



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Lea Barbarić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Proteinske kinaze kao mete lijekova

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za Biokemiju

Mentor rada: doc.dr.sc. Aleksandra Maršavelski

Zagreb, 2019 godina.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

17. srpnja 2019.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

20. rujna 2019.

Mentor rada: doc.dr.sc. Aleksandra Maršavelski

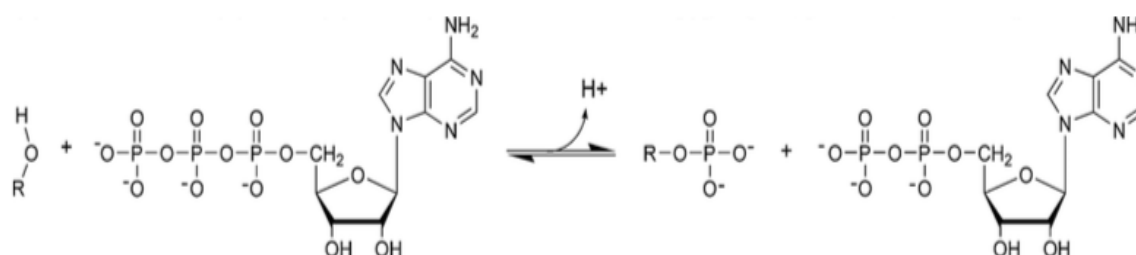
Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	vii
§ 1. UVOD	1
1.1. Fosforilacija.....	1
1.2. Proteinske kinaze.....	3
§ 2. PROTEIN KINAZE KAO METE LIJEKOVA	10
2.1. Inhibitori kinaza.....	10
2.2. Imatinib	12
2.3. Ostali lijekovi.....	14
2.4. Stečena rezistencija i lijekovi druge generacije	16
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	xviii

§ Sažetak

Za uspješnu regulaciju metabolički procesa bitna je sinergija velikoj broja različitih enzima i odgovarajućih kofaktora. Među njima se nalaze i proteinske kinaze kao neizostavni dio metabolizma i njegove regulacije. Proteinske kinaze su enzimi koji kataliziraju reakciju prijenosa terminalne (gama, γ) fosforilne skupine s molekule ATP-a na odgovarajuće proteine, tj. na njihove serinske, treoninske, tirozinske ili čak histidinske bočne ogranke. U 100 godina istraživanja, nađeno je da je fosforilacija vrlo česta posttranslacijska modifikacija s 500 000 potencijalnih mjesta fosforilacije u ljudskom proteomu i 25 000 mogućih fosforilacija za 7 000 ljudskih proteina.¹



Slika 1. Reakcija prijenosa terminalne fosforilne skupine s molekule ATP-a na akceptor R-OH (preuzeto iz ref. 1)

Postoji jako veliki broj proteinski kinaza od kojih neke nisu još ni karakterizirane. Zbog neupitne važnosti njihove uloge u fiziologiji, proteinske kinaze imaju i jako važnu ulogu u razvoju bolesti. Fosforilacija proteina je mehanizam regulacije koji je izuzetno važan u većini staničnih procesa kao što su sinteza proteina, stanična dioba, prijenos (transdukcija) signala, rast stanica, razvoj i starenje jer se mnogo enzima i receptora aktivira i deaktivira fosforilacijom/defosforilacijom djelovanjem specifičnih kinaza i fosfataza.²

Proteinske kinaze podvrgavaju se pravovremenom uništavanju ili inaktivaciji nakon što su izvršili svoju funkciju. To omogućava stanici da pravilno obavlja svoje funkcije i da prolazi kroz ciklus.³

Ljudski kinom, skup proteinskih kinaza koje su kodirane u ljudskom genomu, se sastoji od 518 gena i 106 pseudogena za protein kinaze, od koji se za 218 pretpostavlja da bi mogli biti

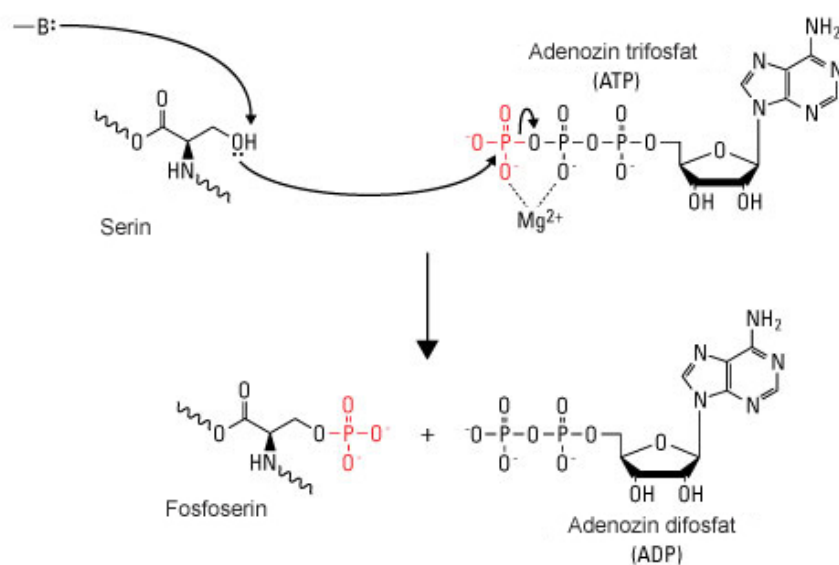
povezani s ljudskim bolestima. Promjena u regulaciji različitih protein kinaza pronađena je kod kronične mijeloične leukemije, stromalnih tumora gastrointestinalnog sustava, raznih drugih sarkoma i karcinoma, kao i kod nemalighnih poremećaja. Da bi se olakšao pronalazak učinkovitijih lijekova te da bi se poboljšala djelotvornost kliničkih studija i samog liječenja, potrebno je pomno istražiti različite načine inhibicije proteinskih kinaza i sam dizajn tih inhibitora kao potencijalnih lijekova. Na primjer, protein p53 je fosfoprotein koji se aktivira fosforilacijom i igra veliku ulogu u razvoju stanice i mehanizmima popravka DNA. Njegova funkcija je aktivirati proteine koji sudjeluju u popravku oštećene DNA, te zaustaviti rast stanice zadržavanjem staničnog ciklusa u fazi G1 kada dođe do prepoznavanja oštećenja DNA da bi se šteta mogla popraviti i da bi stanični ciklus mogao nastaviti svojim tokom. U nekim slučajevima, kada je šteta na DNA nepopravljiva, njegova aktivacija može dovesti do programirane smrti stanice (apoptoze). Neravnoteža u mehanizmu fosforilacije/defosforilacije p53 proteina može dovesti do kronične inaktivacije samog proteina, što zauzvrat može transformirati stanicu u stanicu raka.²

