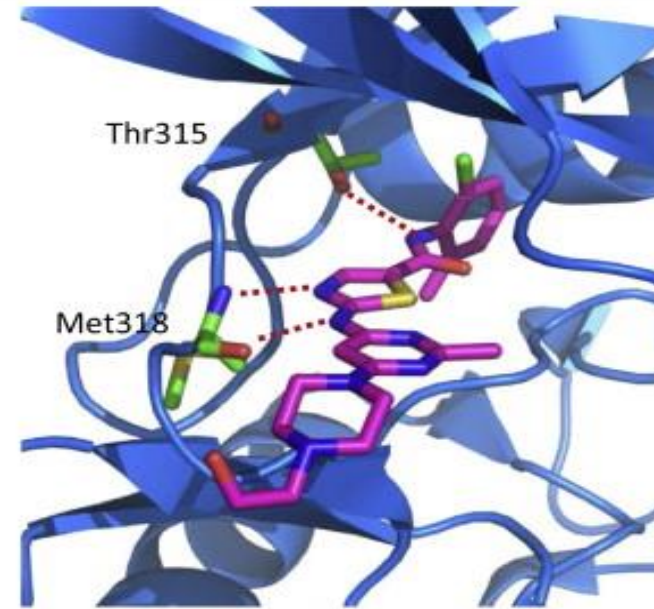
Dasatinib

(C)

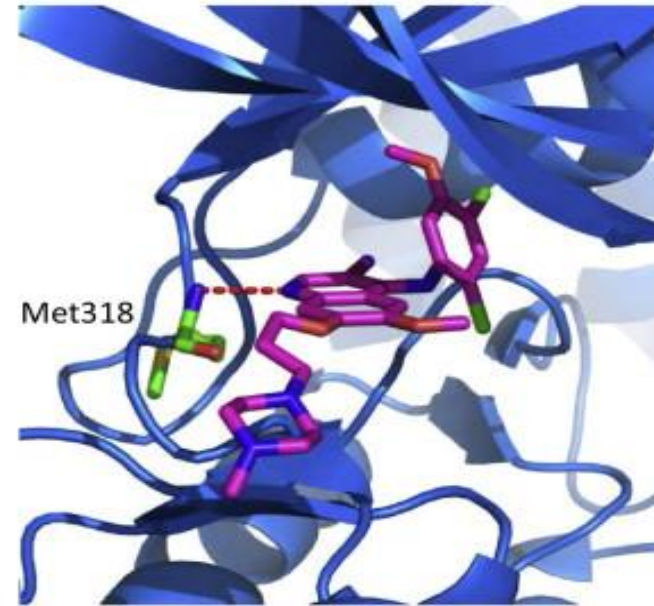


Bosutinib

(B)



(D)



