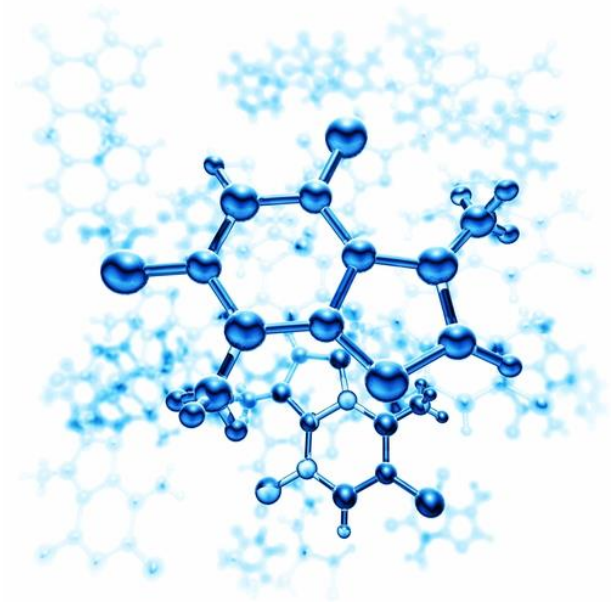
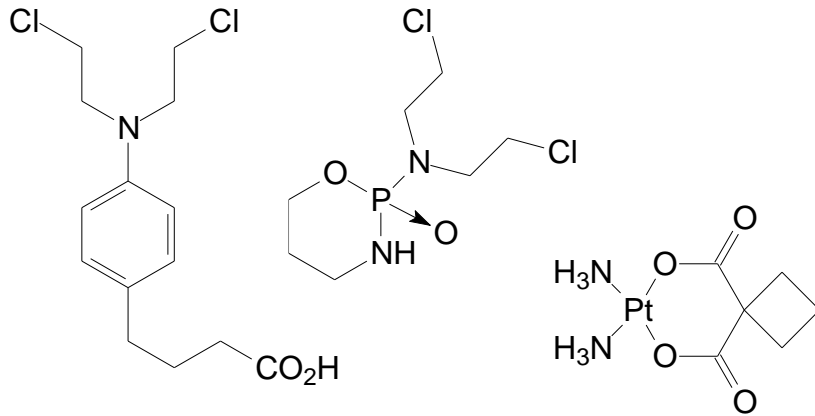


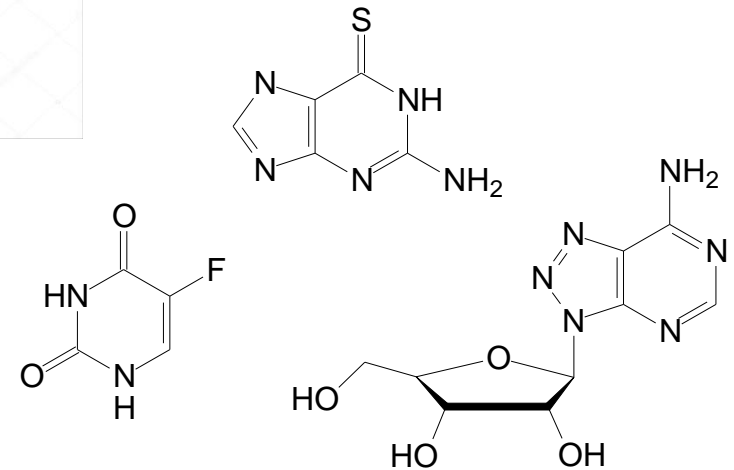
Ενζυμική αναστολή – σχεδιασμός φαρμάκων που αναστέλλουν πρωτεϊνικές κινάσες



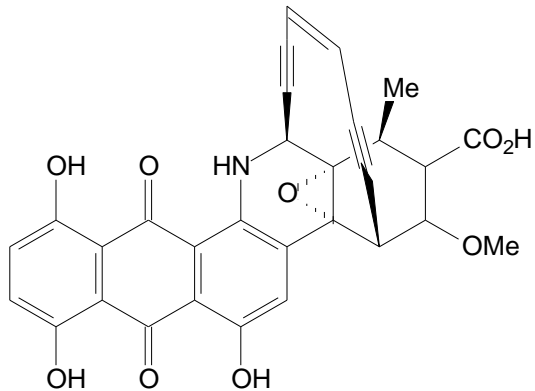
Αλκυλιωτικοί παράγοντες



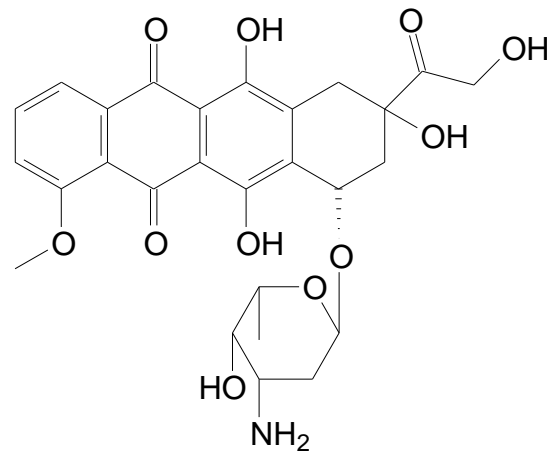
Αντιμεταβολίτες



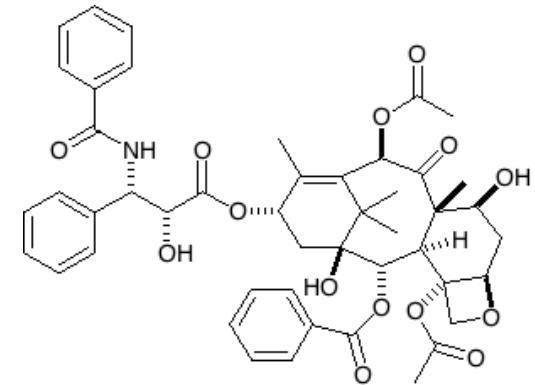
Μόρια που προκαλούν σχάση του DNA



Ενδοπαρεμβολείς

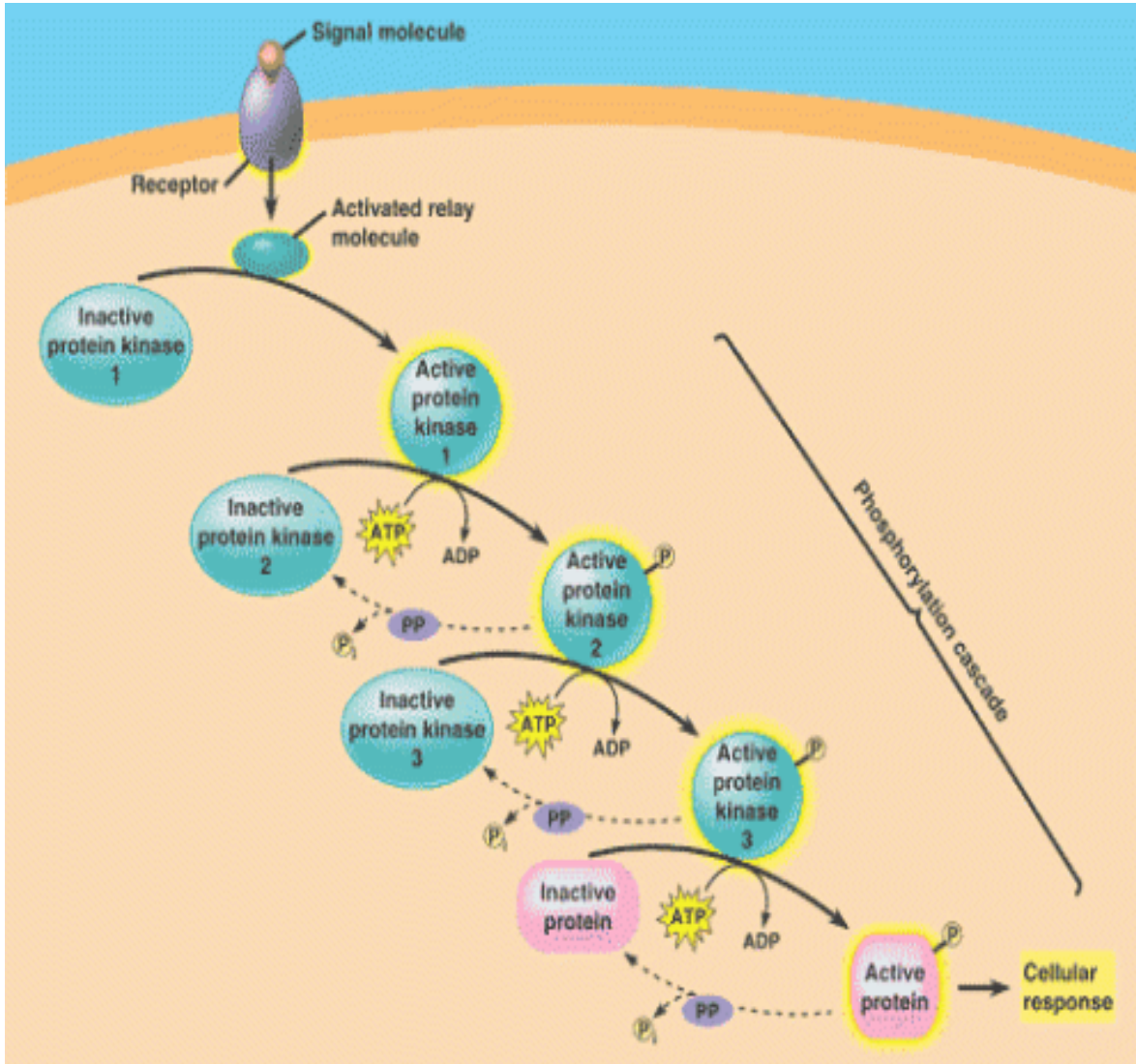


Αναστολείς κυτταρικών στοιχείων



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

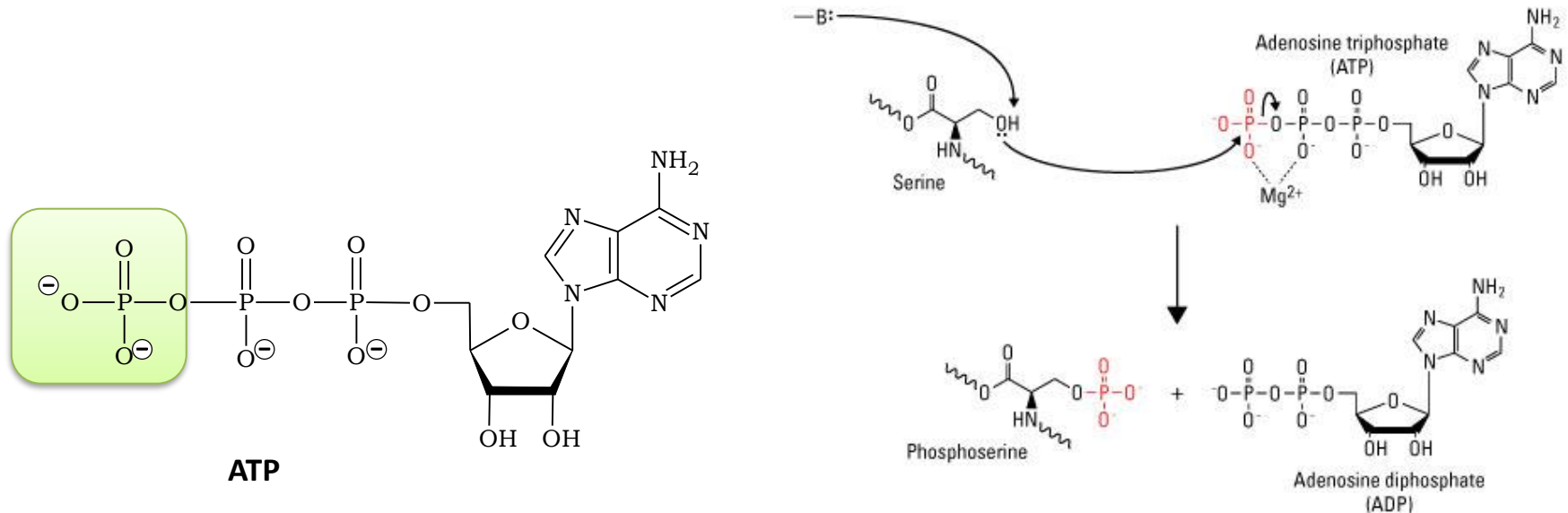
Αναστολείς πρωτεϊνικών κινάσων: πολλές πρωτεϊνικές κινάσες υπερεκφράζονται και εμπλέκονται στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και την επιβίωση του κυττάρου. Έντονη ακαδημαϊκή δραστηριότητα + το 25-30% του R&D των φαρμακευτικών εταιρειών.



Η προσθήκη φωσφορικής ομάδας καταλύεται από εξειδικευμένα ένζυμα και επηρεάζει πληθώρα ιδιοτήτων, όπως τον εντοπισμό των πρωτεϊνών, την ενζυμική τους δραστηριότητα και την αλληλεπίδραση τους 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 αντίδραση: τροποποίηση του μεταβολισμού, κυτταρική διαίρεση, απόπτωση, έκφραση γονιδίων κλπ

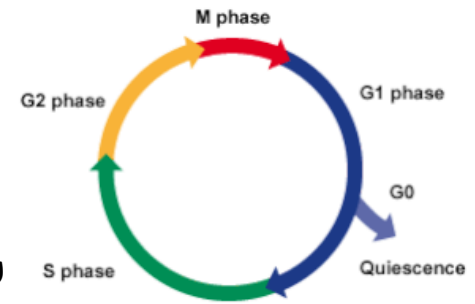
Ανεξαρτήτως της εξειδικευμένης λειτουργίας τους οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι ένζυμα που καταλύουν τη μεταφορά της τελικής γ-φωσφορικής ομάδας του ATP στο υδροξύλιο τυροσίνης, σερίνης, ή θρεονίνης (αμινοξέων που συμμετέχουν σε δομικές πρωτεΐνες, μεταβολικά ένζυμα ή παράγοντες μεταγραφής)



Οι κινάσες και οι φωσφατάσες, που καταλύουν την υδρόλυση της φωσφορικής ομάδας δίνοντας τέλος στη διάρκεια του σήματος, **έχουν μεγάλη βιολογική σημασία**, καθώς **ελέγχουν όλες τις σημαντικές ιδιότητες του κυττάρου**: τον **πολλαπλασιασμό**, τη **διαφοροποίηση**, την **ικανότητα μετάστασης** και την **απόπτωση**.

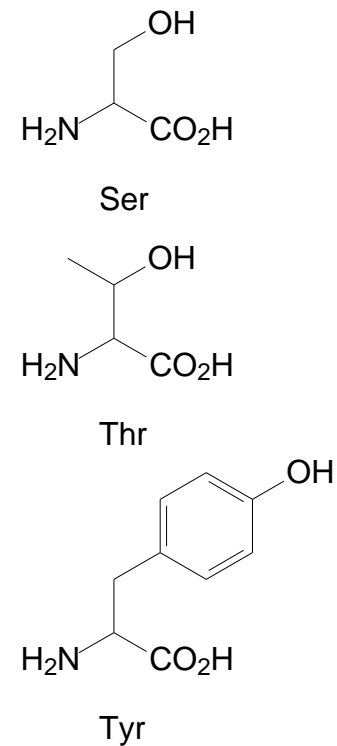
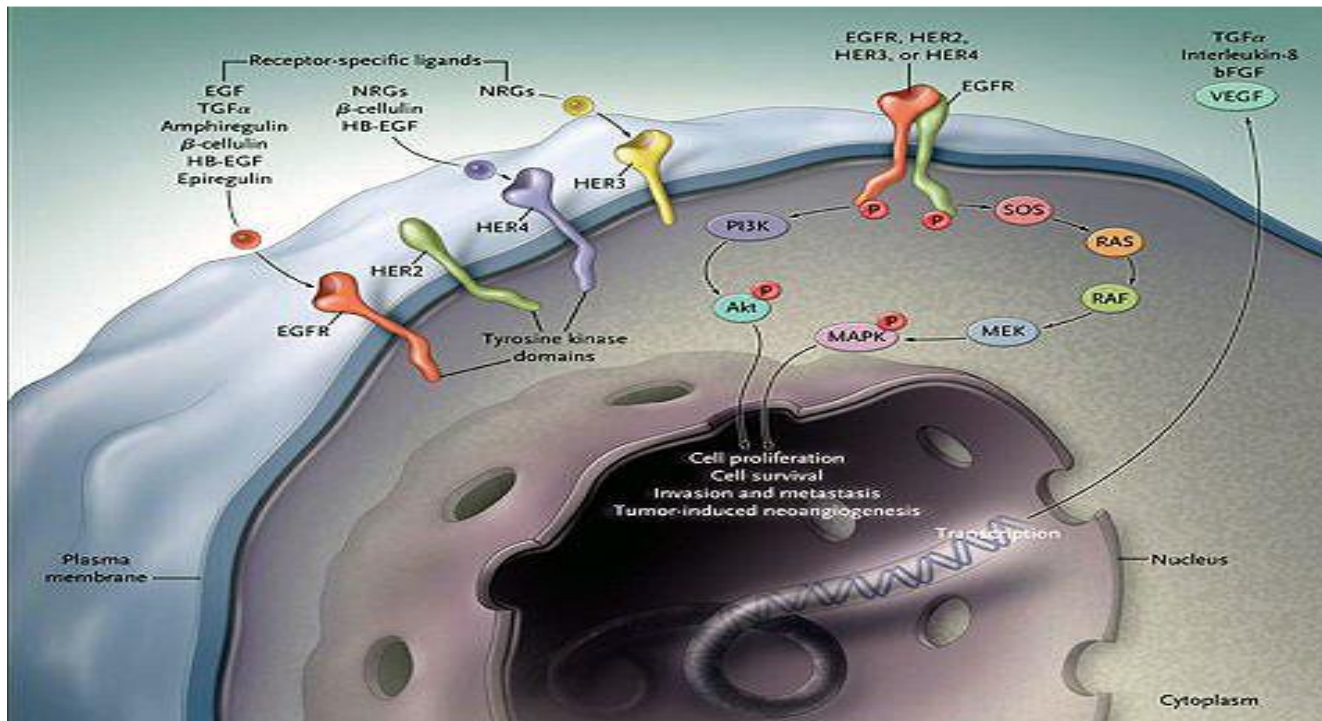
Λειτουργικά κατατάσσονται σε:

- **κινάσες-υποδοχείς**
- **κυτταροπλασματικές κινάσες - κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες**



Υπάρχουν κ.α. κινάσες? Ναι. Χαρακτηρίζονται από το υπόστρωμα που φωσφωρυλιώνουν (νουκλεοτίδια, βιταμίνες κ.α.). Κύριες κατηγορίες:

- **Πρωτεϊνικές κινάσες** (σε Ser, Thr, Tyr)
- **Λιπιδικές κινάσες** (φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης)
- **Υδατανθρακικές κινάσες** (συμμετοχή στο σχηματισμό γλυκογόνου)



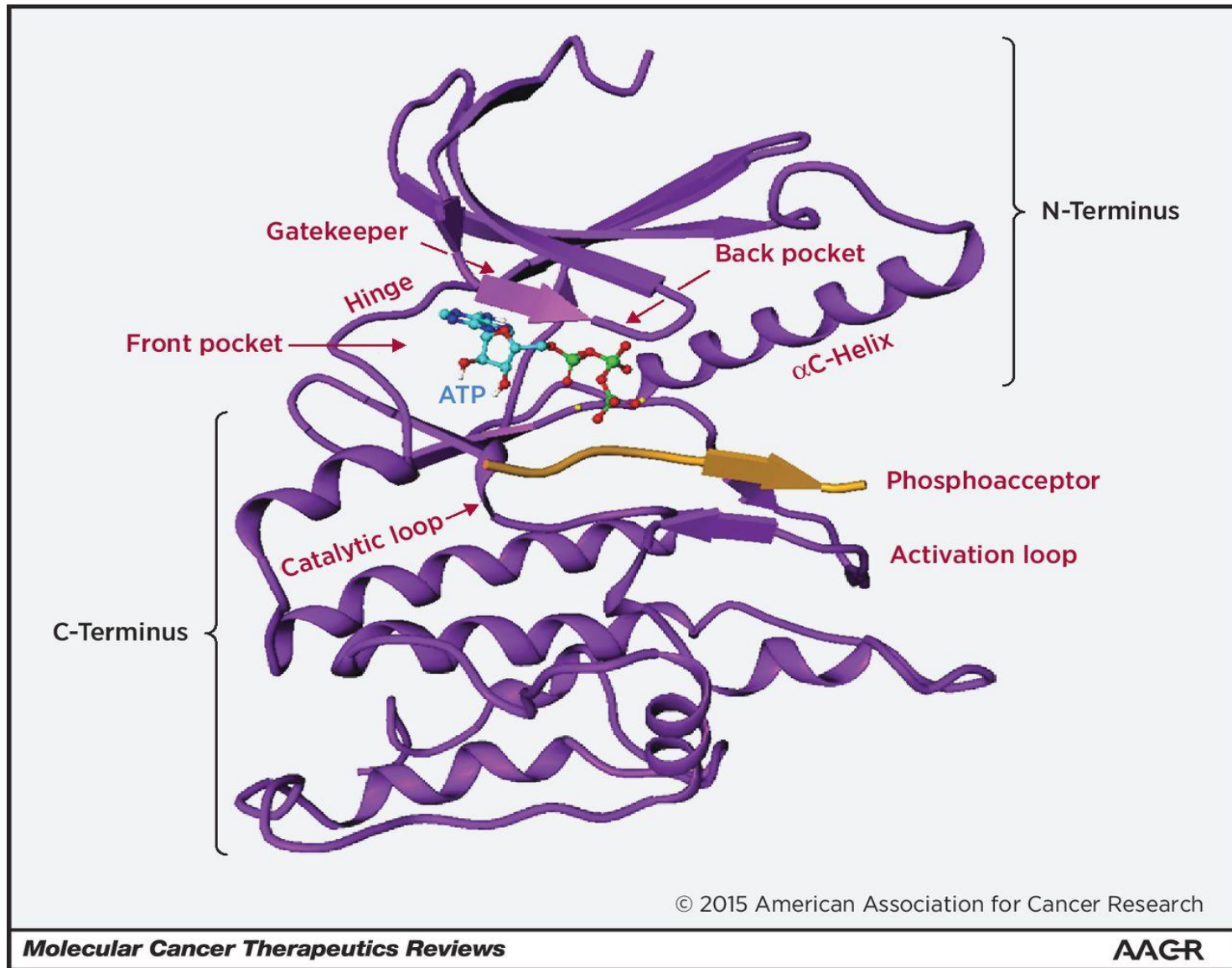
Οι πρωτεϊνικές κινάσες προωθούν την ανάπτυξη καρκίνου με τρεις τρόπους:

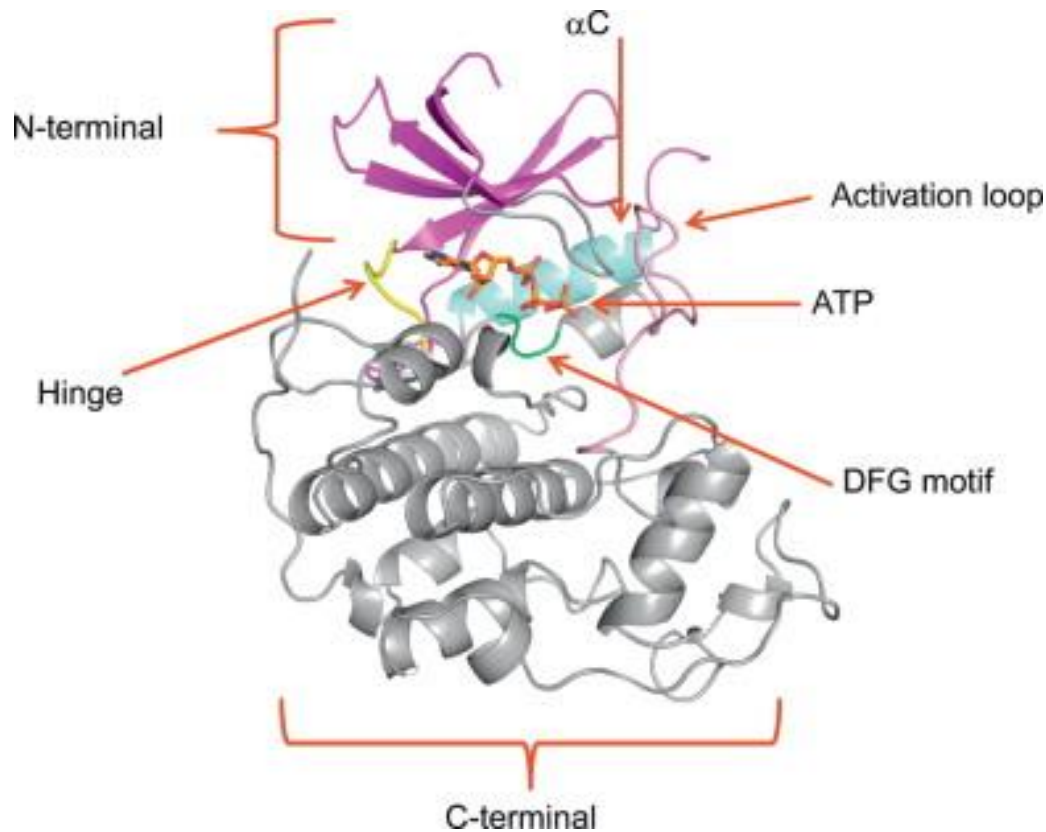
Ογκογόνος κινάση: στη περίπτωση που μια κινάση διατηρείται συνεχώς ενεργοποιημένη, η παρουσία της και μόνο μπορεί να μετατρέψει ένα φυσιολογικό κύτταρο σε καρκινικό. Αυτό μπορεί να συμβεί εξαιτίας κάποιας μετάλλαξης, ή αλλαγής του εντοπισμού της στο κυτταρικό περιβάλλον, με συνέπεια τη διαφυγή της κινάσης από τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς.

Κινάσες downstream ογκογόνου: χωρίς η κινάση να φέρει μεταλλάξεις, πιθανώς επειδή λαμβάνει συνεχώς σήματα, έχει ενεργό ρόλο στη κυτταρική διαίρεση και στη διαφυγή από την απόπτωση.

Κινάσες που εμπλέκονται στη καρκινογένεση ή στην εξέλιξη της ασθένειας: όπως ο υποδοχέας του αγγειακού αυξητικού παράγοντα (vascular endothelial growth factor receptor - VEGFR) που μέσω της αγγειογένεσης έχει κρίσιμο ρόλο στη τροφοδοσία και ανάπτυξη στερεών όγκων.

Δομικά χαρακτηριστικά κινασών



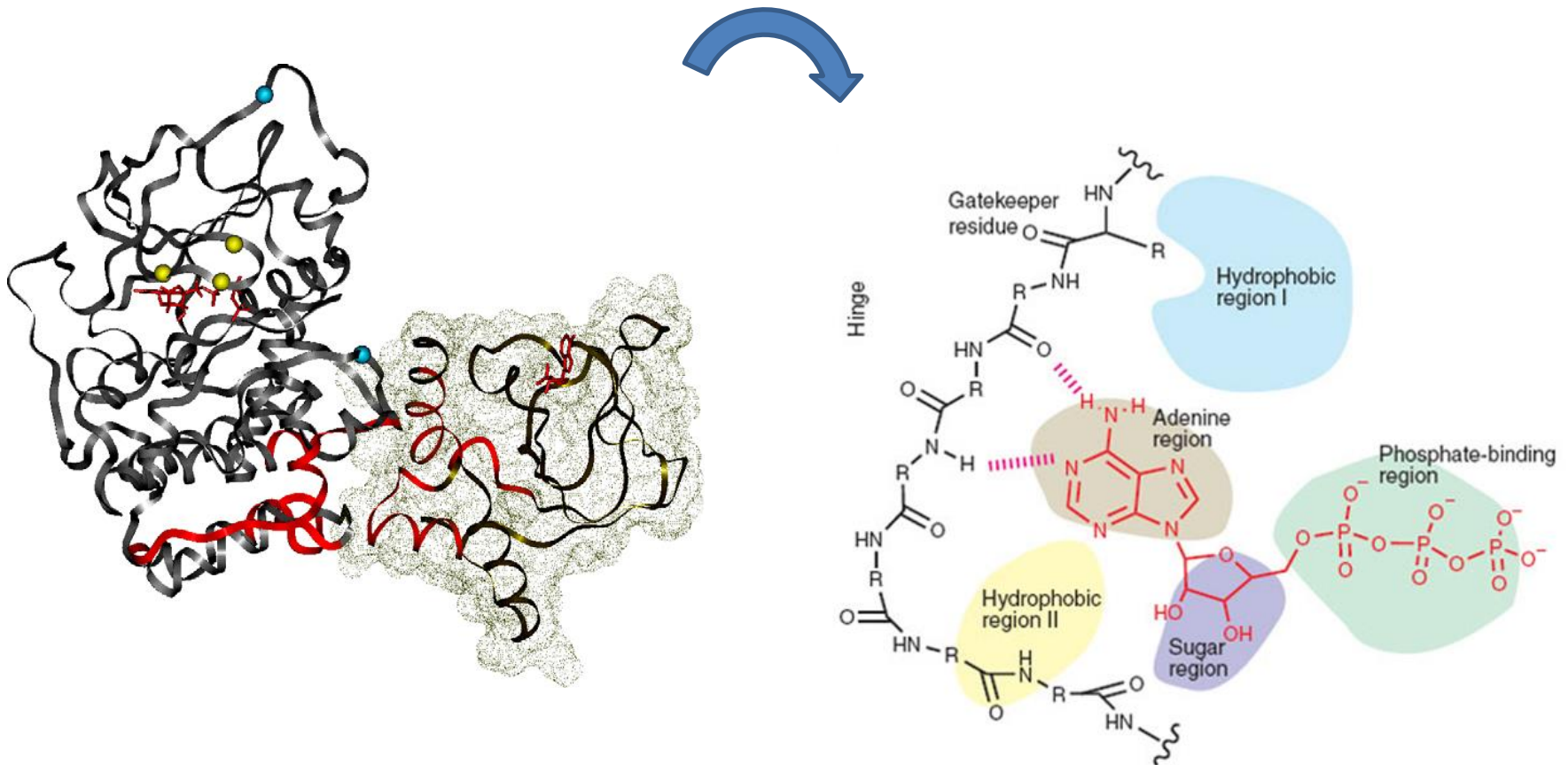


Η φωσφορυλίωση μιας πρωτεΐνης είναι μετα-μεταφραστική τροποποίηση. Η προκύπτουσα δομική αλλαγή είναι δυνατό να δημιουργεί θέση αναγνώρισης για ένα άλλο ένζυμο, ή να επηρεάζει τη καταλυτική δράση της κινάσης, επηρεάζοντας τη λειτουργία μιας σηματοδοτικής οδού, ή ενός καταρράκτη σημάτων.

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

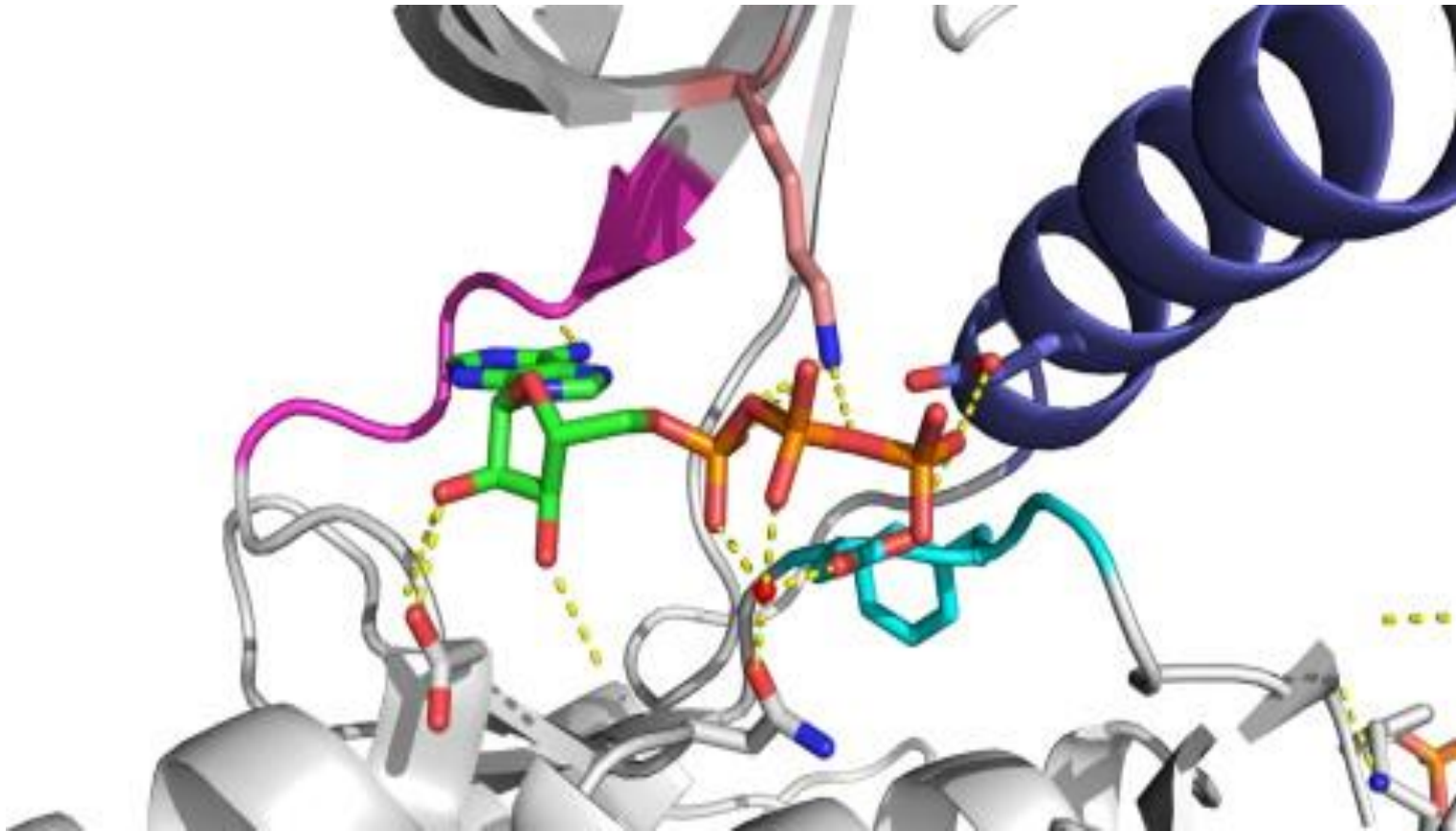
Στην αντίδραση μεταφοράς της φωσφορικής ομάδας συμμετέχουν τρεις περιοχές του ενεργού κέντρου της πρωτεϊνικής κινάσης:

- 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 των δύο διαμορφωμένων άκρων (αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο). Δεν επαληθεύτηκαν οι αρχικές ανησυχίες, σχετικά με τη δυσκολία εύρεσης εκλεκτικών αναστολέων κατά τη στόχευση της θέσης δέσμευσης του ATP, αλλά και σχετικά με τον ανταγωνισμό, λόγω της ενδοκυτταρικής παρουσίας του ATP. Στην ανακάλυψη φαρμάκων αξιοποιήθηκαν σημεία εντός και εκτός κοιλότητας που δεν αλληλοεπιδρούν με το ATP.

