

Léčiva chronické myeloidní leukemie

Zpracováno podle přehledného článku: G.L. Lambert, A.-K. Duhme-Klair, T. Morgan, M.K. Ramjee, The background, discovery and clinical development of BCR-ABL inhibitors. *Drug Discovery Today*, **2013**, *18* (19-20): 992-1000 a některých dalších podkladů

Vývoj inhibitorů BCR-ABL jako léčiv chronické myeloidní leukemie (CML) může sloužit za příklad racionálního přístupu k objevům cílených protinádorových léčiv – inhibitorů proteinkinas. Objasnění mechanismu onemocnění umožnilo identifikaci cílové struktury, což pak vedlo k výzkumu a vývoji, který vyústil v uvedení imatinibu (Glivec/Gleevec, Novartis) na trh jako prvního povoleného inhibitoru BCR-ABL. Nadšení nad jeho klinickým úspěchem brzy opadlo, když se objevily projevy rezistence. Racionální návrh léčiv vycházející z hypotéz o příčinách rezistence a strukturních poznatků ale záhy přinesl další generace inhibitorů, které nabídly lékařům i pacientům další možnosti terapie.

Milníky tohoto vývoje lze ilustrovat následující přibližnou časovou řadou:

- 1960** – u pacientů s chronickou myeloidní leukémií byl zjištěn filadelfský chromosom
- 1972** – byla zjištěna chromosomální mutace – translokace genů mezi chromosomy 9 a 22
- 1986** – při mapování lidského genomu byl identifikován protoonkogen *ABL* a fúzní gen *BCR-ABL*
- 1990** – bylo potvrzeno, že fúzní gen *BCR-ABL* je příčinou chronické myeloidní leukemie
- 1996** – byla připravena látka CGP 51148 selektivně inhibující kinasu BCR-ABL jak *in vitro*, tak i *in vivo*
- 2000** – klinické zkoušky prokázaly účinnost CGP 51148 (nové kódové označení STI 571) při léčbě CML
- 2001** – imatinib (STI 571) byl schválen FDA jako lék CML
- 2004** – zahájeny klinické zkoušky druhé generace tyrosinkinas s cílem překonat rezistenci
- 2006** – dasatinib byl povolen FDA jako první zástupce druhé generace léků CML
- 2007** – nilotinib povolen FDA pro léčbu CML
- 2012** – v září povolen FDA bosutinib a v prosinci ponatinib pro léčbu CML
- 2013** – ponatinib byl v říjnu dočasně stažen z trhu pro závažné vedlejší účinky (vytváření krevních sraženin), v prosinci znovu uvolněn s tím, že dokumentace byla doplněna o příslušné varování
- 2014** – v klinickém zkoušení jsou inhibitory třetí generace s podobnou účinností jako ponatinib, ale omezenými vedlejšími účinky

Tyrosinové proteinkinasy

Kinasy jsou velkou skupinou enzymů, které přenášejí koncovou fosfátovou skupinu adenosintrifosfátu (ATP) na substrát, kterým může být bílkovina nebo lipid. Na přenosu se jako kofaktor podílejí koordinací vazbou hořčnaté ionty. Produktem je adenosindifosfát (ADP) a fosforylovaný protein nebo lipid. Tyrosinové proteinkinasy přitom fosforylují hydroxylovou skupinu tyrosinového zbytku na specifickém místě molekuly bílkoviny. V lidském genomu bylo identifikováno asi 500 genů kódujících různé kinasy. Ty se vyskytují všech buňkách. Zprostředkovávají celou řadu důležitých buněčných procesů – přenos signálů, transkripci genů, diferenciaci buněk i jejich odumírání. Vzhledem k jejich klíčovému významu pro buněčné procesy je aktivita proteinkinas přísně regulována systémem zpětných vazeb, regulačních bílkovin i nebílkovinných faktorů. Narušení tohoto systému regulace nebo abnormální kinasová aktivita může být příčinou některých onemocnění, zejména rakoviny. Na základě informací o lidském genomu bylo identifikováno několik kinas jako potenciálních cílových struktur pro terapii, především v onkologii.

Chronická myeloidní leukemie

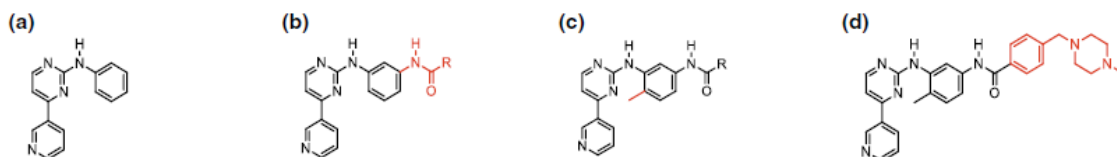
Chronická myeloidní leukemie (CML) je hematologickým onemocněním, rakovinou bílých krvinek kostní dřeně. Její příčinou je ztráta regulace aktivity tyrosinové proteinkinasy Abl1. Tato kinas je protoonkogenem, který se účastní buněčné signalizace, diferenciaci a migrace buněk.

