

DESET LET FARMAKOLOGICKÉ INHIBICE V ATP-VAZEBNÉM MÍSTĚ PROTEINKINÁZ – PŘÍSPĚVEK ČESKÉ ENZYMOLOGIE

Jaroslav Veselý

Ústav patologické fyziologie, LF UP v Olomouci

Autor podává krátký přehled nedávné historie vývoje prvních farmakologických inhibitorů působících kompetitivně a selektivně v ATP-vazebných místech proteinkináz. Vzhledem k tomu, že enzymové domény, které obsahují vazebná místa pro ATP, jsou navzájem vysoce homologní, byly nálezy inhibitorů tohoto typu překvapivé. V době, kdy se tyto inhibitory objevily, tj. v první polovině 90. let minulého století, zcela převládalo přesvědčení, že selektivní kompetitivní inhibice v ATP-vazebném místě není pravděpodobná. Tento názor byl překonán zejména odhalením selektivních syntetických inhibitorů kinázy c-Abl, tyrosinkinázy receptoru epidermálního růstového faktoru, a konečně purinových inhibitorů cyklin-dependentních kináz (CDK). K objevu a vývoji inhibitorů CDK významně přispěla spolupráce mezi českými a francouzskými autory.

Klíčová slova: proteinkinázy, cyklin-dependentní kinázy, imatinib (Glivec), gefitinib (Iressa), olomoucine, roscovitine.

TEN YEARS OF EFFICIENT ATP SITE-DIRECTED COMPETITIVE INHIBITION OF PROTEINKINASES

A brief survey on the development of the first synthetic selective inhibitors that competitively inhibit proteinkinases in their ATP-binding pocket is presented. Until 1990s, selective inhibition of this kind was considered improbable. The reason for such a belief was the high degree of homology existing between proteinkinase ATP-binding domains. The small synthetic molecules inhibiting c-Abl kinase, epidermal growth factor receptor kinase, and cyclin-dependent kinases (CDKs) were the first selective ATP-competitive inhibitors to have been described about ten years ago. French and Czech scientists made an important contribution in this field by discovering lead purine inhibitor olomoucine that competitively targets the CDK catalytic domain.

Key words: proteinkinases, cyclin-dependent kinases, imatinib (Glivec), gefitinib (Iressa), olomoucine, roscovitine.

Úvod

V buněčných regulacích hrají klíčovou úlohu procesy fosforylace. Spočívají v přenosu fosforečné skupiny z ATP na jiné molekuly – akceptory. Přenos skupiny od ATP k akceptoru uskutečňují enzymy, které dokážou navázat na svém povrchu v těsné blízkosti vedle sebe ATP a příslušný akceptor. Mezi akceptory fosforečné skupiny nejsou jen malé chemické molekuly, ale i velké molekuly buněčných proteinů. Enzymy, které katalyzují přenos fosforečné skupiny z ATP na proteiny, se nazývají proteinkinázy. Jsou významnými články buněčných signálních cest. Z výsledků projektu Lidský genom (1) víme, že v lidském genetickém materiálu je zakódováno na 600 proteinkináz. V jednotlivých buňkách je činných kolem 100 členů této velké enzymové rodiny.

Aminokyselinové sekvence, které vytvářejí vazebná místa pro ATP, obsahují evolučně konzervované katalytické skupiny, a proto jsou navzájem vysoce homologní. Z tohoto důvodu panovalo do doby, o níž bude řeč, tj. přibližně

do poloviny devadesátých let minulého století, v biochemii a enzymologii přesvědčení, že nalézt syntetickou látku, inhibitor, který by se mohl selektivně vázat, a tím selektivně inhibovat (blokovat) jen několik vybraných, nebo dokonce jen jednu z proteinkináz, je krajně nepravděpodobné. To výrazně brzdilo pokrok, uvážíme-li, že inhibitory jiných enzymů byly už dávno využívány v průmyslu i v medicíně. Přitom z praktického hlediska představovala inhibice proteinkináz nesmírně atraktivní oblast. Pokroky v molekulární patofyziologii nádorů např. ukazovaly, že právě proteinkinázy jsou klíčovými články buněčných signálních drah, které zprostředkují účinky pozitivních a negativních onkogenů.