§ 1. UVOD

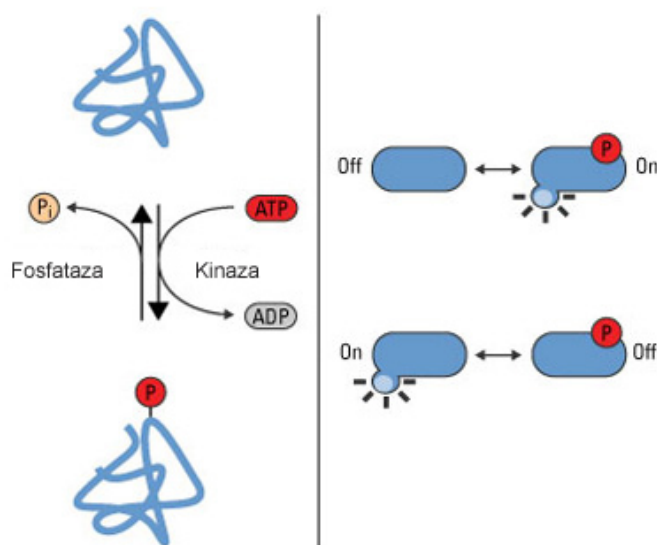
1.1. Fosforilacija

Da bi se pravilno i usklađeno odvijali metabolički putevi, potrebno je vršiti regulaciju u određenim točkama tih puteva. Postoje razne vrste regulacije među koje spada i fosforilacija proteina putem enzima koji kataliziraju tu reakciju. Ti enzimi nazivaju se proteinske kinaze. Fosforilacija je reverzibilna posttranslacijska modifikacija proteina. Reakcije fosforilacije se zapravo sastoje od prijenosa terminalne fosforilne skupine s molekule ATP na neki bočni ogranak koji sadrži hidroksilnu skupinu (serin, treonin, tirozin) proteina koji se treba fosforilirati.

Uklanjanje fosforilne skupine odvija se procesom obratnim fosforilaciji te takvu reakciju kataliziraju enzimi zvani fosfataze.



Slika 2. Prikaz fosforilacije serina. Enzimski katalizirani prijenos protona sa (-OH) skupine serina na bazu što stimulira nukleofilni napad na γ -fosfatnu skupinu ATPa, što rezultira prijenosom fosforilne skupine na serin pri čemu nastaje fosfoserin i ADP. (-B:) označava bazu enzima koja pokreće prijenos protona. (Preuzeto i prilagođeno prema ref. 4)



Slika 3. Prikaz proteinske regulacije fosforilacijom i defosforilacijom. Lijeva strana: proteinske kinaze posreduju fosforilaciju u bočnim ograncima serina, treonina i tirozina, a fosfataze reverznu fosforilaciju proteina hidrolizom fosfatne skupine. Desna strana: fosforilacija uzrokuje konformacijske promjene u proteinima koji ili aktiviraju (gornji) ili inaktiviraju (donji) protein funkcije. (Preuzeto i prilagođeno prema ref. 4)

Fosforilna skupina je pri fiziološkom pH negativno nabijena te je podosta voluminozna skupina upravo zbog čega može potaknuti konformacijske promjene proteina zbog niza elektrostatskih interakcija koje nisu bile prisutne u nefosforiliranom obliku. Na primjer, negativno nabijeni fosfoserin može stvarati nekovalentne interakcije s gvanidinskom skupinom arginina koja posjeduje delokalizirani pozitivni naboj raspoređen preko cijele skupine te takva interakcija ne bi postajala u nefosforiliranom obliku proteina. Te promjene konformacije mogu djelovati na enzim tako da ga aktiviraju ili tako da inhibiraju njegovu aktivnost. Među proteinskih kinaza su uglavnom drugi enzimi koji se fosforilacijom ili aktiviraju ili inhibiraju. Specifičnost proteinske fosforilacije ovisi o mnogim čimbenicima: samom aminokiselinskom ostatku (serin, treonin, tirozin), okolnom aminokiselinskom slijedu i konformaciji fosforiliranog motiva.¹ Proteinska fosforilacija se događa i u uređenim i u neuređenim regijama proteina. Neuređene regije obično posreduju interakcije proteina i proteina (npr. formiranje proteinskog kompleksa), sadrže mnogo više mjesta fosforilacije nego uređene regije i obogaćene su ostacima serina/treonina. Uređene regije obično kodiraju katalitičke, strukturne ili konformacijske interakcije i obogaćene su tirozinskim ostacima.

1.1.1. Zašto baš fosforilacija?

Interaktivni kapacitet fosfatne skupine uglavnom je posljedica njegovih komponenata. Jedan od njegovih glavnih elemenata je fosfor. Ima pet vanjskih elektrona koji mogu tvoriti maksimalno pet kovalentnih veza, ima tri pK_a , veliku topljivost u vodi i može tvoriti, zbog svoje svestranosti, mono, di i tri alkil i aril estere s hidroksilnim skupinama, ali i kiselinskim anhidridima.²

Fosfati su soli fosforne kiseline. Njihovu glavnu odliku čine prvenstveno tri različite točke ionizacije. Pri fiziološkom pH, fosfatne skupine se predominantno nalaze u dianionskom obliku što nije slučaj kod ijedne aminokiseline. Fosforilacija proteina kao posttranslacijska modifikacija je kemijski stabilna pri fiziološkom pH što ju čini pouzdanom za kontrolu bioloških funkcija. Stabilnosti fosfatne skupine velikim udioom doprinose elektrostatke interakcije ali u slučaju enzimske defosforilacije, uklanjanje fosfatne skupine s proteina postaje jednostavna, egzergona reakcija. Također, ono što čini fosforilaciju pogodnom za regulaciju takvih sustava je to što je ATP sveprisutna molekula te se nalazi u visokim koncentracijama u stanicama. To čini izvor fosfatne skupine lako dostupnim i fosforilaciju termodinamički povoljnim procesom.

Upravo zbog njene strukture i naboja, vezanjem fosfatne skupine na ciljani protein dolazi do niza elektrostatskih i ionskih interakcija koje potiču promjenu konformacije enzima. Jedna fosfatna skupina sposobna je stvoriti čitav niz vodikovih veza koja uveliko utječu na inter- i intramolekulske interakcije samog proteina.