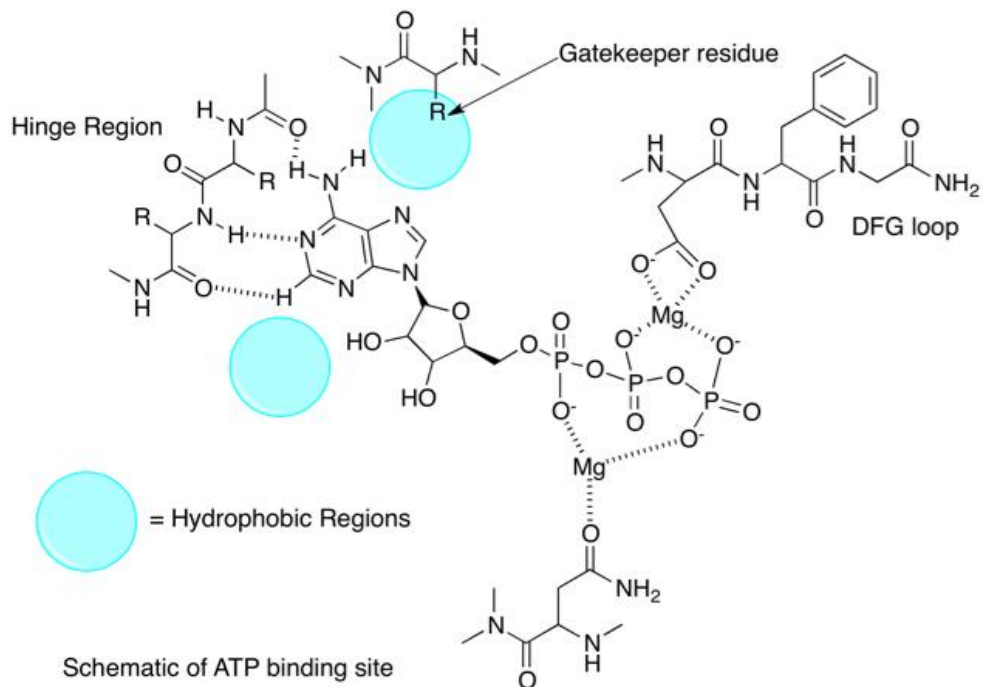
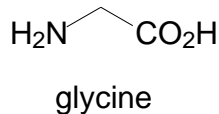
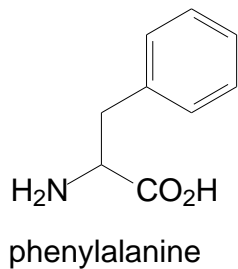
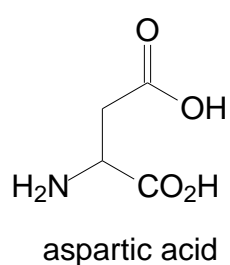


Αντισταθμιστικά Mg^{2+} (με κόκκινο) Ευκίνητη περιοχή (Hinge - μωβ), Δεσμός άλατος με λυσίνη (ροζ) DFG μοτίβο (γαλάζιο), α -C έλικας (σκούρο μπλε), δH (με κίτρινο)

Θέση πρόσδεσης του ATP

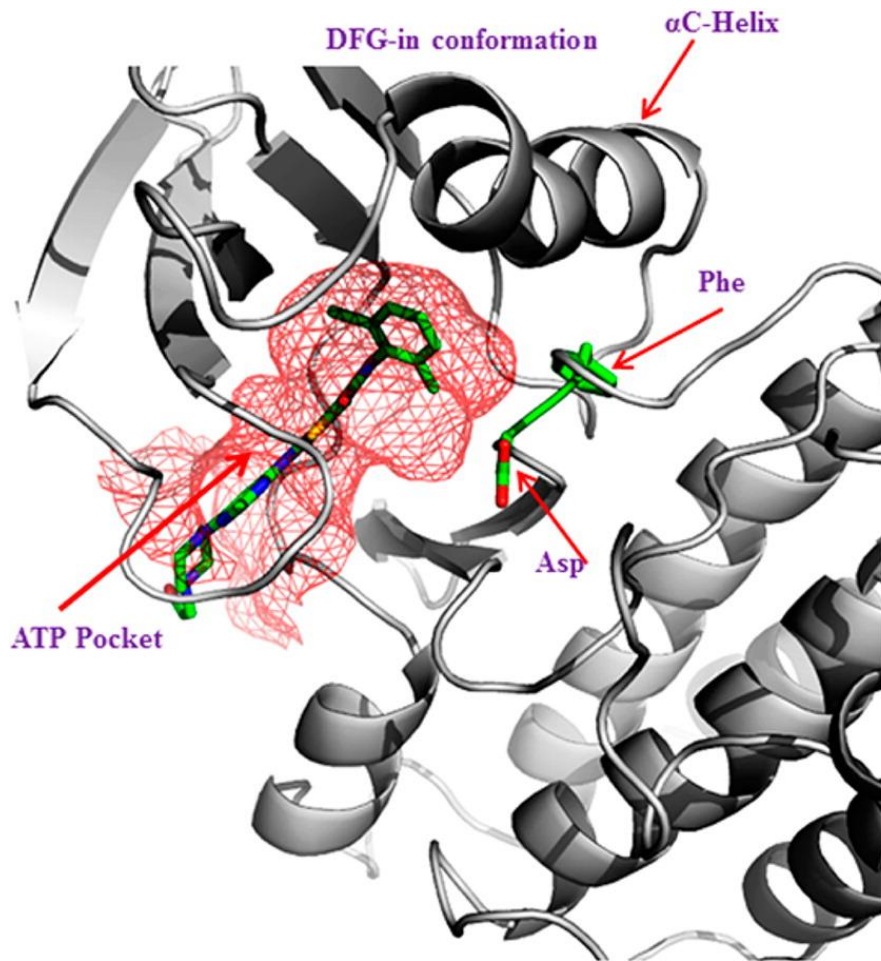
Ο **μικρός αμινοτελικός λοβός** αποτελείται από 5 β-πτυχωτές επιφάνειες και μια έλικα (αC-έλικα). Ένα ισχυρά **διατηρημένο Glu** της αC-έλικας σχηματίζει **γέφυρα άλατος με μία Lys** της β3 επιφάνειας όταν η κινάση λαμβάνει την ενεργή διαμόρφωση. Μια **ευκίνητη περιοχή πλούσια σε γλυκίνη**, (εντοπίζεται μεταξύ β1 και β2) αλληλοεπιδρά με τις φωσφορικές ομάδες του νουκλεοτίδιου και ακολουθείται από **μία Val** που σχηματίζει **υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με την αδενίνη του ATP**.

Ο **μεγάλος καρβοξυτελικός λοβός** αποτελείται κυρίως από α-έλικες. Η καταλυτική περιοχή (βρόγχος) είναι το μόνο σταθερό τμήμα του. Περιέχει ένα **ασπαρτικό υπόλοιπο (D)** που λειτουργεί σαν βάση, για τον ιονισμό του -OH που θα φωσφορυλιωθεί, διευκολύνοντας έτσι 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 αρχίζει με την συντηρημένη **τριάδα αμινοξέων Asp-Phe-Gly (DFG μοτίβο)**. Το **Asp** της τριάδας συμπλοκοποιεί αντισταθμιστικά ιόντα Mg²⁺ που συνδέονται και με τις φωσφορικές ομάδες και παίζει ενεργό ρόλο στην μεταφορά της γ-φωσφορικής ομάδας, ενώ η **Phe** τοποθετείται κάτω από την αC-έλικα, σταθεροποιώντας την σε κατάλληλη θέση ως προς τον βρόγχο ενεργοποίησης.

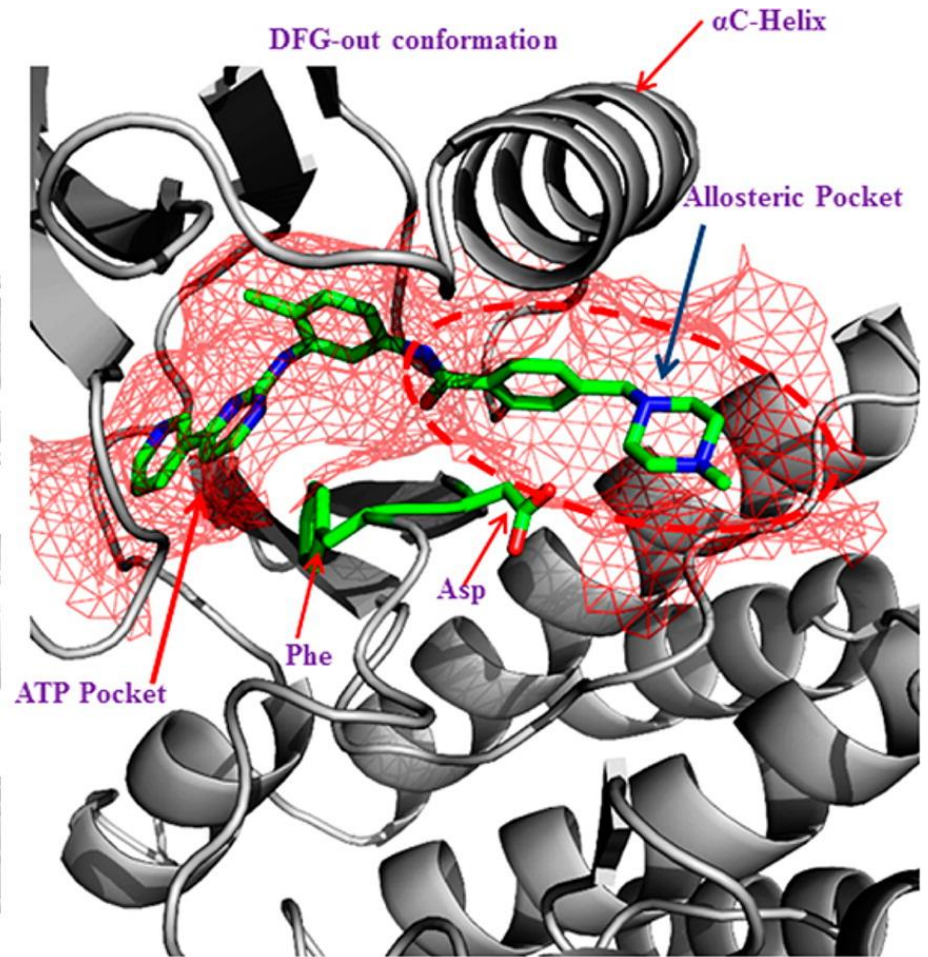


Για την κατάλυση είναι σημαντικές **οι θέσεις της αC-έλικας** (αC-in, active; αC-out, inactive), **του DFG-Asp μοτίβου** (DFG-Asp in, active; DFG-Asp out, inactive) και **του βρόγχου ενεργοποίησης** (AS open, active, AS closed inactive).

Το DFG μοτίβο περιστρέφεται εντός ή εκτός του ενεργού κέντρου, με ακραίες διαμορφώσεις την ενεργή (DFG-in) και την ανενεργή (DFG-out) διαμόρφωση του ενζύμου. Στην DFG-in διαμόρφωση προσδένεται το ATP και το υπόστρωμα και «μεταφέρεται» η φωσφορική ομάδα. Στην DFG-out διαμόρφωση το Asp δεν συμπλοκοποιεί ιόντα Mg²⁺ ενώ η Phe, αντί να σταθεροποιεί την αC-in διαμόρφωση, μετατοπίζεται προς το υδατικό περιβάλλον, αποκαλύπτοντας μια φαρδιά, λιπόφιλη κοιλότητα. Ο βρόγχος ενεργοποίησης βρίσκεται σε κλειστή διαμόρφωση.

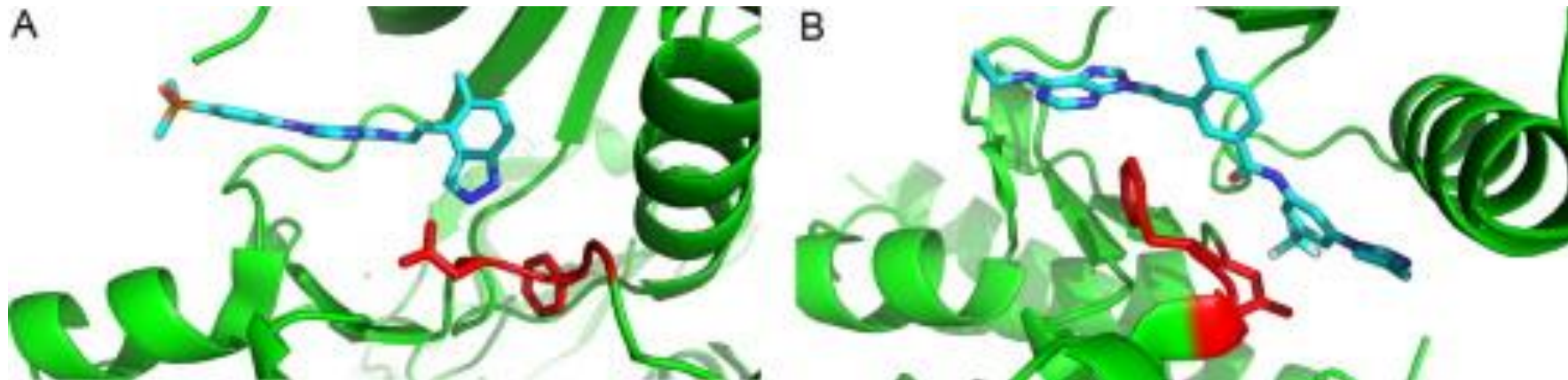


Ενεργή διαμόρφωση ABL κινάσης με αναστολέα



Ανενεργή διαμόρφωση ABL κινάσης με αναστολέα

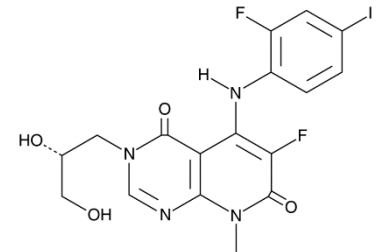
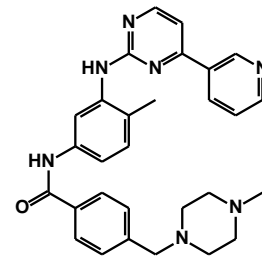
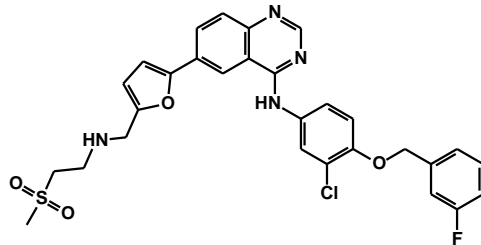
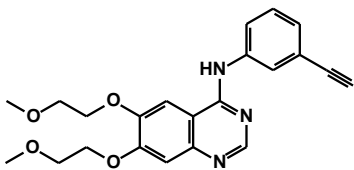
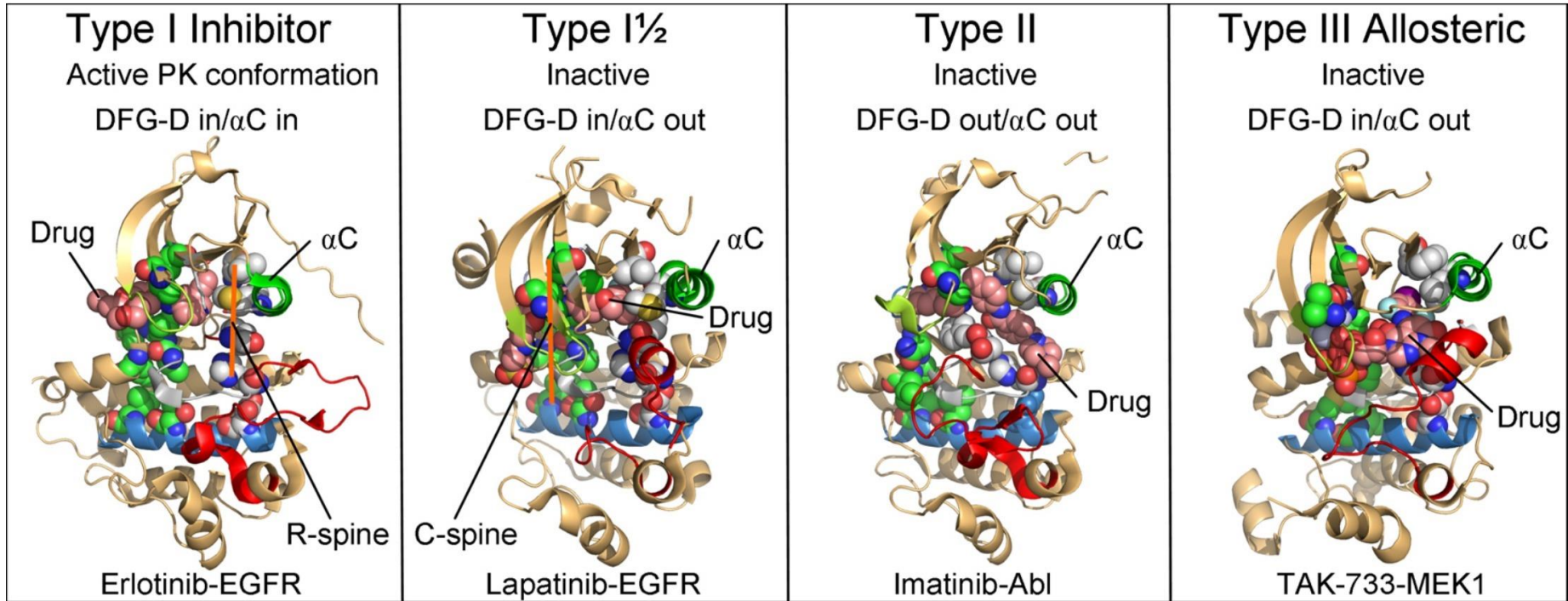
Η αναστολή του ενζύμου μπορεί να γίνει από παράγωγο που καταλαμβάνει το ενεργό κέντρο της ενεργής διαμόρφωσης (**αναστολέας τύπου I**), ή με τη σταθεροποίηση της ανενεργής διαμόρφωσης (**αναστολέας τύπου II**)



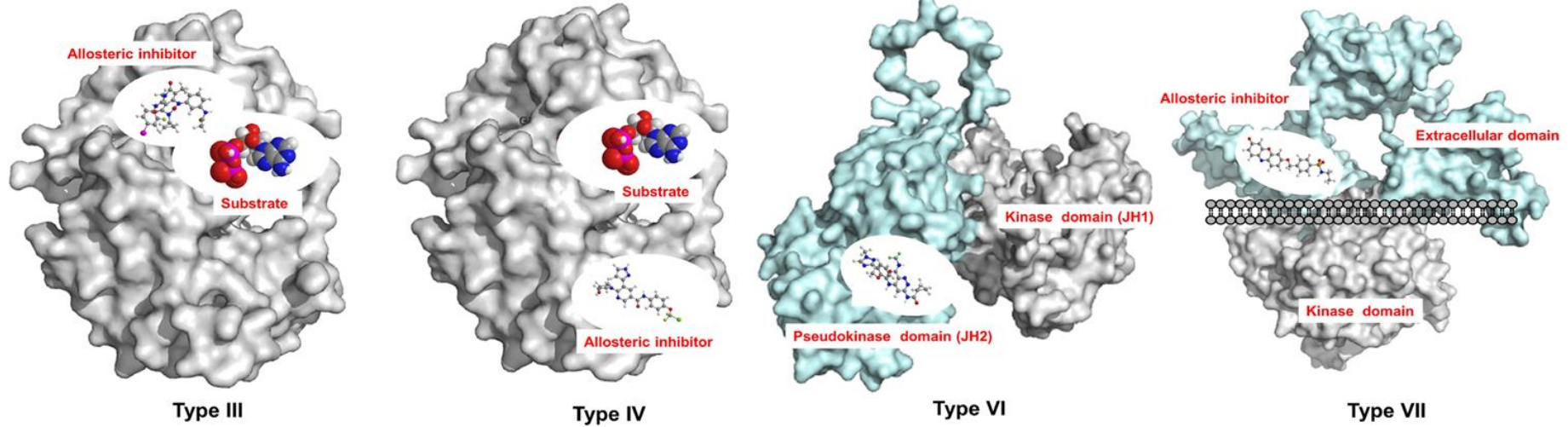
(A) Διαμόρφωση του βρόγχου ενεργοποίησης και του μοτίβου DFG (DFG-in, με κόκκινο) της κινάσης c-ABL (με πράσινο) κατά την υποδοχή αναστολέα τύπου I. Διακρίνεται καθαρά η τοποθέτηση του ασπαρτικού υπόλοιπου που κατευθύνεται προς τη θέση δέσμευσης του ATP.

(B) Κατά τη δέσμευση 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 αλληλεπιδρά με τον αναστολέα.

Κατηγορίες αναστολέων κινασών



Η 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 πιο εκλεκτικοί από τους αναστολείς τύπου I. **Σημαντικά εκλεκτικότεροι είναι οι αλλοστερικοί αναστολείς** (τύπου III και IV) με μειωμένη πιθανότητα για off target toxicity.



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

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

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

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

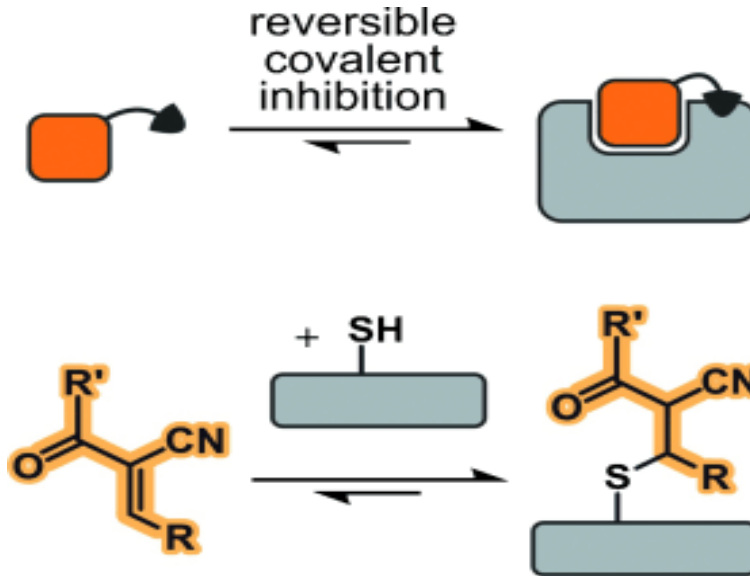
Στόχευση της περιοχής ψευδοκινάσης – αναστολείς τύπου VI

Η ανάγνωση του ανθρώπινου κινώματος αποκάλυψε ότι το 10% των κινασών φέρουν μεταλλάξεις στα κανονικά και σημαντικά για τη κατάλυση αμινοξικά μοτίβα, με αποτέλεσμα να έχουν χάσει (βάσει των *in silico* μοντέλλων) 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.

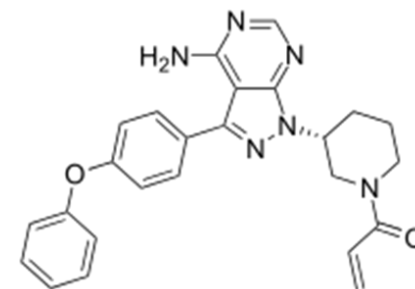
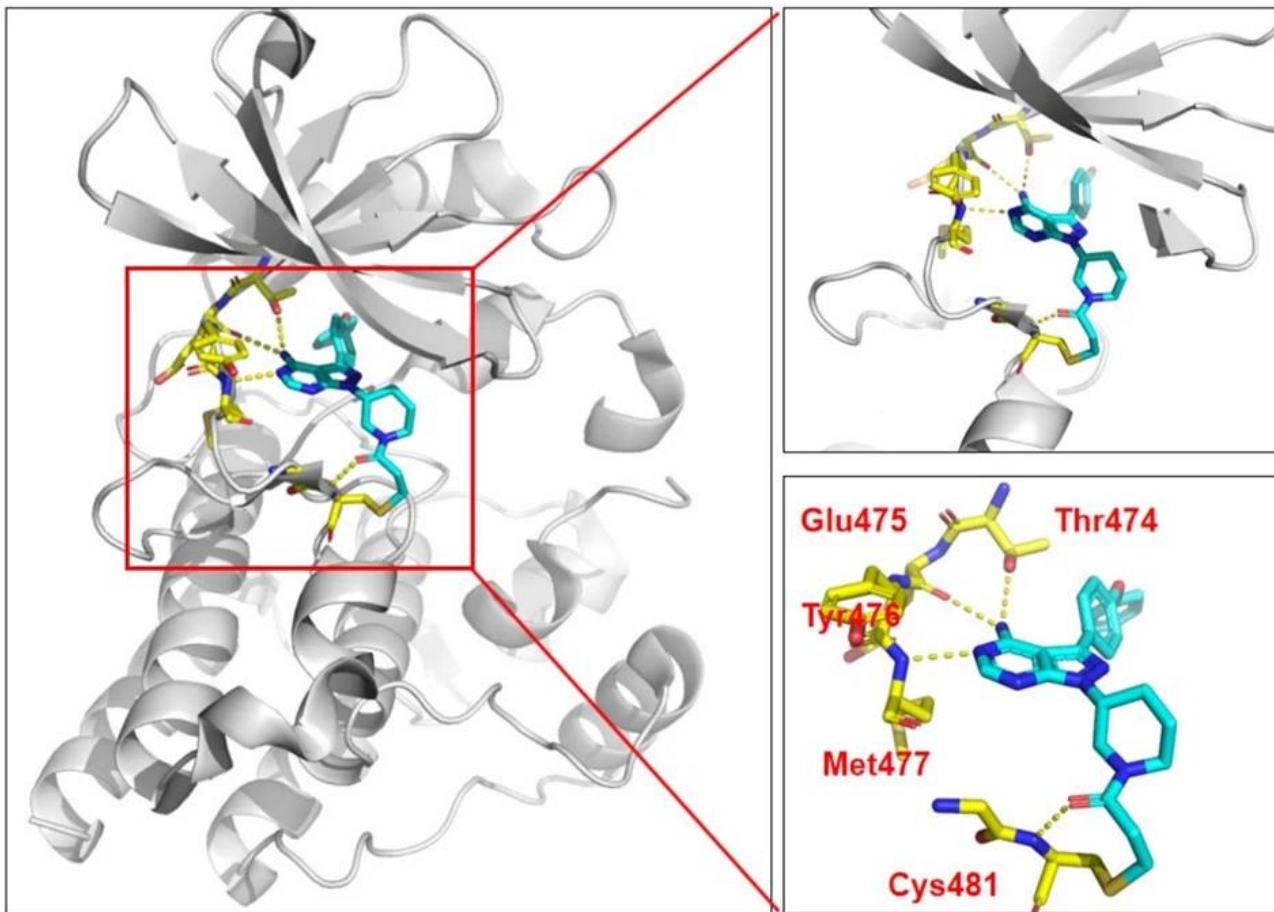
Μη αντιστρεπτοί αναστολείς (τύπου V)



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 σύνδεσης του ATP.

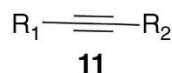
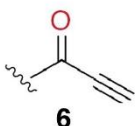
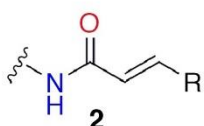
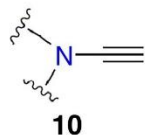
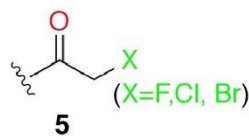
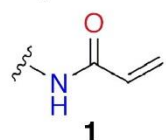


Ibrutinib

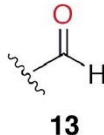
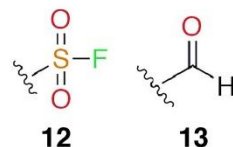
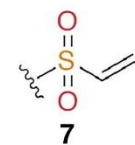
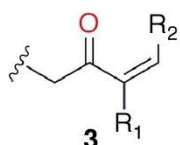
Παράδειγμα μη αντιστρεπτού αναστολέα: η δέσμευση του **ibrutinib** στην κινάση BTK. Το άτομο N και η $-NH_2$ της πυραζολοπυριμιδίνης σχηματίζουν 3 δ.Η με τα αμινοξέα **Glu475**, **Tyr476** και **Thr474**. Το καρβονύλιο σχηματίζει δ.Η με την **Cys481** η οποία προσβάλλει την αλλυλομάδα με προσθήκη τύπου Michael.

(a)

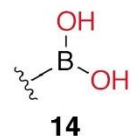
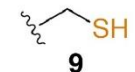
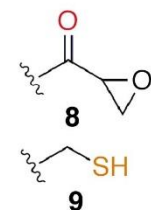
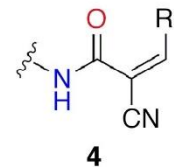
■ Cysteine targeted



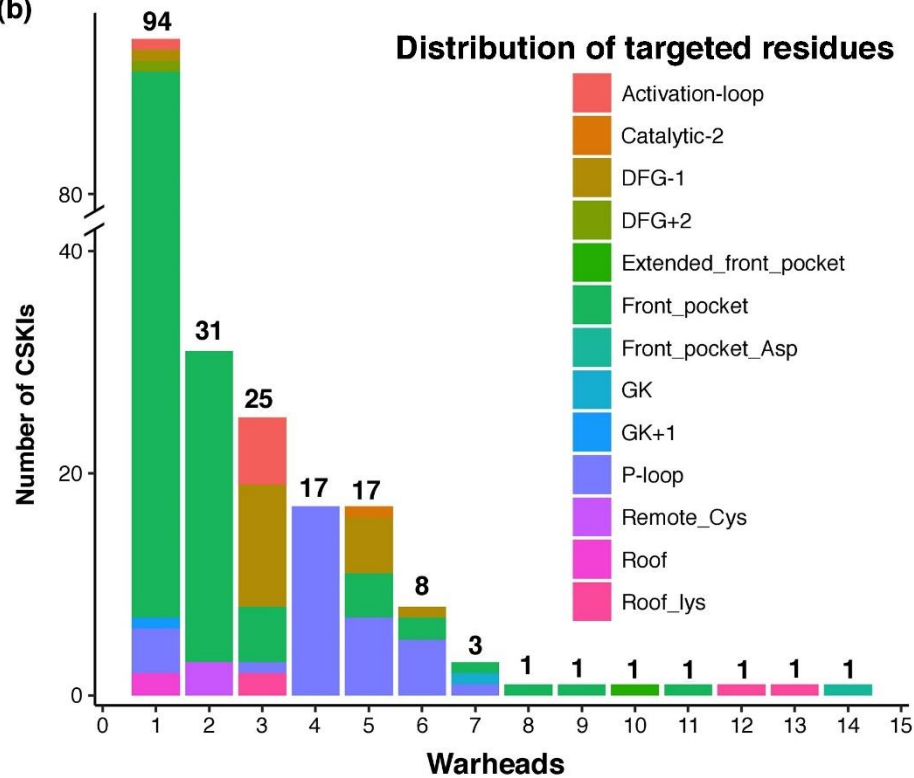
■ Lysine targeted



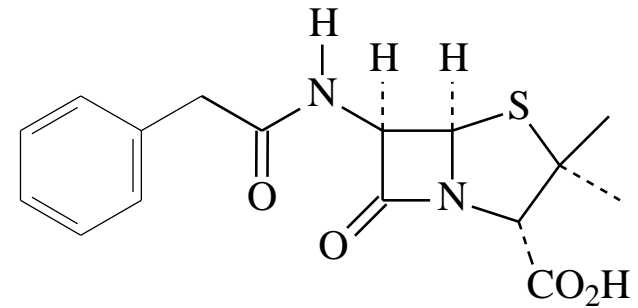
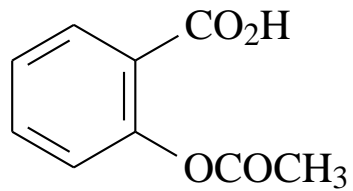
■ Aspartic acid targeted



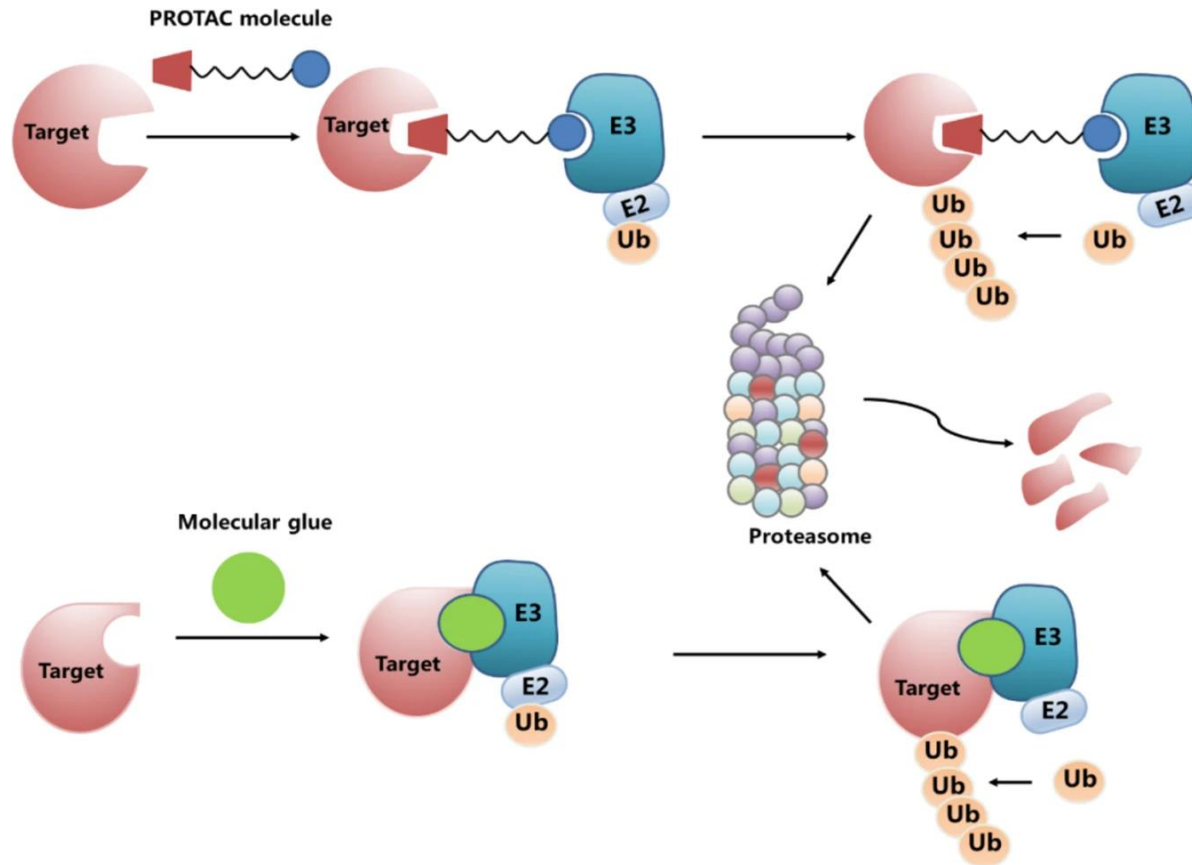
(b)



Σημαντικά φάρμακα που δρουν ως μη αντιστρεπτοί αναστολείς ενζύμων.