Velkým milníkem bylo při hledání terapie CML zjištění přímé souvislosti onemocnění s její molekulárně biologickou podstatou. Při CML dochází ke ztrátě regulace aktivity kinas Abl v důsledku vzájemné chromosomální translokace mezi chromosomy 9 a 22. Výsledkem je spojení genu klastru místa přerušování *BCR* (breakpoint cluster region) s Abelsonovým genem *ABL* za vzniku fúzního genu *BCR-ABL*.

Chromosom 22 se přitom zkrátí, což se projeví změnou jeho tvaru – vznikne „ Filadelfský chromosom“ (Ph) charakteristický pro CML. Mutovaný fúzní gen kóduje trvale aktivní proteinkinasy BCR-ABL. Její aktivita není nijak regulována. Identifikace proteinkinasy BCR-ABL jako molekulárního cíle vedlo k hledání jejího inhibitoru jako léčiva CML. Výsledkem byl první inhibitor – imatinib. Ten sice byl úspěšný i v jiných indikacích, ale vznik rezistence vyvolal potřebu hledat další generace inhibitorů.

Objev a optimalizace struktury imatinibu (Glivec/Gleevec, STI 571, CP57148, Novartis)

Cestu k objevu imatinibu zahájila spolupráce Jürga Zimmermana a jeho kolegů z Ciba-Geigy (dnes Novartis) s Brianem Drukerem z Oregonské univerzity. Jako potenciální inhibitory řady tyrosinových proteinkinás byly při screeningu různých látek identifikovány deriváty fenylaminopyrimidinu s navázanou 3-pyridylovou skupinou v poloze 4-pyrimidinového jádra jako inhibitory receptoru pro destičkový růstový faktor PDGF¹, který je spřažen s kinasou hrající významnou roli v angiogenezi, vzniku nových cév. Základní molekula (a) pak byla modifikována pro inhibici různých dalších proteinkinás. Zavedením amidové funkce do m-polohy benzenového jádra (b) byla zlepšena selektivní inhibiční aktivita vůči fúzní kinase BCR-ABL. Pak následovaly modifikace molekuly. Zavedením methylskupiny do polohy 6 benzenového jádra (c) byla potlačena nežádoucí inhibice proteinkinasy C. Nakonec byla zavedením vysoce polárního N-methylpiperazinového zbytku zvýšena biologická dostupnost léčiva a zlepšena rozpustnost. Výsledkem byla molekula, která dostala generický název imatinib² (d).



Preklinické testy prokázaly, že látka inhibuje proliferaci buněk obsahujících fúzní gen *BCR-ABL* a tím naznačily, že by mohla sloužit k léčbě CML. Následné testy *in vivo* potvrdily preklinické výsledky. Úspěšné klinické zkoušky pak vedly k urychlenému povolení imatinibu pro léčbu pacientů s CML.

Vazba imatinibu na cílovou kinasu

Pro nedostatek strukturních údajů byl empirický přístup k objevu a vývoji imatinibu biochemicky podložen až dodatečně. Ze sekvenování enzymů vyplynulo, že vazebné místo pro ATP je u řady kinás stejné, je „zakonzervováno“. Zdálo se proto, že selektivní inhibice určité kinasy může být nedosažitelná. Postupně získávané rentgenografické údaje o krystalové struktuře kinás ale odhalily některé nuance v geometrickém uspořádání jejich molekul. Pro urychlené dosažení výsledků byla místo fúzní kinasy BCR-ABL ke strukturním a biochemickým studiím použita snáze dostupná kinasa Abl. Jelikož kinasy mají v katalytickém centru identickou sekvenci aminokyselin, bylo možné na základě studia Abl predikovat inhibici BCR-ABL, přestože fúzní protein je tetramerní a vyskytuje se v komplexech s ostatními bílkoviny.

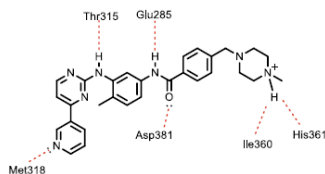
Způsob vazby imatinibu byl při absenci krystalografických údajů predikován studiem *in silico* s homologním modelem založeným na vazebném místě tyrosinové proteinkinasy specifické pro lymfocyty (LCK) Z predikce vyplynulo, že imatinib se váže na aktivní konformaci enzymu. Když pak ale byly dostupné rentgenokrystalografické struktury dalších kinás³ byla vyslovena alternativní hypotéza o způsobu vazby inhibitoru. Aby byly překonány některé problémy, byly připraveny kokrystaly Abl s analogem imatinibu. Jejich strukturní analýza naznačila, že imatinib se váže na inaktivní konformaci Abl, což bylo v rozporu s počítačovou predikcí. Vazbu na inaktivní konformaci ale potvrdily další krystalografické experimenty a také NMR studium vazby inhibitoru na enzym v roztoku.

