

# Молекулярные механизмы лейкогенеза

## Лекция № 5 Основы таргетной терапии

Д.А. Домнинский

ФГБУ ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздравсоцразвития России, Москва

Контакты: Дмитрий Анатольевич Домнинский D7777777@yandex.ru

### Molecular mechanisms of leukemogenesis 5. Overview of targeted therapy

D.A. Domninskiy

Dmitriy Rogachev Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow

#### Предисловие

В предыдущих лекциях были рассмотрены ключевые генетические нарушения, которые индуцируют развитие гемобластозов миелоидного или лимфоидного происхождения [1–4]. Существенный прогресс в понимании молекулярных процессов онкогенеза, достигнутый в последние два 10-летия, позволил выявить основные типы генов, которые ча-

сто становятся мишенями лейкогенных aberrаций. Это, в свою очередь, сделало возможным разработку лекарств, которые целенаправленно воздействуют на онкогенные белки, что привело к возникновению опухоли-специфичной таргетной терапии (от англ. *target* – мишень). В настоящее время одобрено к применению несколько десятков таргетных препаратов (некоторые из них приведены в таблице), а несколько

Таргетные препараты, обладающие наибольшей эффективностью против опухолей, несущих определенные генетические повреждения [5, 6] \*

Лекарство	Опухоли	Гены	Генетические повреждения
Иматиниб (imatinib mesylate)	ХМЛ ОЛЛ GIST MD/MPD	<i>BCR-ABL</i> <i>BCR-ABL</i> <i>KIT</i> , <i>PDGFR</i> <i>PDGFR</i>	Ph хромосома t(9;22)(q34;q11) Активирующие мутации Хромосомные транслокации
Дазатиниб (dasatinib)	ХМЛ ОЛЛ	<i>BCR-ABL</i> <i>BCR-ABL</i>	Ph хромосома t(9;22)(q34;q11)
Нилотиниб (nilotinib)	ХМЛ	<i>BCR-ABL</i>	Ph хромосома t(9;22)(q34;q11)
Трастузумаб (trastuzumab)	Рак груди	<i>HER2</i>	Повышенная экспрессия или амплификация
Лапатиниб (lapatinib)	Рак груди	<i>HER2</i>	Повышенная экспрессия или амплификация
Гефитиниб (gefitinib)	NSCLC	<i>EGFR</i>	Активирующие мутации
Эрлотиниб (erlotinib)	NSCLC	<i>EGFR</i>	Активирующие мутации
Кризотиниб (crizotinib)	NSCLC	<i>EGFR</i>	Активирующие мутации
Цетуксимаб (cetuximab)	CRC	<i>EGFR</i> ± <i>K-RAS</i>	Активирующие мутации <i>EGFR</i> и/или <i>K-RAS</i>
Вемурафениб (vemurafenib)	Меланома	<i>B-RAF</i>	Активирующие мутации

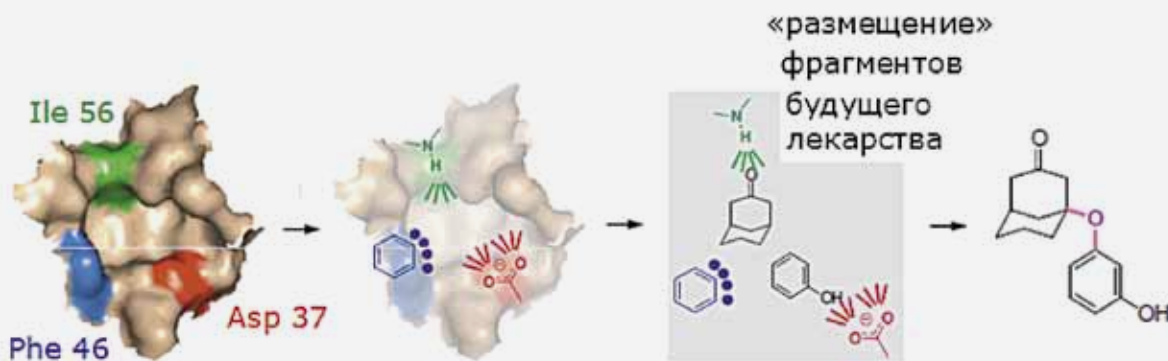
\* Окончание в названии препарата характеризует его природу: окончание «маб» присутствует у моноклональных антител («*tab*», *monoclonal antibody*), а «ниб» – у ингибиторов протеинкиназ («*nib*», *tyrosine kinase inhibitors*).