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

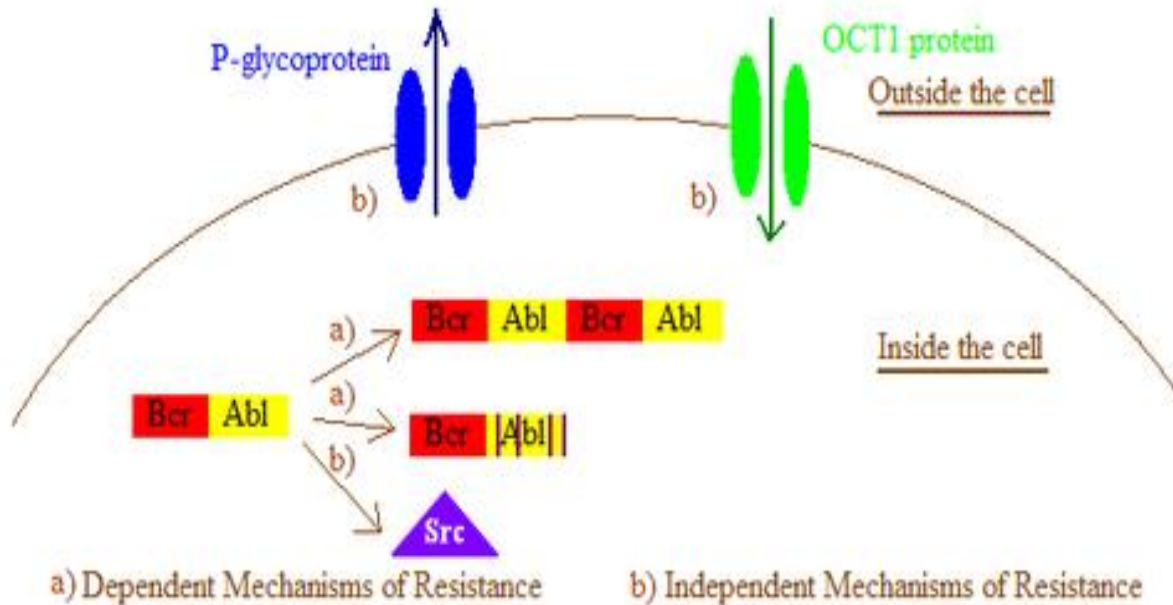


ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΝΕΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ - proteolysis targeting chimeras (PROTAC)- molecular glue

Η πρωτεΐνη-στόχος (κινάση) δεσμεύεται με το 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 την λιγάση, ώστε να στοχευθεί για αποικοδόμηση.

Επαγόμενη ανάπτυξη αντοχής προς τους αναστολείς κινασών

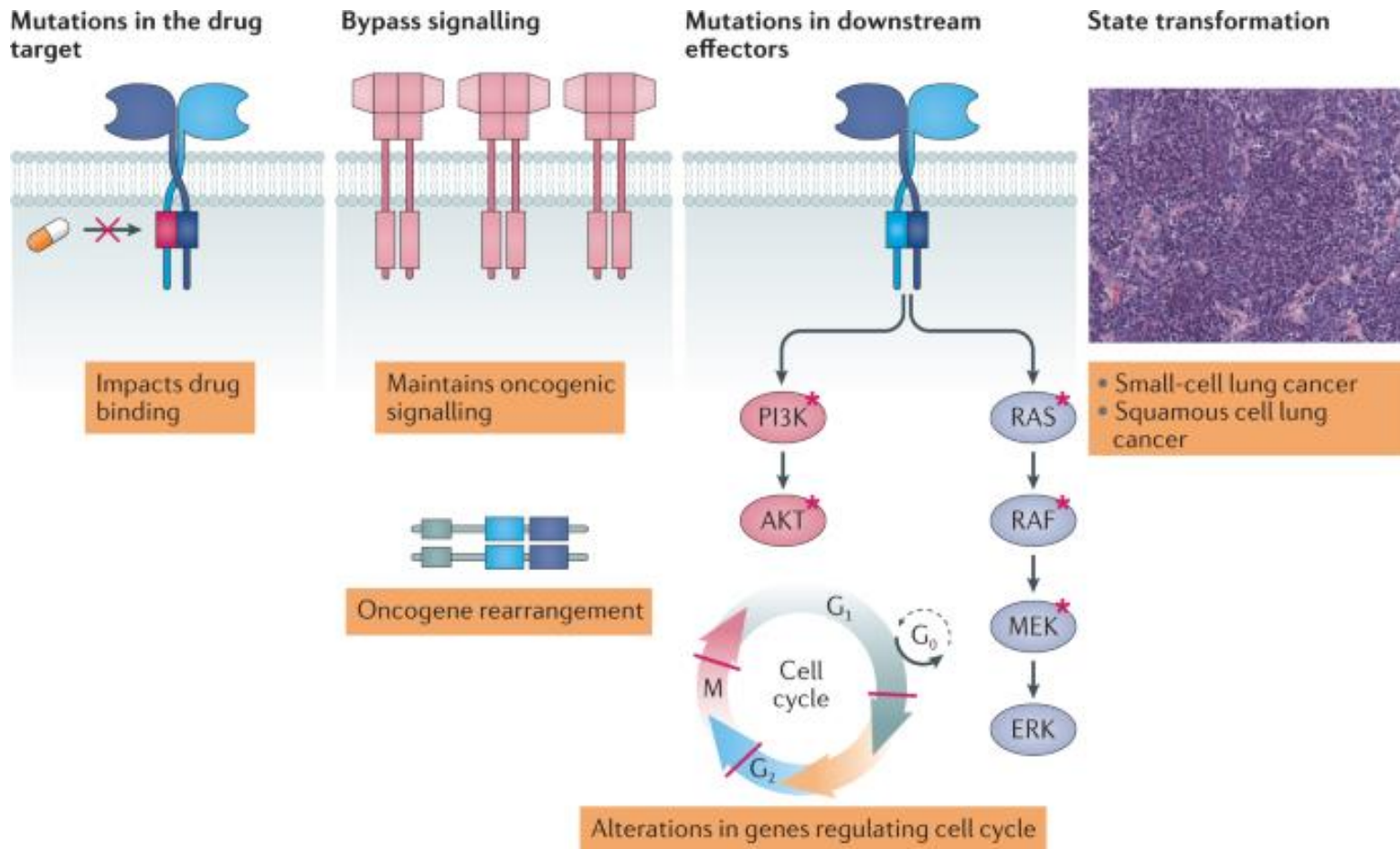


Η αντοχή μπορεί να οφείλεται και σε ποικιλία μηχανισμών, όπως:

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

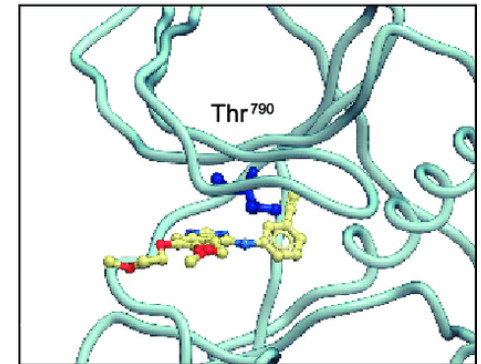
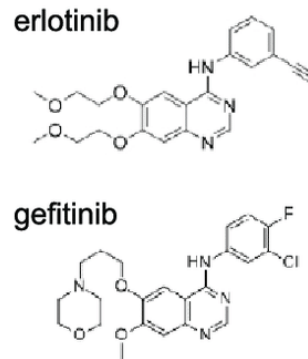
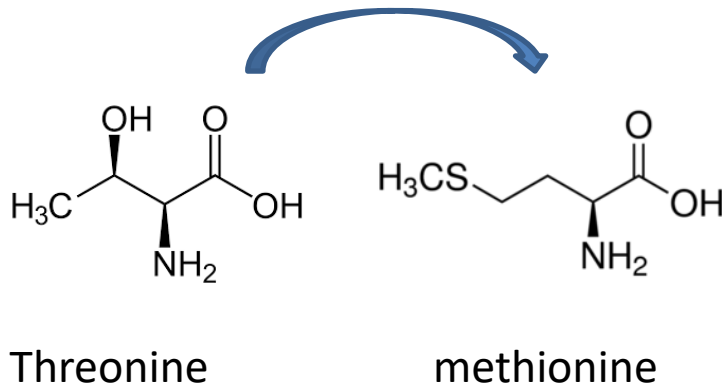


3) Η ενίσχυση εναλλακτικών μονοπατιών ή των επόμενων βημάτων της σηματοδότησης μέσω της επαγωγής μεταλλάξεων, μπορεί να οδηγήσει στην επαναφορά της λειτουργίας της οδού, παρά την αποτελεσματική διακοπή ενός βήματος.

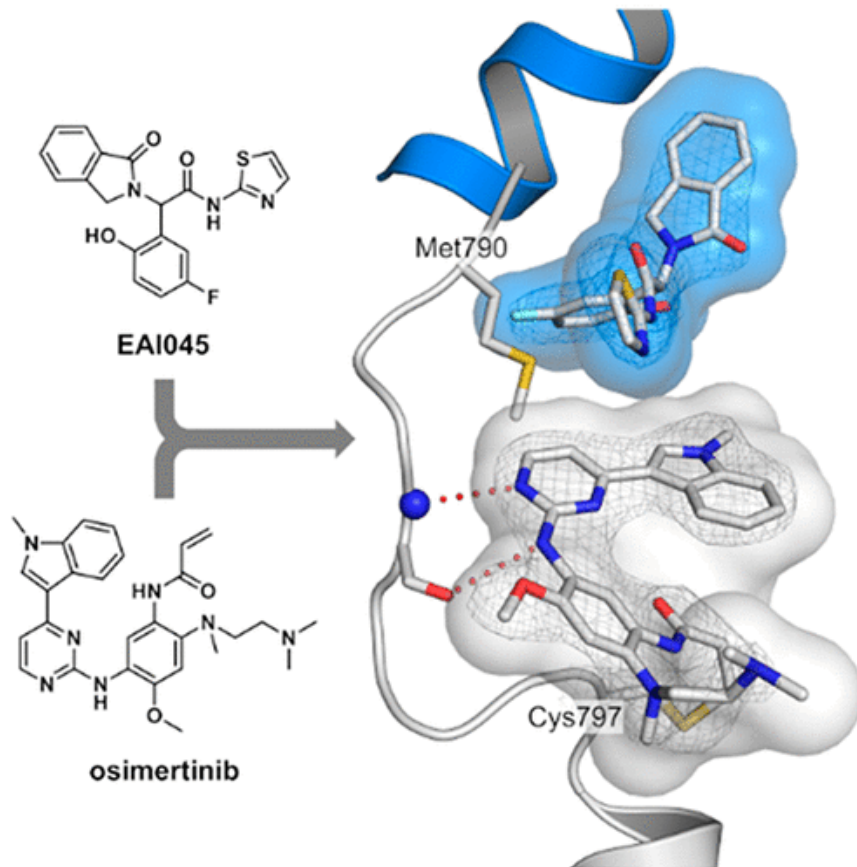
Ανάπτυξη αντοχής προς τους αναστολείς κινασών

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
- Παρεμπόδιση ή και απώλεια της ομάδας του ενεργού κέντρου, που σχηματίζει ομοιοπολικό δεσμό με τον αναστολέα (για τους μη αντιστρεπτούς αναστολείς)



Η πιο συνηθισμένη μετάλλαξη που οδηγεί σε ανάπτυξη αντοχής αφορά αντικατάσταση του αμινοξέος-θυρωρού, που ελέγχει τη πρόσβαση στην υδρόφοβη κοιλότητα πρόσδεσης του ATP. Τα λιπόφιλα αμινοξέα που συχνά απαντώνται ως θυρωροί κατευθυνόμενα προς το εσωτερικό του ενεργού κέντρου, δεν διαθέτουν ιονιζόμενες ομάδες και προσδιορίζονται κυρίως από τον όγκο τους.



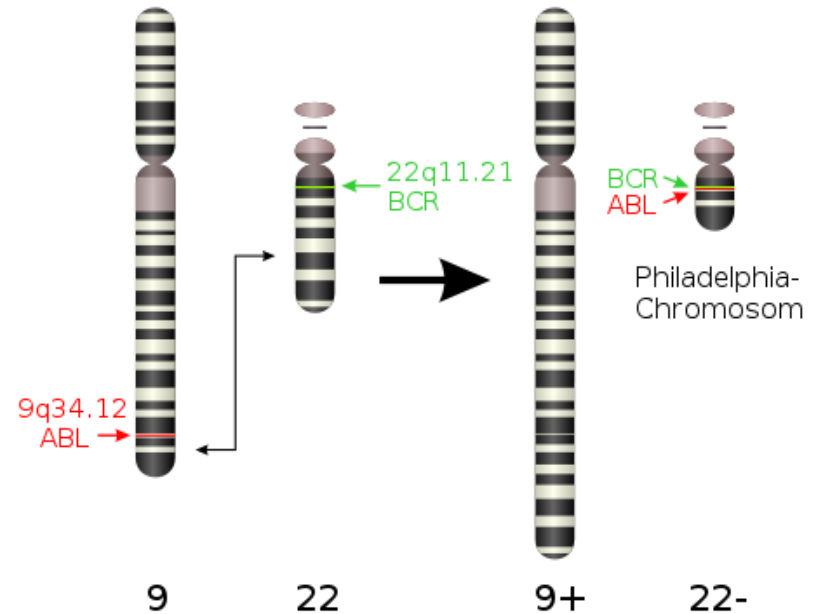
Για να αντιμετωπιστεί η αντοχή, αναπτύσσονται **αναστολείς επόμενης γενιάς**, οι οποίοι μπορεί να:

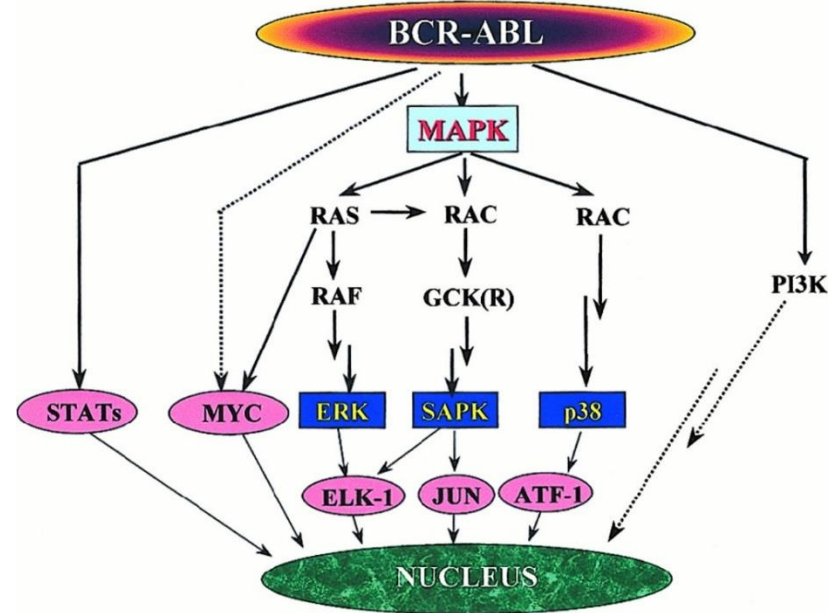
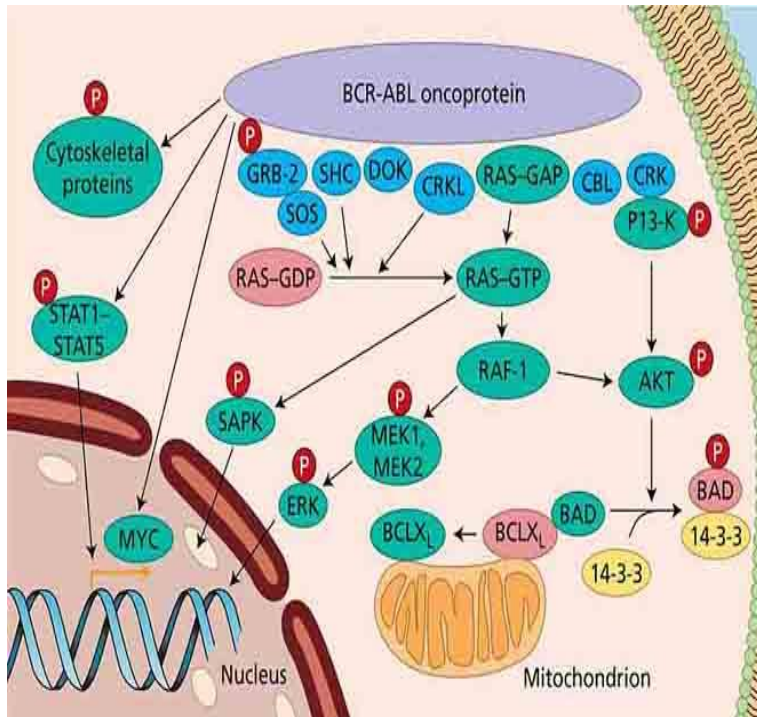
- ❖ Υπερβαίνουν την μετάλλαξη του αμινοξέος «θυρωρού»
- ❖ Συνδέονται ομοιοπολικά στην ATP περιοχή
- ❖ Συνδέονται εκτός της ATP περιοχής (αλλοστερικοί αναστολείς)
- ❖ Στοχεύουν πολλές κινάσες (multitargeting) σε ένα ή περισσότερα σηματοδοτικά μονοπάτια

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.

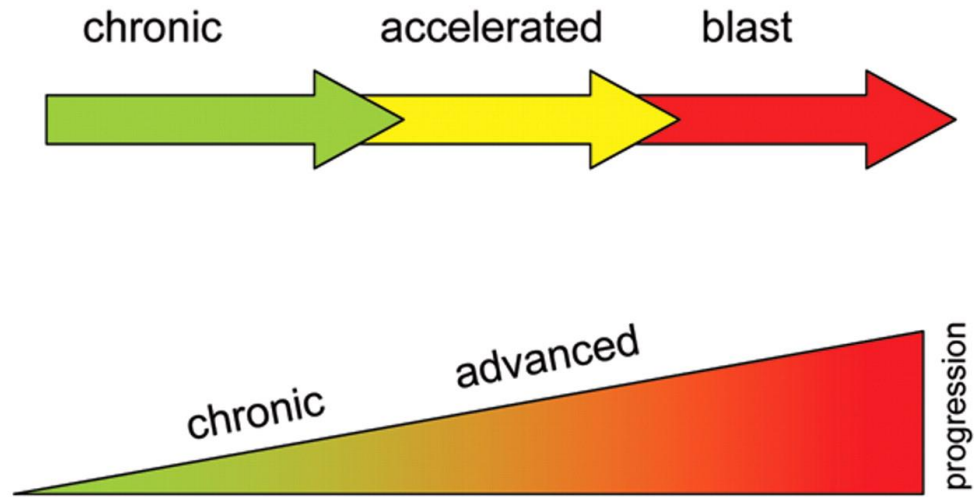
Το γονίδιο Abl (χρωμόσωμα 9) κωδικοποιεί την κινάση τυροσίνης Abl (Abelson). Συντήκεται με το γονίδιο Bcr (breakpoint cluster region protein, του χρωμοσώματος 22) και παράγει την χιμαιρική πρωτεΐνη Bcr-Abl που δρα ως μονίμως ενεργοποιημένη κινάση τυροσίνης, αφού έχει απωλέσει την ρυθμιστική της ιδιότητα.





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)

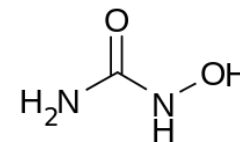
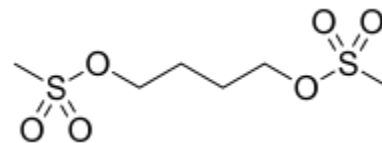
Busulfan (1953)

Hydroxyurea (1964)

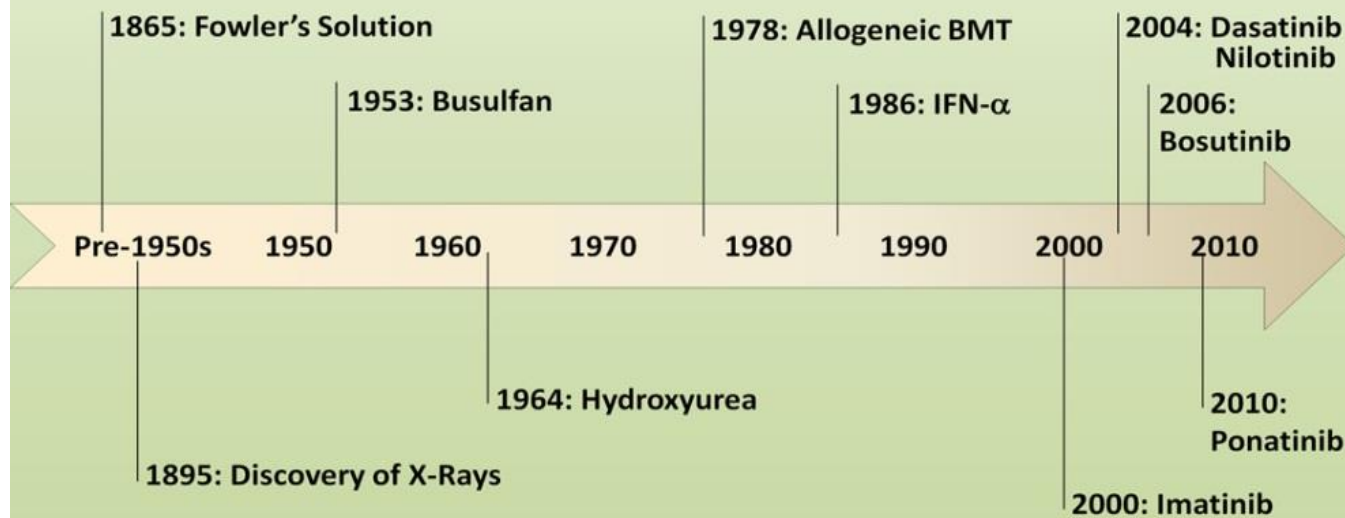
IFN- α (1986)

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)

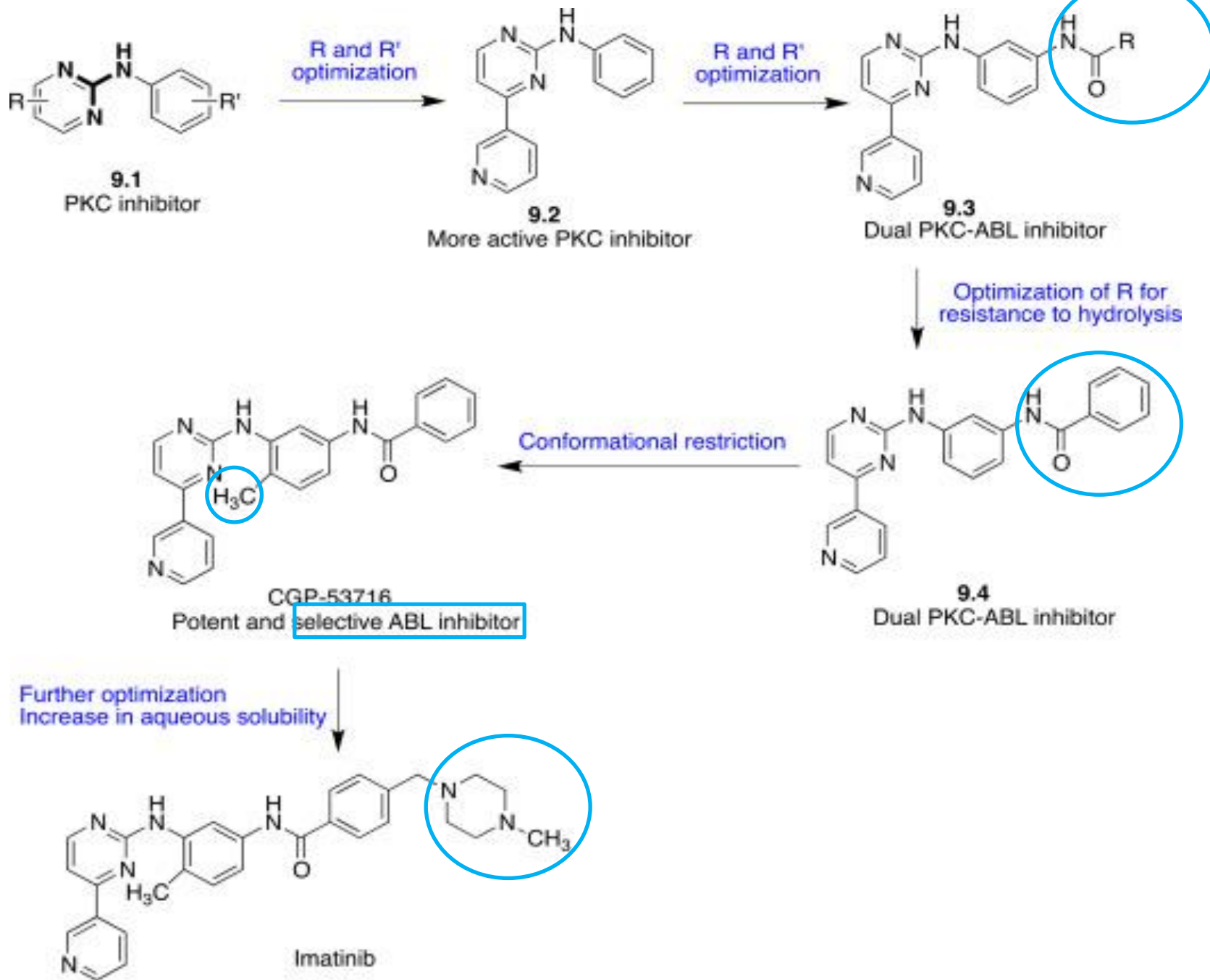
Η ανταπόκριση των ασθενών φθάνει στο 85% αν χορηγηθεί στη χρόνια φάση.

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

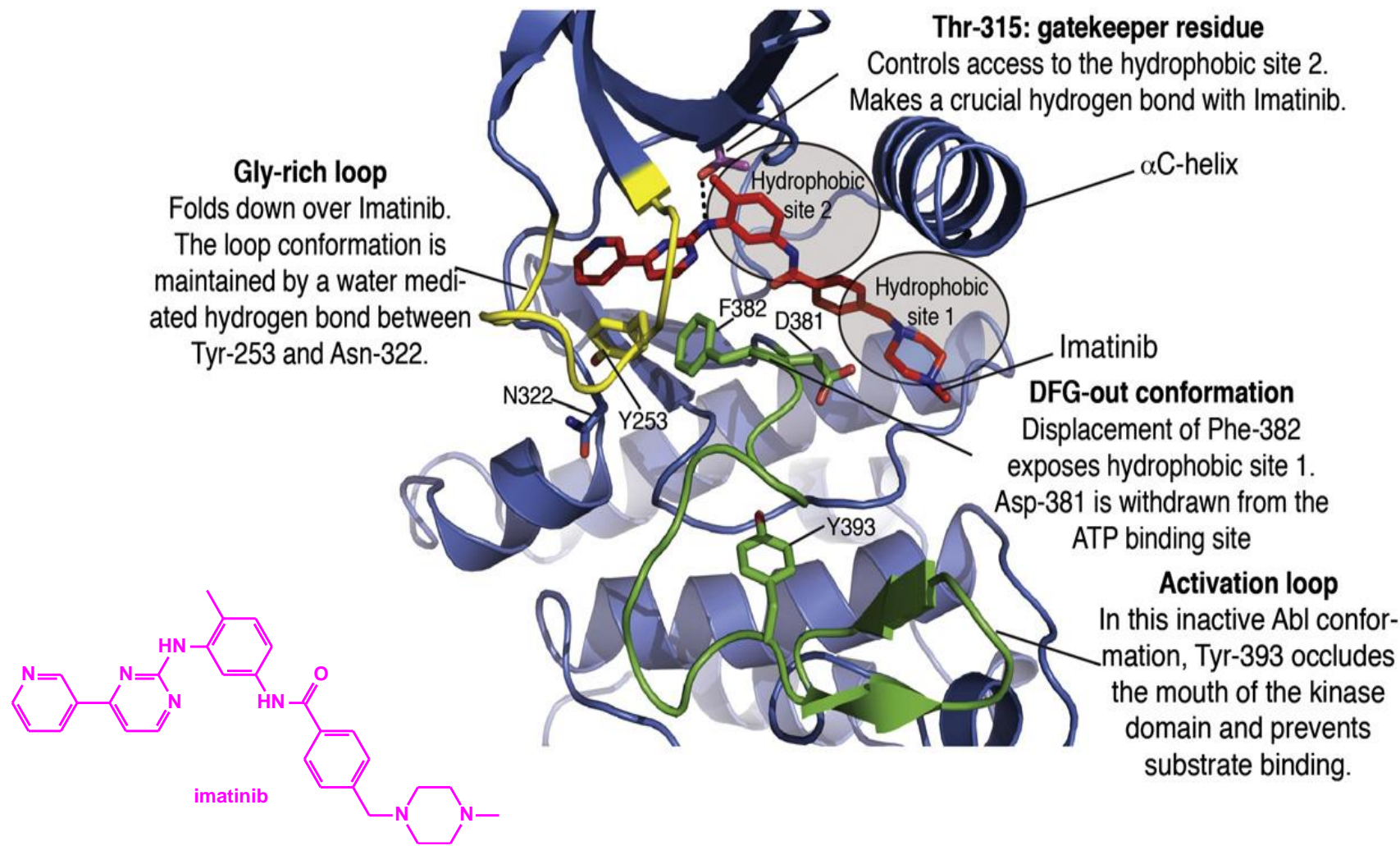
Αύξηση του εμπορικού ενδιαφέροντος. Παρά τα χαμηλά ποσοστά εμφάνισης της ασθένειας, τουλάχιστον 100.000 ασθενείς εξαρτούν την επιβίωση τους από τη λήψη του φαρμάκου.

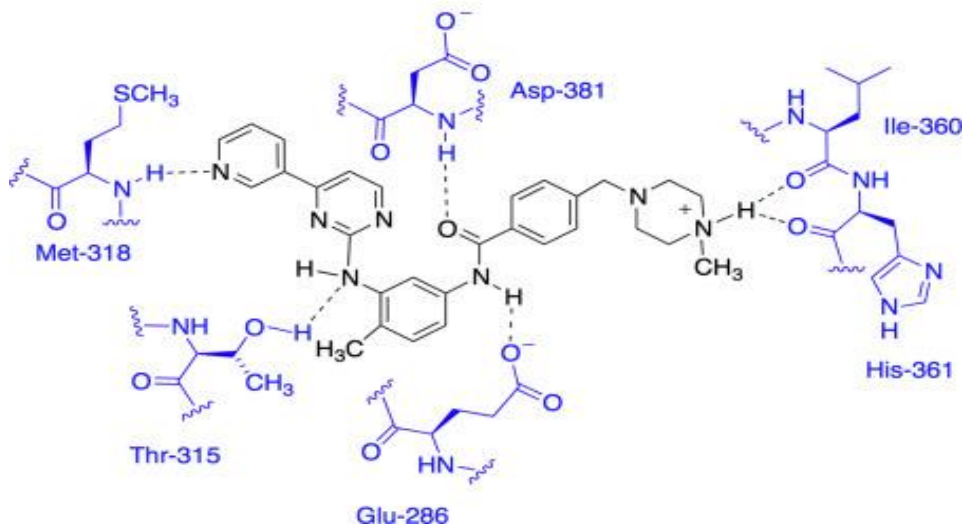
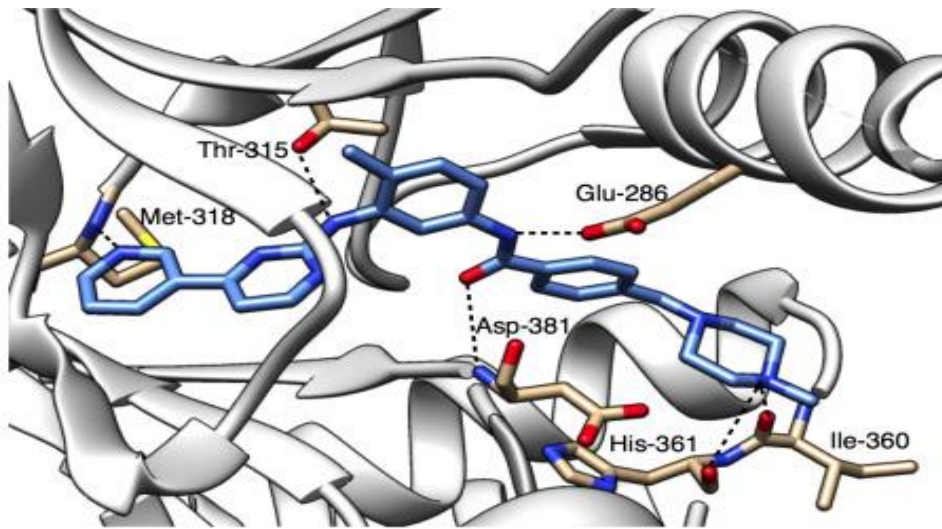
Κατά παράδοξο τρόπο η καινοτόμα αυτή αντικαρκινική θεραπεία αύξησε το ποσοστό των ασθενών, αφού δεν οδηγεί σε πλήρη θεραπεία.





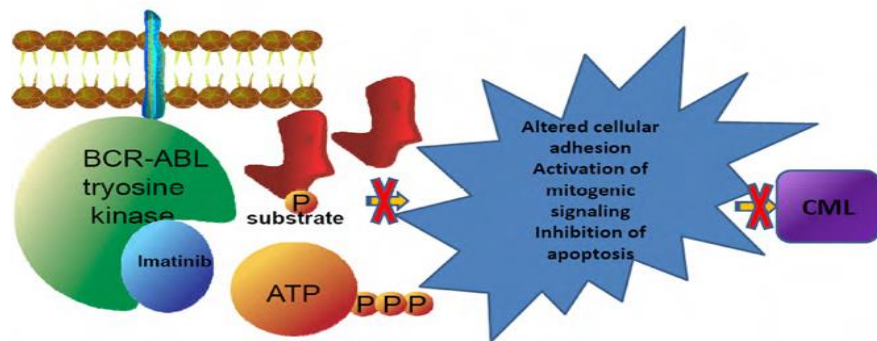
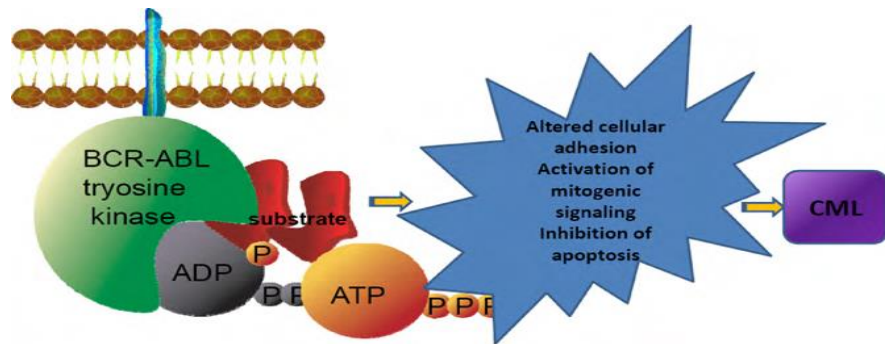
Παρόλο που η **CML** παρουσιάζει απλούστερη παθογένεση από άλλες μορφές καρκίνου και προσφέρει σαφή φαρμακευτικό στόχο, **η ανακάλυψη του imatinib αποτελεί καλό παράδειγμα, σχετικά με τη σημασία που έχει η γνώση του βιολογικού υπόβαθρου, για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων**





Το DFG μοτίβο της κινάσης αποτελείται από τα **Asp381-Phe382-Gly383**. Το φάρμακο συνδέεται με **6 συνολικά 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 δρα ως δότης σε δΗ με την **Thr315** (αμινοξύ-θυρωρός). Η πρωτονιωμένη 4-μεθυλοπιπεριδινική ομάδα συνδέεται με τα backbone καρβονύλια των **Ile360** και **His361**.

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



Το imatinib προσδέεται στο ενεργό κέντρο της Bcr-Abl κινάσης, ανταγωνιζόμενο το ATP και αναστέλλει τη δράση της σταθεροποιώντας την ανενεργή μορφή του ενζύμου.