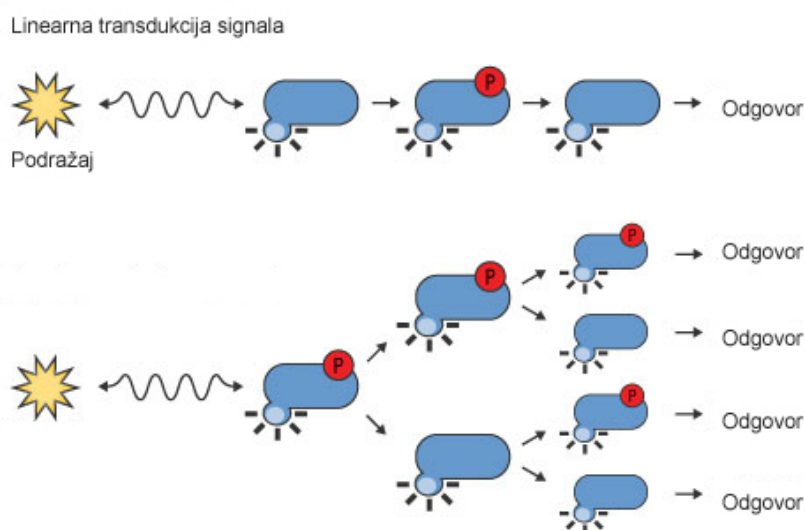
1.2. Proteinske kinaze

Kemijska aktivnost proteinskih kinaza sastoji se od prijenosa terminalne fosforilne skupine s molekule ATPa na protein sa slobodnom hidroksilnom skupinom na bočnom ogranku serina, treonina ili tirozina (O-fosforilacija). Fosforilne skupine vežu se fosfoesterskom kovalentnom vezom na proteine. ATP je substrat za gotovo sve proteinske kinaze, mada mali broj kinaza koristi i guanozin trifosfat (GTP). ATP je idealna struktura za prijenos α -, β - ili γ -fosfatnih skupina za nukleotidil-, pirofosforil- ili fosforiltransfer. Ljudski genom se sastoji od gena za 518 različitih proteinskih kinaza koje se mogu podijeliti u više podskupina koje uključuju tirozin kinaze ili serin/treonin kinaze. Studije su pokazale da je relativni omjer zastupljenosti fosfoserin: fosfotreonin: fosfotirozin aminokiselina u stanici 1800:200:1. Iako fosfotirozin nije

tako rasprostranjen kao fosfoerin i fosfotreonin, globalna fosforilacija tirozina prednjači u biomedicinskim istraživanjima zbog uloge tirozin kinaza (RTK) u ljudskim bolestima poput kronične mijeloične leukemije, stromalnih tumora gastrointestinalnog sustava, raka gusterace, raka pluća nemalih stanica, raka bubrežnih stanica i još mnogo tumora te ostalih bolesti.⁴ Postoje i kinaze koje mogu fosforilirati neke druge aminokiseline poput histidina stvarajući labilne spojeve koji sadrže fosfoamidatne veze.

Specifičnost supstrata proteinske kinaze temelji se ne samo na ciljnoj aminokiselini, već i na ostalim aminokiselinama koje okružuju aktivno mjesto i dozvoljavaju prijenos fosforilne skupine na protein. Zbog takvih aminokiselinskih sljedova koji se razlikuju od kinaze do kinaze, neke kinaze mogu fosforilirati samo pojedine proteina, dok druge posjeduju mnogo više supstrata (>300). Uz to, kinaze mogu fosforilirati pojedinačne ili više aminokiselina na istom proteinu. Također, na samoj protein kinazi mogu postojati regulatorne podjedinice koje mogu djelovati kao aktivatori ili autoinhibitori kinazne aktivnosti kinaze te mogu imati različite regulatorne supstrate. U bazalnom stanju, većina kinaza je deaktivirana i neaktivna te se njenom fosforilacijom aktivira. Mali broj kinaza je konstitutivno aktivan i nakon fosforilacije se postiže neaktivno ili neučinkovito stanje. Neke kinaze, poput kinaze Src, zahtijevaju kombinaciju fosforilacije i defosforilacije da bi postale aktivne, što ukazuje na visoku regulaciju ovog protoonkogena (gen zdravog ljudskog genoma koji zbog somatskih mutacija može postati onkogen).

Reverzibilnost ove posttranslacijske modifikacije čini fosforilaciju proteina idealnom za transdukciju signala što omogućava stanicama da brzo reagiraju na unutarstanične ili izvanstanične podražaje. Kaskade signala karakteriziraju proteini koji fizički osjećaju signalne znakove bilo da je to vezanje liganda, cijepanje ili nekom drugom vrstom odgovora koji zatim prenose na sekundarne glasnike i ostale signalne enzime. U slučaju fosforilacije, ovi receptori aktiviraju nizvodne kinaze, koji potom fosforiliraju i aktiviraju svoje srodne supstrate nizvodno, uključujući dodatne kinaze, dok se ne postigne specifičan odgovor. Kaskade transdukcije signala mogu biti linearne, u kojima kinaza A aktivira kinazu B, koja aktivira kinazu C i tako dalje.⁴ Također, postoje signalni putevi koji amplificiraju početni signal; kinaza A aktivira više kinaza, što zauzvrat aktivira dodatne kinaze. Uz ovu vrstu signalizacije, jedna molekula, poput faktora rasta, može aktivirati globalne stanične programe poput proliferacije.



Slika 4. Prikaz vrsta signalnih puteva. Vanjski i unutarnji podražaji izazivaju širok raspon staničnih odgovora kroz seriju sekundarnih glasnika i enzima. Linearni putevi transdukcije signala daju sekvencijalnu aktivaciju diskretnog broja efektora nizvodno, dok drugi podražaji izazivaju kaskade signala koji pojačavaju početni podražaj za široke ili globalne stanične odgovore. (Preuzeto i prilagođeno prema ref. 4)