¹ J. Zimmerman *et al.*, Phenylamino-pyrimidine (PAP) derivatives: A new class of potent and highly selective PDGF-receptor autophosphorylation inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996** 6: 1221-6.

² J. Zimmerman *et al.*, Potent and selective inhibitors of the Abl kinase: Phenylamino-pyrimidine (PAP) derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997** 7: 187-192

³ X-ray crystallographic data of kinases: www.rcsb.org/pdb/results/timeline.do?grid=C19A9BSA

Imatinib se váže do oblasti vazby ATP, což je štěrbinina mezi dvěma laloky terciární struktury kinasy. Tato oblast obsahuje tři konzervované aminokyselinové zbytky Asp381-Phe382-Gly383 nazývané podle jednopísmenných kódů aminokyselin DFG motiv. Pro účinnou katalýzu musí motiv zaujmout konformaci „DFG-in“, která umožňuje navázání ATP. V inaktivním stavu má kinasa konformaci „DFG-out“, kdy se vedle vazebného místa vytváří hydrofobní kapsa. Imatinib se na enzym váže 6 vodíkovými vazbami přes vazebné místo pro ATP a hydrofobní kapsu. Dusík pyridinového cyklu a kyslík karbonylové skupiny jsou přitom protonakceptory, amidové skupiny zbytků Met318 a Asp381 protondonory. Protonizovaná N-methylskupina methylpiperazinu je protondonorem pro karbonylové skupiny zbytků Ile360 a His361. Sekundární aminoskupina slouží jako donor protonu pro hydroxylovou skupinu postranního řetězce Thr315 zatímco vodík amidové NH skupiny je donorem pro karboxylátový anion postranního řetězce Glu285:



Kromě toho vazbu imatinibu na inaktivní konformaci kinasy zesilují π - π interakce mezi pyrimidinovými a pyridinovými kruhy a aromatickými zbytky Phe382 a Phe 317. Stabilitu vazby imatinibu ještě dále zesilují van der Waalsovské interakce⁴.

Rezistence na imatinib

Vznik rezistence utlumil klinický úspěch imatinibu a u některých pacientů způsobil návrat choroby. Analýza kinasy rezistentní vůči inhibici imatinibem odhalila bodovou mutaci v místě vazby ATP na BCR-ABL, kterou byla snížena afinita léčiva k enzymu. Při nejčastější mutaci označované BCR-ABL^{T315I} je „vrátný“ aktivního místa enzymu, threoninový zbytek v poloze 315, nahrazen isoleucinem. Vodíková vazba mezi molekulou léčiva a hydroxylovou skupinou threoninu se tak nemůže vytvořit. Objemný postranní řetězec isoleucinu stericky dále oslabuje interakci imatinibu s BCR-ABL^{T315I}. Výsledkem je, že se afinita léčiva k jeho cílové struktuře asi 20 x sníží⁵. K dosažení stejného účinku terapie je pak třeba zvyšovat dávky léčiva. Kromě zmíněné bodové mutace mohou ke vzniku rezistence přispívat i další faktory, jako je amplifikace genu *BCR-ABL* a zvýšená tvorba nebo aktivita transportního glykoproteinu, který „pumpuje“ léčivo ven z buňky.

Vznik rezistence vedl ke snahám o vyvinutí druhé generace inhibitorů kinasy BCR-ABL, které by při zachování účinnosti vůči původnímu typu kinasy rezistenci překonávaly. Přitom se uplatňovaly rostoucí znalosti o vazbě léčiva na enzym a o vztazích mezi strukturou a reaktivitou (SAR)

Druhá generace inhibitorů tyrosinových proteinkinás

Při objevování inhibitorů kinasy BCR-ABL se uplatnilo více přístupů založených na využití rozdílných aspektů způsobu vzájemných interakcí inhibitoru s enzymem. Většinu nových inhibitorů lze rozdělit podle způsobu jejich vazby do dvou podskupin. Inhibitory typu 1 se váží, podobně jako ATP, na aktivní konformaci vazebného místa enzymu „DFG-in“. Brání fosforylaci bílkovin tím, že kompetitivně blokují vazebné místo pro ATP. Mohou ale být málo selektivní vzhledem k zakonzervované struktuře vazebného místa kinas pro ATP. Naproti tomu se inhibitory typu 2 váží do hydrofobní kapsy sousedící s vazebným místem pro ATP, která se vytváří v konformaci „DFG-out“. Tato konformace, při níž se nezbytný kosubstrát fosforylace ATP nemůže na kinasu navázat, je interakcemi enzymu s inhibitorem fixována. Selektivita inhibitorů je přitom dosahována vazbou na místa aminokyselinového řetězce