TRENDS in Pharmacological Sciences

Αναστολείς τύπου I

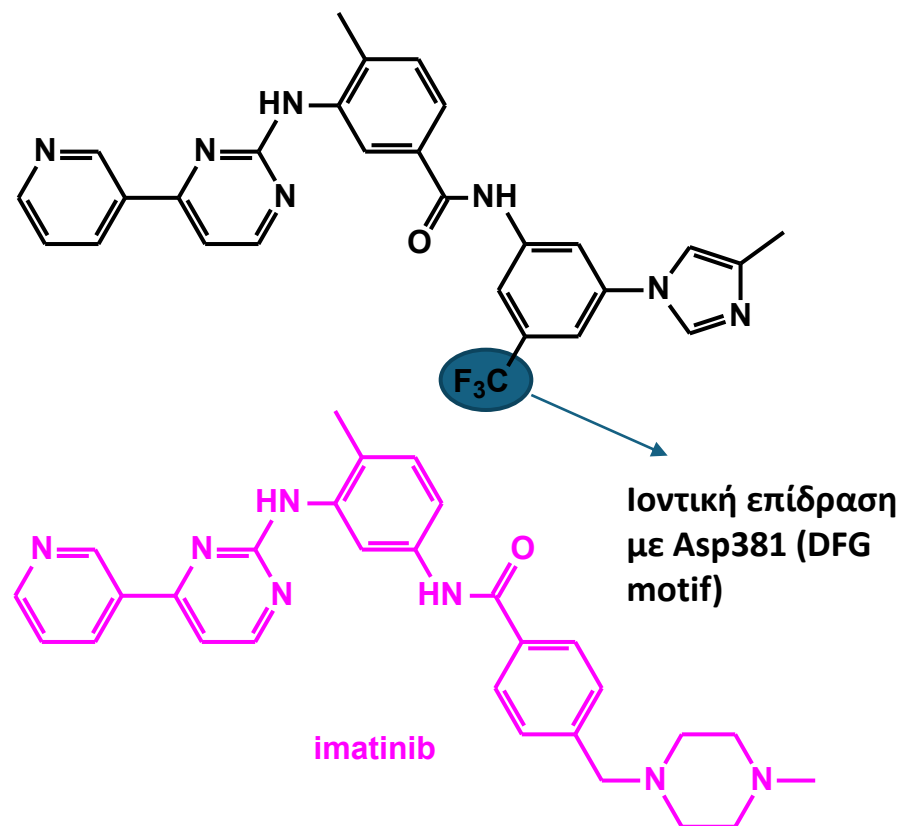
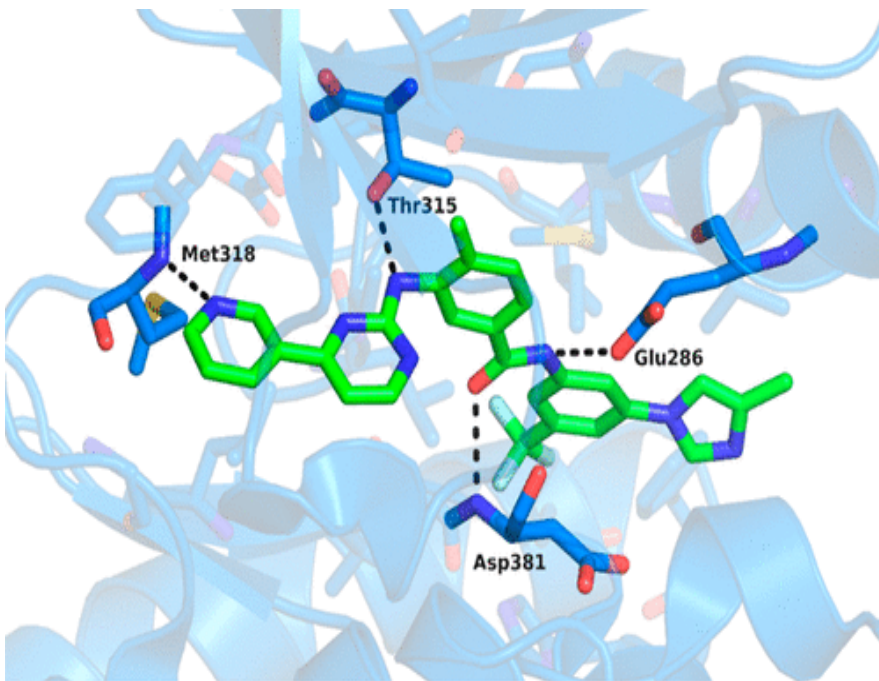
Αναστολείς 2^{ης} γενιάς τύπου II

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.**

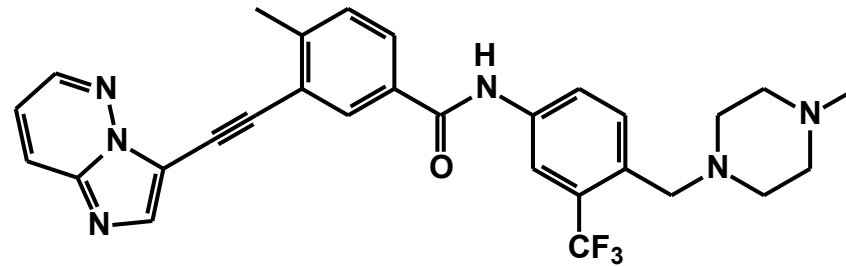


Φάρμακα 3^{ης} γενιάς

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.