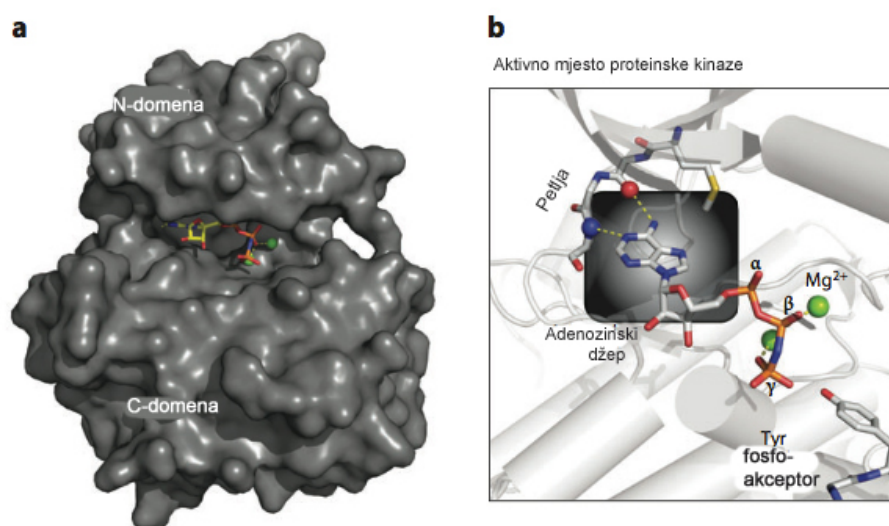
Mutacije ili oštećenja enzima koji sudjeluju u regulaciji metabolizma mogu dovesti do nepoželjne aktivacije ili poremećaja kinaznih signalnih puteva i to je osnova onkogeneze za više tumora. Rak se ne smatra samo bolešću koja proizlazi iz genetskih mutacija, već i bolešću koja je posljedica epigenetskih promjena koje uglavnom dovode do neuobičajene regulacije u prijenosu signala koji naknadno uzrokuju promjene u normalnim staničnim mehanizmima. Mnogi ključni regulatorni proteini koji kontroliraju ekspresiju gena su meta kinaza.²

1.2.1. Struktura katalitičke domene

Pošto proteinske kinaze čine veliki udio genoma, specifičnost i regulacija katalitičke aktivnosti je esencijalni dio funkcionalnosti ovih enzima. Katalitička domena, ili tzv. kinazna domena građena je od dvije glavne poddomene. Jedna od njih je manja polovica na N-kraju polipeptidnog lanca sačinjena od 5 β -ploča i jedne ključne α -zavojnice. Druga, veća polovica nalazi se na C-kraju polipeptidnog lanca te je građena primarno od α -zavojnica.¹ Te dvije katalitičke poddomene povezane su peptidnim lancem koji stvara petlju u kojoj se nalazi pukotina koja tvori aktivno mjesto enzima. Aktivno mjesto čine prednji i stražnji džep. Dok

prednji džep služi vezanju ATP-a i sadrži specifične aminokiselinske ostatke koji služe za tu svrhu, stražnji džep je hidrofoban i služi za dodatne regulacijske funkcije.

U prednjem džepu, dolazi do stabilizacije adeninskog prstena ATP-a putem vodikovih veza s peptidnom okosnicom aminokiselina koje se nalaze u petlji. Amino skupina glicina se veže na α - i β -fosforilnu skupinu ATP-a putem vodikovih veza. Regulacija kinazne aktivnosti događa se na mjestu ključne α -zavojnice i ovisi o njenoj orijentaciji i aktivacijskom segmentu koji ima mnogo različitih funkcija te se nalazi na C-kraju katalitičke domene. Na tom segmentu nalazi se aminokiselinski slijed DFG koji vezanjem iona magnezija na bočni ogranak aspartata potiče orijentiranje γ -fosforilne skupine u položaj povoljan za prijenos iste.¹ Aktivacijska petlja može mijenjati konformaciju i putem fosforilacije čime nastaje mreža vodikovih veza koje dovode do promijene u konformaciji samog aktivnog mjesta i reorganizaciji aminokiselinskih ostataka koji sudjeluju u katalizi. Do regulacije katalize znatno doprinosi i stražnji džep. Njegova dostupnost je kontrolirana s dvaju aminokiselinskih ostataka: lizinski ostatak i ostatak „vratar“ koji sadrži ili aminokiseline s velikim bočnim ogrankom poput fenilalanina ili aminokiselinu s malim bočnim ogrankom poput treonina. Ostatak aminokiseline s velikim bočnim ogrankom služi kao inhibitor te sprječava ulazak liganda u džep dok ostatak s malim bočnim ogrankom dopušta njegov ulazak.

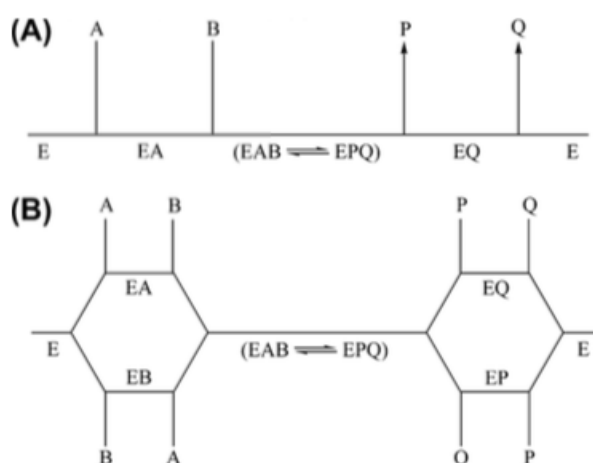


Slika 5. Prikaz protein kinaza-ATP kompleksa. Prikazana je kinaza inzulinskog receptora u kompleksu s ATP-om i malim peptidnim supstratom. (a) Džep koji veže ATP unutar domene protein kinaze nalazi se duboko u pukotini između N-terminalne domene, zglobnim predjelima i C-terminalne domene: protein kinaza, siva površina; ATP, štapići; Mg²⁺ ioni, zelene sfere. (b)

Povećanje na aktivnom mjestu: kritične H-veze između ATP-a i atoma glavnog lanca petlje su istaknute (isprekidane linije). Gama-fosfat ATP-a spreman je za prijenos na hidroksilnu skupinu peptidnog supstrata (u ovom slučaju akceptorski ostatak na peptidnom supstratu je tirozin). (Preuzeto i prilagođeno prema ref. 5)

1.2.2. Kinetički mehanizam proteinskih kinaza

Za aktivnost proteinskih kinaza potrebna su dva supstrata, ciljani protein i kompleks Mg-ATP pri čemu nastaju fosfoprotein i Mg-ADP. Bisupstratne enzimске reakcije mogu koristiti različite vrste reakcijskih mehanizama. U nekim slučajevima, oba supstrata su vezana na enzim u nekoj točki reakcije, formirajući nekovalentni ternarni kompleks. Supstrati se mogu vezati nasumično ili u specifičnom poretku. U ostalim slučajevima, prvi supstrat je pretvoren u produkt i disocira prije nego što se drugi supstrat veže, tako da nije formiran ternarni kompleks već kovalentni enzimski međuprodukt, što bi u slučaju kinaza bio neka vrsta fosfoenzima. Primjer toga je Ping-Pong mehanizam. Prvi korak u razumijevanju enzimskog mehanizma je karakterizacija kinetičkog mehanizma koja je definirana relativnom brzinom kemijskih i fizikalnih koraka i obaveznim redoslijedom dodavanja supstrata (A i B, ako postoje) i otpuštanje produkata (P i Q).