Níže je stručně popsána historie vývoje prvních selektivních inhibitorů působících kompetitivně v ATP-vazebných místech tří proteinkináz – kinázy c-Abl, kinázy receptoru epidermálního růstového faktoru (EGF-R) a cyklin-dependentních kináz (CDK). Historie těchto nových směrů protinádorové terapie

se začala přibližně na přelomu osmdesátých a devadesátých let minulého století. Téma už bylo podrobně zpracováno v řadě obsáhlých pojednání v zahraniční literatuře.

1. Syntetické inhibitory kinázy c-Abl

Přední farmaceutičtí producenti začali s cíleným vývojem preparátů proti buněčným signálním drahám asi před 10–15 lety. Inhibitory zpočátku postrádaly potřebnou účinnost a specifitu. První zpráva o významnější selektivní kompetitivní inhibici v ATP-vazebném místě enzymu ze skupiny proteinkináz byla zřejmě publikována v r. 1992 v souvislosti s inhibicí kinázy v-Abl viru Abelsonovy myši leukémie (2).

S kinázou v-Abl je homologní savčí proteinkináza c-Abl. Její gen se nachází na chromozomu 9. Je dobře známo, že při reciproční translokaci mezi chromozomy 9 a 22 jsou počáteční úseky genu *c-Abl* nahrazeny sekvencemi genu *Bcr*. Vzniká tzv. Filadelfský (Ph-)

chromozom. Na takto vniklém fúzním genu se následně syntetizují různé fúzní (chimérní) Bcr-Abl proteiny. Ve většině případů chronické myeloidní leukémie a u části Ph-pozitivních pacientů trpících akutní lymfoblastickou leukémií se vyskytují tři hlavní verze Bcr-Abl chimér. Pokud se kináza c-Abl syntetizuje fyziologicky, plní funkci uzlu na křižovatce několika signálních cest a neustále migruje mezi cytoplazmou a jádrem. Patologický fúzní protein Bcr-Abl však trvale zůstává v cytoplazmě, což vede ke vzniku zhoubného fenotypu. Navíc se *c-Abl* může dostat i pod kontrolu jiných genů (3, 4).

Farmakologická účinná látka STI571 byla jako inhibitor patologicky aktivní c-Abl vyvinuta postupnými chemickými modifikacemi, jejichž počátečním cílem bylo diverzifikovat nescifické inhibitory jiné proteinkinázy, a sice proteinkinázy C (5). Látka STI571 je po chemické stránce sloučeninou ze skupiny fenylaminopyrimidinů. Postupně byla dotažena do klinické praxe pod generickým názvem imatinib (obchodní přípravek Gleevec[™] anebo Glivec[®], Novartis) v letech 1996-7. Inhibuje kinázu c-Abl v jejím ATP-vazebném místě a kromě c-Abl inhibuje také receptor růstového faktoru odvozeného z destiček. Je tedy duálním kompetitivním inhibitorem (3, 4).