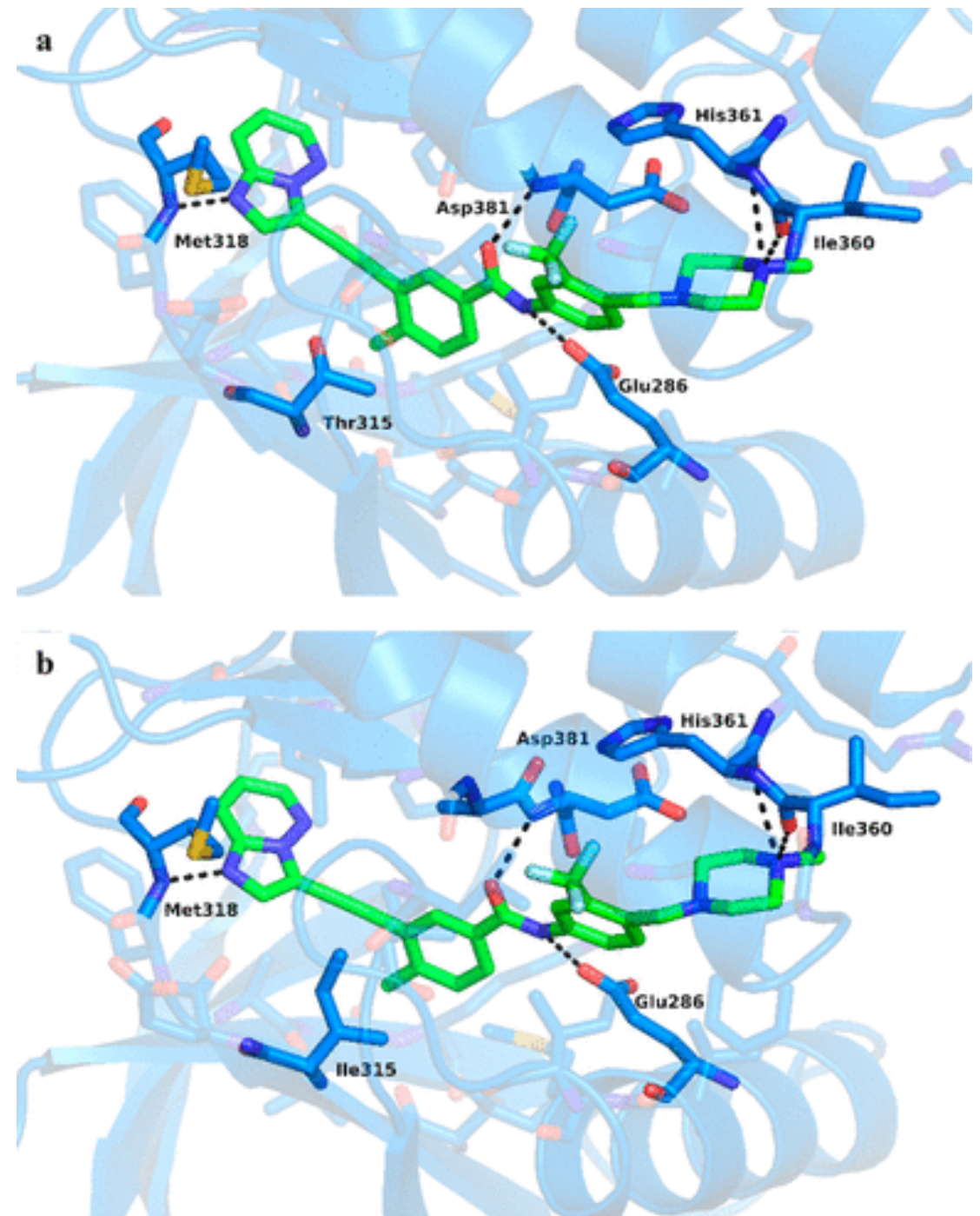
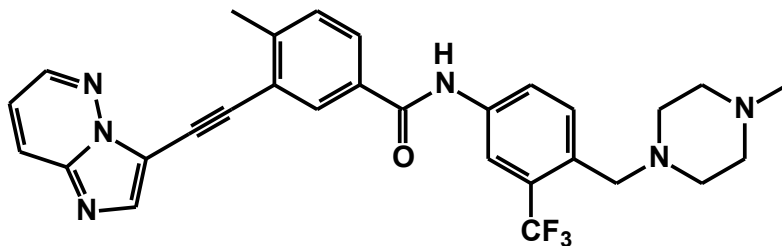


Ponatinib

Iclusig (Ariad Pharmaceuticals)