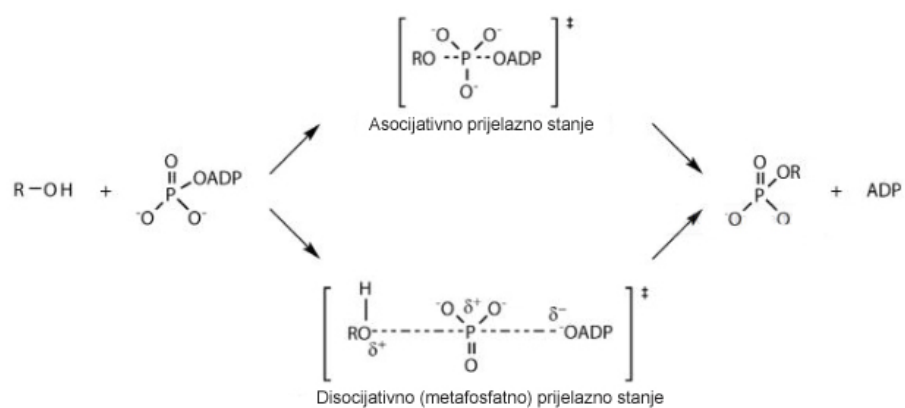
Slika 6. Clelandovi dijagrami za sekvencijalne mehanizme reakcija prijenosa fosforilne skupine u reakcijskom mehanizmu proteinskih kinaza. (A) Uređeni sekvencijalni mehanizam. Za kinaze koje djeluju ovim mehanizmom, supstrat A je uglavnom ATP. (B) Nasumični sekvencijalni mehanizam. U ovom mehanizmu, oba supstrata mogu tvoriti produktivni binarni kompleks s enzimom. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 1)

Klasična dva pokusa s kinetikom ustaljenog stanja supstrata koja otkrivaju presjek linija u dvostrukim recipročnim crtama kao i više tehnički sofisticiranih stereokemijskih studija koje pokazuju inverziju fosforilne skupine pomogle su dokazati da protein kinaza A (PKA) slijedi mehanizam ternarnog kompleksa. Nakon toga, dvije studije kinetike supstrata na različitim Ser/Thr i Tyr kinazama i mnogim rendgenskim strukturama ovih enzima u kompleksu sa analogima supstrata potvrdile su da je ovo opće obilježje superfamilije kinaza. Međutim, nedavno je rendgenska kristalna struktura atipične kinaze pokazala iznenađujuće otkriće da je aspartat aktivnog mjesta fosforiliran. Za ovaj fosforilirani aspartat pretpostavlja se da odgovara fosfoenzimskom međuproduktu koji bi mogao prenijeti fosforilnu skupinu do proteinskog supstrata.⁶

Do neke mjere, kinetički modeli ne samo da ovise o uvjetima ispitivanja kinaze (koncentracija soli, dvovalentni ion (Mg nasuprot Mn), peptid ili proteinski supstrat), već pokazuju i razlike među samim kinazama.

1.2.3. Kemijski mehanizam prijenosa fosforilne skupine

Zbog strukturne sličnosti domena te korištenja očuvanih katalitičkih ostataka, smatra se da sve proteinske kinaze imaju zajednički kemijski mehanizam koji se razlikuje samo u supstratima i distalnim elementima za prepoznavanje. Glavno pitanje u definiranju mehanizma kinaze je pojašnjenje prirode prijelaznog stanja fosforilnog prijenosa. U istraživanju neenzimatskih mehanizama prenošenja fosforila, istraživanje iz 1960-ih pokazalo je da fosfatni monoesteri poput fenolfosfata pokazuju "disocijativna" prijelazna stanja. Disocijativno prijelazno stanje je ono u kojem se veza između atoma fosfora i izlazeće skupine u velikoj mjeri prekida prije značajnog stvaranja veze između dolaznog nukleofila i fosfora, uključujući metafosfatni intermedijer. Suprotno tome, neenzimatske reakcije fosfata u obliku fosfata monoestera obično pokazuju asocijativno prijelazno stanje u kojem nukleofil stvara značajnu vezu s fosforom prije izlaska iz skupine. Ovaj disocijativni karakter monoestera racionaliziran je na temelju negativno nabijenih nepremošćujućih kisika koji odbijaju nukleofile i stabiliziraju djelomični pozitivni naboj na metafosfatnom intermedijeru.⁶ Analizom ovisnosti aktivnosti tirozin kinaze s nizom tirozinskih analoga supstituiranih atomima fluora na fenolnom prstenu, utvrđeno je da je brzina prijenosa fosforila gotovo neovisna o nukleofilnom pK_a .



Slika 7. Mehanizam protein kinaza. Shema asocijativnih i disocijativnih prijelaznih stanja prijenosa fosforila. Predlaže se model disocijativnog stanja za prijenos gama-fosforilne skupine ATP na hidroksi skupinu na kompleksu kinaza-supstrat. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 6)

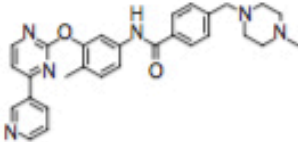
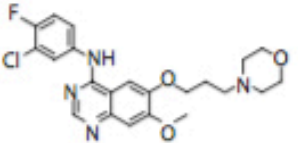
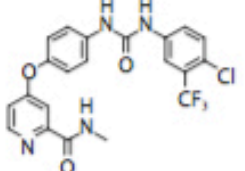
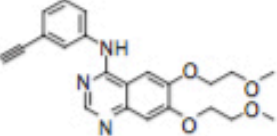
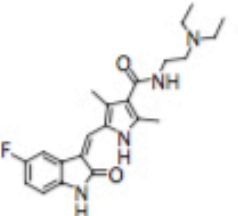
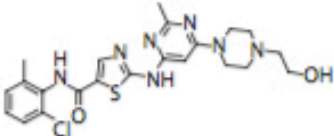
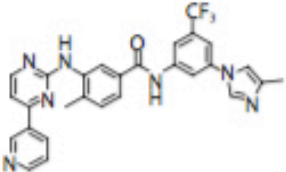
§ 2. PROTEIN KINAZE KAO METE LIJEKOVA