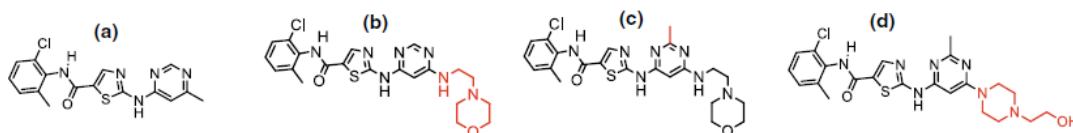
⁴ B. Nagar *et al.* Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with small molecule inhibitors PDI173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res.*, **2002**, 6: 4236-4243

⁵ Apperley J.F., Part I: Mechanism of resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Lancet Oncol.*, **2007**, 8: 1018-1029.

vytvářejícího v inaktivní konformaci enzymu hydrofobní kapsu. Struktura této “kapsy” není tak zakončována jako struktura aktivního místa. Mezi inhibitory typu 2 lze zařadit imatinib.

Dasatinib (Sprycel, BMS-354825, Bristol-Myers-Squibb)

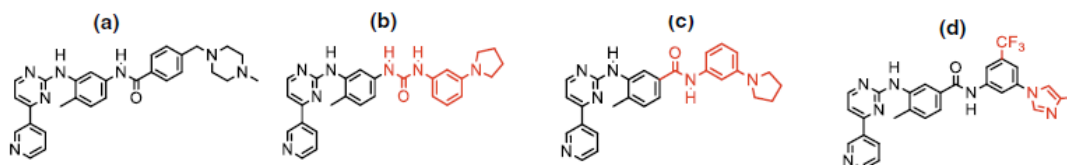
Hledání další generace inhibitorů vycházelo ze snahy využít k jejich vazbě jiná místa molekuly enzymu než je vazebné místo pro ATP. Ze zakončování jeho struktury vyplynulo, že nebude snadné dosáhnout požadované selektivity. Selektivní inhibice příbuzných kinas by ale mohla mít pozitivní efekt v tom, že by se snížila celková kinasová aktivita buněk. Při vysokokapacitním screeningu byl identifikován derivát aminothiazolu (a) jako inhibitor tyrosinových proteinkinaz sarkomu Src. Podobně jako Abl je i kinasa Src protoonkogenem. Inhibicí Src jsou blokovány signální dráhy podílející se na přeměně buňky na nádorovou. Derivát aminothiazolu přitom inhiboval i kinasu Abl⁶. Struktura hitu screeningu byla optimalizována pro inhibici tyrosinové proteinkinasy specifické pro lymfocyty Lck, kinasy patří do rodiny kinas Scr. Zavedením morfolinopropylaminoskupiny (b) byly zlepšeny farmakokinetické vlastnosti. Methylskupina v poloze 2 zlepšila účinnost, ale zhoršila biologickou dostupnost (c). Dobrá biologická dostupnost pak byla obnovena zavedením N-2-hydroxyethylpiperazinyl skupiny, přičemž rezultoval dasatinib (d):



Dasatinib se váže na aktivní konformaci Abl („DFG-in“). Místo vazby pro ATP je přitom blokováno aminothiazolovým seskupením. Vazbu inhibitoru zajišťují tři vodíkové vazby, z nichž na dvou se podílí zbytek Met318 aminokyselinového řetězce enzymu. Dusík aminothiazolového kruhu přitom interaguje s -NH- skupinou methioninového zbytku, zatímco vodík sekundární aminoskupiny dasatinibu s karbonylovou skupinou. Třetí vazba se vytváří mezi amidoskupinou dasatinibu a hydroxylovou skupinou Thr315. Vazbu inhibitoru ještě zesilují van der Waalsovy interakce⁷. Odlíšná vazba inhibitoru na enzym podporuje jeho aktivitu vůči 14 z 15 rezistentních mutant BCR-ABL, výjimkou je BCR-ABL^{T315I}.