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

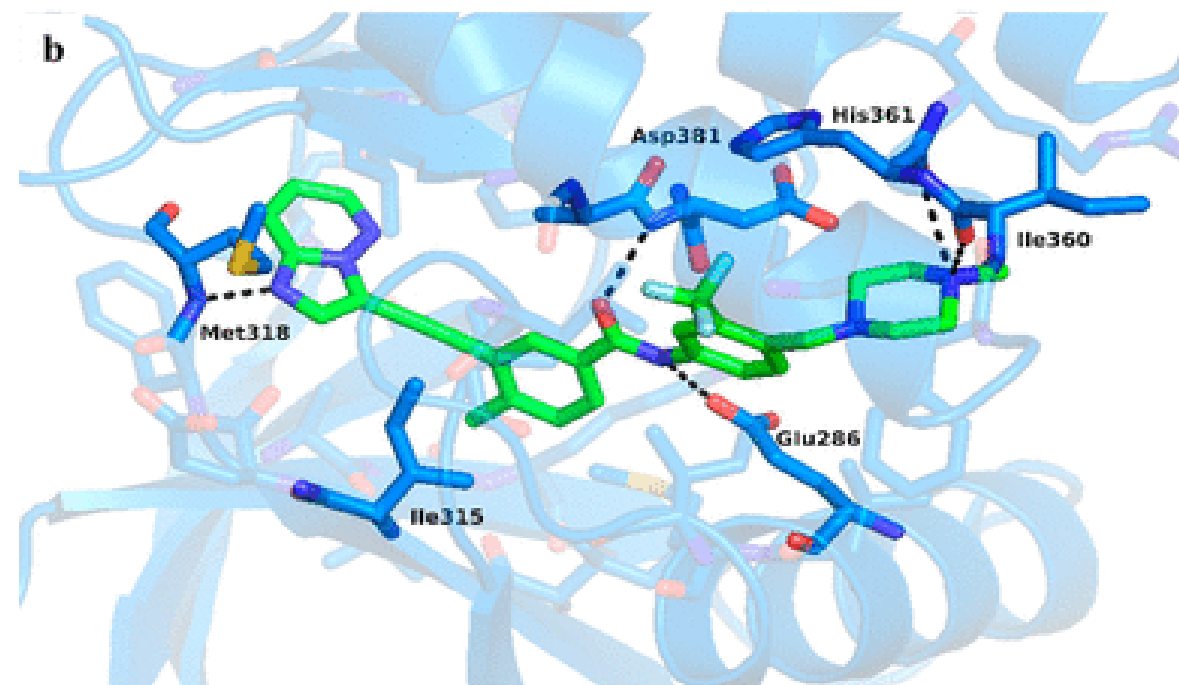
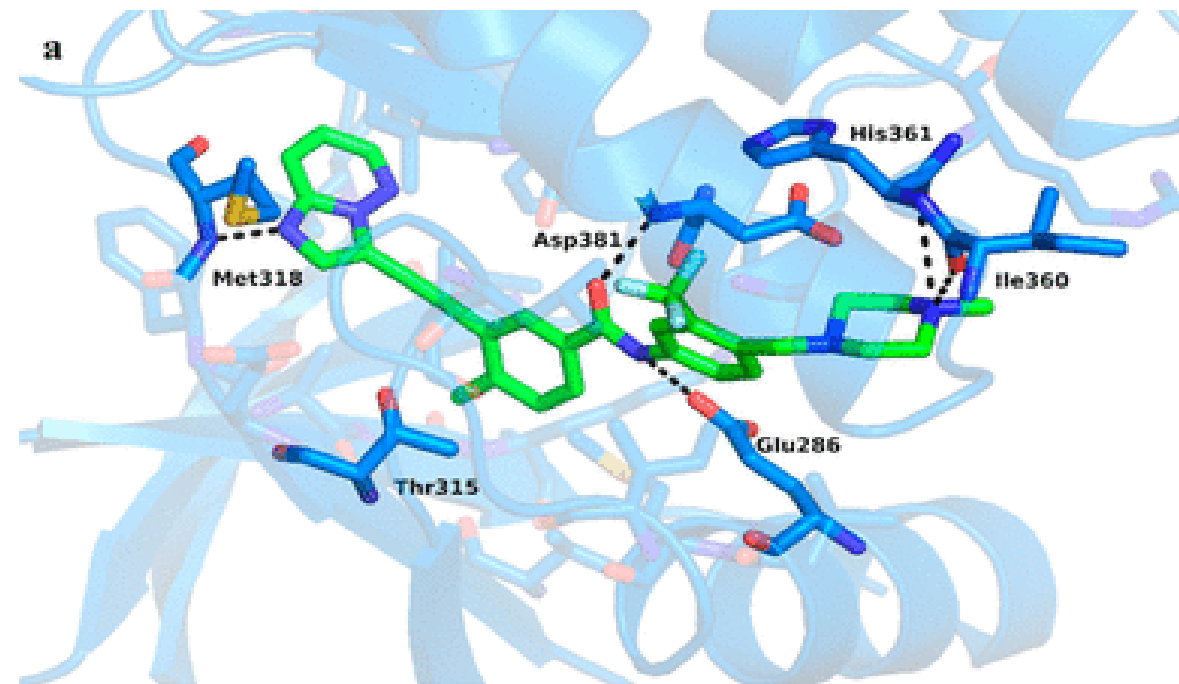
- Ο **ιμιδαζο[1,2-*b*]πυριδαζινικός δακτύλιος** καταλαμβάνει τη θέση της αδενίνης του ATP. Το ιμιδαζολικό άζωτο αναπτύσσει ισχυρό δεσμό με την **Met318** της ευκίνητης περιοχής.
- Η **μεθυλοφαινυλομάδα** εισέρχεται στη δευτερεύουσα λιπόφιλη κοιλότητα πίσω από τον gatekeeper.
- Η **τριφθορομεθυλοφαινυλομάδα** 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.