2. Syntetické inhibitory receptoru epidermálního růstového faktoru

Podobně jako c-Abl byly mezi prvními důkladněji prostudovanými komponentami signálních drah také receptor epidermálního růstového faktoru (EGF-R) a jeho extracelulární ligand EGF. Dnes jsou jedním z nejlépe charakterizovaných signálních párů i po klinické stránce. EGF-R, rovněž označovaný jako ErbB1, je členem rodiny protein-tyrosinkinázových receptorů, k níž dále patří ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) a ErbB4 (Her4). EGF-R s nimi může vytvářet heterodimery a sdílet s nimi ligandy. Vazba ligandu aktivuje intracelulární enzymovou doménu receptoru. Nadměrná aktivita EGF-R je způsobena bodovými mutacemi nebo genovou amplifikací samotného receptoru anebo nadprodukcí jeho extracelulárních ligandů. Mezi přibližně 30 receptorovými protein-tyrosinkinázami, jejichž poruchy způsobují lidské nádory, patří mutace EGF-R mezi nejčastější (6). Nadměrná aktivita EGF-R provází nádory prsu, ovarií, plic, močového měchýře, skvamózních karcinomů a glioblastomů. EGF-R je důležitým markerem využívaným v onkologické praxi, ale může být předmětem zájmu i při léčbě jiných hyperproliferativních onemocnění, např. psoriázy. Z těchto důvodů se farmaceutické koncerny zaměřily na dráhu EGF-R už na samém počátku vývoje preparátů proti buněčným signálním drahám (3, 4, 7).

Pokud jde o první syntetické inhibitory EGF-R, byly získány v první polovině 90. let minulého století. Zpráva o inhibici EGF-R v jeho ATP-vazebném místě byla zřejmě poprvé publikována v r. 1994 (8). Jednotlivé vůdčí sloučeniny pak byly postupně dovedeny až k terapeuticky použitelným variantám. V polovině roku 2003 bylo registrováno léčivo gefitinib (Iressa, látka ZD1839, AstraZeneca) ze skupiny anilinochinazolinů. V pokročilém stadiu zkoušek je rovněž anilinochinazolin erlotinib (Tarceva, látka OSI-774, Roche/Genetech/OSI) (3,9).

3. Syntetické purinové inhibitory CDK

Historie vývoje inhibitorů CDK je úzce svázána s molekulárními objevy dotýkajícími se samých základů regulace buněčného cyklu. Přibližně v polovině 80. let minulého století nastalo „velké sjednocení“, když se zjistilo, že produkty genů *cdc2/CDC28*, známých z genetických studií kvasinek, jsou totožné s tzv. maturačním promočním faktorem (MPF) charakterizovaným do té doby pouze biochemicky ve vajíčkách bezobratlých. Ukázalo se, že MPF má stejně jako produkt *p34^{cdc2}* aktivitu specifické proteinkinázy. Tím začala vědecká éra enzymů ovládajících buněčný cyklus – cyklin-dependentních proteinkináz (CDK) (10).

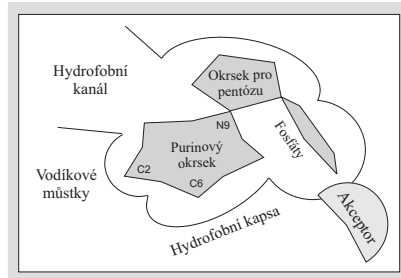
K počátečnímu vývoji selektivních inhibitorů CDK přispěla i česká enzymologie výzkumem, který se uskutečnil při spolupráci s laboratorii francouzského biologa L. Meijera ze Station Biologique, CNRS, Roscoff. L. Meijer byl mezi prvními badateli, kteří ve druhé polovině 80. let minulého století dokázali identifikovat a izolovat komponenty kinázy *p34^{cdc2}* (CDK1). Svě zkušenosti pak obratem vložil do praktické aplikace, když spolu s V. Rialetovou provedli prioritní screening několika purinů, mezi nimiž byl zahrnut také rostlinný hormon izopentenyladenin. Cílem screeningu bylo odhalit látky, které by dokázaly inhibovat živočišnou CDK1, a tím buněčné dělení (11). Jejich publikaci zachytil v Olomouci autor tohoto článku na jaře r. 1992 při literární rešerši. L. Meijer už tehdy správně předvídal, že látky s inhibičními účinky na CDK by mohly být výhledově použity v protinádorové léčbě, a v mezinárodním měřítku je proto právě tento badatel zapsán jako prioritní tvůrce praktických výzkumných aplikací zaměřených na hledání nových potenciálních protinádorových léčiv prostřednictvím testování enzymových inhibitorů s CDK (11,12). Enzymová inhibice dávala příležitost uplatnit dřívější průpravu ve studiu dvousubstrátové kinetiky, kterou autor článku získal při práci na dizertaci v laboratoři M. Černocho na Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP v Olomouci. Citovaná publikace (11) tak otevřela cestu ke kontaktu s týmem v Roscoffu