Δυστυχώς, το 35% των ασθενών θα εμφανίσουν αντοχή στο φάρμακο: Θα χρειασθεί η ανάπτυξη νέων αναστολέων της μεταλλαγμένης Bcr-Abl κινάσης

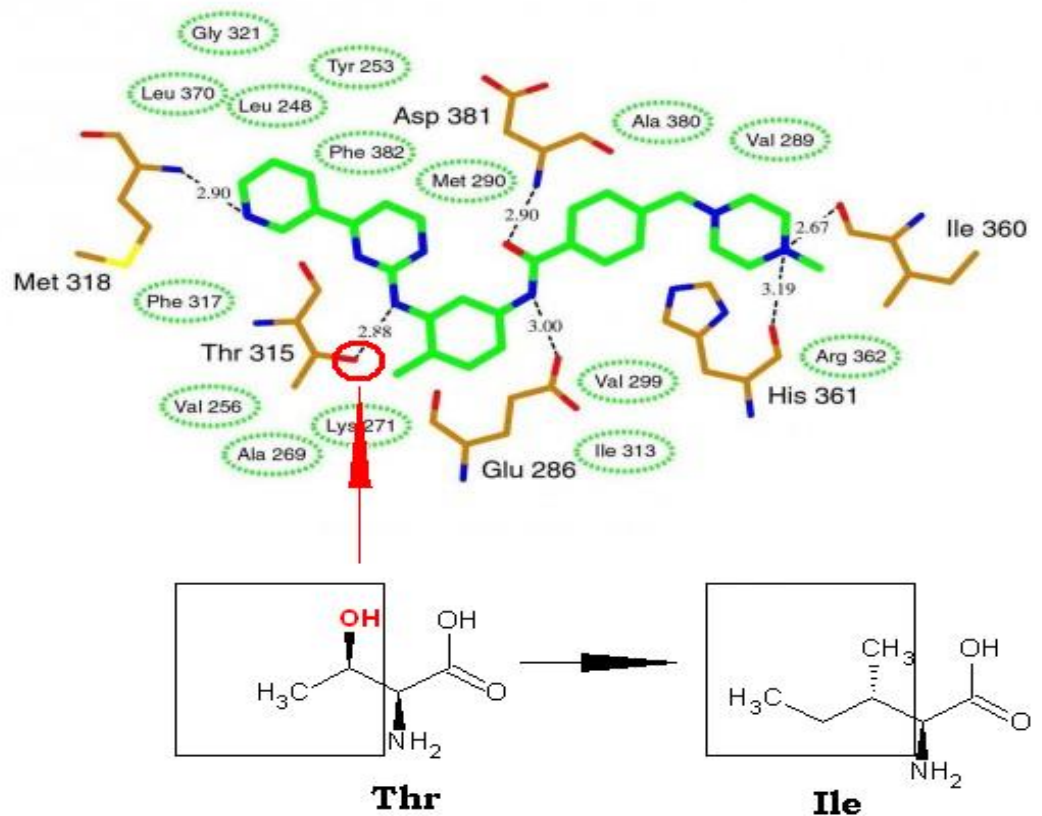
First-in-class versus next generation inhibitors

Στόχος: καλύτερα ανεκτοί και πιο αποτελεσματικοί αναστολείς - αντιμετώπιση 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).

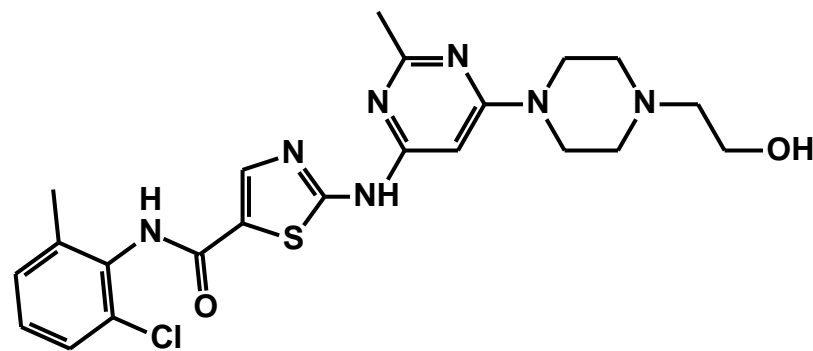
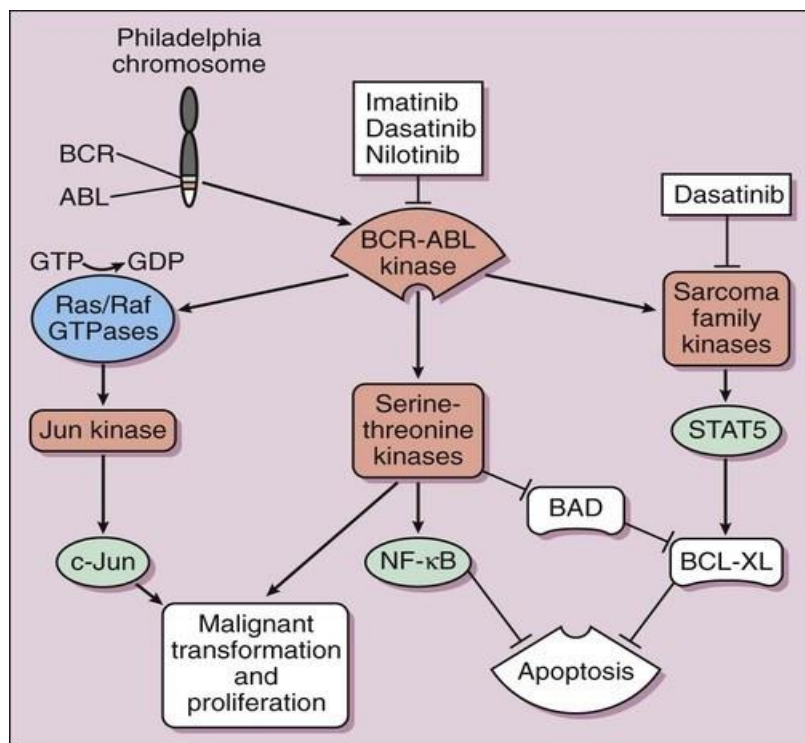
Η ΕΙΣΟΔΟΣ ΤΟΥ ΑΤΡ ΔΕΝ ΕΜΠΟΔΙΖΕΤΑΙ
Αντίθετα, εμποδίζεται η είσοδος του αναστολέα, ενώ η απώλεια ενός σημαντικού δH (-OH της θρεονίνης με αμινοπυριμιδίνη) εξασθενεί την αλληλεπίδραση.



Φάρμακα 2^{ης} γενιάς - αναστολείς 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 της Bcr-Abl και της Src κινάσης
Δρα ως μεικτός αναστολέας (τύπου I και τύπου II)
325 φορές ισχυρότερο του imatinib έναντι της Bcr-Abl
Αναστέλλει 32/33 μεταλλαγμένες μορφές του ενζύμου



Dasatinib

Sprycel (Bristol-Myers Squibb)

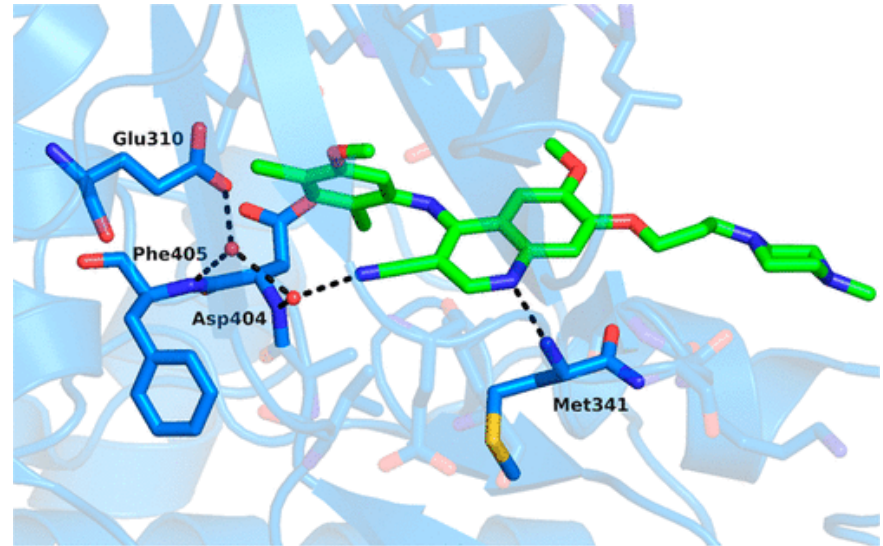
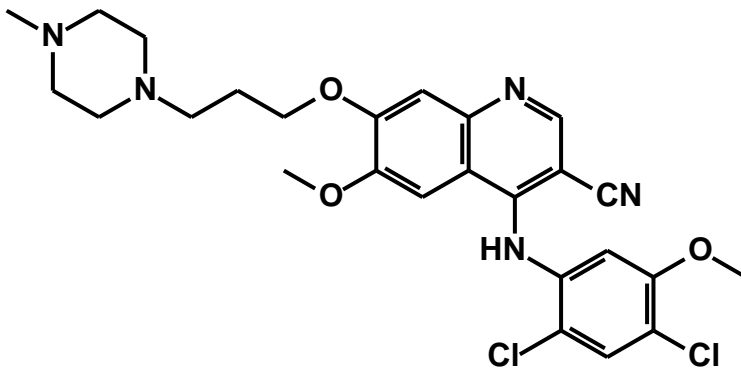
Έτος έγκρισης 2006

Η υψηλή εκλεκτικότητα δεν είναι απαραίτητη

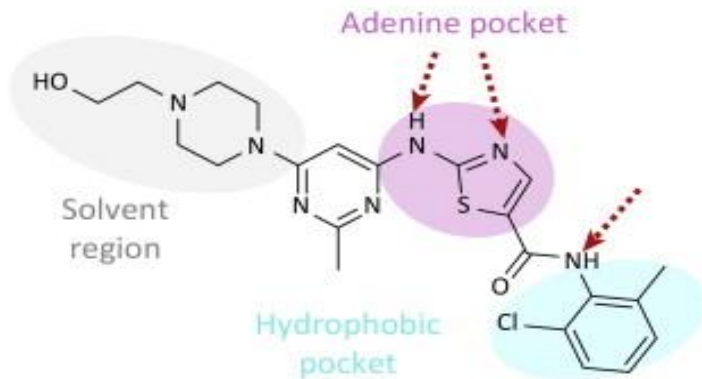
Το **Bosutinib** (Bosulif, Pfizer) έλαβε αρχικά έγκριση για την αντιμετώπιση περιστατικών CML που ανέπτυξαν ανοχή στο Imatinib – σήμερα αποτελεί θεραπεία πρώτης γραμμής.

Διπλός αναστολέας τύπου I Bcr-Abl και Src κινάσης .

Δεν αντιμετωπίζει την μετάλλαξη T315I, αλλά είναι γενικά **πολύ καλά ανεκτό** από τους ασθενείς = **αύξηση του χρόνου επιβίωσης**

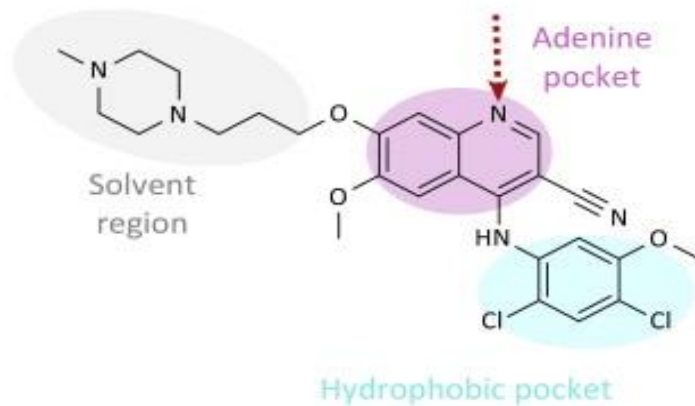


(A)



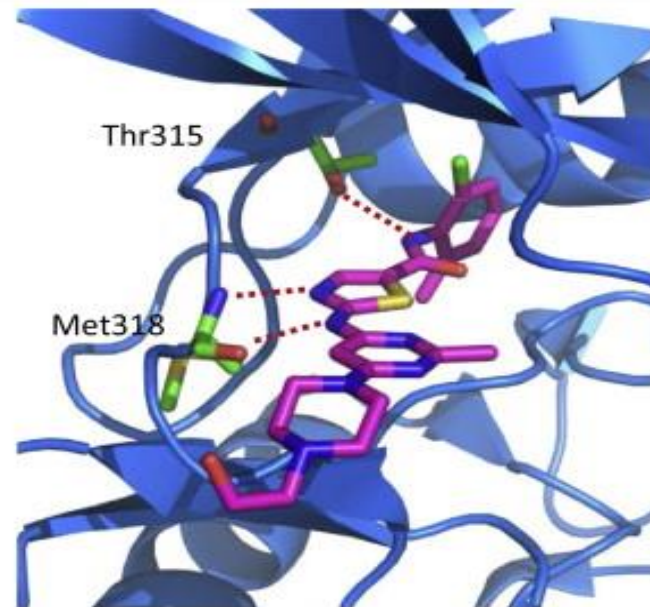
Dasatinib

(C)

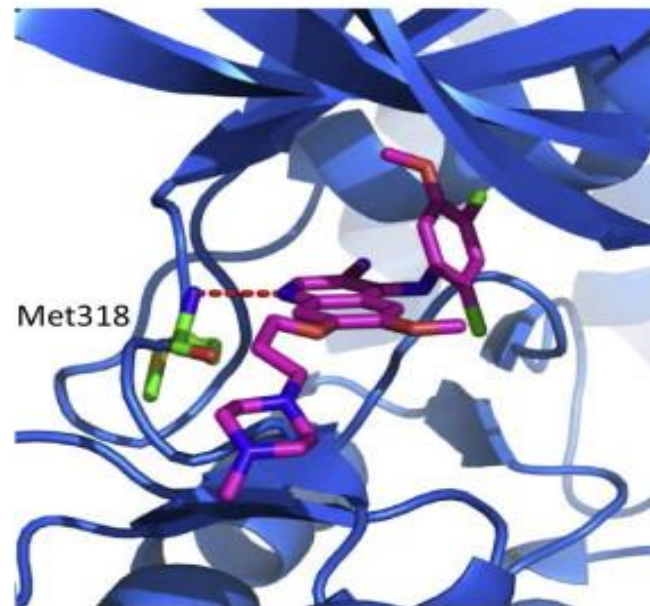


Bosutinib

(B)



(D)



TRENDS in Pharmacological Sciences

Αναστολείς τύπου I

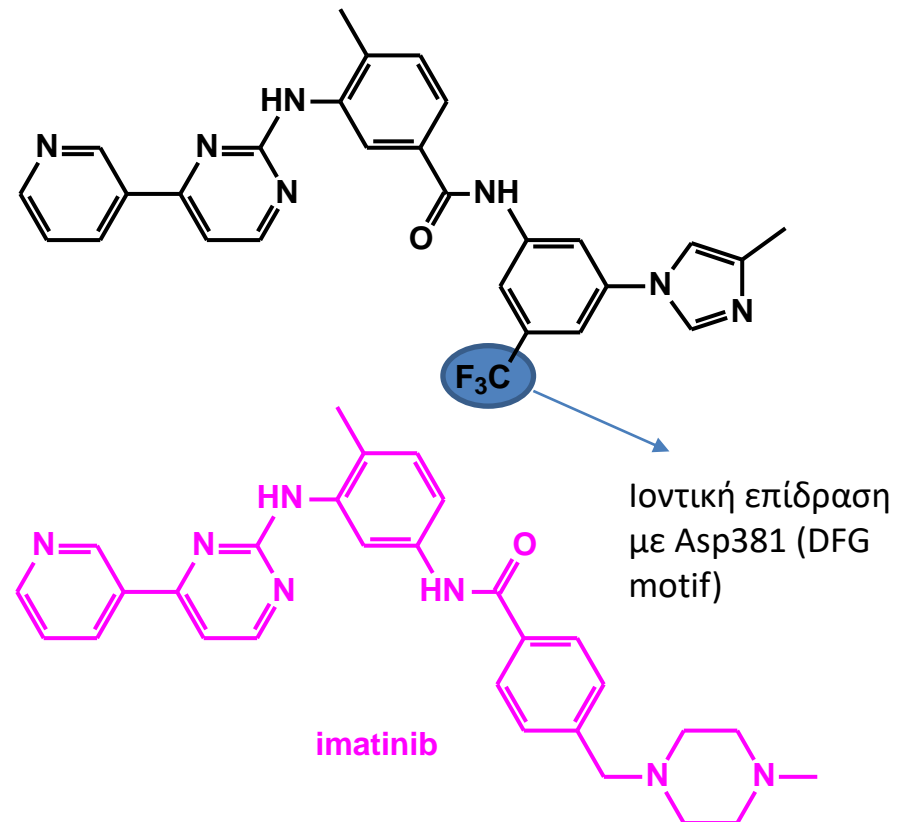
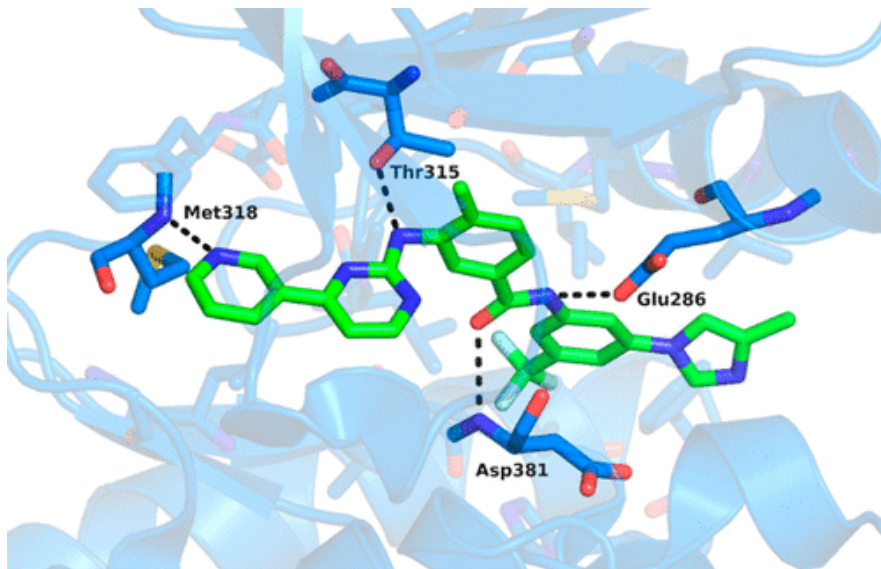
Αναστολείς 2^{ης} γενιάς τύπου II

Nilotinib: αντικατάσταση μεθυλοπιπεραζινικού υποκαταστάτη και αντιστροφή του αμιδικού δεσμού του **imatinib**. Ο δεσμός ιοντικού τύπου που αναπτύσσει η τριφθορομεθυλομάδα με το Asp του μοτίβου DFG ενισχύει σημαντικά τη σύνδεση. Το 4-μεθυλιμιδαζόλιο εισχωρεί βαθιά και συνδέεται ισχυρά στη δευτερεύουσα κοιλότητα. **10-30 φορές ισχυρότερη αναστολή** από το imatinib.

Δραστικό έναντι μεταλλαγμένων μορφών του ενζύμου, **όχι του T315I** - Δεν αναγνωρίζεται από τον OTC1 λόγω χαμηλότερης βασικότητας του μεθυλιμιδαζόλιου, έναντι της μεθυλοπιπεραζίνης. Δεν αναγνωρίζεται από την Ρ-γλυκοπρωτεΐνη. **Διαπερατότητα στο ΚΝΣ.**

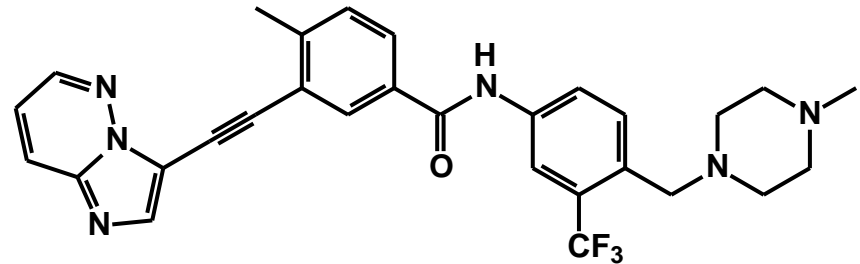
Nilotinib

Tasigna (Novartis)



Φάρμακα 3^{ης} γενιάς

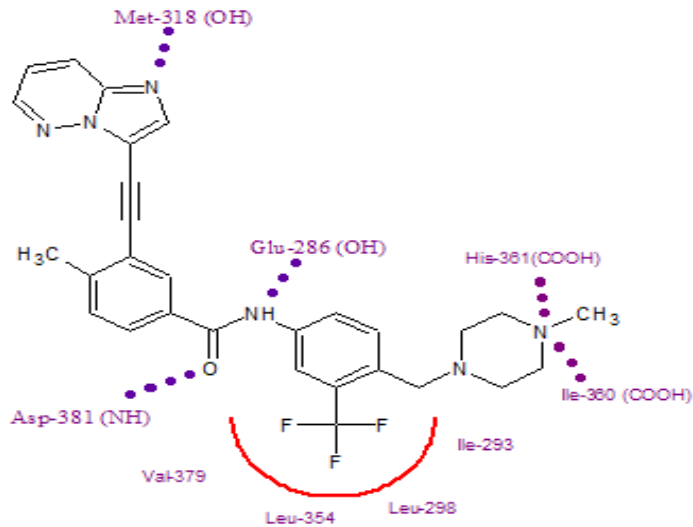
Το **Ponatinib** είναι επίσης αναστολέας τύπου II. Αναστέλλει την μη μεταλλαγμένη (wild type, wt) και πολλές μεταλλαγμένες μορφές του ενζύμου, ακόμη και την Bcr-Abl **T315I**. Έλαβε έγκριση (FDA) **με επείγουσες διαδικασίες** για ασθενείς με τη συγκεκριμένη μετάλλαξη. Παρενέργειες από το καρδιαγγειακό (θρομβώσεις).



Ponatinib

Iclusig (Ariad Pharmaceuticals)

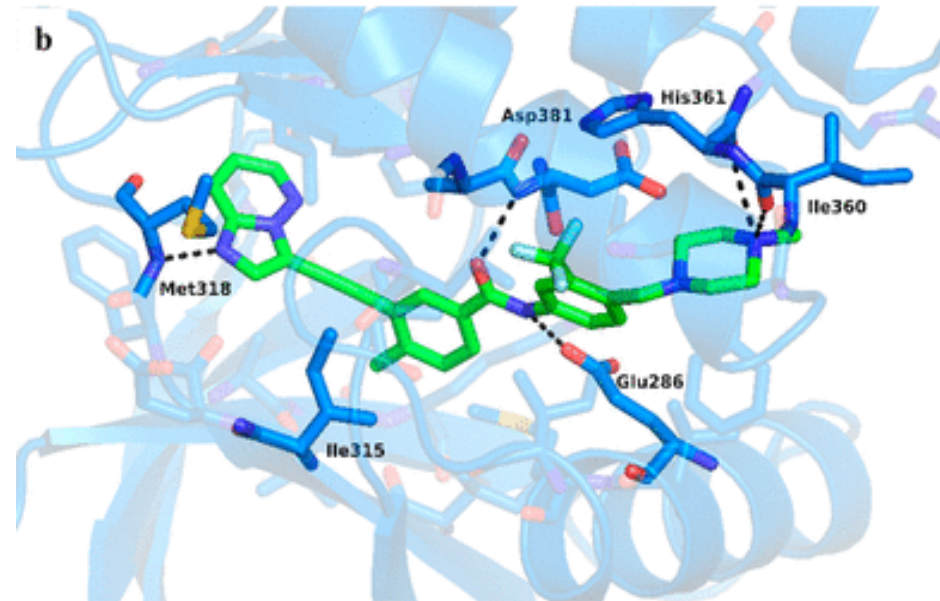
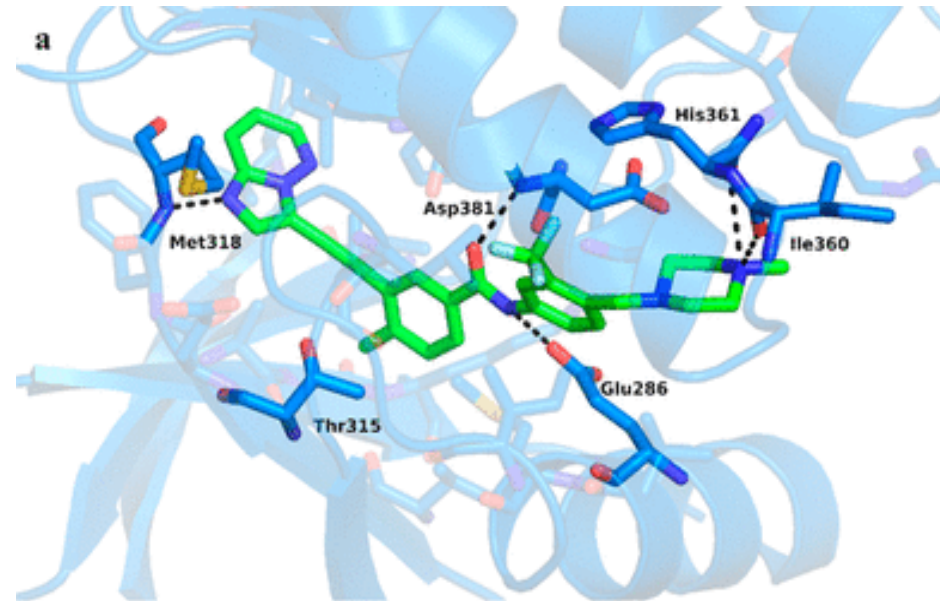
Έντονος προβληματισμός σχετικά με το κόστος της θεραπείας
\$138,000 / έτος

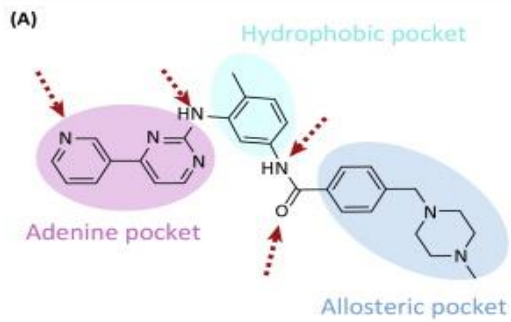


Η άκαμπτη αιθινυλομάδα λειτουργεί ως ενδιάμεσο (linker):

επιτρέπει την διείσδυση του ιμιδαζοπυριδαζινικού τμήματος στην καταλυτική περιοχή, όπου το ιμιδαζολικό άζωτο αναπτύσσει ισχυρό δεσμό με την Met318 της ευκίνητης περιοχής.

εντροπικό κέρδος: η μείωση της στερεοχημικής παρεμπόδισης ευνοεί τη διευθέτηση που επιτρέπει αλληλεπίδραση είτε με την Thr315, είτε με την Ile315, με αποτέλεσμα να αναστέλλει τόσο το wt, όσο και το μεταλλαγμένο ένζυμο.





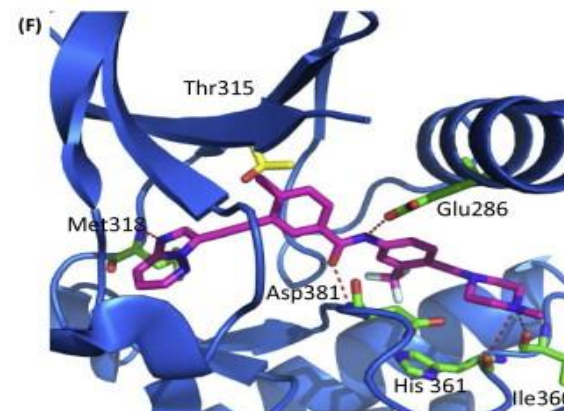
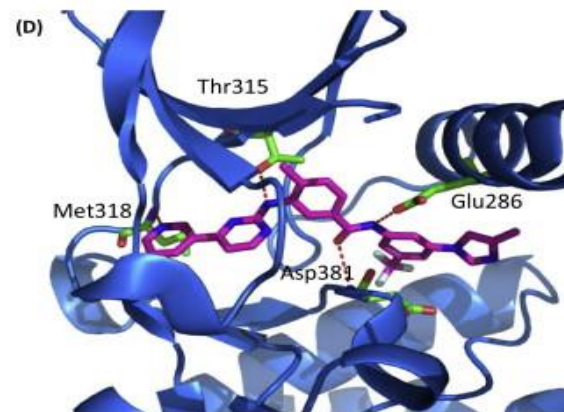
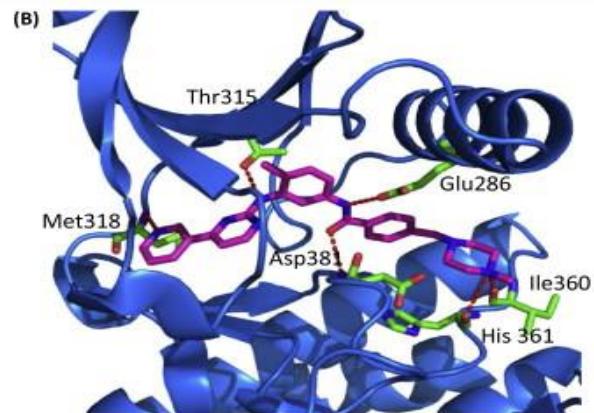
Imatinib



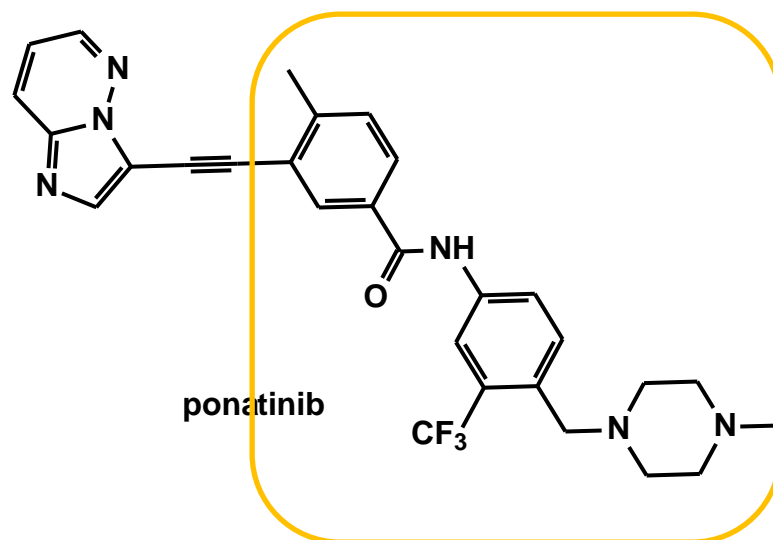
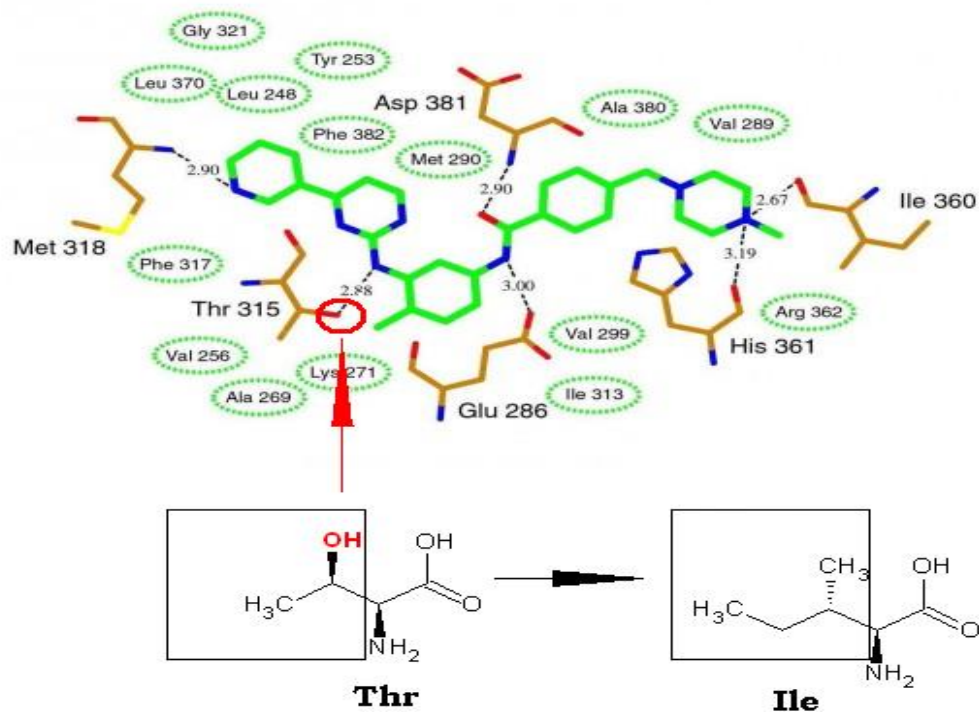
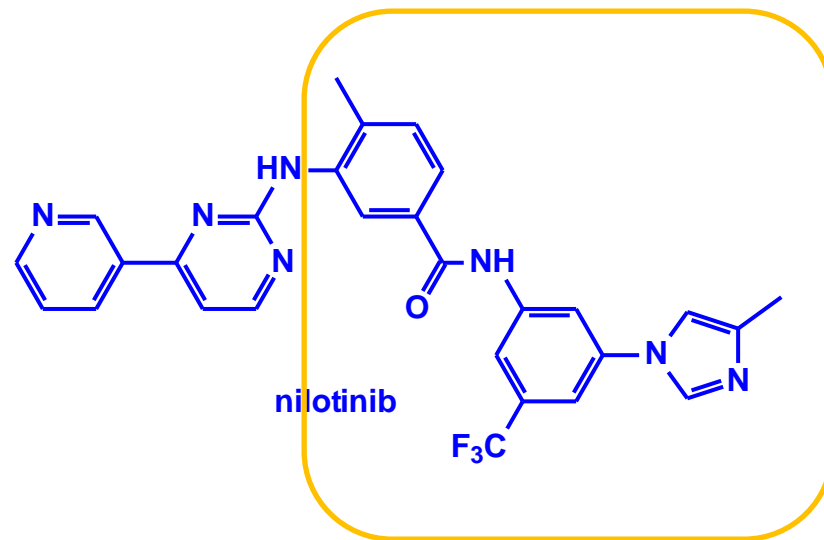
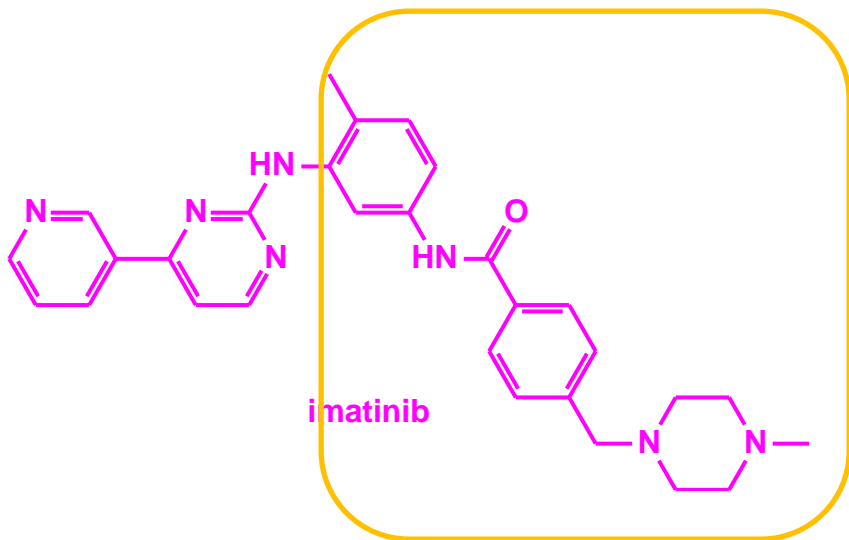
Nilotinib