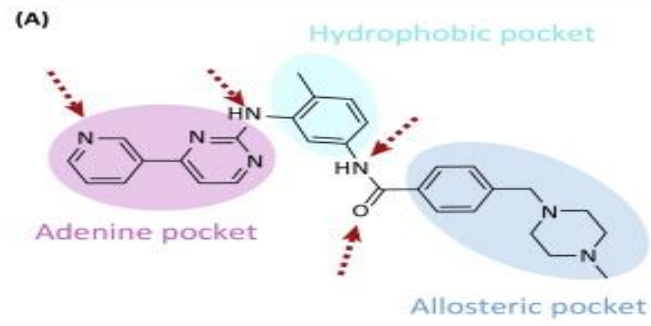


Η άκαμπτη αιθινυλομάδα λειτουργεί ως ενδιάμεσο (linker):

επιτρέπει τη διείσδυση του ιμιδαζο-πυριδαζινικού τμήματος στην καταλυτική περιοχή, τόσο στο wt (a), όσο 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





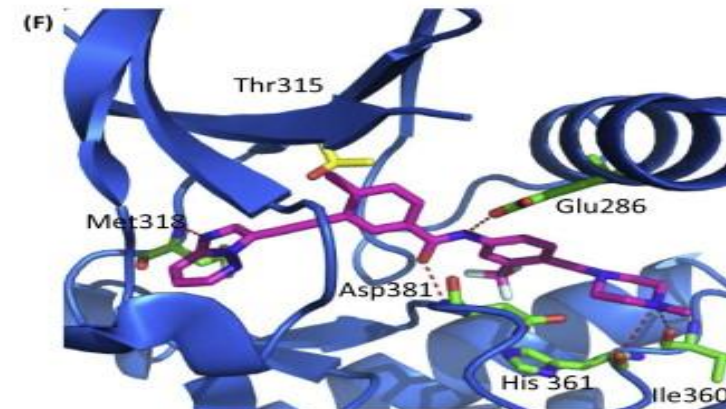
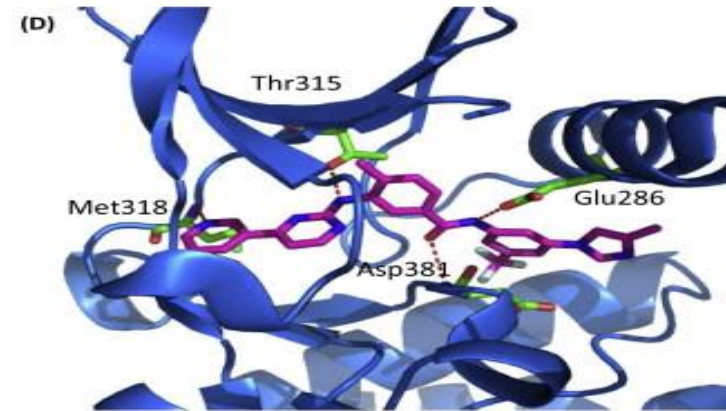
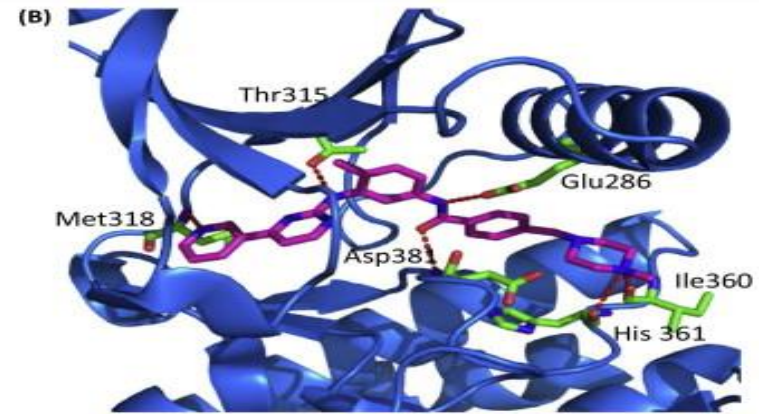
Imatinib