a vyústila ve společný projekt a v přijetí k pracovnímu pobytu.

V návaznosti na zmíněné testování přirozeného cytokininu izopentenyladeninu (11) začala práce v Roscoffu screeningem rostlinných cytokininů pocházejících z pracoviště ÚEB AV ČR v Olomouci vedeného tehdy J. Vagerou. Už první experimentální výsledky ukázaly, jak na nutnost korigovat původní předpoklady projektu, tak na potřebu podstatně rozšířit spektrum studovaných purinových struktur. Toto rozšíření vedlo k odhalení syntetické, komerčně dostupné purinové sloučeniny 2-(hydroxyetylamo)-6-benzylamo-9-metylpurinu, která zřetelně inhibovala CDK1. Sloučenina se od roku 1986 rutinně používala v botanickém výzkumu (13) a poté, co byla v Roscoffu rozpoznána jako inhibitor CDK, byla přejmenována na olomoucín (se souhlasem autorů syntézy (13)). Screening cytokininů, který byl dokončen v souladu s původním plánem projektu, naproti tomu nepřinesl žádná nová zjištění, což zároveň dostatečně charakterizuje náhodné aspekty objevu.

V následujícím, systematickém stupni zkoumání nově objevených inhibičních účinků bylo prvním úkolem zjistit, nakolik je působení sloučeniny na CDK1 selektivní. Tento problém byl v Roscoffu řešen testováním interakcí téměř se čtyřiceti dalšími enzymy, převážně proteinkinázami (14). Poté se klasickou dvousubstrátovou kinetickou studií podařilo objas-

Obrázek 1. Schéma ATP-vazebné kapsy CDK s navázaným ATP. Kapsa se otevírá do okolí hydrofobním kanálem. ATP se v něm vazebně neuplatňuje, interaguje zde ale olomoucín, který se oproti ATP váže v purinovém okrsku v dvakrát převrácené pozici: 1. Olomoucín se oproti ATP překlápá podél příčné osy purinového skeletu. Svým substituentem na C2-atomu se pak olomoucín neorientuje k oblasti vodíkových můstků jako ATP, nýbrž do vazebného místa pro pentózu, kam se normálně pokládá N9-substituent ATP. Tam nachází vazebné interakce. 2. Olomoucín se zároveň překlápá podél podélné osy purinového skeletu. Substituent na C6-atomu olomoucínu pak nesměruje do hydrofobní kapsy, jako u ATP, nýbrž do hydrofobního kanálu, tj. ven, do okolí mimo vazebné místo ATP. Právě tam nachází vazebné interakce, které jsou specifické. Do hydrofobní kapsy se olomoucín obrací substituentem na N9. Podle prací (3, 15)



nit povahu této inhibice. Přestože šlo o purin (stejně jako ATP), ukázalo se překvapivě, že inhibice je selektivní a kompetitivní v ATP vazebném místě CDK1. Opakované experimenty pak doplnily tento závěr průkazem nekompetitivní inhibice vůči substrátu-akceptoru histonu (vlastní nepublikované výsledky autora). L. Meijer tak mohl ještě před odesláním rukopisu do tisku (14) kontaktovat skupinu pracovníků v Berkeley v Kalifornii, kde v krátké době rentgenostrukturní analýzou potvrdili, že olomoucín se skutečně váže v kapse určené pro ATP (15) (viz obrázek 1).