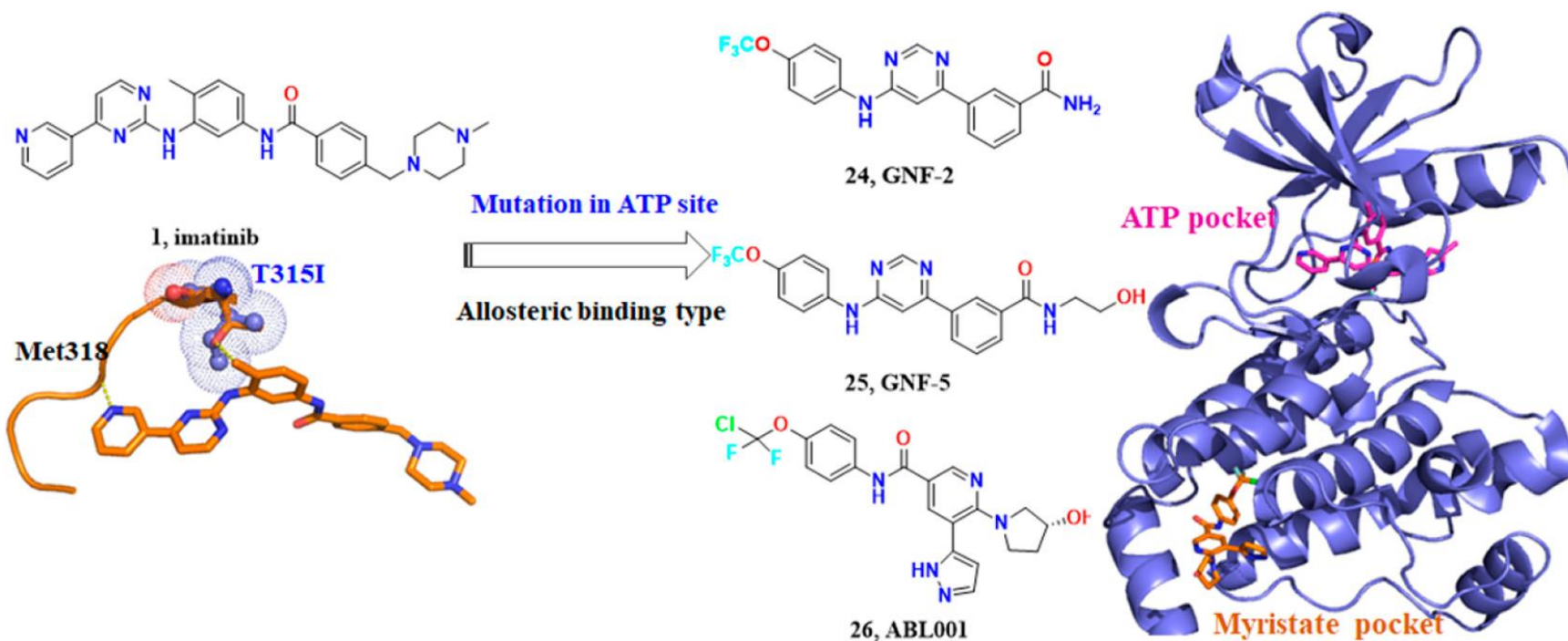
Ponatinib



TRENDS in Pharmacological Sciences

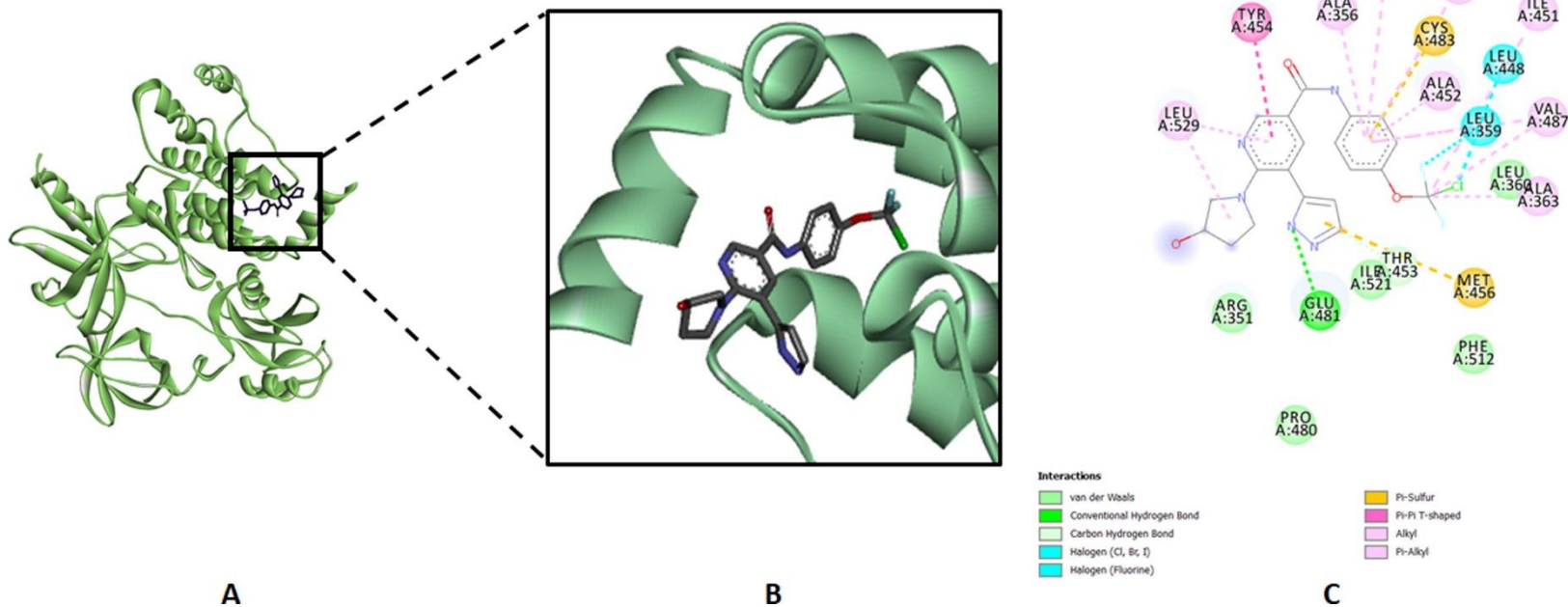


Ανάπτυξη αλλοστερικών αναστολέων τύπου IV



Το **asciminib (ABL001)** συνδέεται στην **μυριστοϋλική κοιλότητα** (Abl myristoyl pocket), μια αυτορυθμιστική περιοχή της κινάσης και **μειώνει την ευκινησία της, ευνοώντας τη λήψη της ανενεργής διαμόρφωσης (αναστολέας τύπου IV)**. Αναστέλλει ισχυρά πολλές μεταλλαγμένες Bcr-Abl κινάσες και την **T315I**. Δεν είναι ATP-competitive αλλά **παρουσιάζει συνέργεια με τους ATP-competitive αναστολείς**.

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



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

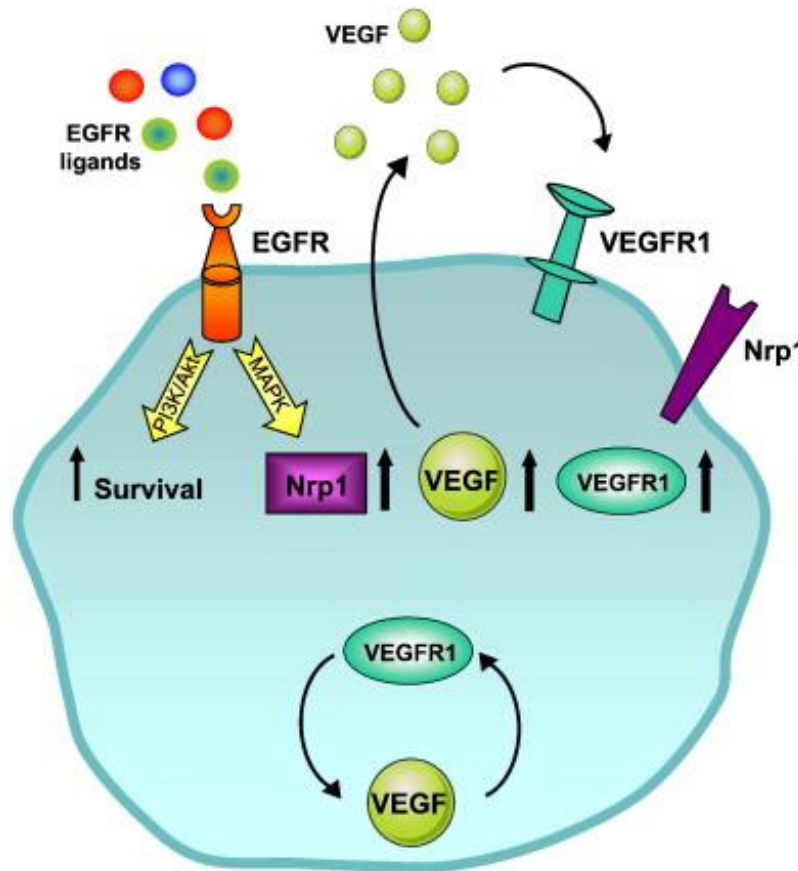
Η μυριστοϋλίωση αποτελεί μετα-μεταφραστική τροποποίηση ενός μικρού ποσοστού (0.5–0.8%) πρωτεϊνών του ευκαρυωτικού κυττάρου. Αυξάνει τη συνάφεια τους με τη κυτταρική μεμβράνη και πυροδοτεί μηχανισμούς που σχετίζονται με μεταβολικές διεργασίες.

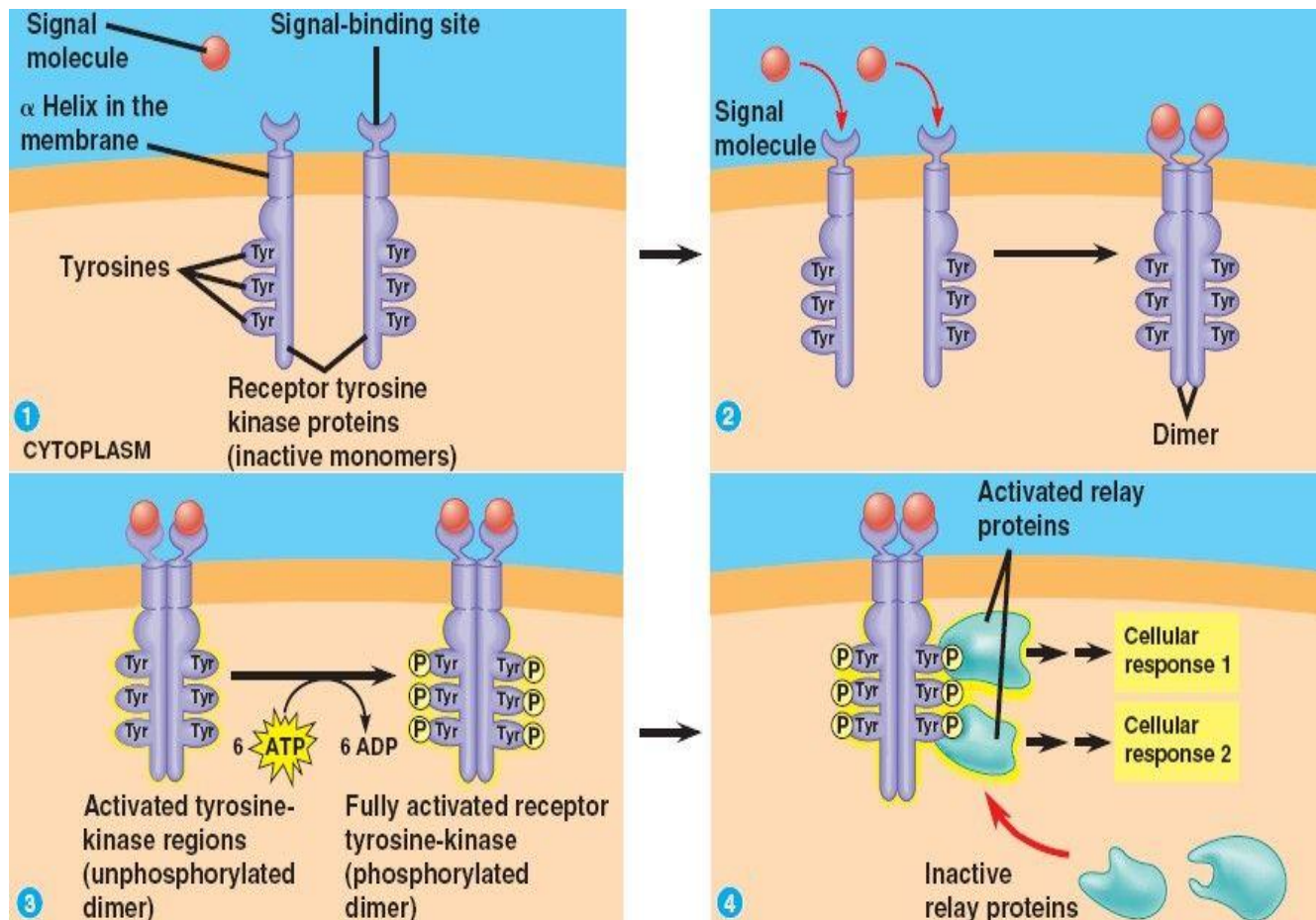
Η αντιμετώπιση της CML έγινε δυνατή μέσω της στενής συνεργασίας ερευνητών αλληλοσυμπληρούμενων θεματικών περιοχών.

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

Αναστολείς υποδοχέων αυξητικών παραγόντων

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

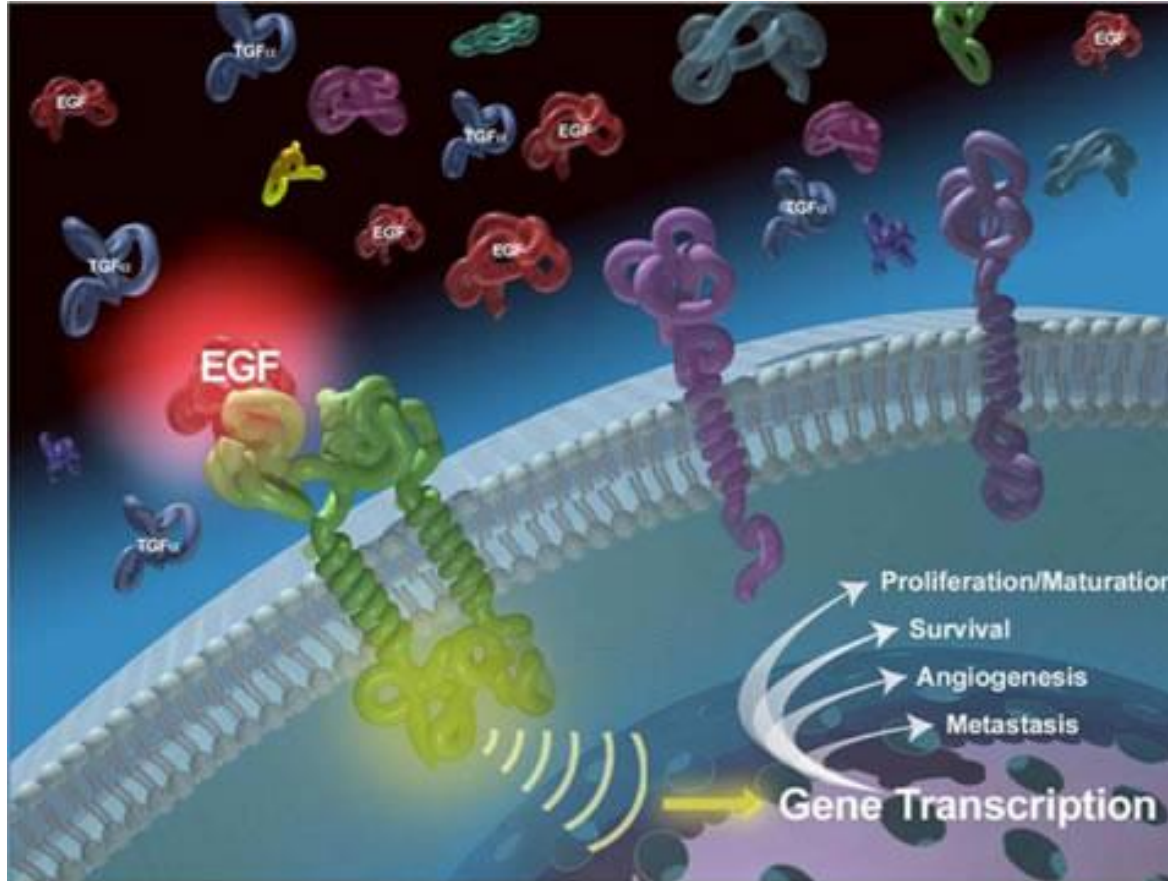




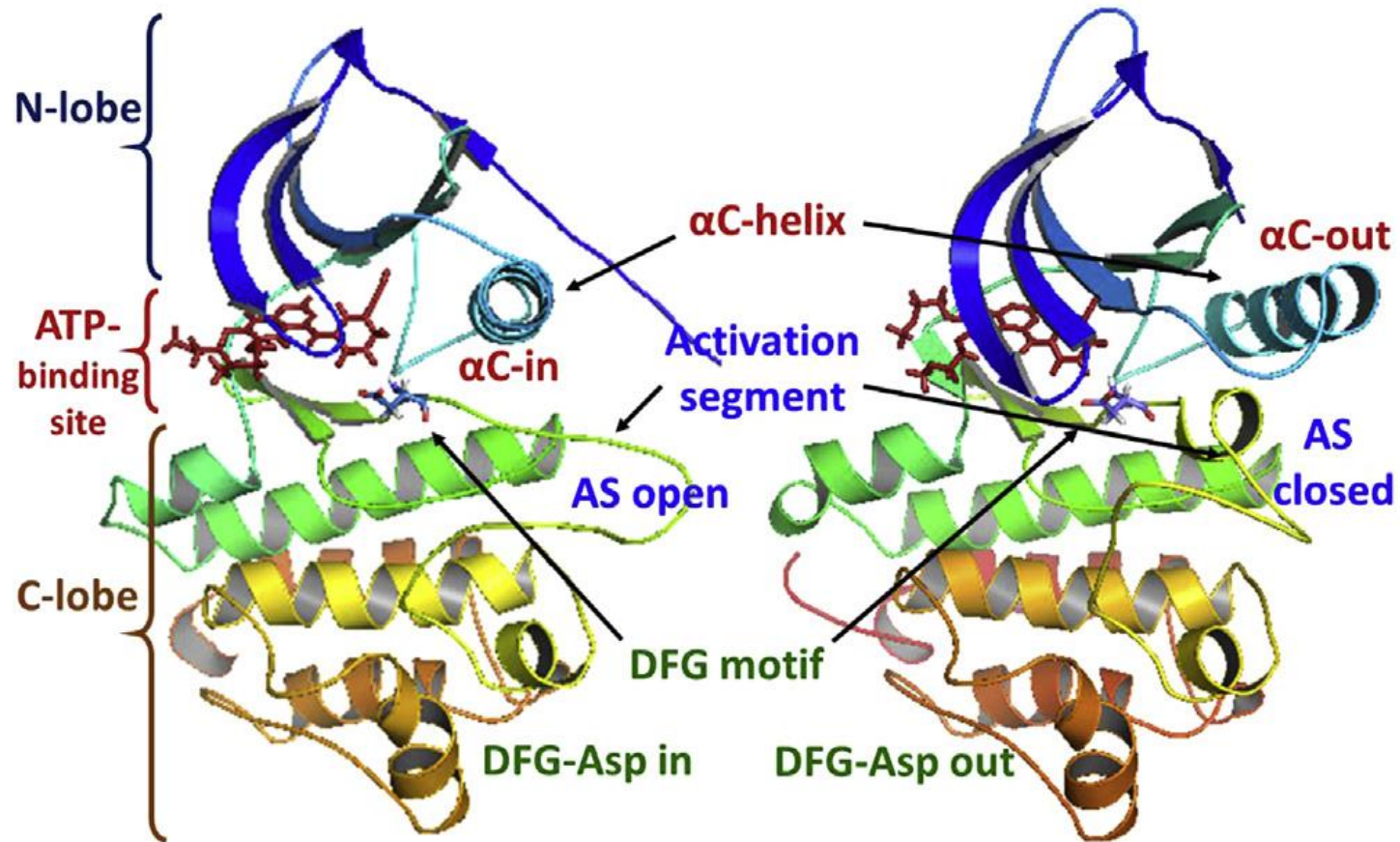
Ενδοκυτταρικά οι φωσφορυλιωμένες τυροσίνες δημιουργούν θέσεις με υψηλή βιοχημική συγγένεια προς πρωτεΐνες που περιέχουν μια συγκεκριμένη περιοχή-μοτίβο ~100 αμινοξέων (περιοχή SH2, **Src Homology domain 2**).

Υπερέκφραση παραγόντων ανάπτυξης (*growth factors*) ή γονιδιακές μεταλλάξεις => απορρύθμιση ελεγχόμενης λειτουργίας RTKs => Καρκίνος

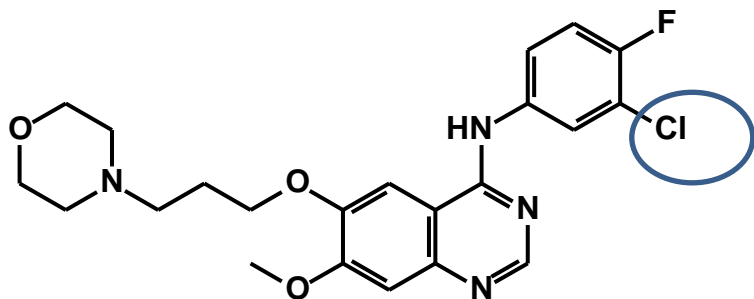
Epidermal Growth Factor (επιδερμικός αυξητικός παράγοντας)



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 στην ενεργοποίηση των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων.



Το ενδοκυτταρικό τμήμα των υποδοχέων λειτουργεί ως κλασική κινάση τυροσίνης.



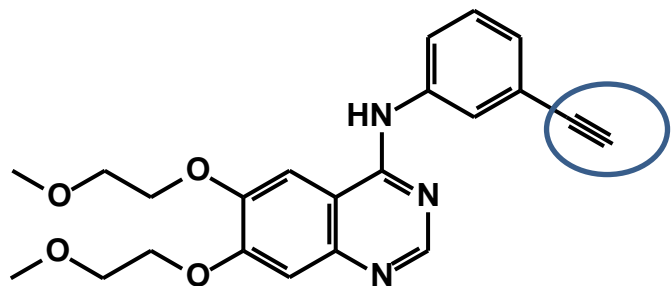
Gefitinib

Iressa (AstraZeneca)



Οι πρώτοι εγκεκριμένοι αναστολείς του EGFR είναι τύπου I. Πρόκειται για παράγωγα αμινοκιναζολίνης: gefitinib και erlotinib που φέρουν 3'-υποκαταστάτη σημαντικό για εκλεκτική αναστολή του EGFR.

Μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα (NSCLC)

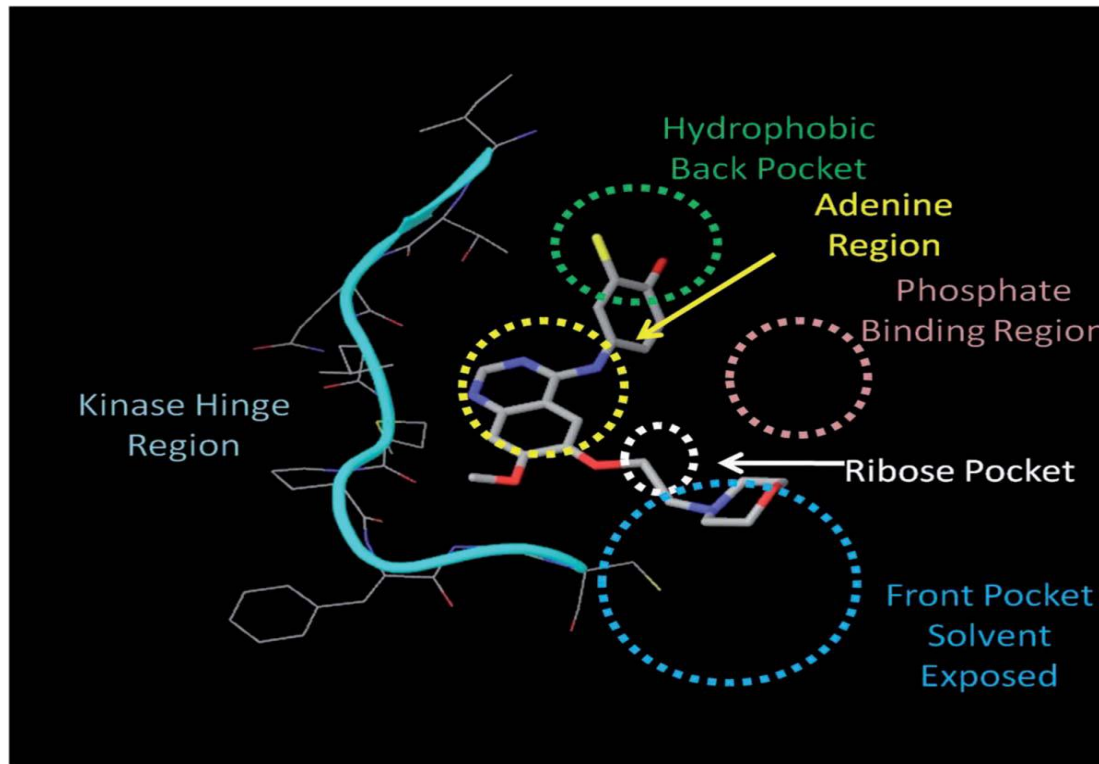


Erlotinib

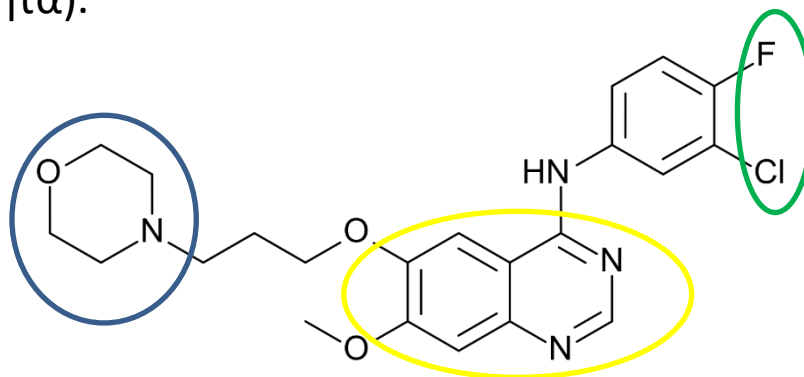
Tarceva (Genetech)

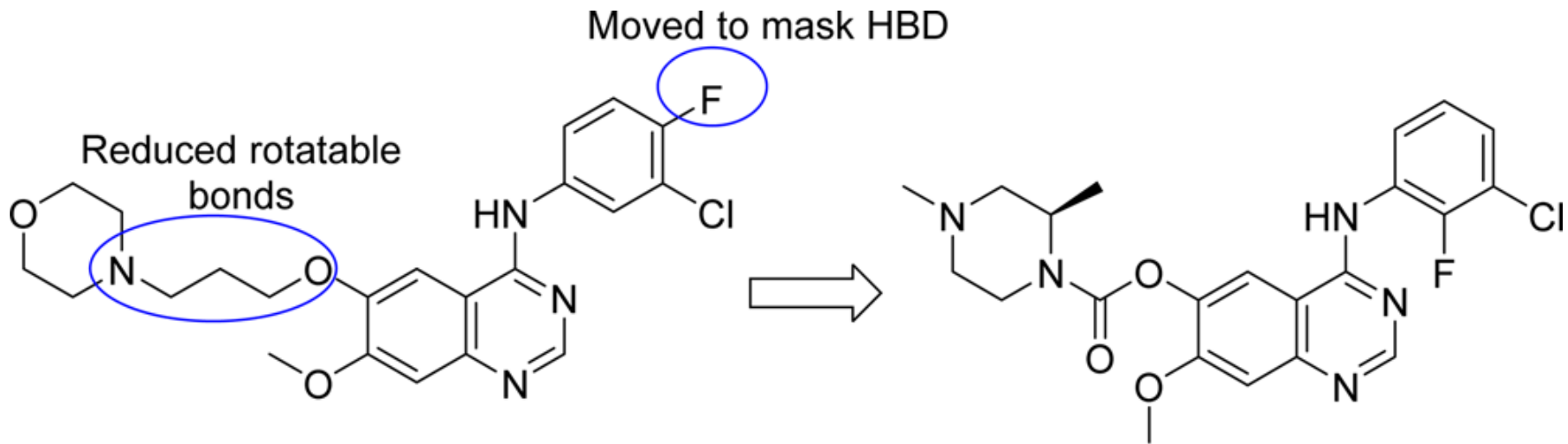


Μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα (NSCLC)
Παγκρεατικός καρκίνος (+ gemcitabine)



Η περιοχή που εκτίθεται προς τον διαλύτη επιτρέπει την εισαγωγή πολικών ομάδων, που χρησιμεύουν μεταξύ άλλων και για τη ρύθμιση των φ/χ ιδιοτήτων (λιποφιλία, υδατοδιαλυτότητα).





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

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

$$L858R \text{ pEGFR } IC_{50} = 7 \text{ nM}$$

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

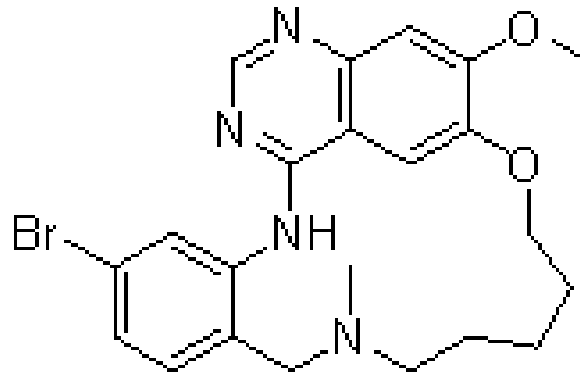
$$K_{puu,CSF} = 1.3$$

$$L858R \text{ pEGFR } IC_{50} = 7 \text{ nM}$$

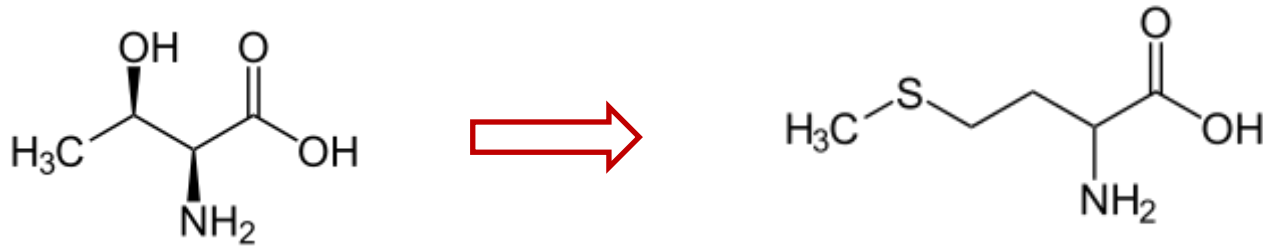
Ζητούμενο: αύξηση διαπερατότητας των αναστολέων στο ΚΝΣ

Συχνές μεταστάσεις στο ΚΝΣ (NSCLC), ενώ οι αναστολείς δεν διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

Δομική τροποποίηση 1: το 2-F του **22** σχηματίζει ενδομοριακό δH με το γειτονικό N και μειώνει τον αριθμό των ομάδων που συμμετέχουν σε διαμοριακούς δH. Η παράλληλη μείωση περιστροφής των υποκαταστατών βελτιώνει θεαματικά τη διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού.



Δομική τροποποίηση 2: η εισαγωγή κατάλληλης μακροκυκλικής δομής μπορεί να βελτιώσει τόσο την εκλεκτικότητα, όσο και τις φυσικοχημικές ιδιότητες, που καθορίζουν μεταξύ άλλων και τη διαπερατότητα στο ΚΝΣ.

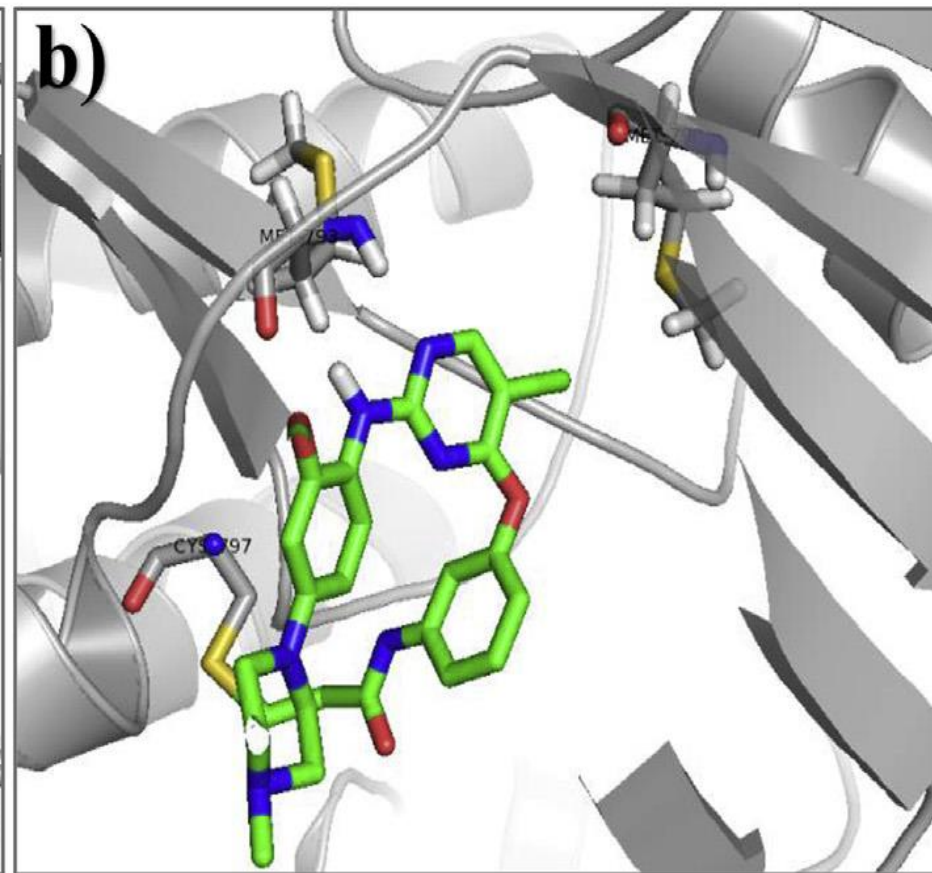
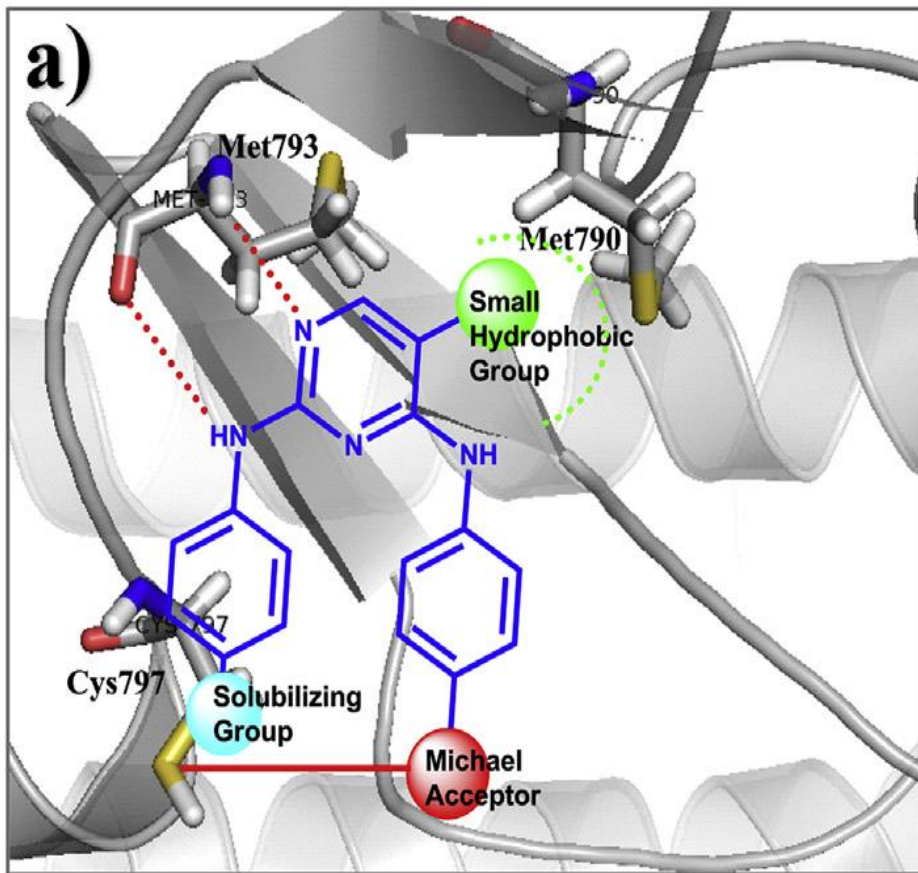


Ζητούμενο: αντιμετώπιση της επαγόμενης αντοχής στους αναστολείς της EGFR κινάσης

Σημαντικότερη (55-70% των ασθενών) είναι η αντικατάσταση του αμινοξέος θυρωρού θρεονίνη-790 από μεθειονίνη: **T790M**. **Η μεταλλαγμένη κινάση παραμένει συνεχώς ενεργή.**

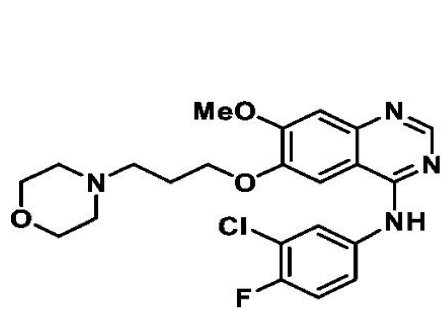
➤ **Η Met790 είναι λιπόφιλη:** και σταθεροποιεί την αC-in διαμόρφωση

➤ **Η Met790 είναι ογκώδης:** ο ανιλινούποκαταστάτης αναπτύσσει αλληλεπιδράσεις κοντά στο αμινοξύ-θυρωρό. Λόγω της στερεοχημικής παρεμπόδισης ο αναστολέας λαμβάνει μια λιγότερο ευνοούμενη διαμόρφωση, με αποτέλεσμα τη **σημαντική μείωση της συνάφειας**. Αντίθετα, η συνάφεια του ATP, που δεν αλληλεπιδρά με το αμινοξύ-θυρωρό, όχι μόνο δεν μειώνεται, αλλά αυξάνεται και τα φάρμακα δεν το ανταγωνίζονται αποτελεσματικά, στις συγκεντρώσεις που αντιστοιχούν στα συνήθη δοσολογικά σχήματα.