Nilotinib

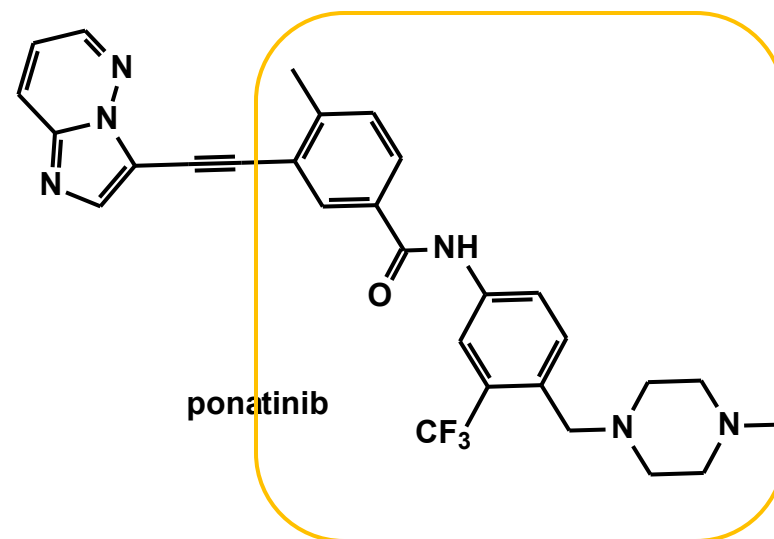
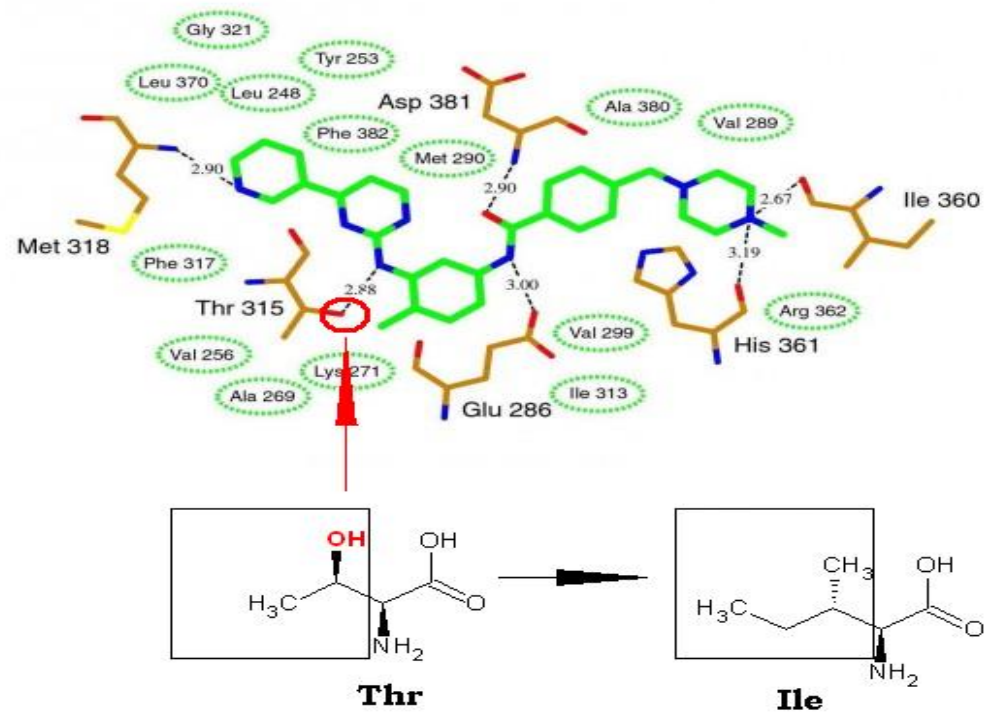
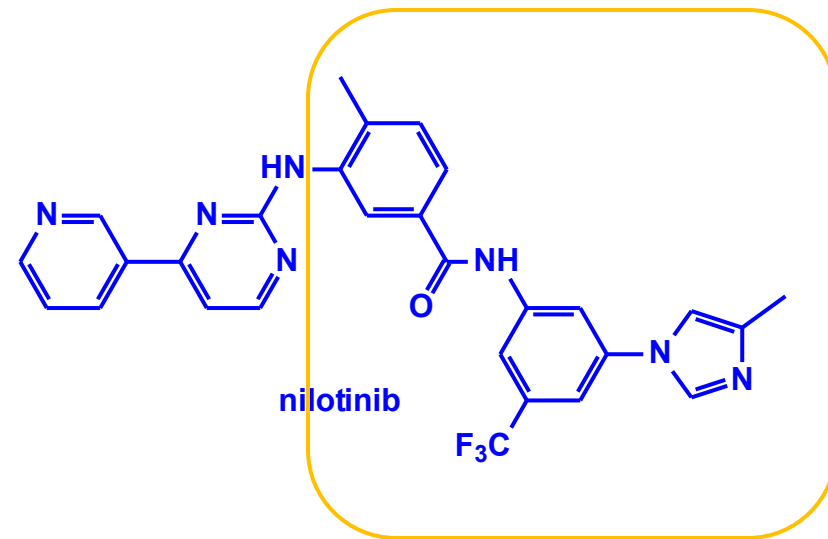
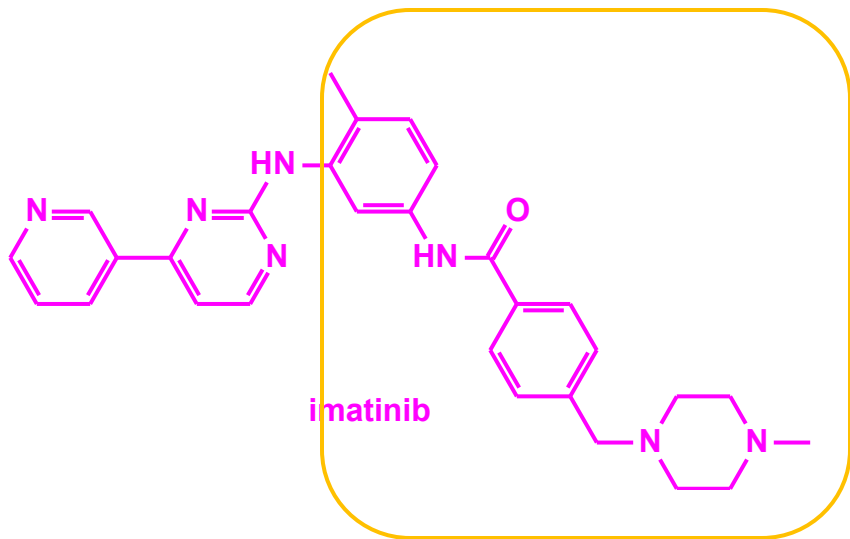