Význam výsledků z Roscoffu shrnutých v pracích (14, 15) spočívá v tom, že šlo, za prvé, o prioritně jednoznačně prokázanou úroveň selektivní ATP-kompetitivní inhibici enzymu purinem. Tento závěr byl vzápětí potvrzen rentgenovou difrakcí. Za druhé, specifická studovaného inhibitoru byla prokázána testováním s mimořádně obsáhlým panelem dalších enzymů. Za třetí, uvedené molekulární výsledky byly navíc přesvědčivě doloženy závěrečnou cytologickou studií až na buněčnou úroveň, když se prokázalo, že selektivní inhibice CDK olomoucínem – ve shodě s předpoklady – skutečně způsobí zástavu buněčného cyklu. To vše, za čtvrté, učinilo z olomoucínu vůdčí sloučeninu nové třídy inhibitorů CDK a antiproliferačních látek, zajistilo vysoký ohlas obou prací (14, 15) a dalo práci v Roscoffu charakter objevu (12).

Prakticky současně s výsledky z Roscoffu byly publikovány i výsledky dalších laboratoří, jejichž pracovníci nezávisle prokázali kompetitivní inhibici v ATP-vazebném místě, když studovali jiné (nepurinové) inhibitory (17, 19) anebo jiné proteinkinázy (3, 4, 7). Roky 1992–1995 lze proto z hlediska odhalení selektivní kompetitivní inhibice v ATP-vazebném místě enzymů považovat za přelomové.

Na výsledky z Roscoffu pak plynule navázaly svými syntézami desítky laboratoří v celém světě. Nejznámějšími dosud syntetizovanými inhibitory CDK olomoucínového typu jsou roscovitín – syntetizovaný L. Havlíčkem z Izotopové laboratoře AV ČR a 1. LF UK v Praze – a purvalanol. V lednu r. 2004 firma Cyclacel (Dundee, UK) oznámila, že zmíněný roscovitín (látko Cyc202), který tam po sérii studií ve své laboratoři uvedl L. Meijer, úspěšně prošel druhou fází klinických zkoušek (16).

I když je vhodné mít na paměti široké mezinárodní souvislosti řešení dané problematiky, je namístě uvést, že na AV ČR v Praze mezitím L. Havlíček a J. Hanuš se spolupracovníky úspěšně pokračovali v syntézách odvozených sloučenin. Tyto sloučeniny byly fundovaně testovány – přes problémy s boheminem – také na pracovištích UP v Olomouci. Vklad V. Kryštofa, M. Hajdúcha a dalších by vydal na další článek. Lze se jim jen omluvit, že vzhledem k zaměření tohoto krátkého přehledu nejsou uvedeni.

Vedle purinového inhibitoru roscovitínu jsou v klinických zkouškách i nepurinové inhibitory CDK flavopiridol (Aventis) a chloroindolylsulfonamid E7070 (Eisai) (17, 18). Antiproliferační a potenciální příznivé klinické účinky flavopiridolu byly například původně odvozeny z pokusů na buněčných liniích a jeho ATP-

-kompetitivní působení na CDK bylo dodatečně odhaleno v r. 1996 (17).

Závěr

Vývoj nových potenciálně účinných farmakologických látek cestou cíleného screeningu proti definovaným buněčným komponentám poskytuje nebyvalou možnost minimalizovat jejich vedlejší účinky. Zároveň však dosavadní zkušenosti se všemi výše uvedenými preparáty ukazují, že nádorové buňky dovedou vyvinout rezistenci i proti nejnovějším farmaceutickým produktům. Dlouhodobá terapie nádorů tedy nejspíše bude i v nejbližší budoucnosti nadále založena na strategii kombinací látek, které dovedou účinně zasáhnout větší počet buněčných cílů. Lze očekávat, že v tom budou mít své místo i selektivní enzymové inhibitory inhibující ve vazebném místě pro ATP.