Nilotinib (Tasigna, AMN107, Novartis)

Současně s vývojem dasatinibu pokračovala další optimalizace struktury imatinibu (a) založená na vztazích mezi strukturou a aktivitou. Na základě strukturálních studií bylo předpokládáno, že nahrazení 4-(N-methylpiperazinyl)methylfenylskupiny okupující hydrofobní kapsu pyrrolidinovým substituentem by mohlo zvýšit afinitu inhibitoru k enzymu. Aby mohl být prozkoumán konformační prostor a vazebný potenciál při zachování vodíkových vazeb s aminokyselinovými zbytky Glu286 a Asp381, byla amidová skupina nahrazena močovinovým seskupením (b). Další optimalizace pak vedla ke struktuře s obrácenou amidovou skupinou, což se projevilo zaujetím konformace molekuly, která byla výhodnější pro vznik vodíkových vazeb (c). Nakonec byl pyrrolidinový zbytek nahrazen methylimidazolovým a do benzenového jádra byla zavedena trifluormethylskupina. Vznikl nilotinib (d)⁸, který díky zesíleným hydrofobním interakcím byl 10-50 x účinnějším inhibitorem BCR-ABL než imatinib:



⁶ Wityak J. Discovery and initial SAR of 2-amino-5-carboxamidothiazoles as inhibitors of the Scr family kinase p56(Lck). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13: 4007-4010

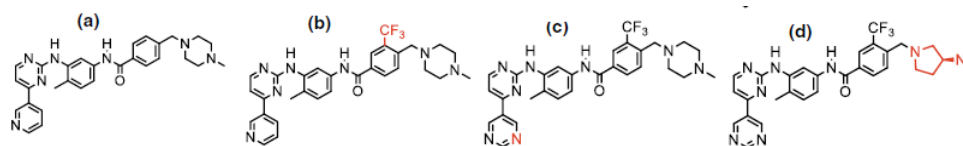
⁷ Tokarski J.S. *et al.* The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants. *Cancer Res.* **2006**, 66: 5790-7

⁸ Manley P.W., Zimmermann J., Drug research leading to imatinib and beyond imatinib v *knize Polypharmacology in Drug Discovery* (ed. Peters J.-U.), John Wiley and Sons Inc., 409-421

Strukturní studie potvrdily, že vazba nilotinibu na kinasu Abl je podobná jako vazba imatinibu. K vazbě nilotinibu na enzym přispívají dále dipolární interakce: elektronegativní atomy fluoru interagují s elektropozitivním karbonylem zbytku Asp381. Trifluormethylskupina se podílí i na hydrofobních interakcích. Výsledkem posílení vazby inhibitoru je zajištění dostatečné aktivity vůči různým bodovým mutacím kinasy, výjimkou ale je opět aktivita vůči mutované formě BCR-ABL^{T315I}. Rezistence je podobně jako u imatinibu způsobena významem vodíkové vazby inhibitoru s Thr315 pro aktivitu.

Bafetinib (INNO-406, NS-187, CNS-9, Inovive)

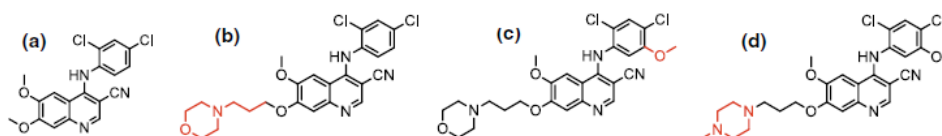
Vývoj bafetinibu byl obdobný jako v případě nilotinibu. Návrh jeho molekuly se opíral o výsledky rentgenové krystalografie. Pečlivá analýza vazby imatinibu na enzym vedla ke zjištění, že hydrofobní kapsu neaktivní formy enzymu okupuje fenyl sousedící s N-methylpiperazinylovou skupinou. Bylo předpokládáno, že substituce fenylu hydrofobní skupinou posílí interakce léčiva s hydrofobní kapsou a tím zvýší účinnost léčiva. Asaki⁹ studoval vztah mezi inhibičními koncentracemi a hydrofobitou a velikostí substituentů v meta poloze. Na základě modelování molekulové mechaniky a dokování dovedl, že hydrofobní substituent v meta poloze k amidové funkci posílí interakce s hydrofobní kapsou. Blízkost substituentu omezila volnou rotaci N-methylpiperazinové části. Tím vším byla posílena vazba léčiva a tím i jeho účinnost. Jako substituent vhodné velikosti a hydrofobity byla zvolena trifluormethylskupina (b). Vzrůst hydrofobity ale znamenal pokles rozpustnosti v biologických tekutinách. Bylo předpokládáno, že náhrada koncového pyridinu za polárnější substituent rozpustnost zlepší. Ukázalo se však, že přítomnost pyridinu v molekule stabilizuje π - π interakcí se zbytkem Tyr253 inaktivní formu kinasy. Řešením byla náhrada pyridinového kruhu za pyrimidinový – stabilizující interakce zůstala zachována a přitom se zvýšila rozpustnost léčiva (c). Nakonec byla N-methylpiperazinová skupina nahrazena 3-dimethylaminopyrrolidinovou, čímž byla při zachování vodíkových vazeb s Ile360 a His361 zvýšena účinnost (d). Byl tak získán bafetinib, který byl 10 x účinnější než imatinib:



Na vazbě bafetinibu na kinasu se stejně jako u imatinibu podílelo 6 vodíkových vazeb s aminokyselinovými zbytky Met318, Thr315, Glu286, Asp381, Ile360 a His361. Komplex bafetinibu s enzymem byl ale dále stabilizován hydrofobní interakcí CF₃ skupiny s hydrofobní kapsou tvořenou aminokyselinovými zbytky Ile293, Leu298, Leu354 a Val379. Ačkoliv byl bafetinib účinný i v případě některých rezistentních mutant, zůstával opět inaktivní v případě klinicky významné mutanty BCR-ABL^{T315I}.

Bosutinib (Bosulif, SKI-606, Pfizer)

Stejně jako dasatinib byl i bosutinib původně vyvíjen jako inhibitor kinasy Scr. Při screeningu knihovny sloučenin byl jako vodítko pro další vývoj identifikován derivát chinolinkarbonitrilu (a). Při optimalizaci (především pro inhibici kinasy Scr) bylo zjištěno, že pro zajištění aktivity jsou potřebné anilínový, nitrilový a 6-methoxylový substituent. Náhrada 4-chloranilinu nebo 6-methoxylylu za objemnější substituenty měla za následek snížení aktivity. Postupná optimalizace nakonec poskytla bosutinib (d)¹⁰.



Při testování inhibitoru se ukázalo, že bosutinib kromě kinasy Scr inhibuje rovněž kinasu BCR-ABL. Je inhibitorem typu 2. Při interakci s enzymem se uplatňuje jen jedna vodíková vazba mezi chinolinovým

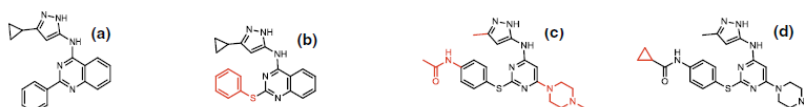
⁹ Asaki T. *et al.*, Design and synthesis of 3-substituted benzamide derivatives as Bcr-Abl kinase inhibitors. *Bio-org. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16: 1421-5

¹⁰ Boschelli D.H. *et al.*, Optimization of 4-phenylamino-3-quinoline carbonitriles as potent inhibitors of Scr kinase activity. *J. Med. Chem.* **2001**, 44: 3965-3977

dusíkem a NH skupinou zbytku Met318 polypeptidového řetězce. Lipofilní 2,4-dichlor-5-methoxyanilínová skupina okupuje hydrofobní kapsu v sousedství vazebného místa pro ATP, van der Waalsovy interakce stabilizují vazby u zbytku Thr315 obklopeného nitrilovou skupinou a methoxyem substituované anilínové skupiny. Vzhledem k tomu, že nitrilová skupina je jediným fragmentem, který může stericky bránit vazbě inhibitoru na mutovaný enzym, v jehož molekule je threonin nahrazen izoleucinem, mohlo by odstranění této skupiny poskytnout látky účinné proti mutantě BCR-ABL^{T315I}.

Tozasertib (VX-680, MK-0457)

Tozasertib byl původně vyvinut jako inhibitor kinasy Aurora. Při prvním screeningu byla identifikována sloučenina aminopyrazolu a chinazolinu (a) jako neselektivní inhibitor enzymu. Podobně jako kinasa BCR-ABL má i Aurora kinasa aktivní a neaktivní konformaci. Ze struktury kokryystalu enzymu s inhibitorem vyplynulo, že inhibitor interaguje s vazebným místem pro ATP v neaktivním stavu. Hydrofobní kapsa tak představovala potenciál pro optimalizaci vazebných interakcí inhibitoru pro zvýšení selektivity. Byly syntetizovány řady látek s cílem určit nejvhodnější substituenty pro optimalizaci afinity k hydrofobním skupinám kapsy při zachování dostatečné rozpustnosti. Vložení thioetherové spojky do molekuly vodítkové látky (b) zesílilo interakce se skupinami hydrofobní kapsy a tím i selektivitu pro kinasy Aurora. Zavedením acetamidové skupiny byla zvýšena rozpustnost (c). Vývoj tozasertibu (d) byl dokončen náhradou methylu acetamidoskupiny za cyklopropyl, čímž byly dále posíleny hydrofobní interakce inhibitoru:



Při preklinických zkouškách se ukázalo, že kromě kinasy Aurora inhibuje tozasertib i kinasu BCR-ABL, a to včetně mutantů BCR-ABL^{T315I}. Přestože byl tozasertib vyvíjen jako inhibitor typu 2 pro Aurora kinasu, pro kinasu BCR-ABL je inhibitorem typu 1, protože se váže na aktivní konformaci enzymu. Do vazebného místa pro ATP se tozasertib váže 4 vodíkovými vazbami. Dvě z nich se vytváří mezi dvěma dusíky methylpyrazolu a karbonylovou resp. amidovou skupinou zbytku Met318. Další vodíková vazba je mezi aminoskupinou sousedící s pyrazolovým kruhem a karbonylem zbytku Glu315 v polypeptidickém řetězci. Čtvrtá vodíková vazba mezi amidovým dusíkem a zbytkem Asp381 stabilizuje aktivní konformaci „DFG-in“. N-Methylpiperazinová část molekuly zasahuje mimo kinasovou doménu a je vystavena vodnímu prostředí na povrchu kinasy. Mezi tozasertibem a zbytkem Thr315 nedochází k žádné vazebné interakci a ani náhrada threoninu na izoleucin nepředstavuje žádnou sterickou zábranu. Tozasertib proto inhibuje i mutantní kinasu BCR-ABL^{T315I} a mohl by tak být léčivem i pro terapii rezistentní CML.

Klinické zkoušky tozasertibu ale musely být z bezpečnostních důvodů ukončeny ve fázi II¹¹, protože při podávání tozasertibu docházelo u pacientů prodloužení QTc intervalu¹².

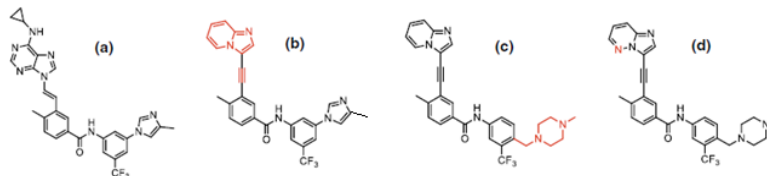
Ponatinib (Iclusig, AP245345, ARIAD Pharmaceuticals)

Ponatinib je výsledkem racionálního návrhu léčiva využívajícího počítačové postupy. U aryloethenylpurinu (a) byla zjištěna inhibice BCR-ABL. Struktura výchozí vodítkové látky byla optimalizována s cílem překonat rezistenci mutantní formy kinasy BCR-ABL^{T315I} při zachování inhibiční aktivity pro původní nemutovanou formu. Nahrazením ethenylové skupiny za ethynylovou (b) byla překonána sterická zábrana interakce způsobená isoleucinovým zbytkem mutantního enzymu. Ethynylová spojka přitom zajistila zaujetí konformace požadované pro entropicky upřednostněnou vazbu na cílový en-

¹¹ Boss D.S. *et al.* Clinical experience with Aurora kinase inhibitors: A review. *The Oncologist*, **2009**, *14*: 780-793

¹² Jde o interval mezi začátkem Q vlny a koncem T vlny elektrického cyklu srdce korigovaný na tepovou frekvenci. Zjišťuje se pomocí EKG. Interval reprezentuje dobu od začátku depolarizace do konce repolarizace srdeční svaloviny. Jeho prodloužení nad hraniční hodnoty, které může být způsobeno mj. i podáním některých léčiv, je spojeno s 60% nárůstem rizika arytmií, jako je fibrilace srdečních síní, což může vést i k náhlé srdeční smrti. Od r. 2005 proto FDA i EMA požadují, aby při klinických zkouškách bylo zjišťováno, zda léčivo interval neprodlužuje.

zym. Nahrazením imidazolového substituentu N-methylpiperazinem (c) byla zlepšena rozpustnost i biologická dostupnost. Při optimalizaci byl ještě 6-cyklopropylaminopurinový zbytek nahrazen nejprve za imidazopyridin (b) a pak za imidazo[1,2-b]pyridazin (d), čím byl dále zlepšen farmakokinetický profil látky¹³



Ponatinib (d) se váže na inaktivní konformaci kinasy „DFG-out“ 5 vodíkovými vazbami. Imidazolový dusík imidazopyridazinu interaguje přitom s amidovou skupinou zbytku Met318, amidový karbonyl vytváří vodíkovou vazbu s amidovou skupinou Asp381 polypeptidického řetězce, amidový dusík léčiva se váže na karboxylátovou skupinou postranního řetězce Glu285. N-Methylpiperazin vytváří dvě vodíkové vazby s karboxyly Ile360 a His361 polypeptidické kostry bílkoviny. Imidazo[1,2-b]pyridazinový zbytek se účastní van der Waalsovských interakcí s oběma laloky vazebného místa kinasy; šestičlenný heterocykl interaguje s Phe382 a Tyr253. Methylfenylový fragment okupuje hydrofobní kapsu sousedící s Thr315, zatímco trifluormethylfenylový fragment interaguje se skupinami hydrofobní kapsy konformace „DFG-out“. Ethynylová spojka je nutná pro schopnost inhibitoru vázat se jak na přirozenou, tak i mutantní kinasu: může se účastnit výhodných interakcí jak s Thr315, tak i Ileu 315 mutantu. Rigidita ethynylové skupiny zajišťuje správnou orientaci a konformaci inhibitoru ve vazebné šterbině, což pro jeho interakce přináší zřetelnou entropickou výhodu¹⁴.