Ponatinib

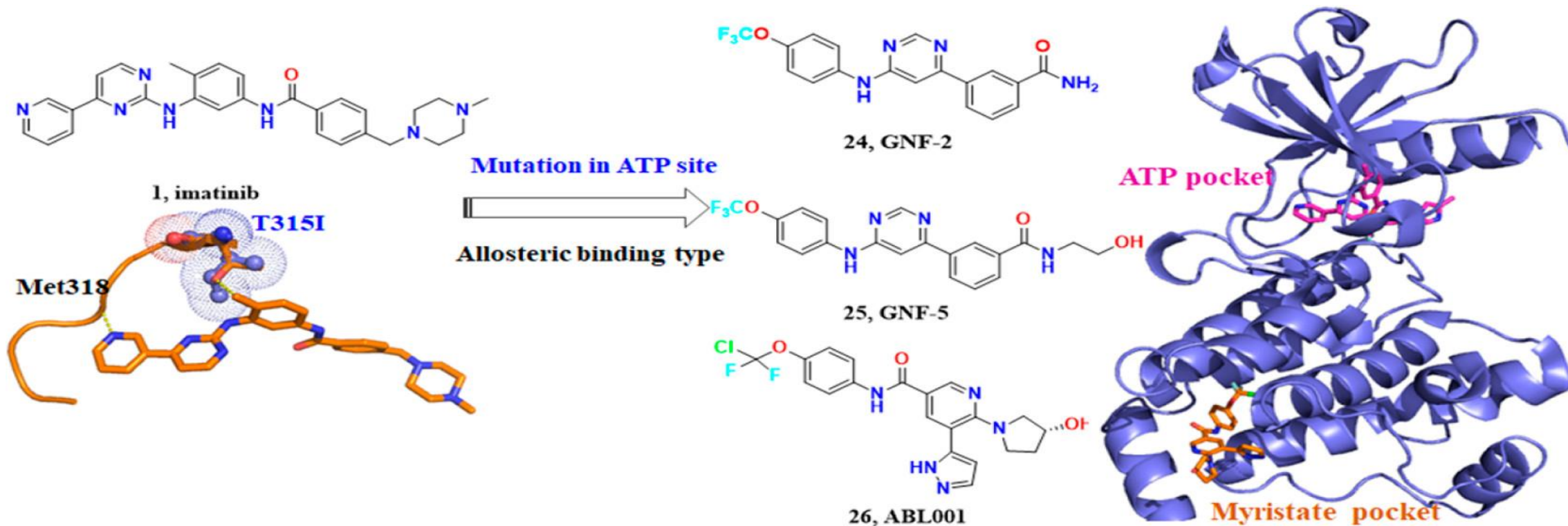


TRENDS in Pharmacological Sciences

Αναστολείς τύπου II



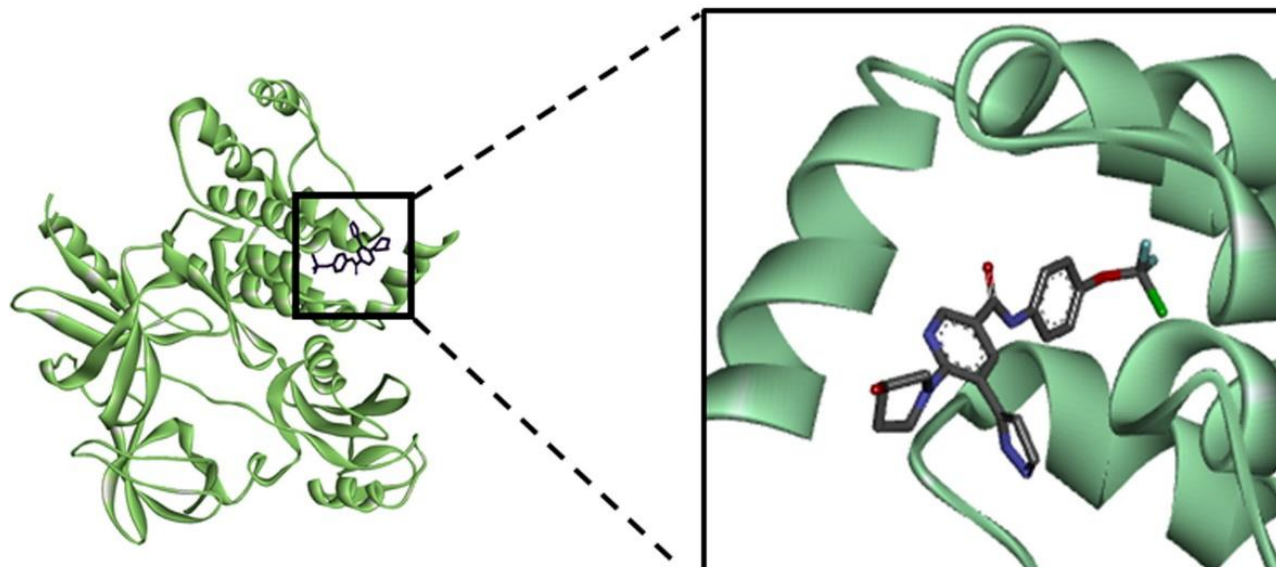
Ανάπτυξη αλλοστερικών αναστολέων τύπου IV



Το **asciminib** προσδέεται στη κοιλότητα πρόσδεσης του μυριστικού οξέος, μια αυτορρυθμιστική περιοχή της κινάσης. Η πρόσδεση μειώνει την ευκινησία του ενζύμου και σταθεροποιεί μια ανενεργή διαμόρφωση: STAMP (Specifically Targeting the ABL Myristoyl Pocket) αναστολέας τύπου IV. Το φάρμακο αναστέλλει ισχυρά την wt και μεταλλαγμένες Bcr-Abl κινάσες, μεταξύ αυτών και την **T315I**.