Literatura

1. International Human Genome Consortium: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860–921.
2. Geissler JF, Roesel JL, Meyer T, Trinks UP, Traxler P, Lydon NB. Benzopyranones and benzothiofuranones: a class of tyrosine kinase inhibitors with selectivity for the v-Abl kinase. *Cancer Res* 1992; 52: 4492–4498.
3. Fabbro D, Ruetz S, Buchdunger E et al. Protein kinases as targets for anticancer agents: from inhibitors to useful drugs. *Pharmacol Ther* 2002; 93: 79–98.
4. Traxler P, Bold G, Buchdunger E. Tyrosine kinase inhibitors: from rational design to clinical trials. *Med. Res. Rev.* 2001; 21: 499–512.
5. Zimmermann J, Buchdunger E, Mett H, Meyer T, Lydon NB. Potent and selective inhibitors of the ABL-kinase: phenylaminopyrimidine (PAP) derivatives. *Biorg Med Chem Lett* 1997; 7: 187–192.
6. Bange J, Zwick E, Ullrich A. Molecular targets for breast cancer therapy and prevention. *Nat Med* 2001; 7: 548–552.
7. García-Echeverría C, Traxler P, Evans DB. ATP site-directed competitive and irreversible inhibitors of protein kinases. *Med Res Rev* 2000; 20: 28–57.
8. Buchdunger E, Trinks U, Mett H et al. 4,5-Dianilinothalimide: A Protein-Tyrosine Kinase Inhibitor with Selectivity for the Epidermal Growth Factor Receptor Signal Transduction Pathway and Potent in vivo Antitumor Activity *Proc Nat Acad Sci USA* 1994; 91: 2334–2338.
9. Sridhar SS, Seymour L, Shepherd FA. Inhibitors of epidermal-growth-factor receptors: a review of clinical research with a focus on non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 2003; 4: 397–406. Čes. verze: *Lancet Oncol-CZ* 2003; 2: 265–276.
10. Forsburg SL, Nurse P. Cell cycle regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Annu Rev Cell Biol* 1991; 7: 227–256.
11. Riale V, Meijer L. A new screening test for antimitotic compounds using the universal M phase-specific protein kinase, p34cdc2/cyclin Bcd13, affinity-immobilized on p13suc1-coated microtiteration plates. *Anticancer Res* 1991; 11: 1581–1590.
12. Meijer L, Raymond E. Roscovitine and other purines as kinase inhibitors. From starfish oocytes to clinical trials. *Acc Chem Res* 2003; 36: 417–425.
13. Parker CW, Wilson M, Letham DS, Cowley DE, MacLeod JK. Inhibitors of two new enzymes which metabolize cytokinins. *Phytochem.* 1986; 25: 303–310.
14. Veselý J, Havlíček L, Strnad M et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur J Biochem* 1994; 224: 771–786.
15. Schulze-Gahmen U, Brandsen J, Jones HD et al. Multiple modes of ligand recognition: crystal structures of cyclin-dependent protein kinase 2 in complex with ATP and two inhibitors, olomoucine and isopentenyladenine. *Proteins: Struct Funct Gen* 1995; 22: 378–391.
16. http://www.cyclacel.com/company_profile/press2003/2003_1_20.htm
17. DeAzevedo WF, Mueller-Dieckmann HJ, Schulze-Gahmen U, Worland PJ, Sausville E, Kim S-H. Structural basis for specificity and potency of a flavonoid inhibitor of human CDK2, a cell cycle kinase. *Proc Nat Acad Sci USA* 1996; 93: 2735–2740.
18. <http://www.aventisoncology.com/assets/Flavo.pdf>
19. Kitagawa M, Okabe T, Ogino H, et al. Butyrolactone-I, a selective inhibitor of CDK2 and CDC2 kinase. *Oncogene* 1993; 8: 2425–2432.