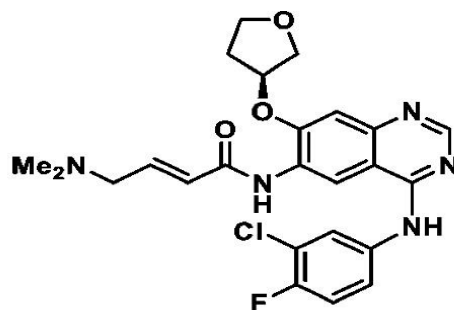


Σχεδιασμός αναστολέων 2^{ης} και 3^{ης} γενιάς

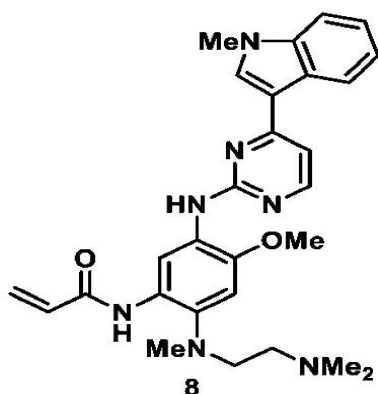
Η παρουσία υπολοίπου Cys στο ενεργό κέντρο, σε θέση που εκτείνεται προς τον διαλύτη προσφέρει τη δυνατότητα σχεδιασμού μη αντιστρεπτών αναστολέων, που σχηματίζουν ομοιοπολικό δεσμό με την Cys797 του ενεργού κέντρου της EGFR



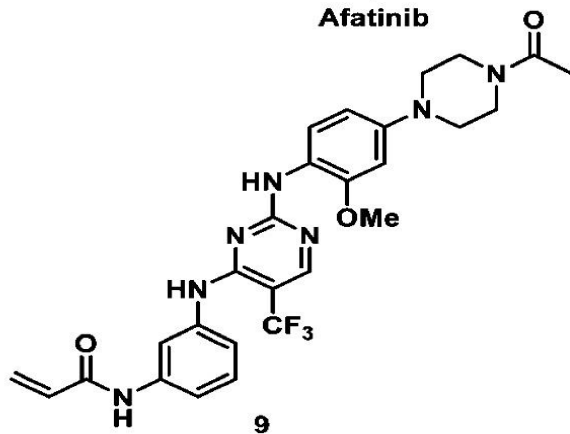
6
Gefitinib



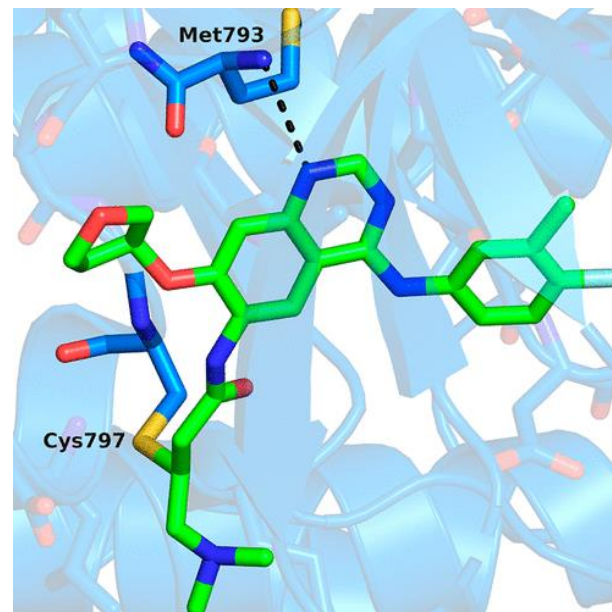
7
Afatinib



8
Osimertinib (AZD9291)

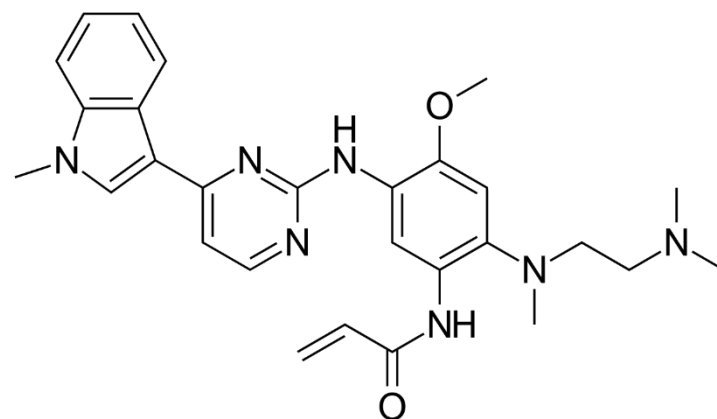
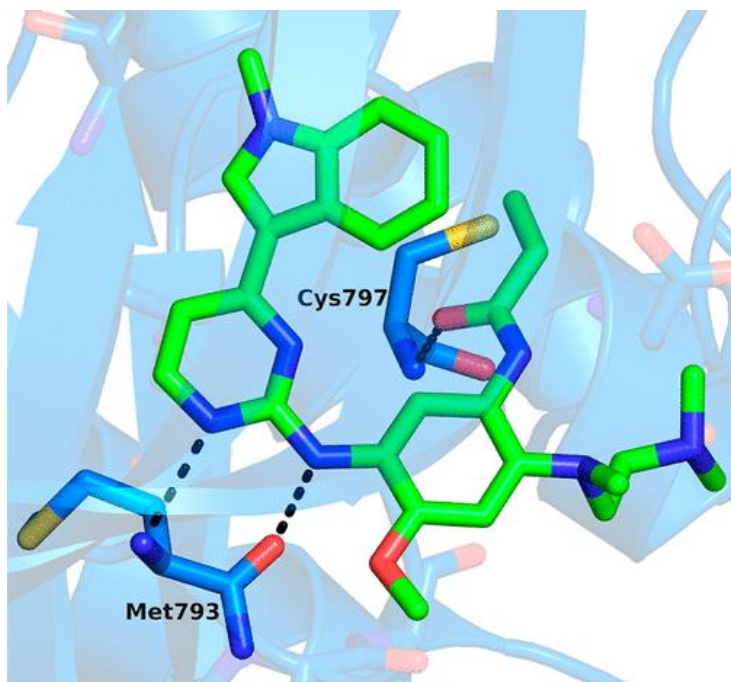


9
Rociletinib (CO-1686, AVL-301)



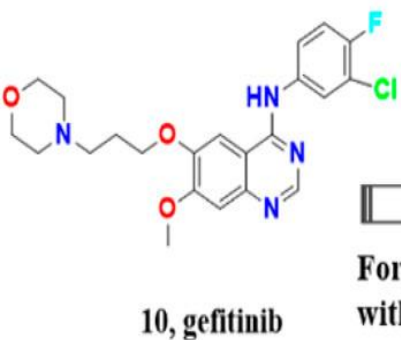
Αναστολείς 2^{ης} γενιάς (μη αντιστρεπτός αναστολέας **afatinib**): αντικατάσταση της μορφολινοπροπυλοξομάδας του gefitinib με διμεθυλαμινοβουτεναμίδιο, που αντιδρά με την **Cys797 της EGFR** (επιβεβαίωση με κρυσταλλογραφία).

Όμως, η επιτυχία στα προκλινικά μοντέλλα δεν μεταφέρθηκε 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.

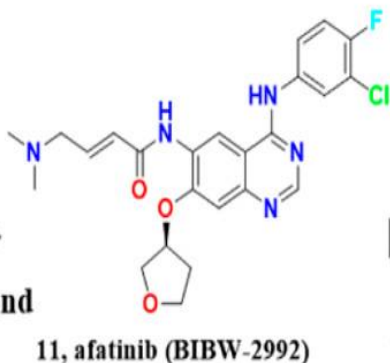
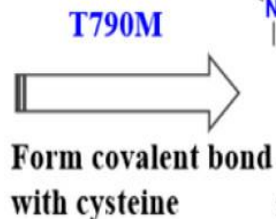


Στους μη αντιστρεπτούς αναστολείς υπάρχει πάντα το ενδεχόμενο τοξικότητας.

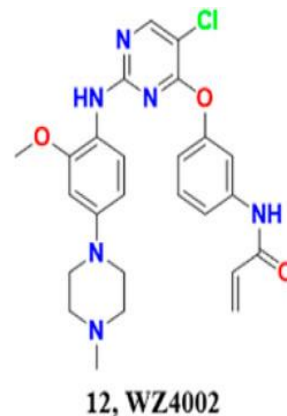
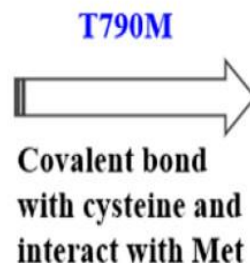
Οι αναστολείς 3^{ης} γενιάς (osimertinib) σχεδιάσθηκαν με σκοπό την **εκλεκτική αναστολή της μεταλλαγμένης κινάσης**. Είναι πιο ευκίνητα παράγωγα αμινοπυριμιδίνης, που δεν ενοχλούνται από τη παρουσία του ογκώδους αμινοξέος-θυρωρού και χαρακτηρίζονται από **μείωση της συγγένειας για την wtEGFR** και **αύξηση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



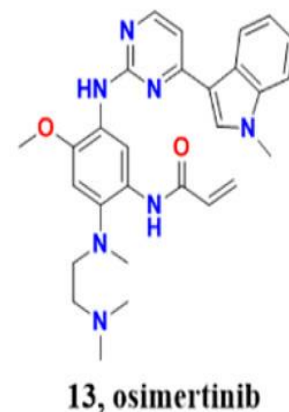
EGFR WT (LoVo)
 $IC_{50} = 59 \text{ nM}$
 EGFR L858R/T790M
 (H1975) $IC_{50} = 3102 \text{ nM}$



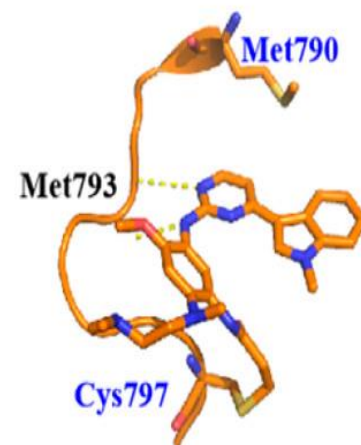
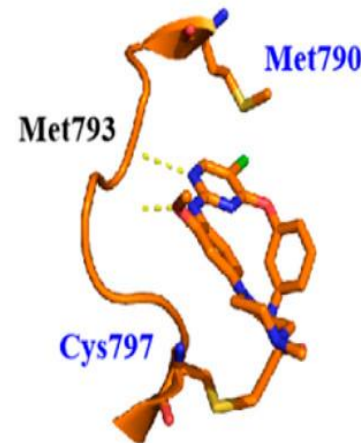
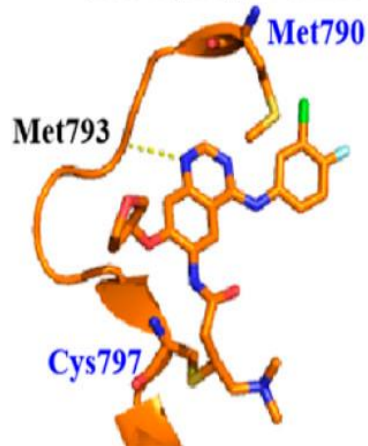
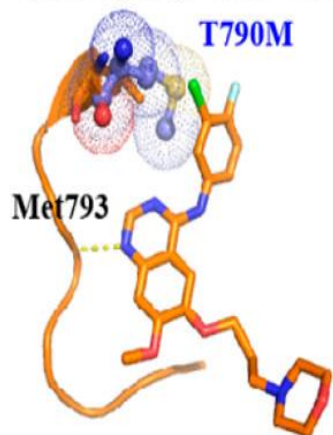
EGFR WT (LoVo)
 $IC_{50} = 15 \text{ nM}$
 EGFR L858R/T790M
 (H1975) $IC_{50} = 22 \text{ nM}$



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

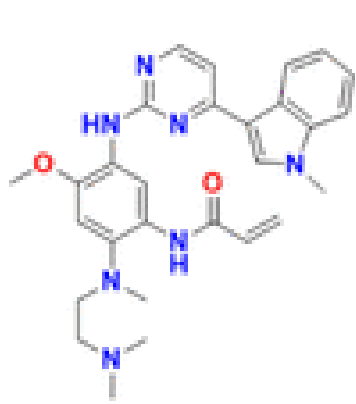


EGFR WT (LoVo)
 $IC_{50} = 480 \text{ nM}$
 EGFR L858R/T790M
 (H1975) $IC_{50} = 15 \text{ nM}$



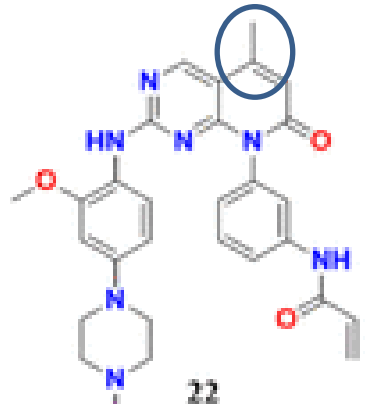
Τα **WZ4002** και **Osimertinib**, **αναστολείς υιοειδούς σχήματος**, συνδέονται ισχυρά με την ανάπτυξη δΗ (2 δΗ με Met793 της ευκίνητης περιοχής) και λιπόφιλων αλληλεπιδράσεων (Met793 και Met790): το ακρυλαμίδιο προσβάλεται εύκολα από την **Cys797**, με αποτέλεσμα να αναστέλουν μη αντιστρεπτά και ισχυρότερα τη μεταλλαγμένη κινάση.

Αναστολείς 4^{ης} γενιάς Η αντικατάσταση της κυστεΐνης από την λιγότερο πυρηνόφιλη σερίνη (C797S/T790 κινάση), 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 χλωροφθοροβενζόλιο στο 23 ευνοούν την αλληλεπίδραση με τη Met 790.



21, osimertinib

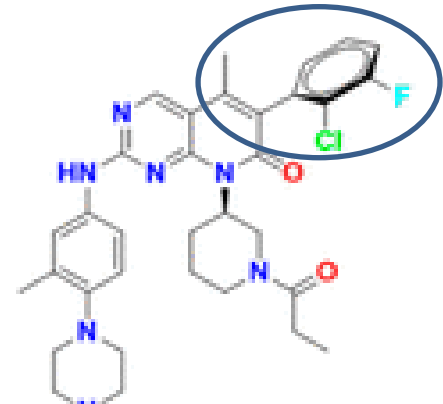
EGFR L858R/T790M/C797S IC₅₀ = 27.5 nM



22

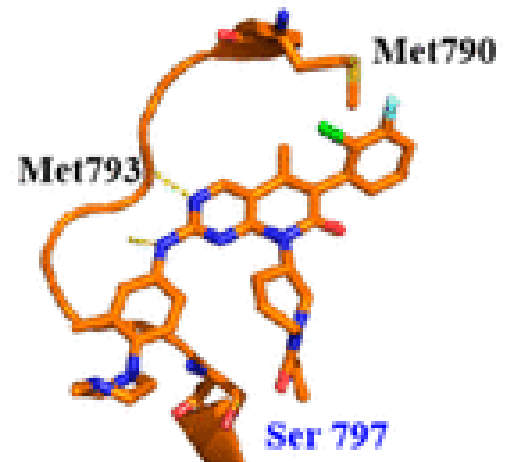
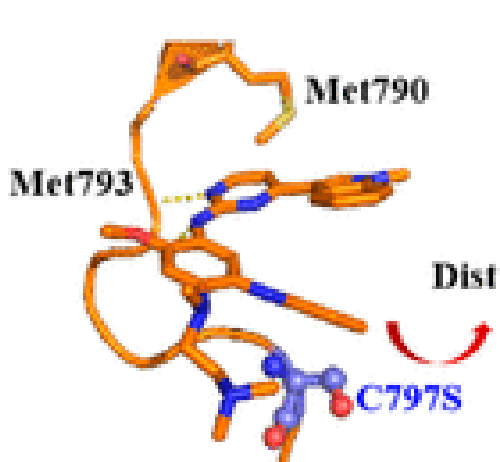
C797S

Reversible binding type

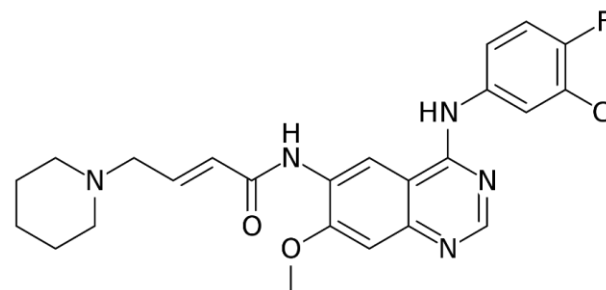
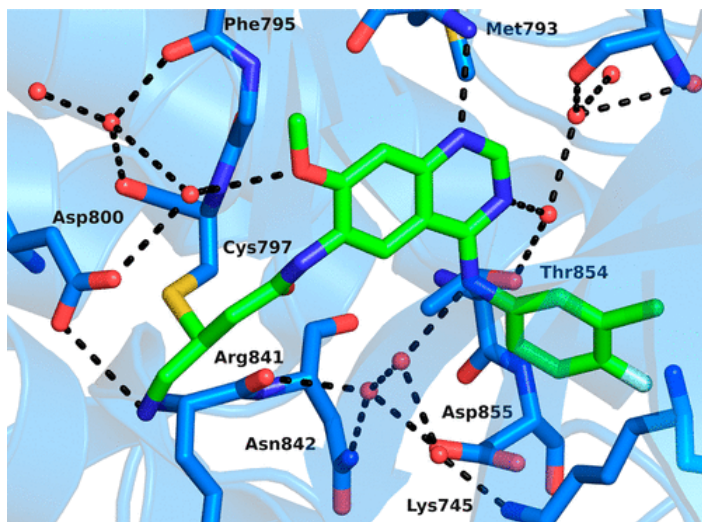


23

EGFR L858R/T790M/C797S IC₅₀ = 27.5 nM

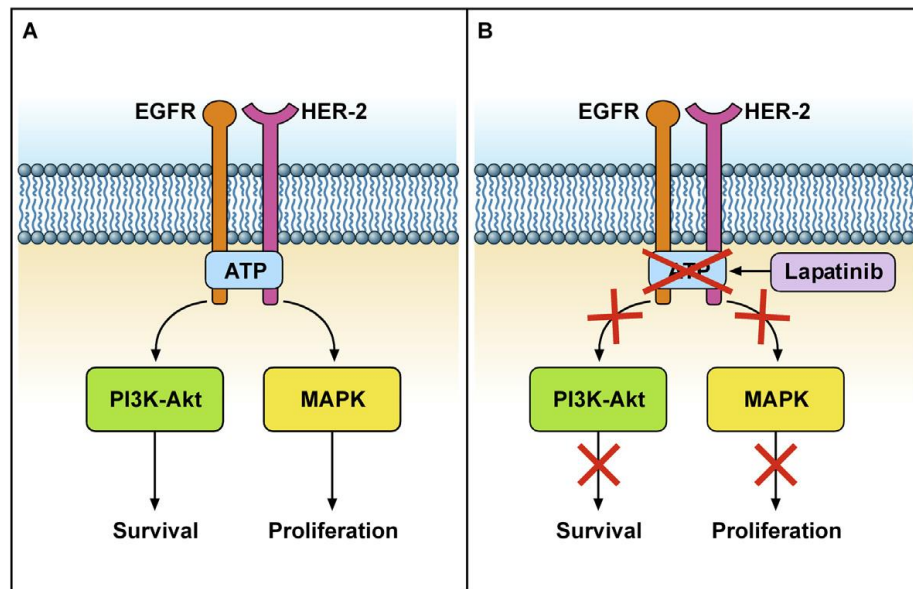
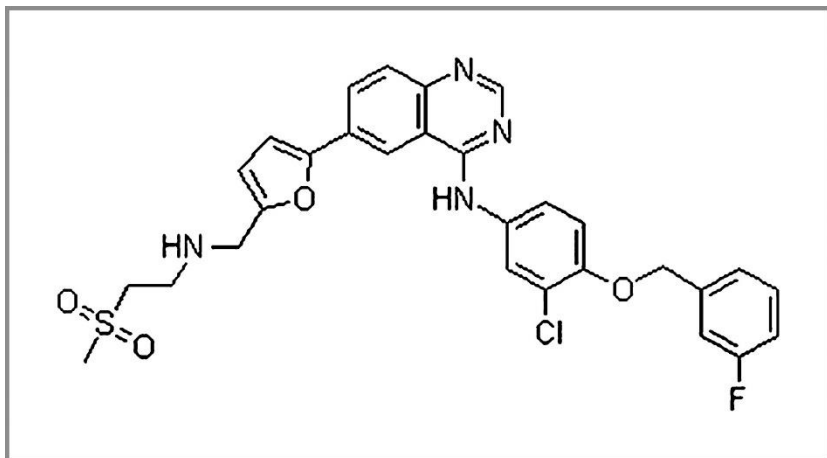


Dacomitinib Μη αντιστρεπτός αναστολέας EGFR 4^{ης} γενιάς Εκλεκτικός για τη μεταλλαγμένη (T790M) κινάση, τύπου II που σταθεροποιεί τη μη ενεργό διαμόρφωση. Διακρίνεται ο τρόπος σύνδεσης στην ευκίνητη περιοχή, με τη συμμετοχή μορίων νερού (κόκκινες σφαίρες).



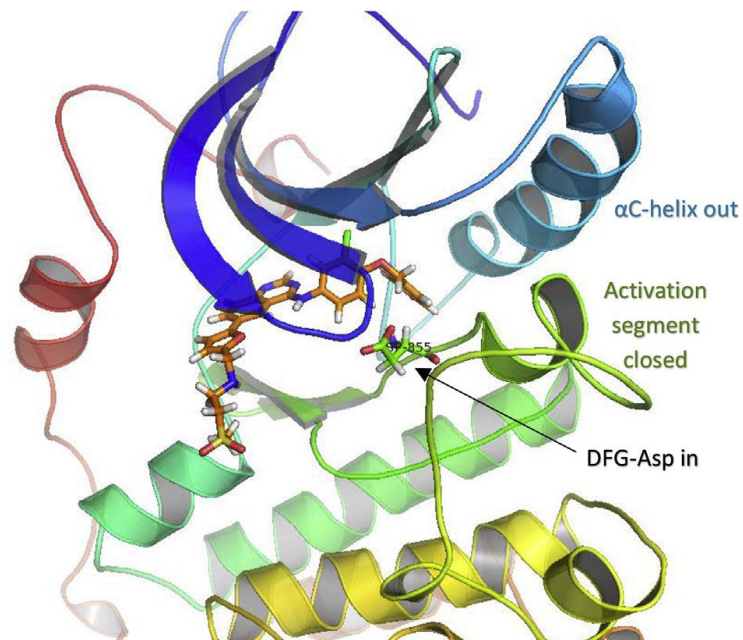
Όλοι οι αναστολείς 4^{ης} γενιάς διακρίνονται για **αυξημένο θεραπευτικό εύρος**. Είναι ασφαλή φάρμακα με λίγες μη σημαντικές παρενέργειες (περιορισμένο ερύθημα, διάρροια).

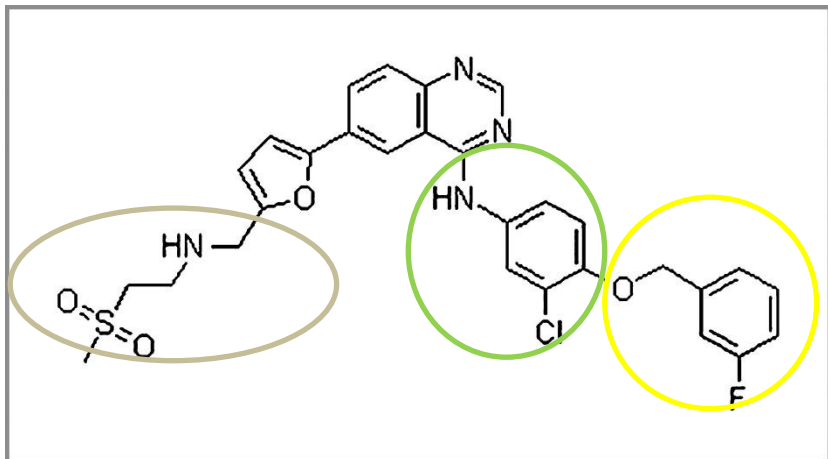
Άλλες λύσεις: αλλοστερικοί αναστολείς, PROTACS, συνδυαστικά σχήματα



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

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



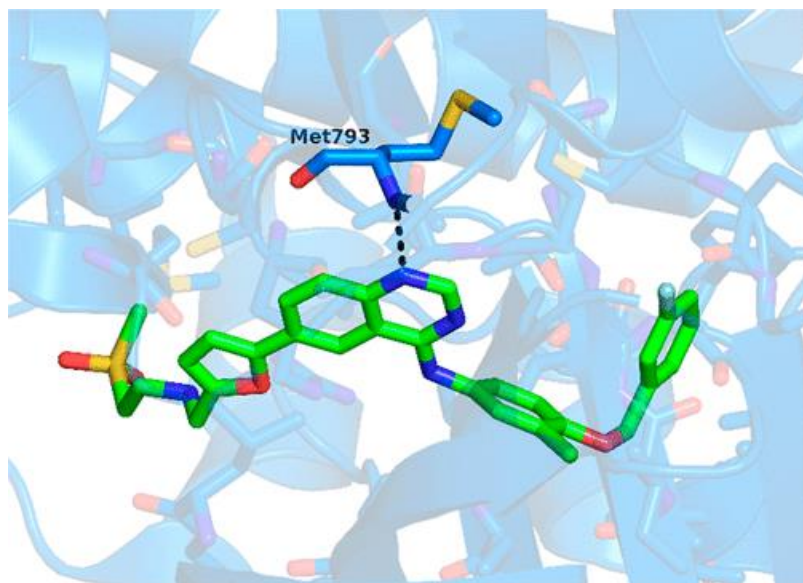


Το **Laratinib** είναι **αναστολέας τύπου I1/2**.

Το **κιναζολινικό N1** σχηματίζει δH με το NH της Met793 με τον ογκώδη 4-βενζυλοξυανιλινοϋποκαταστάτη να είναι σημαντικός για τη πρόσδεση (εκλεκτικά) σε ανενεργή διαμόρφωση (DFG-in, αC-out) της κινάσης. Δεν είναι ξεκάθαρο αν η δέσμευση του φαρμάκου προκαλεί μετατόπιση της αC έλικας, ή αν απλώς **σταθεροποιεί την ανενεργή αC-out** διαμόρφωση της (πιθανότερο το δεύτερο).

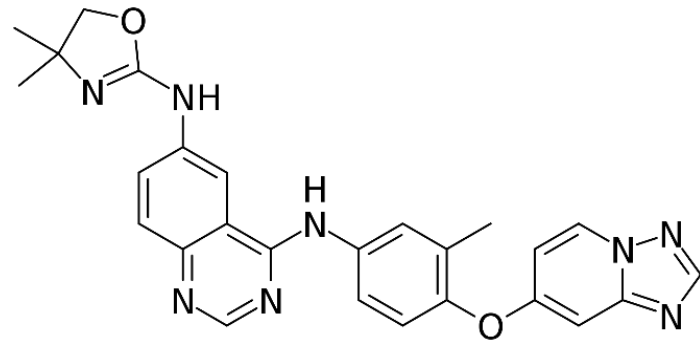
Η **3-φθοροβενζυλοξυ-ομάδα** κατευθύνεται προς τα πίσω και αλληλεπιδρά με μια δευτερεύουσα λιπόφιλη κοιλότητα ενισχύοντας σημαντικά την ανασταλτική δράση σε σύγκριση με το gefitinib.

Η **μεθυλοσουλφονυλαιθυλαμινομάδα** εκτείνεται προς τον διαλύτη και συνεισφέρει στην υδατοδιαλυτότητα.



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 αμινοκιναζολινών 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

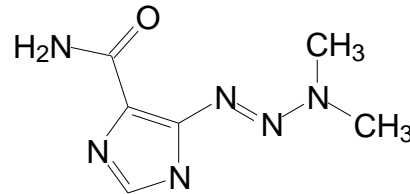
Κατάταξη σε στάδια I-IV ανάλογα με την μακροσκοπική εικόνα, το βαθμό διείσδυσης/διάχυσης στο δέρμα και της εξάπλωσης στους ιστούς.



Η χειρουργική αντιμετώπιση είναι αποτελεσματική σε εστιασμένη περιοχή του δέρματος.

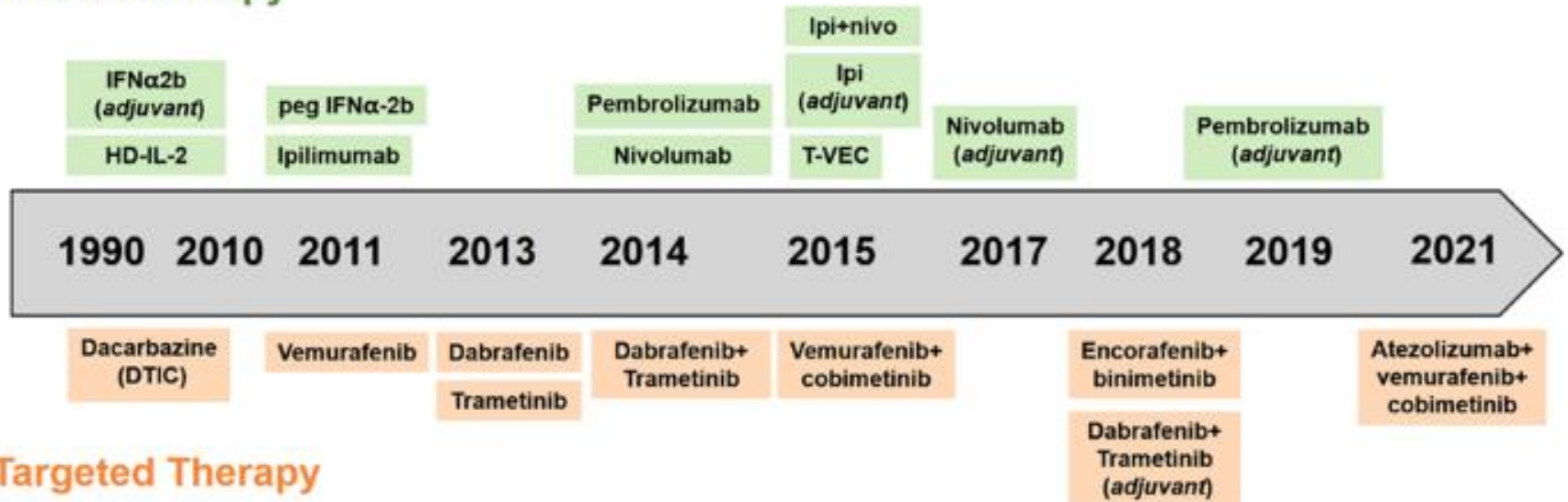
Η φαρμακευτική αγωγή ποικίλει, ανάλογα με το στάδιο της ασθένειας.

dacarbazine

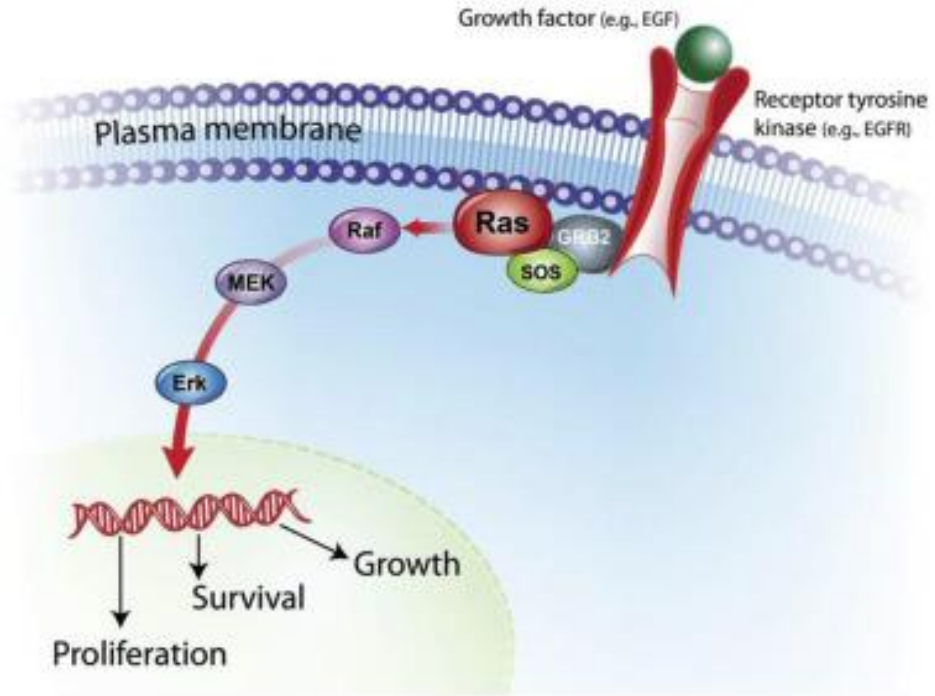


Η θεραπευτική αντιμετώπιση βασίζεται στην ταυτοποίηση μεταλλάξεων σε γονίδια, που κωδικοποιούν κυρίως τη σηματοδότηση μέσω MAPKs (επαγόμενη αύξηση της κυτταρικής διαίρεσης, διαφυγή απόπτωσης κλπ) και την εφαρμογή κατάλληλων αναστολέων.