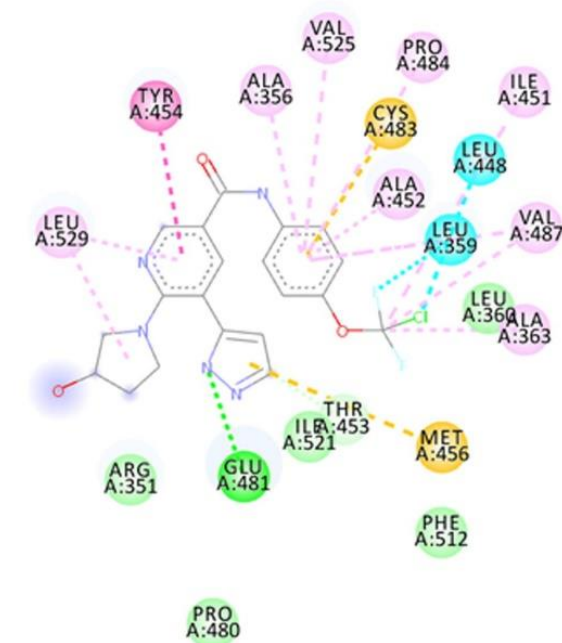
Αν και δεν είναι ATP-competitive αναστολέας, παρουσιάζει συνέργεια με ATP-competitive αναστολείς.

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.



A

B



■ Conventional Hydrogen Bond
■ Carbon Hydrogen Bond
■ Halogen (Cl, Br, I)
■ Halogen (Fluorine)

■ Pi-Pi T-shaped
■ Alkyl
■ Pi-Alkyl

C

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

Η μυριστουλίωση (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.