Přes minimální rozdíl v charakteru vzájemných interakcí inhibuje ponatinib původní „divokou formu“ enzymu 5-7 x účinněji než mutantní formu enzymu. Při vazbě inhibitoru na mutantní formu ABL^{T315I} byla zjištěna malá odchylka v jeho konformaci: aby byly zajištěny příznivé interakce a zmenšena sterická kolize je přitom methylfenylový kruh mírně vychýlen ven z hydrofobní kapsy¹⁵. Tato změna pak je patrně příčinou snížení účinnosti při inhibici mutované formy enzymu.

V prosinci 2012 obdržela firma ARIAD Pharmaceuticals předběžný souhlas FDA s uvedením ponatinibu na trh. Bylo to již na základě příznivých výsledků fáze II klinických zkoušek v rámci programu zrychleného schvalování. Po podání ponatinibu byla dosažena pozitivní odezva u dvou třetin pacientů s rezistentní formou CML, přičemž to bylo u všech pacientů s mutací T315I. Firma ARIAD ale musela v souladu s podmínkami urychleného schvalování pokračovat v klinickém zkoušení. Zkouška fáze III nazvaná EPIC (Evaluation of Ponatinib versus Imatinib in CML) byla ale v říjnu 2013 přerušena na základě požadavku FDA. Ponatinib musel být stažen z trhu, protože u léčených pacientů docházelo ve zvýšené míře k tvorbě krevních sraženin. O několik týdnů později ale byl prodej léku znovu povolen. Na základě požadavku FDA musel ovšem přitom být doprovodný leták přípravku Iclusig doplněn o varování před zjištěnými závažnými vedlejšími účinky. Výrobce byl ze strany veřejnosti také kritizován za příliš vysokou cenu terapie (cca 140 tis. \$ ročně).

V Evropě byl ponatinib povolen v r. 2013.

Závěr

Pokrok dosažený v oblasti inhibitorů tyrosinových proteinkinaz zřetelně ukazuje na schopnost farmaceutických věd úspěšně se zapojit do léčení lidských onemocnění.

¹³ Huang W.S. *et al.*, Discovery of 3-[2-(imidazo[1,2-b]pyridazin-3-ylethynyl)-4-methyl-N-{4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]-3-(trifluoromethyl)phenyl}benzamide (AP24534), a potent, orally active pan-inhibitor of breakpoint cluster region –Abelson (BCR-ABL) kinase including the T315I gatekeeper mutant. *J. Med. Chem.*, **2010**, 53: 4701-4719

¹⁴ O'Hare T. *et al.*, AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer Cell*, **2009**, 16: 401-412

¹⁵ Zhou T. *et al.*, Structural mechanism of the pan-BCR-ABL inhibitor ponatinib (AP24534): lessons for overcoming kinase inhibitor resistance. *Chem. Biol. Drug Des.* **2011**, 7(1): 1-11

Imatinib byl vyvinut na základě pochopení biologické podstaty onemocnění chronickou myeloidní leukemií. V té době ještě nebyl k dispozici dostatek dat, takže vývoj léčiva mohl vycházet pouze z výsledků screeningu látek. Přesto se imatinib stal jedním z prvních cílených léčiv a stál u zrodu vývoje dalších inhibitorů tyrosinových proteinkinas. Kromě léčby CML se imatinib uplatnil i v dalších onkologických indikacích. Jeho úspěšnost ale poněkud znehodnotil vznik rezistence nádorových buněk, který si vyžádal vývoj nových selektivních inhibitorů.

Vývoj nových léčiv je stále více usnadňován prohlubujícími se poznatky biochemie a molekulární biologie, pochopením příčin inhibice enzymů, novými fyzikálně chemickými metodikami strukturní analýzy a algoritmy pro počítačové modelování interakcí léčiv. Nové poznatky se přitom neuplatňují jen při vývoji dalších generací inhibitorů tyrosinových proteinkinas, ale i léčiv pro jiné oblasti terapie. Pokračující rozvoj bioinformatiky, jakož i rozvoj diagnostiky (zahrnující genomické a proteomické techniky) umožňuje postupné uplatňování personalizované terapie, kdy léčebné postupy medicíny založené na důkazech mohou být specificky navrhovány podle potřeb konkrétních pacientů.