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 Sos πρωτεΐνες και τη πρόσδεση GTP στις Ras GTPάσες. Αυτές μετακινούν τα ετεροδιμερή RAF/MEK προς τη κυτταρική μεμβράνη, όπου σχηματίζονται προσωρινά τετραμερή, με διμερισμό των RAF, που διευκολύνει τον ομοδιμερισμό των MEK. Ακολούθως, οι RAF ενεργοποιούν τις MEK κινάσες, που φωσφορυλιώνουν με τη σειρά τους τις ERK, ώστε να ενεργοποιηθούν περαιτέρω οι downstream στόχοι.

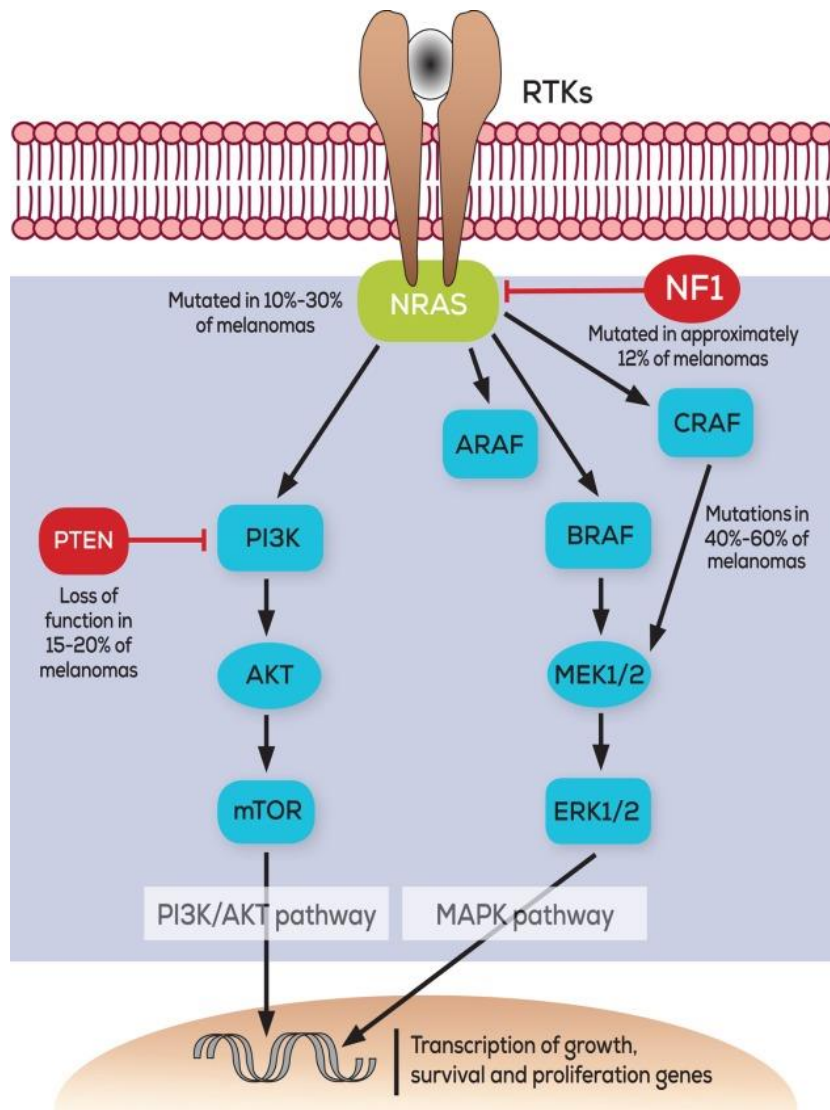


Η **RAF** (**R**apidly **A**ccelerated **F**ibrosarcoma) είναι κινάση σερίνης θρεονίνης που ανακαλύφθηκε ως **ογκογόνο** ρετροϊών που προκαλεί σάρκωμα μαλακών μορίων.

Όταν ενεργοποιηθεί ομο- ή ετεροδιμερίζεται.

Γενετικές αλλαγές στο μελάνωμα κατατάσσονται σε 4 κατηγορίες

mutations on
NRAS
MAPK
PI3K/AKT

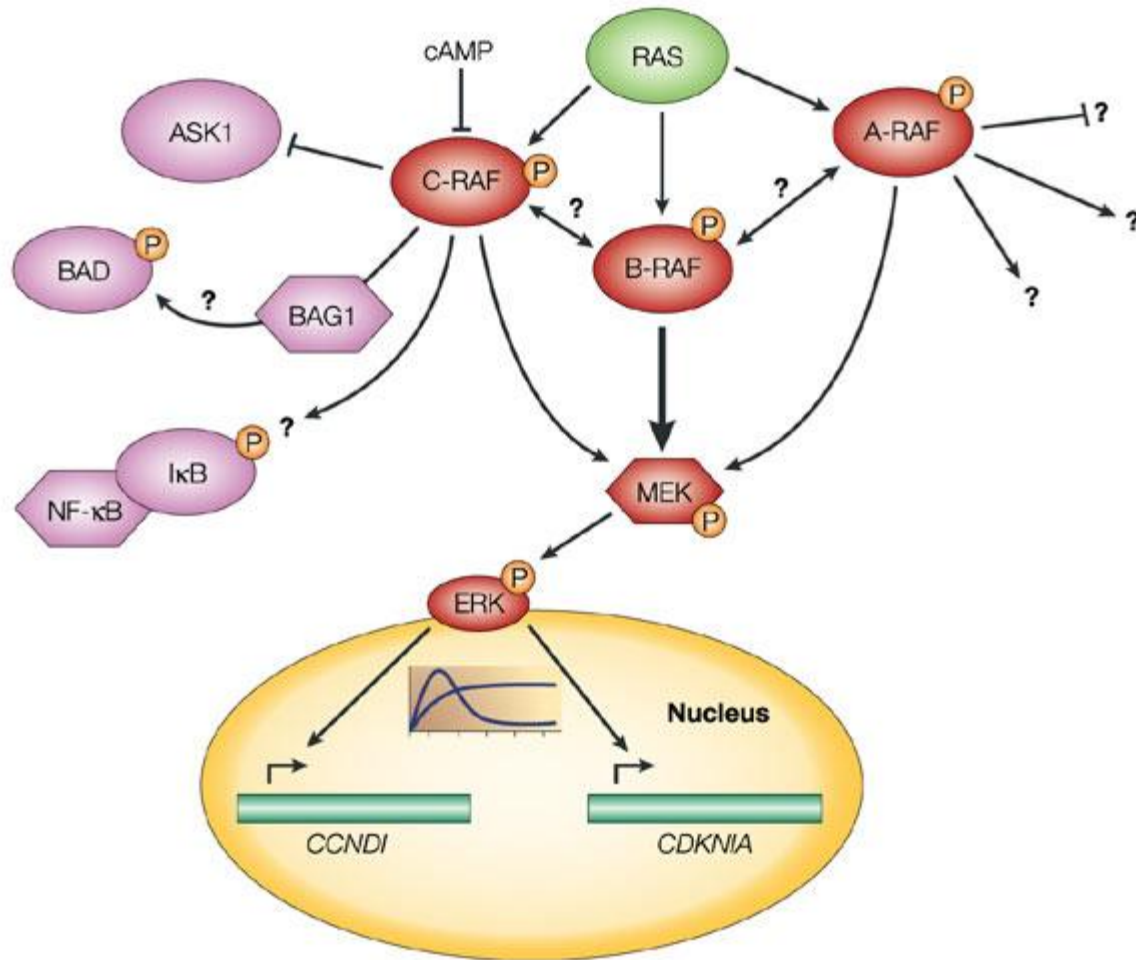


mutations on
c-KIT
PI3K/AKT

mutations on
NF1
MAPK

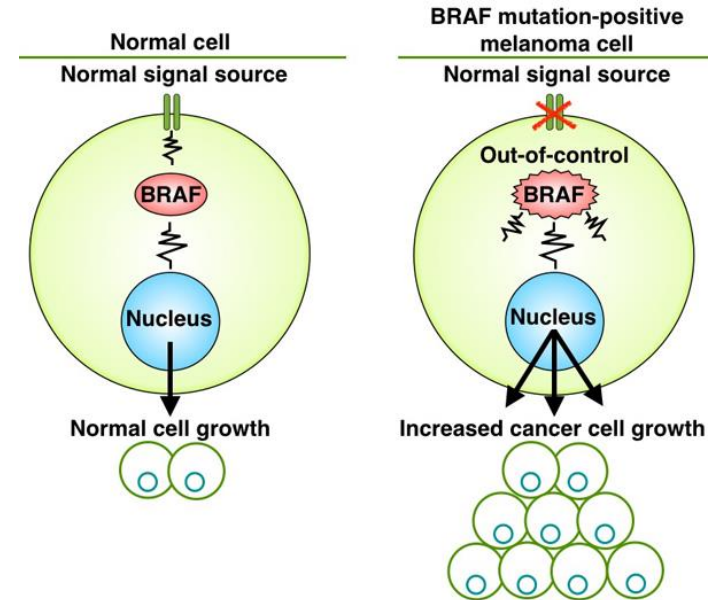
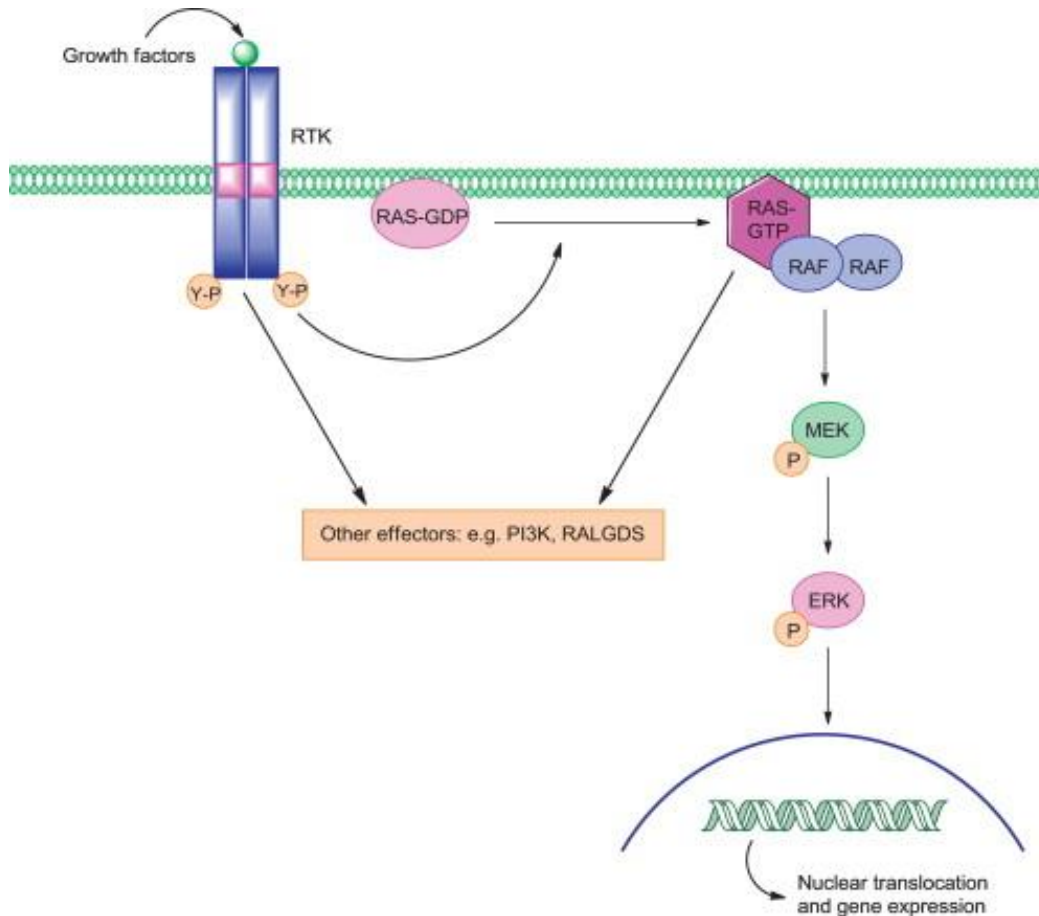
mutations on
MAPK
RAS/RAF/MEK/ERK

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.

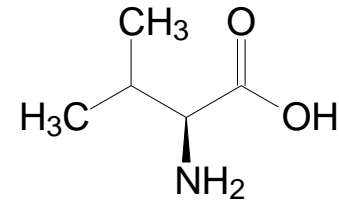
Η ογκογόνος μεταλλαγμένη B-Raf παρουσιάζεται, με χαμηλότερη συχνότητα και σε άλλους τύπους καρκίνου, θυρεοειδούς (30-50%), παχέος εντέρου (5-20%) και ωοθηκών (~30%).



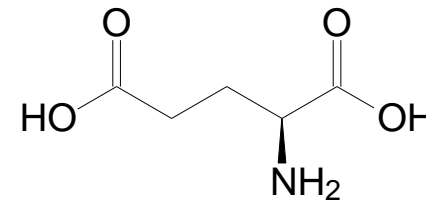
Braf^{wt} → BRaf^{V600E} Η πιο συχνή μετάλλαξη (90% των ενεργοποιητικών παρεκκλίσεων της B-Raf) αφορά την αντικατάσταση της **υδρόφοβης βαλίνης 600** από το **υδρόφιλο γλουταμινικό οξύ**:

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

Λιγότερο συχνές μεταλλάξεις (απαντούν στο μελάνωμα):
V600K (λυσίνη, ~15%)
V600R (αργινίνη ~3%)
V600D (ασπαρτικό οξύ, ~3%)



valine

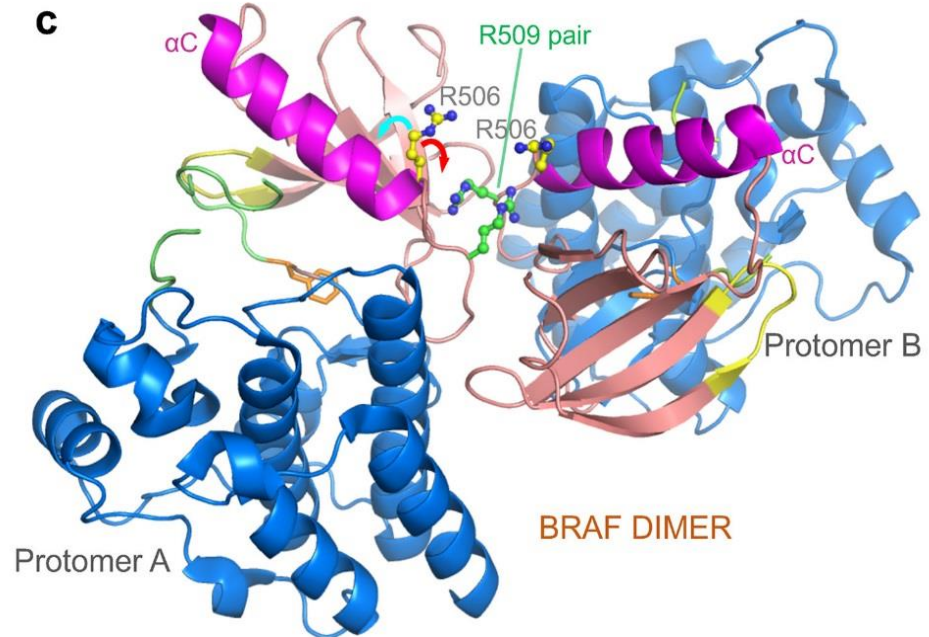
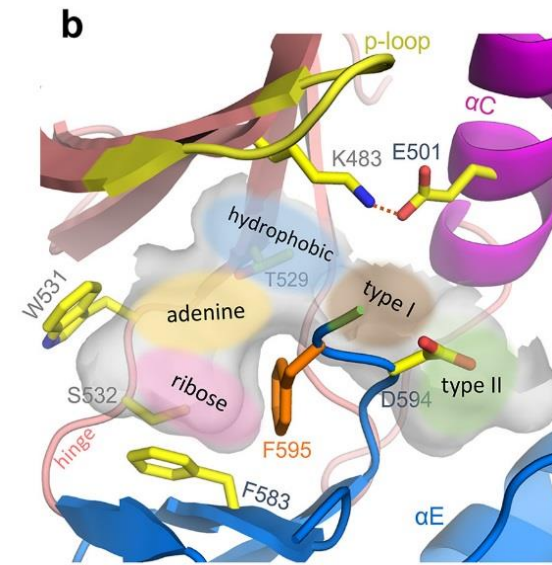
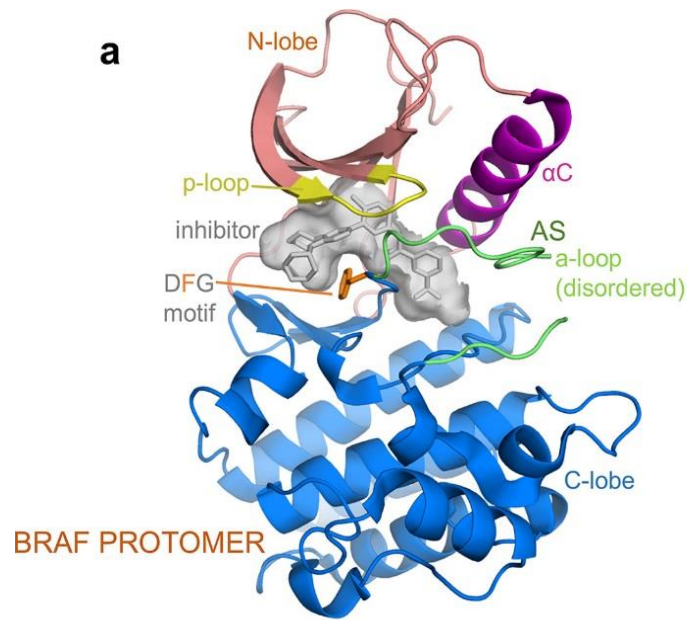


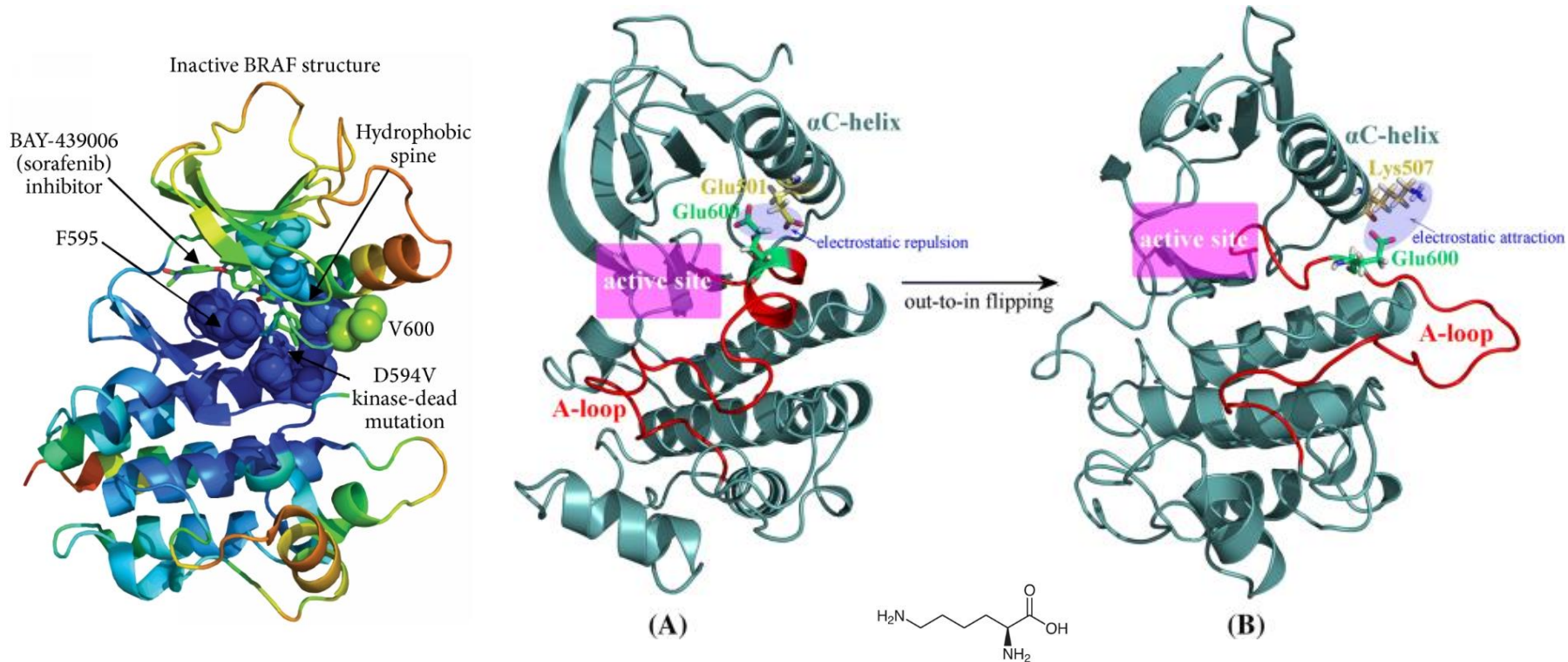
glutamic acid

Η αναστολή της μεταλλαγμένης B-Raf^{V600E} αποτελεί σήμερα την ουσιαστικότερη **στοχευμένη θεραπευτική προσέγγιση**.

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

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



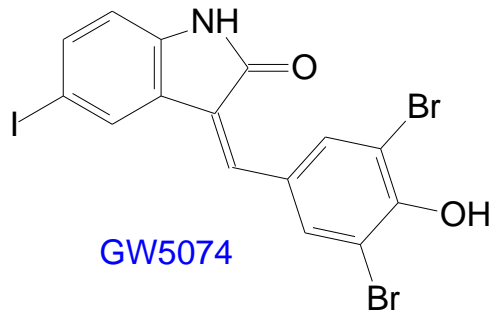


Στην $BRAF^{WT}$ η V600 σχηματίζει ισχυρές λιπόφιλες αλληλεπιδράσεις που σταθεροποιούν την ανενεργή α C-out διαμόρφωση. Για να ενεργοποιηθεί η κινάση πρέπει να φωσφορυλιωθεί το OH της Ser599, που σχηματίζει ισχυρό δεσμό άλατος με μια θετικά φορτισμένη λυσίνη (Lys507) του α C έλικα σταθεροποιώντας την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

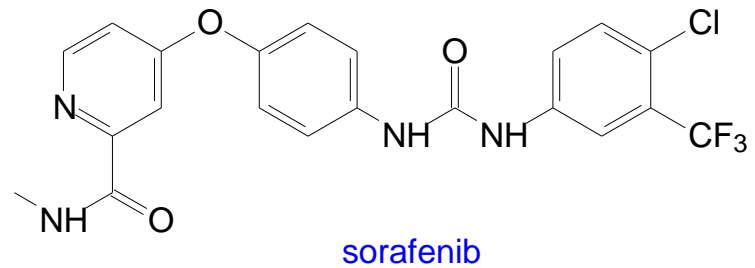
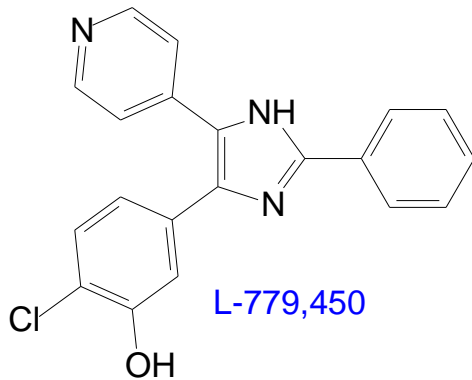
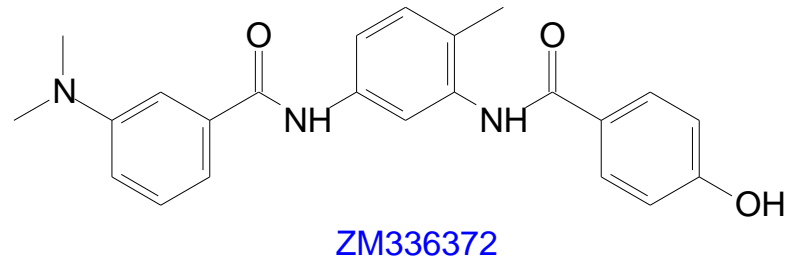
Στην $BRAF^{V600E}$ η Val600 αντικαθίσταται από το φορτισμένο στο φυσιολογικό pH Glu που μιμείται τη φορτισμένη φωσφορική ομάδα της Ser 599 και ευνοεί τη λήψη ενεργής α C-in διαμόρφωσης.

Σημαντικότεροι RAF αναστολείς προ του 2005

p/s CRAF inhibitor
(IC₅₀: 9nM)



p/s CRAF inhibitor
(IC₅₀: 70nM)



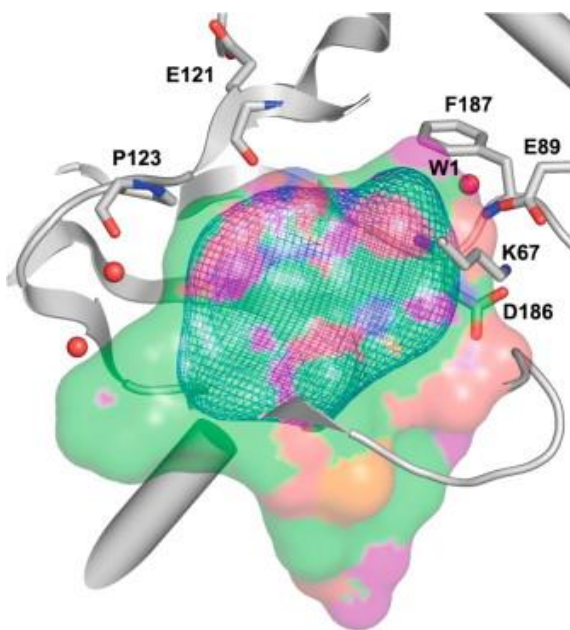
p ARAF inhibitor
(IC₅₀: 10nM)

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

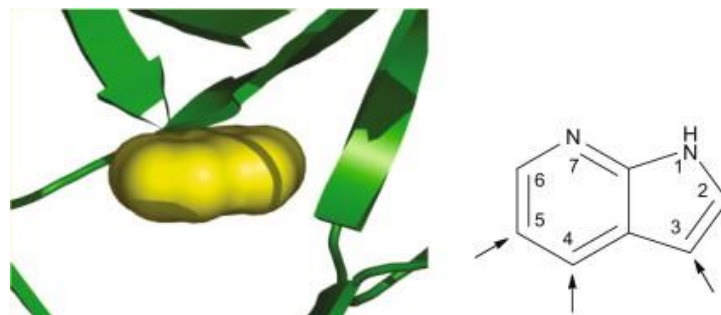
fragment-based approaches τακτική που βασίζεται στον συνδυασμό δύο ξεχωριστών τμημάτων που δεν δεσμεύονται πολύ ισχυρά στο ένζυμο, με σκοπό τη λήψη ενός μεγαλύτερου παραγώγου με βελτιωμένες θερμοδυναμικές παραμέτρους.

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

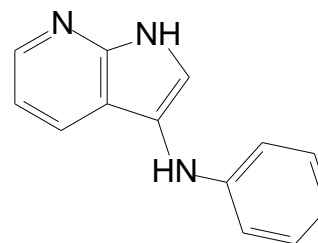
Βιοχημικός έλεγχος 20.000 μορίων σε υψηλές συγκεντρώσεις, έναντι αρκετών μελών μιας συγκεκριμένης οικογένειας κινασών και κατόπιν συγκρυστάλλωση των δραστικών μορίων με τις μελετώμενες πρωτεΐνες.



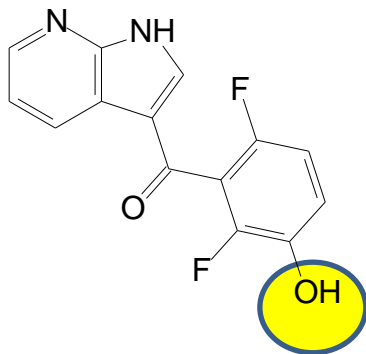
Ανακάλυψη του 7-αζαϊνδολίου ως ένωσης-οδηγού για scaffold-based approach συγκρυστάλλωση με την Pim-1.



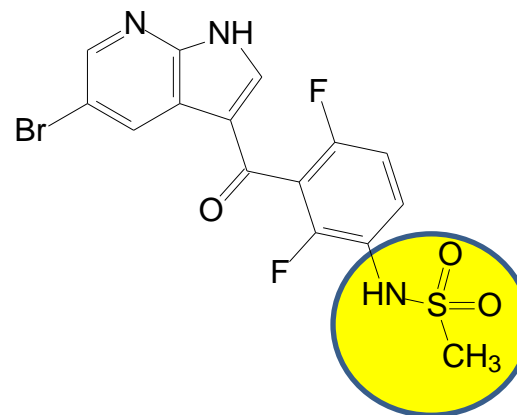
Pim-1 $IC_{50} > 200 \mu M$



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

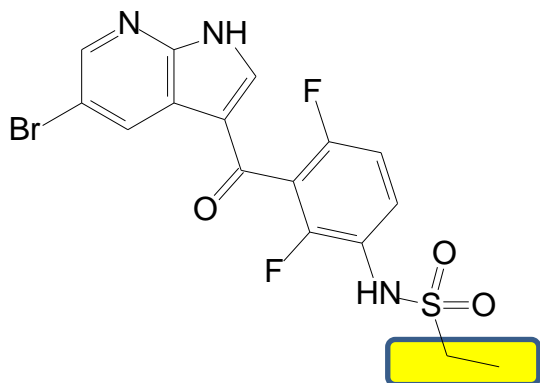


διφθοροφαινόλη
 Δημιουργία δ.Η με ATP binding pocket

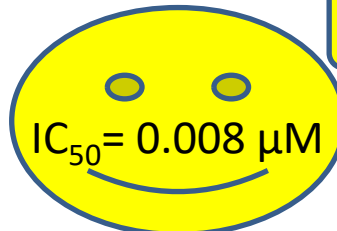
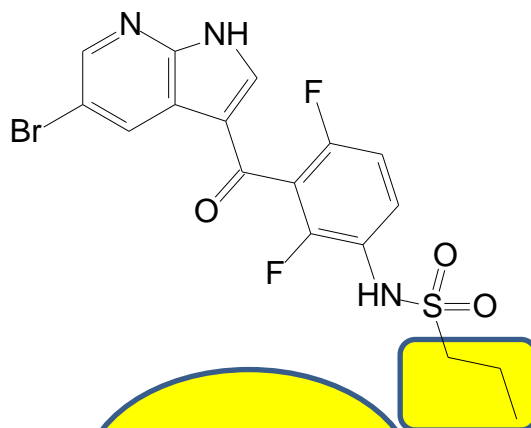


Μεταβολική σταθεροποίηση
 Βιοϊσοστερής αλλαγή (IC₅₀= 0.22 μM)

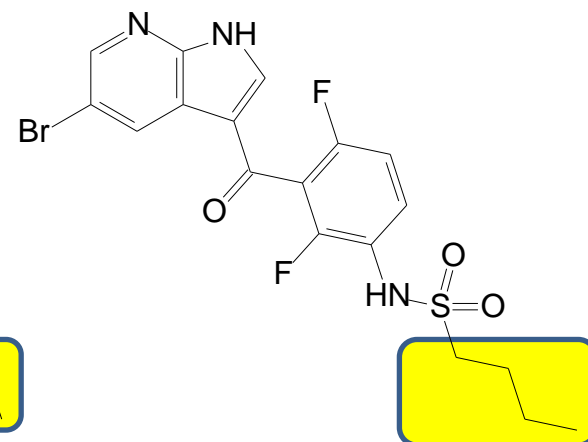
Lead optimization



IC₅₀= 0.11 μM

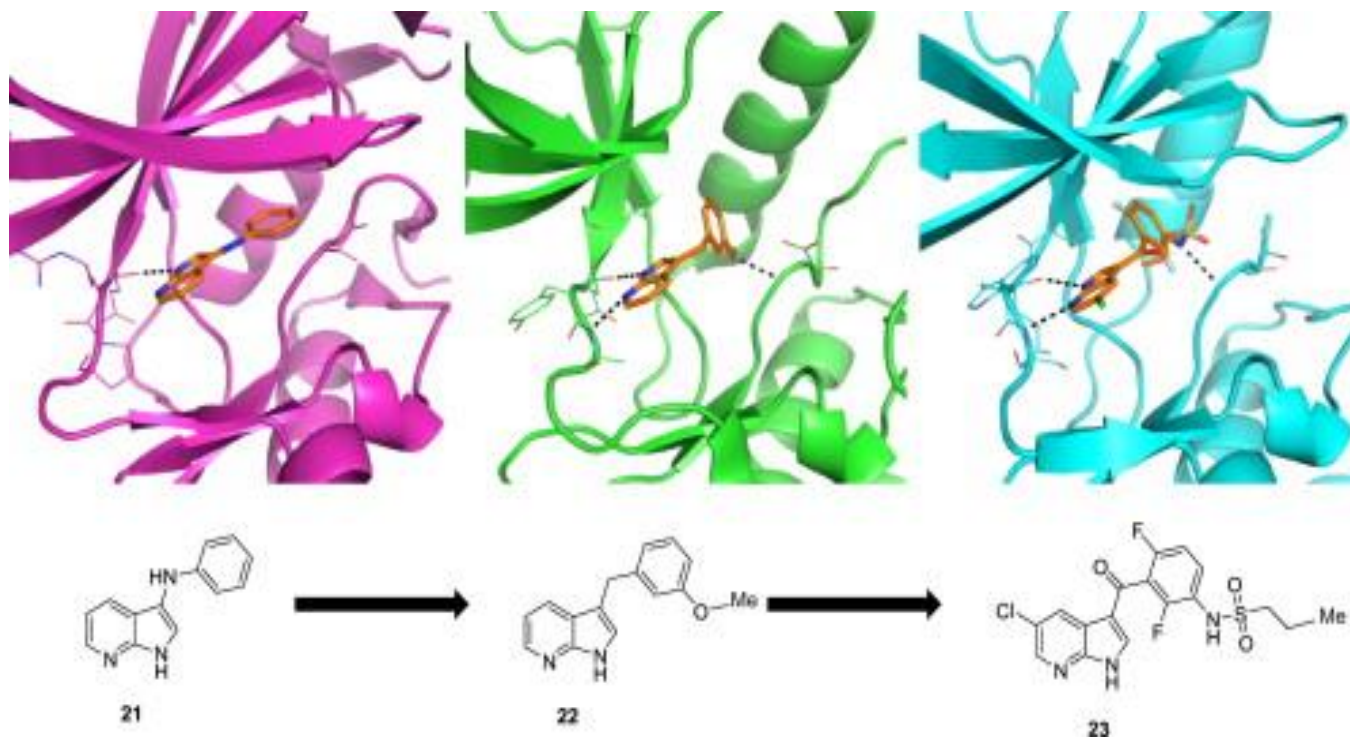


IC₅₀= 0.008 μM

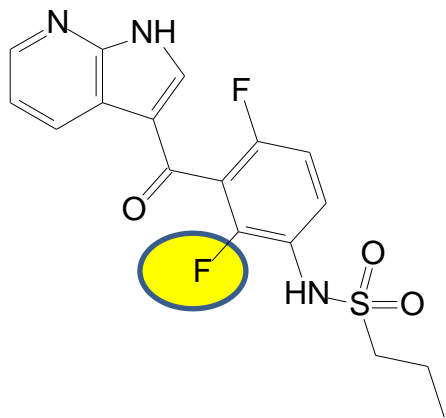


IC₅₀= 0.02 μM

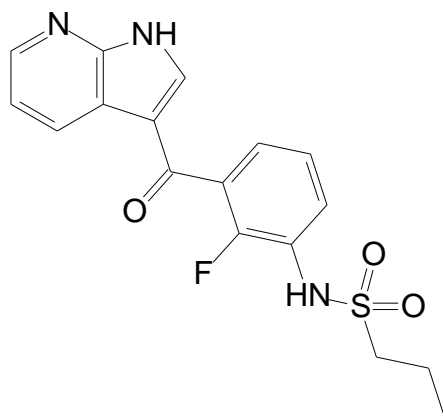
Οι σχέσεις δομής-δράσης επαληθεύονται με κρυσταλλογραφία



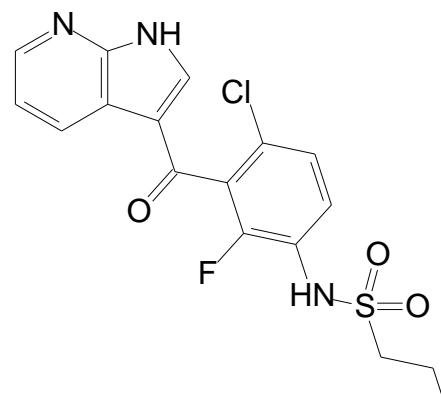
(A) Κρυσταλλογραφική απεικόνιση του 3-αμινοφαινυλο-7-αζαινδολίου (**21**) εντός της PIM-1 κινάσης. (B) Κρυσταλλογραφική απεικόνιση του 3-(3-μεθοξυβενζυλο)-7-αζαινδολίου (**22**) εντός της κινάσης FGFR1. (C) Κρυσταλλογραφική απεικόνιση του PLX4720 (**23**) εντός της B-Raf κινάσης.