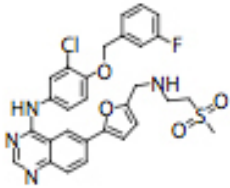
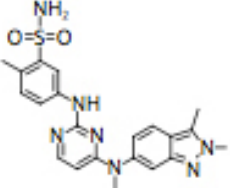
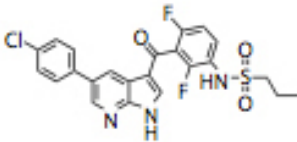
2.1. Inhibitori kinaza

Posljednjih 30 godina kinaze se intenzivno istražuju kao mete lijekova, a do danas je odobreno 38 inhibitora različitih kinaza. Ovi lijekovi su pretežno inhibitori receptorske tirozin kinaze (RTK) odobreni za liječenje karcinoma, poput imatiniba.⁷ Osim različitih vrsta raka poput raka bubrežnih stanica, raka gušterače te kronične mijeloične leukemije i sl., dokazano je da promjena u funkciji kinaze igra važnu ulogu u imunološkim, upalnim, degenerativnim, metaboličkim, kardiovaskularnim i zaraznim bolestima. Pojava rezistencije na postojeće lijekove koji ciljaju kinaze motivirala je znanstvenike na potragu alternativnih meta. Umjesto ciljanja inhibicije samog onkogeno, pozitivni rezultati su dobiveni kada su ciljevi inhibicije postali bazalni stanični procesi koje karcinom iskorištava i postaje nerazmjerno ovisan u odnosu na zdrave stanice. Dva područja u kojima je ovaj pristup uspješan su ciljanje kinaza koje reguliraju transkripciju i ciljanje kinaza koje reguliraju imunološki odgovor.

Pošto kinaze kao enzimi, reguliraju veliki udio staničnih procesa, uključujući i stanični rast, često služe kao primarni mehanizam stanica raka za nekontroliranu proliferaciju. Ljudski genom kodira oko 90 proteina koji sadrže tirozin kinaznu domenu. Mutacija u tim genima dovodi do potencijalnih malignih promjena u rastu i ciklusu stanica. S time na umu, nastali su lijekovi prve generacije kojima je cilj inhibirati neželjene pojave zloćudnih stanica blokirajući upravo njihove tirozin kinaze. Cilj većine otkrića inhibitora kinaze je blokiranje puta posredovanog određenom kinazom za stanice, životinje i, potencijalno, pacijente. Inhibitori kinaza (Tablica 1) pružaju mnoštvo informacija o tome kako tumori reagiraju na takvu ciljanu terapiju.

Tablica 1. Imena, strukture, godine odobrenja te ciljane bolesti odobrenih nekih inhibitora kinaza. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 5)

Lijek	Struktura	Godina odobrenja	Korištenje u liječenju:
Imatinib		2001	Kronična mijeloidna leukemija Stromalni tumori gastrointestinalnog sustava
Gefitinib		2003	Rak pluća nemalih stanica
Sorafenib		2005	Karcinom bubrežnih stanica Hepatocelularni karcinom
Erlotinib		2005	Rak gušterače
Sunitinib		2006	Karcinom bubrežnih stanica Imatinib-rezistentni stromalni tumori gastrointestinalnog sustava
Dasatinib		2006	Kronična mijeloidna leukemija Akutna limfoblastična leukemija
Nilotinib		2007	Imatinib-rezistentna kronična mijeloidna leukemija

Lapatinib		2007	HER2+ rak dojke
Pazopanib		2009	Napredni karcinom bubrežnih stanica
PLX4032		Pod regulatomom revizijom	BRAF mutirani metastatski melanom

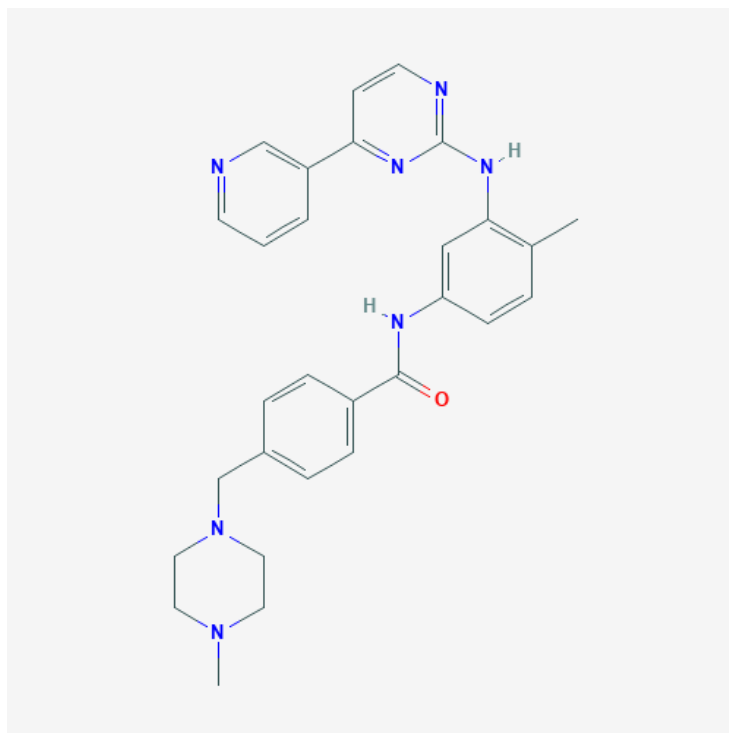
Cilj takvih lijekova je konkurirati vrlo visokim unutarstaničnim koncentracijama ATP-a (2-10 mM) te osigurati specifičnost jer je regija veznog mjesta ATP-a gotovo u svim kinazama evolucijski vrlo sačuvana. Studije provedene s visoko specifičnim inhibitorom serin/treonin kinazne p38 MAPK, SB203580, koji pripada klasi piridinil imidazola, riješile su nedoumice. Analiza trodimenzionalne strukture p38 MAPK u kompleksu s SB203580 pokazala je da se specifičnost u velikoj mjeri određuje interakcijom spoja s ostacima koji leže u blizini, ali izvan džepa koji veže ATP. Štoviše, ova 'dodatna' interakcija s malim hidrofobnim džepom tik do mjesta vezanja za ATP, koje ATP ne iskorištava, omogućuje inhibitoru da se učinkovito natječe s ATP-om za aktivno vezanje mjesta.⁷