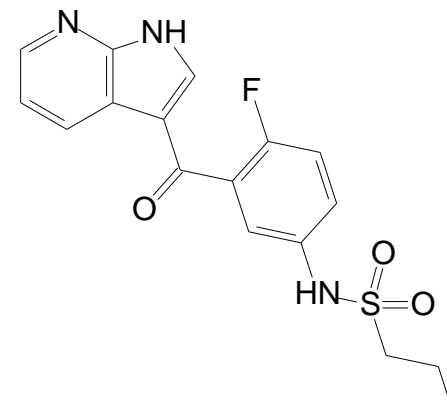
$IC_{50} = 0.11 \mu M$



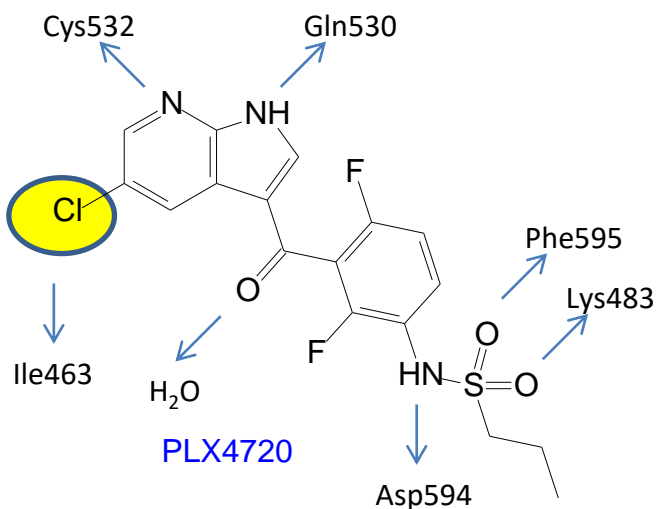
$IC_{50} = 0.68 \mu M$



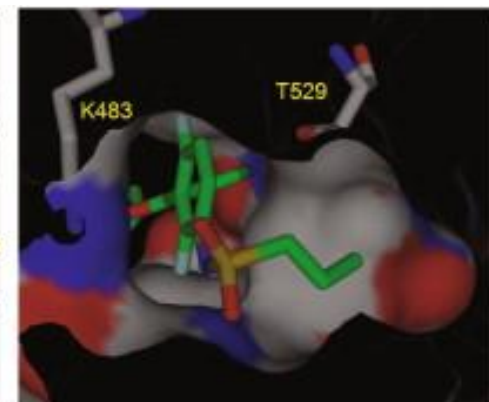
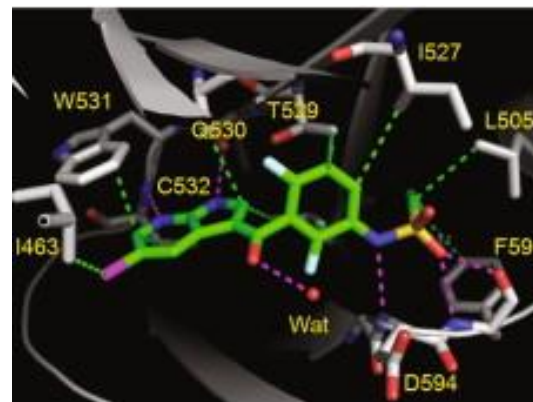
$IC_{50} = 0.24 \mu M$



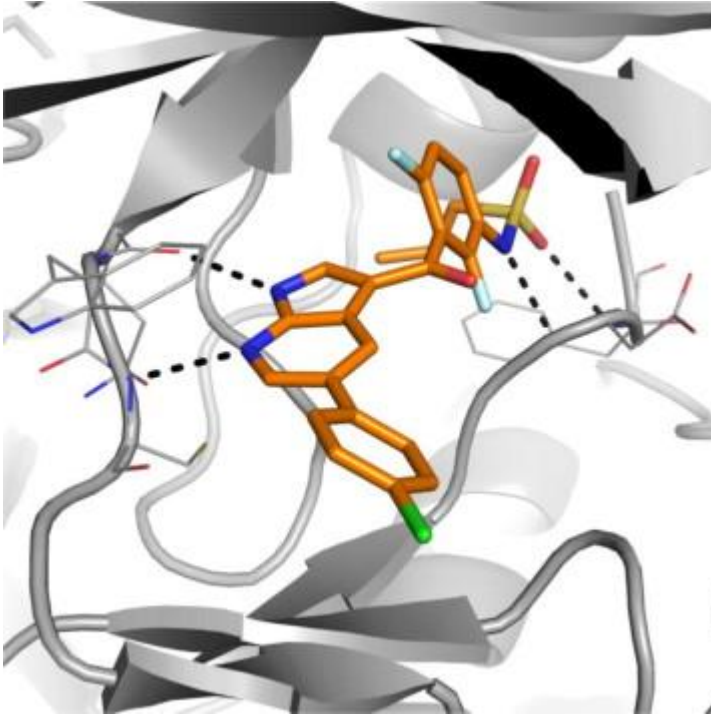
$IC_{50} > 10 \mu M$



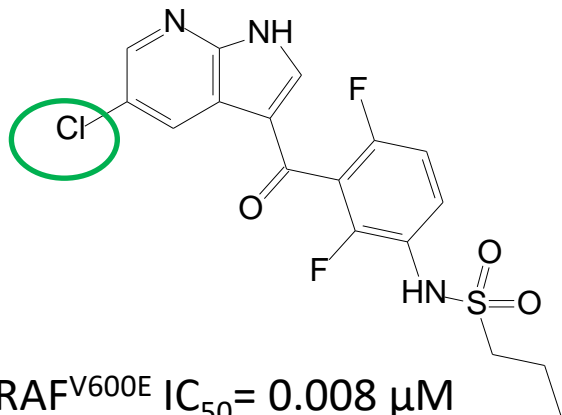
$IC_{50} = 0.008 \mu M$ έναντι B-Raf^{V600E}
 10πλασια εξειδίκευση έναντι WT B-Raf
 100πλασια εξειδίκευση έναντι 70
 κινασών



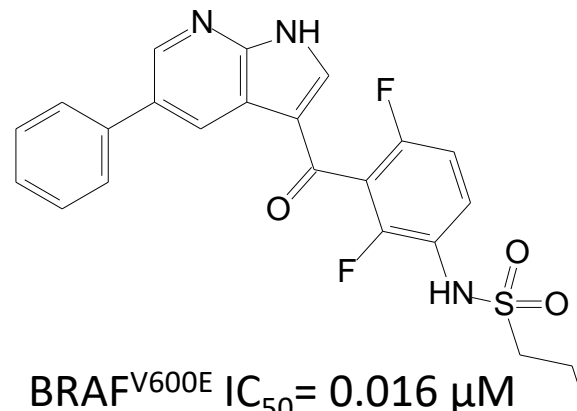
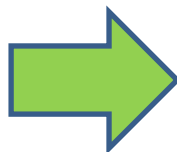
Ο 3-υποκαταστάτης αλληλεπιδρά με το αμινοξύ-
 θυρωρό (Thr529) και με το μοτίβο DFG (**DFG-in**
διαμόρφωση), ενώ η προπυλομάδα μπαίνει σε
 μικρή λιπόφιλη κοιλότητα που υπάρχει μόνο στην
 οικ RAF



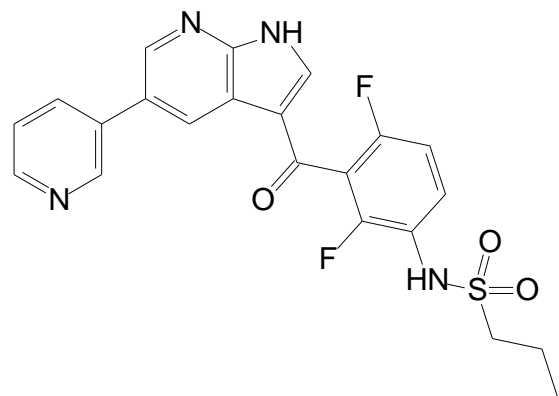
Διακρίνεται η αλληλεπίδραση του N του σουλφοναμιδίου με το μοτίβο DFG καθώς και η είσοδος της προπυλομάδας στην Raf-selective κοιλότητα.



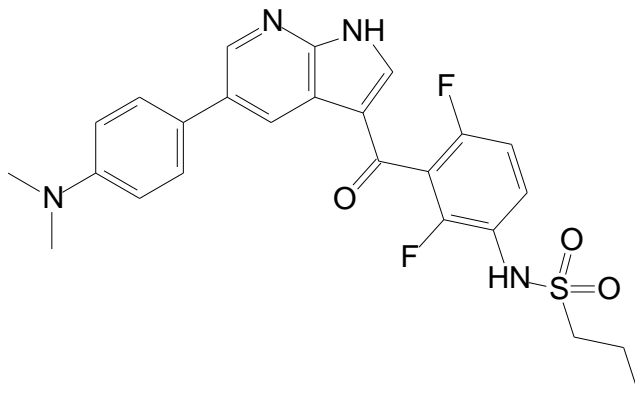
BRAF^{V600E} IC₅₀ = 0.008 μM



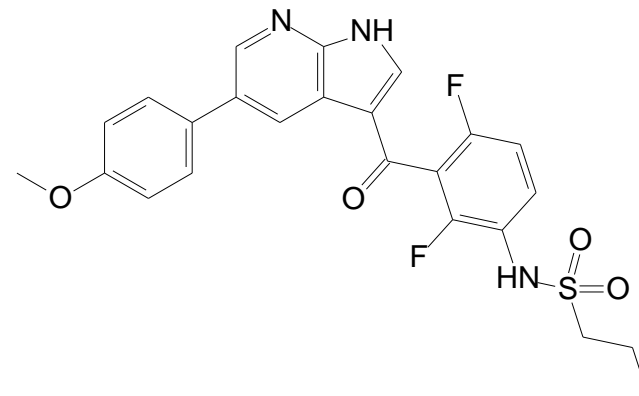
BRAF^{V600E} IC₅₀ = 0.016 μM



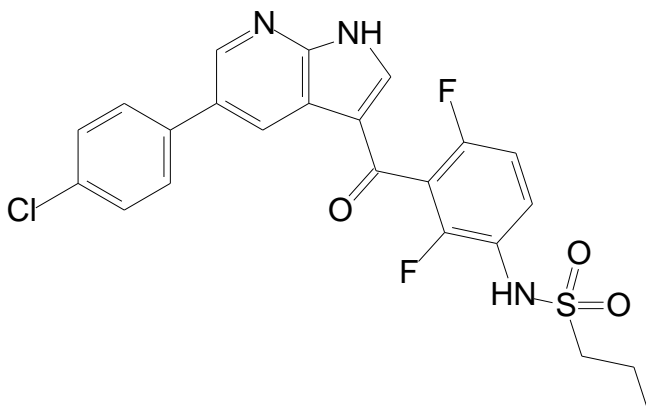
BRAF^{V600E} IC₅₀ = 0.003 μM



BRAF^{V600E} IC₅₀ = 0.055 μM



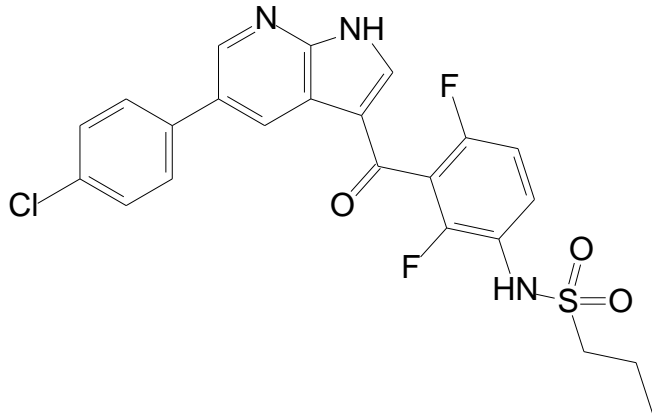
BRAF^{V600E} IC₅₀ = 0.02 μM



BRAF^{V600E} IC₅₀ = 0.031 mM

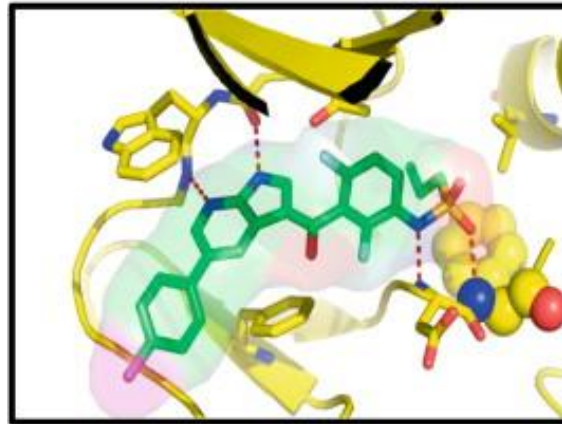
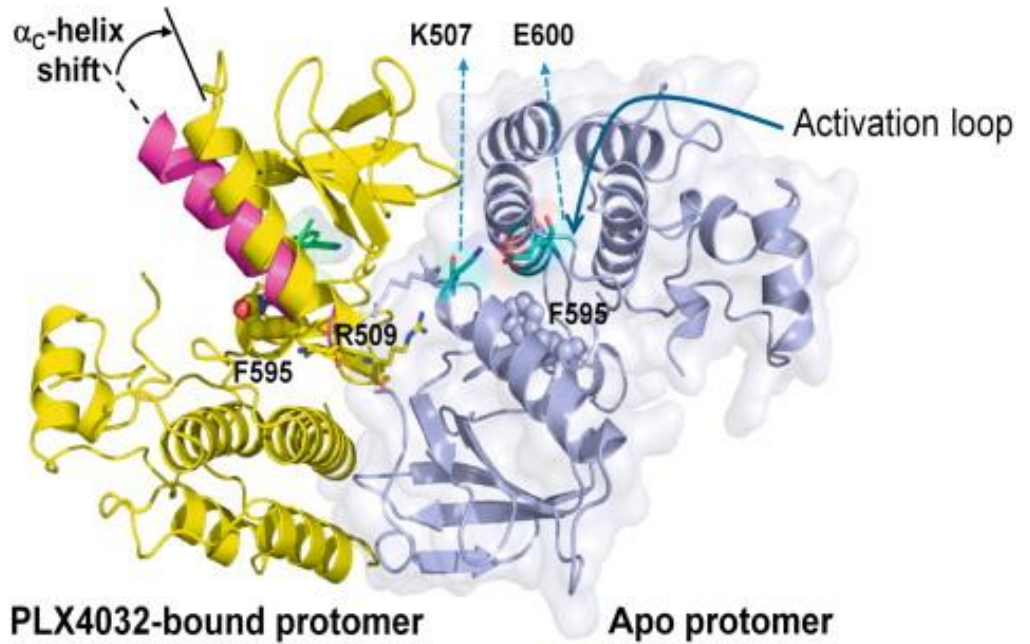
Η βελτίωση των
φ/κ παραμέτρων
είναι επίσης
σημαντική

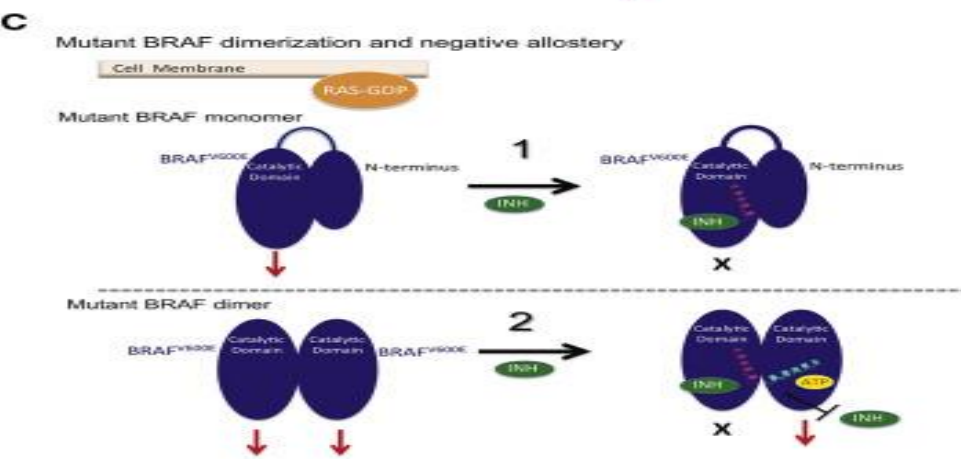
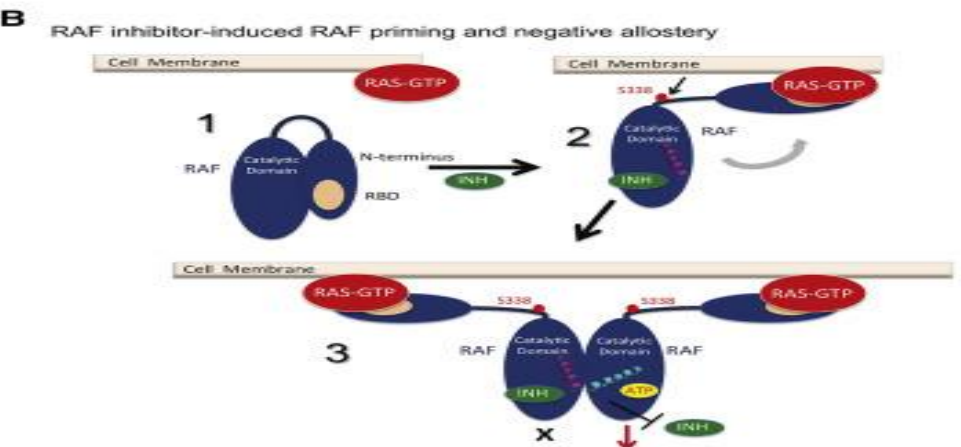
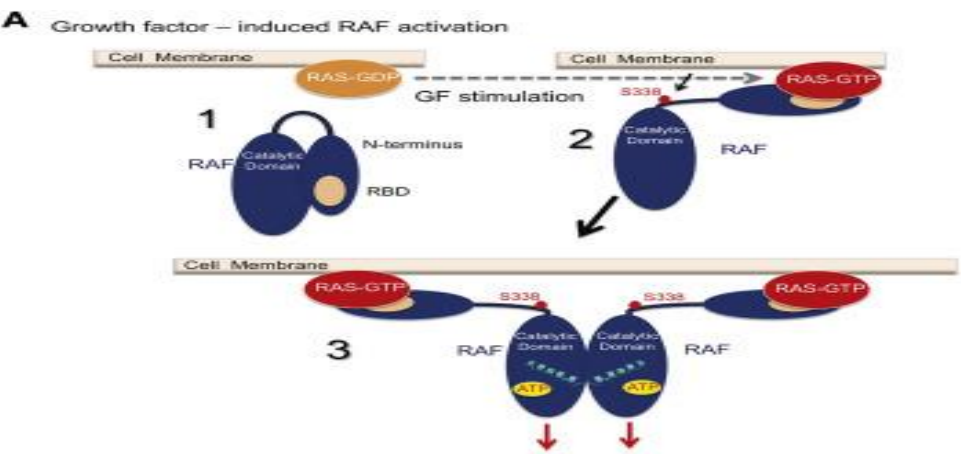
Vemurafenib (PLX4032)
V600E mutated BRAF
inhibition



Το **vemurafenib** είναι αναστολέας τύπου **I1/2**. Το σουλφοναμίδιο συνδέεται με το DFG της ενεργής διαμόρφωσης. Η πυρρολοπυριδίνη ως ανάλογο πουρίνης αλληλεπιδρά με την ευκίνητη ενδιάμεση περιοχή, ενώ το 4-χλωροφαινύλιο εκτείνεται προς τον διαλύτη.

Προκαλείται όμως μετατόπιση της α C-έλικας σε ανενεργή διαμόρφωση (α C-out) και παρεμποδίζεται ο διμερισμός.



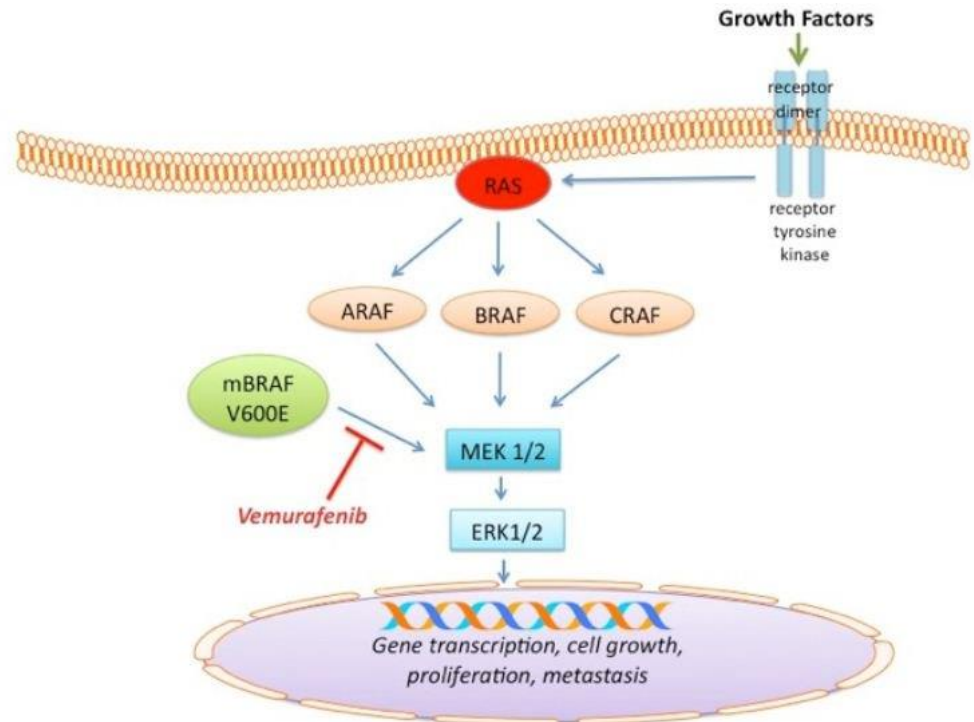


Ασύμμετρο διμερές: Η πρόσδεση του vemurafenib στο 1^ο πρωτομερές υποχρεώνει την αC έλικα να λάβει την αC-out διαμόρφωση. Όμως, η αC έλικα του 2^{ου} πρωτομερούς τοποθετείται υποχρεωτικά σε αC-in διαμόρφωση (**αρνητική αλλοστερική επίδραση**) με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η πρόσδεση 2^{ου} μορίου vemurafenib: το φάρμακο αναστέλλει τα μονομερή της BRAF αλλά όχι τα διμερή.

Φάρμακο ειδικό για κακοήθειες που οφείλονται στη παρουσία της μεταλλαγμένης κινάσης, που μπορεί να 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



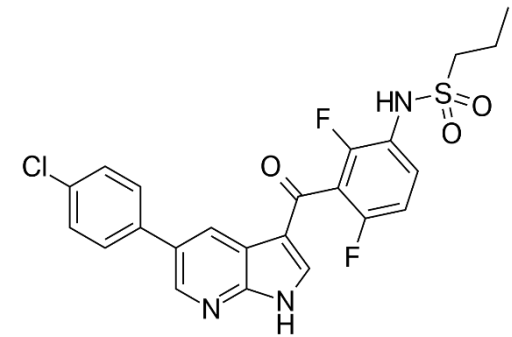
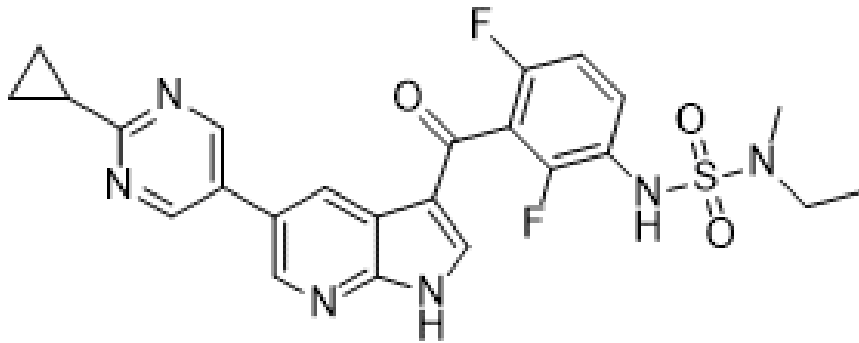
Το διαγνωστικό τεστ εγκρίθηκε ταυτόχρονα με το vemurafenib.

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. Ενεργοποιείται η σηματοδότηση ERK (**παράδοξη ενεργοποίηση**) και η **ανάπτυξη δευτερογενών καρκίνων** (κερατοκαρκινώματα).
- 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.

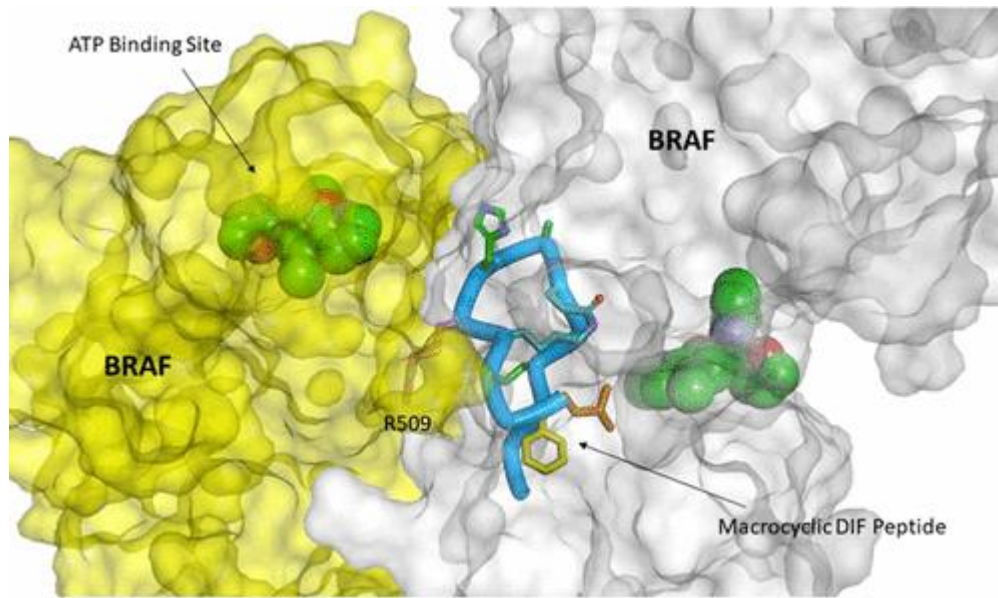


ΛΥΣΕΙΣ

- “paradox breakers”

Αναστολείς που δεν επάγουν τον διμερισμό ή αναστολείς της αC-in/αC-in διαμόρφωσης της διμερούς BRAF (υπό ανάπτυξη). Το εικονιζόμενο παράγωγο PLX7904 αναστέλλει την φωσφορυλίωση των ERK1/2 παρουσία της μεταλλαγμένης BRAF, χωρίς να επάγει την φωσφορυλίωση των ERK1/2 σε κύτταρα που φέρουν μεταλλάξεις στην RAS.

Κλινικά αποτελεσματικό - δραστικό σε κύτταρα ανθεκτικά στο vemurafenib.

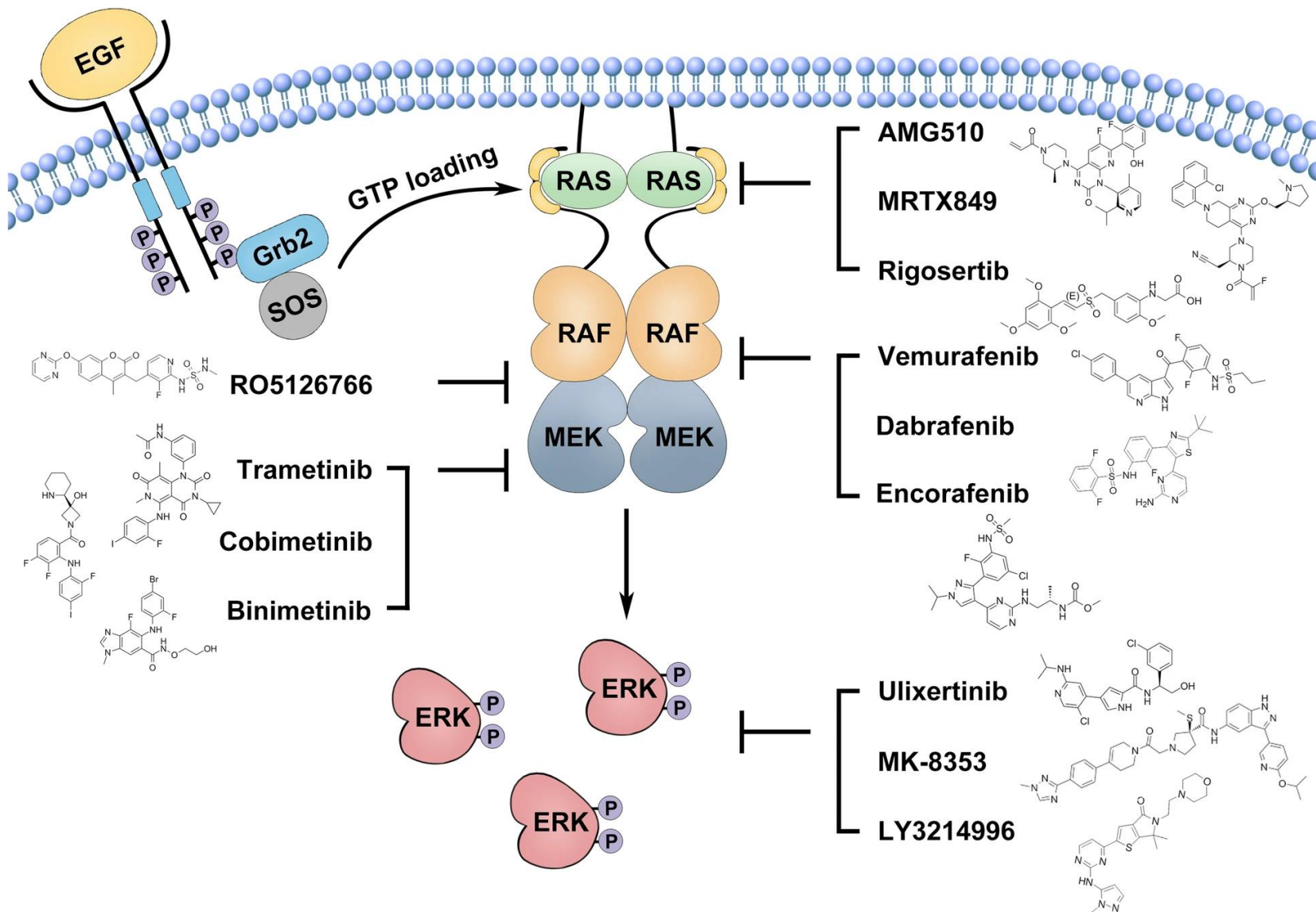


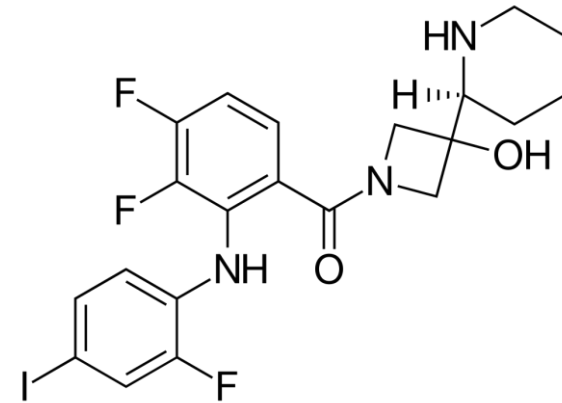
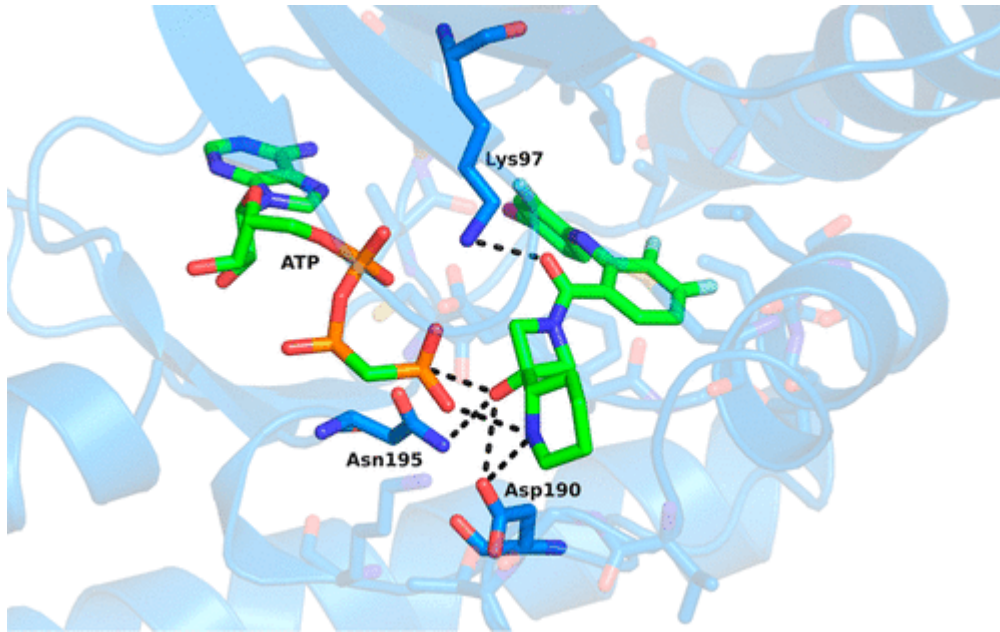
- **Αναστολείς του διμερισμού – αλλοστερικοί αναστολείς τύπου IV**

Η πρόσδεση μορίων στην περιοχή επαφής των δύο πρωτομερών εμποδίζει τον διμερισμό της BRAF και διακόπτεται η παράδοση ενεργοποίηση (μακροκυκλικοί αναστολείς τύπου IV- σε προκλινική ανάπτυξη).

J. Med. Chem. 2019, 62, 8, 3886–3897

• Ανάπτυξη αναστολέων της MEK για συνδυαστικό σχήμα.





Το **Cobimetinib** είναι **αλλοστερικός αναστολέας τύπου III των MEK1/2**, που σταθεροποιεί την ανενεργή τους διαμόρφωση. Ο συνδυασμός **vemurafenib+cobimetinib** αποδείχθηκε πολύ αποτελεσματικός κλινικά, χωρίς συμπτώματα παράδοξης ενεργοποίησης, με σχετικά ήπιες παρενέργειες και μικρότερη πιθανότητα εμφάνισης νέων μεταλλάξεων, έναντι της μονοθεραπείας με vemurafenib.

Επίσης αποτελεσματικοί (εγκρίθηκαν έναντι μελανώματος) είναι και οι υπόλοιποι 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)*