2.2. Imatinib

Aktivna tvar lijeka pod imenom *Gleevec* je organska molekula imatinib (Slika 6). Primarni doseg ovog lijeka je u liječenju kronične mijeloidne leukemije (CML). Do te određene vrste tumora dolazi u osobama u kojima dođe do karakteristične recipročne translokacije između kromosoma 9 i 22. Time nastaju neprirodno dugački kromosom 9 i neprirodno kratki kromosom 22. U tom stanju, kromosom 22 naziva se kromosomom Philadelphia (Ph) Problem kod ove specifične translokacije je u tome što se događa kao posljedica spajanja gena koja se nalaze na dotičnim kromosomima. Na kromosomu 9 nalazi se gen *c-abl* dok je na kromosomu 22, na mjestu spajanja, lociran gen *BCR*. Gen *c-abl* kodira nereceptorsku tirozin kinazu dok fuzijom

ovih dvaju gena nastaje gen *BCR-abl* koji kodira protein konstantno aktivne kinazne aktivnosti te upravo zbog toga predstavlja ozbiljnu onkološku prijetnju. Posljedično, aktivacija tog novonastalog gena, *BCR-abl*, uzrokuje nekontroliranu aktivaciju kaskade MAPK, što dovodi do prekomjerne proliferacije leukocita mileoidne loze (granulociti i makrofagi), a samim tim i bolesti CML. Zbog prekomjerne aktivnosti tirozin kinaze dolazi do abnormalne proliferacije mijelocitnih stanice koje dovode do ove rijetke bolesti. Nekontrolirana aktivnost tirozin kinaze koju kodira nastali gen *BCR-abl* je dovoljan uzrok bolesti kao takve, čineći takvu tirozin kinazu idealnom metom terapija. Nakon mnogo istraživanja potencijalnih molekula inhibitora, nađena je grupa spojeva koji imaju obećavajuća svojstva za dotičan problem, poput 2-fenilamin pirimidina. Njihovu identifikaciju slijedila je sinteza imatiniba te je nizom eksperimenata dokazano da snažno inhibira proliferaciju *BCR-abl* eksprimiranih stanica i njihovu sposobnost formiranja tumora. Nakon što je u početku razvijen kao kompetitivni inhibitor ATP-a, imatinib je ubrzo pokazao da igra poprilično poboljšanu ulogu od ove: rendgenska kristalografija pokazala je da imatinib inhibira ABL kinazu čak izvan okvira vezanja u aktivno mjesto kinaze, izazivajući strukturnu promjenu zbog čega kinaza usvaja neaktivnu konformaciju. Drugim riječima, iako imatinib cilja relativno dobro očuvanu nukleotid-vezujuću domenu ABL, ipak može postići izuzetnu specifičnost vezanjem na neaktivnu (nefosforiliranu) konformaciju aktivacijske petlje ABL.⁷ Mnogi pacijenti s uznapredovalim stadijem bolesti reagiraju u početku na lijek, ali se tijekom vremena pojavljuje rezistencija na imatinib te podliježu napredovanju bolesti. Ta rezistencija se u većini slučajeva događa zbog ponovne aktivacije signalnih puteva *BCR-abl* gena. Dva najčešća mehanizma takve rezistencije su pretjerana ekspresija samog *BCR-abl* gena kao rezultat amplifikacije gena te pojava točkastih mutacija u kinaznoj domeni. Jedna od uobičajenih mutacija u imatinib-rezistentnoj CML je C-u-T mutacija pojedinačnog nukleotida koja uzrokuje zamjenu takozvanog 'vratarskog' ostatka Thr315 sa izoleucinom. Smješten u hidrofobnom džepu u blizini ATP-vezivnog mjesta kinaze divljeg tipa, Thr315 tvori kritičnu vodikovu vezu s imatinibom, zbog čega je inhibitor sposoban da se efikasno natječe s unutarstaničnim razinama ATP-a povećavajući njegov afinitet za vezanje. Zamjena Thr315 većim ostatkom izoleucina na ovom položaju vratara ometa vezanje imatiniba na mutiranu kinazu i tako doprinosi stvaranju otpornosti na lijek. (7) Takva vrsta mutacije desenzitivira kinazu na inhibiciju imatinibom ili izmjenom aminokiselinskih ostataka koji direktno stupaju u interakciju s molekulom inhibitora ili stabiliziranjem neaktivne konformacije aktivacijske petlje potrebne za vezanje imatiniba. Ostali mehanizmi rezistencije na imatinib

mogu biti povezani s farmakokinetičkim čimbenicima davanja lijekova (tj. smanjenom intracelularnom bioraspoloživošću slobodnog lijeka zbog poboljšanog aktivnog transporta lijeka iz stanica i izvanstanične sekvestracije lijeka proteinima plazme) i aktiviranje alternativnih putova kinaze u nadoknadu za gubitak BCR-ABL signalizacije.⁷ Njegovo djelovanje kao kompetitivni inhibitor ATP-a proširuje se i na druge vrste tumora poput gastrointestinalnih stromalnih tumora te kronične mijelomonocitne leukemije.

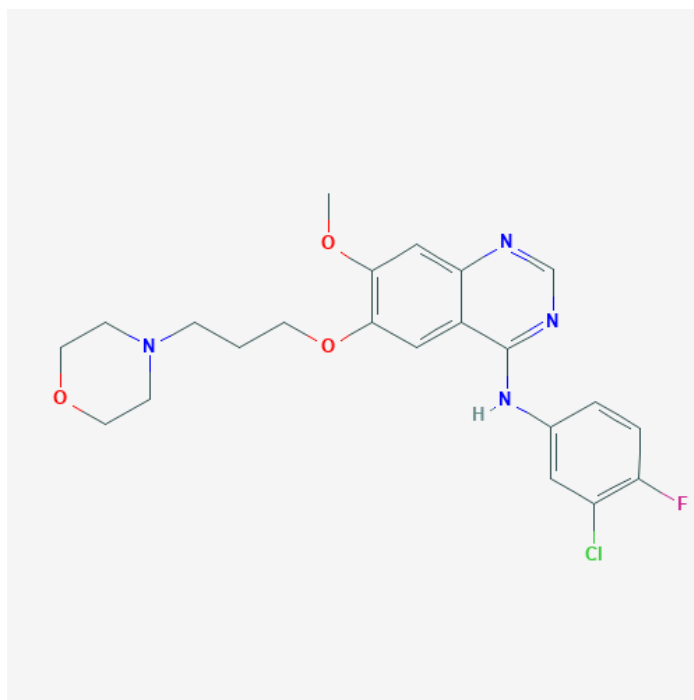


Slika 8. Molekulska struktura imatiniba. (Preuzeto iz ref. 8)

2.3. Ostali lijekovi

2.3.1. Gefitinib

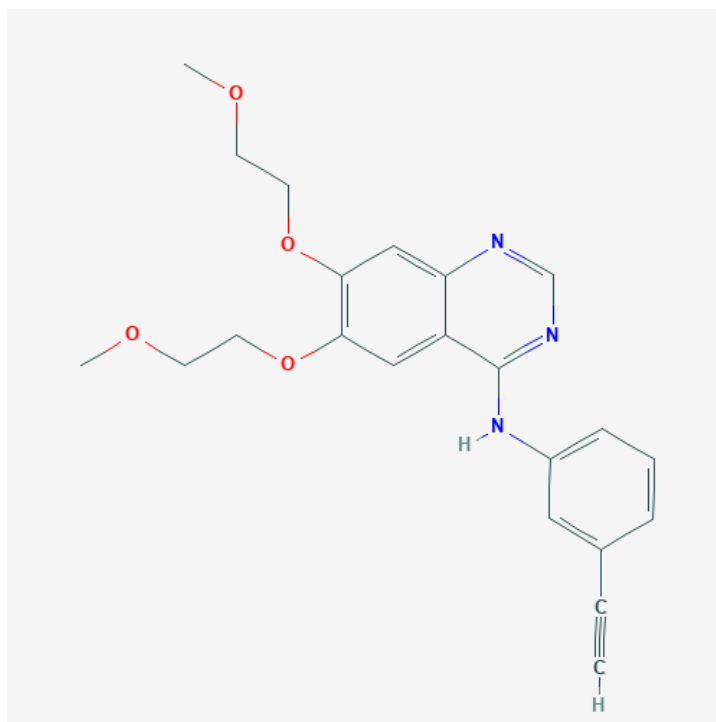
Gefitinib je organska molekula koja čini aktivnu tvar lijeka koji se prodaje pod imenom *Iressa* te se koristi u liječenju nekih vrsta raka dojke, pluća i ostalih vrsta tumora. Gefitinib služi kao inhibitor tirozin kinazne domene receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR) koji je pripadnik obitelji receptora ErbB. U malignim stanicama ljudskih tumora, EGFR je prekomjerno izražen što dovodi do aktivacije različitih signalnih kaskada koje naposljetku dovode do proliferacije takvih stanica.



Slika 9. Molekulska struktura gefitiniba. (preuzeto iz ref. 9)

2.3.2. Erlotinib

Erlotinib hidroklorid je aktivna supstanca lijeka pod imenom *Tarceva* te se koristi u liječenju raka pluća nemalih stanica, gasterače i raznih ostalih tumora. Kao i gefitinib, inhibitor je tirozin kinazne domene EGFR-a. Pacijenti koji primaju ovakve vrste terapija često i brzo razviju rezistenciju na lijek, što je i česta pojava kod imatiniba. Do rezistencije uglavnom dolazi zbog mutacije u ATP veznom džepu kinazne domene EGFR-a koja uzrokuje supstituciju polarne aminokiseline treonina s nepolarnom aminokiselinom metionina. Takva mutacija povećava afinitet veznog mjesta za ATP te se analogno reducira inhibitorska efikasnost lijeka.



Slika 10. Molekulska struktura molekule erlotiniba. (preuzeto iz ref. 10)

Inhibitori EGFR-a učinkovita su terapija za neke karcinome pluća nemalih stanica (NSCLC), kolorektalni karcinom i rak glave i vrata. Kod liječenja NSCLC-a pokazali su se izuzetno efikasni čak i kod onih karcinoma koji aktiviraju mutacije EGFR. Dvije uobičajene vrste mutacija, niz preklapajućih delecija egzona 19 i mutacija egzona 21 (L858R), čine 85% svih poznatih aktivirajućih mutacija EGFR-a.¹¹ Iako većina ovih karcinoma u početku reagira na EGFR inhibitore, s vremenom oni postaju otporni na ove terapije.

2.4. Stečena rezistencija i lijekovi druge generacije

Jedan od glavnih problema kod lijekova čiji je cilj inhibirati tirozin kinaze je što pacijenti u konačnici razviju neku vrstu rezistencije na dobivenu terapiju. Do rezistencije može doći zbog amplifikacije onkoloških gena proteinskih kinaza ali u najvećim postocima, razlog rezistencije je sekundarna mutacija u stanicama tumora. Takve mutacije uglavnom imaju veliki utjecaj na primarnu strukturu proteina te dolazi do supstitucije aminokiselina u katalitičkom mjestu enzima i imaju kritičnu ulogu u suzbijanju ili slabljenju interakcija aktivnog mjesta s molekulom inhibitora. Da bi se taj problem riješio, znanstvenici su dizajnirali lijek nove generacije s većom konformacijskom slobodom, koji se pokazao dostojnom zamjenom imatiniba. Također, kod pacijenata koji su razvili rezistenciju na erlotinib, utvrđeno je da su

tumorske stanice, koje su razvile takve mutacije, osjetljive na seriju ireverzibilnih EGFR inhibitora koju čine male molekule koje kovalentno premošćuju aktivno mjesto, tj. receptor. Uspostavljanje nekoliko molekularnih mehanizama koji bi mogli temeljiti na stečenoj otpornosti na imatinib i erlotinib, kako od pretkliničkog modeliranja i procjene kliničkih uzoraka bilo je vrlo važno u razvoju strategija upravljanja takvom rezistencijom, a koristi tih napora počinju se ostvarivati s kliničkim uspjehom novosintetiziranih inhibitora druge generacije.¹¹

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. P. A. Schwartz, B. W. Murray, *Bioorg. Chem.* **39** (2011) 192-210.
2. F. Ardito, M. Giuliani, D. Perrone, G. Troiano, L. Lo Muzio, *Int J Mol Med.* **40** (2017) 271-280.
3. I. Shchemelinin, L. Šefc, E. Nečas, *Folia Biol. (Prague, Czech Repub.)* **52** (2006) 81-101.
4. <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/phosphorylation.html> (datum pristupa: 5. rujna 2019.)
5. A. C. Dar, K. M. Shokat, *Annu. Rev. Biochem.* **80** (2011) 769-795.
6. Z. Wang, P. A. Cole, *Methods Enzymol.* **548** (2014) 1-21.
7. M. A. Arslan, O. Kutuk, H. Basaga, *Curr. Cancer Drug Targets* **6** (2006) 623-634.
8. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Imatinib> (datum pristupa 5. rujna 2019.)
9. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gefitinib> (datum pristupa 5. rujna 2019.)
10. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Erlotinib> (datum pristupa 5. rujna 2019.)
11. J. A. Engelman, J. Settleman, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **18** (2008) 73-79.