Аббревиатуры: ОЛЛ – острый лимфолейкоз; ХМЛ – хронический миелолейкоз; *B-RAF* – *v-raf murine leukemia viral oncogene homolog, type B*; CRC – colorectal cancer; *EGFR* – epidermal growth factor receptor; GIST – gastrointestinal stromal tumor; *HER2* – human epidermal growth factor receptor 2 (также известен как CD340 и *EGFR2*); *KIT* – *v-kit feline sarcoma viral oncogene homolog* (также известен как CD117 и *SCFR, stem cell factor receptor*); MD/MPD – myelodysplasia-myeloproliferative disease; NSCLC – non-small-cell lung cancer; *PDGFR* – platelet-derived growth factor receptor; Ph – филадельфийская хромосома (22q-), возникающая при t(9;22)(q34;q11) хромосомной транслокации.

## Приложение 1. Современные методы создания новых лекарств (часть 1)



Поиск новых лекарственных препаратов еще недавно являлся чрезвычайно длительным процессом. Чтобы выявить соединение, обладающее биологической активностью, необходимо было почти наугад протестировать огромное число новых синтезированных химических молекул. Такое тестирование проводили на животных, оно было очень дорогим, требовало большого количества испытываемых соединений и затягивалось на много лет. Бурное развитие в последние 10-летия молекулярной биологии и геной инженерии, а также теоретических методов анализа свойств «структура–функция» биологических молекул привело к коренному изменению методологии поиска лекарственных соединений. Было не только выявлено огромное число потенциальных «мишеней» (биомолекул, на которые могут воздействовать лекарства), но также стало возможно выделять их в чистом виде и в неограниченных количествах. В подавляющем большинстве случаев мишенями для лекарств являются белки (обычно рецепторы, ферменты или факторы транскрипции), но ими также могут быть другие важные биологические макромолекулы. В современном процессе конструирования новых лекарств, который принято называть «драг-дизайн» (от англ. *drug* – лекарство и *design* – проектирование), можно выделить несколько основных этапов [32, 33]. Во-первых, это процедуры установления основных структурных особенностей соединений, которые могут обладать нужной биологической активностью. На рис. 1 показан пример конструирования потенциально активного соединения (прототипа будущего лекарства), в основе которого лежит знание структуры участка фермента, ответственного за его связывание с субстратом. Такого типа манипуляции, известные как «молекулярный докинг» (от англ. *docking* – стыковка), являются ключевой процедурой методов «виртуального скрининга» – автоматизированного просмотра баз данных химических соединений и отбора среди них тех, которые обладают желаемыми свойствами. В основе виртуального скрининга может быть не только информация о пространственном строении активных участков белка-мишени, но также знание структуры субстрата (лиганда), взаимодействующего с данной мишенью. Так, например, для разработки многих ингибиторов протеинкиназы в качестве прототипа будущего лекарства использовалась структура АТФ, взаимодействующего с АТФ-связывающим участком активного центра фермента.



**Рис. 1.** Пример принципа конструирования соединений, способных связываться с активным центром фермента. Экспериментальным или теоретическим путем была установлена структура активного центра белка (слева). Этот участок, обычно представляющий собой углубление на белковой молекуле и называемый «карманом» связывания (*binding pocket*), содержит, в данном случае, несколько потенциально активных аминокислотных остатков – аспарагиновой кислоты (Asp37), фенилаланина (Phe46) и изолейцина (Ile56), определяющих специфичность взаимодействия фермента с субстратом. При этом Phe46 отвечает за липофильные взаимодействия, Asp37 является акцептором, а Ile56 – донором водородных связей (в центре слева). В процессе виртуального скрининга для данного «кармана» было подобрано несколько соответствующих ему соединений («строительных блоков», один из вариантов скрининга показан на рисунке), которые наиболее оптимально размещаются в пространстве «кармана» и взаимодействуют с функциональными аминокислотными остатками (в центре справа). Заключительным этапом является соединение «состыкованных» с активным центром белка фрагментов будущего лекарства в единую молекулу с помощью различных химических группировок (показано розовым цветом), что осуществляется в процессе синтеза (справа). Рисунок адаптирован из статьи G. Schneider & U. Fechner [34].

Процесс виртуального скрининга напоминает детский конструктор «Лего», в котором используется огромное число «строительных блоков» (*building block*), в данном случае – небольших органических молекул. Для осуществления синтеза лекарственных препаратов с заданными свойствами при таком подходе требуется не только информация о структуре очень большого числа химических соединений, но и сами эти соединения. Поэтому такой способ разработки новых таргетных препаратов под силу только крупным фармацевтическим компаниям, обладающим коллекциями, содержащими несколько миллионов различных органических молекул, из которых впоследствии будут «собраны» новые лекарства.

сотен подобных лекарств находятся на разных стадиях доклинических и клинических испытаний [5–7]. Окончание работ по расшифровке генома человека позволяет сегодня осуществлять масштабный поиск генов-мишеней, которые критичны в патологии различных заболеваний человека – так называемый «druggable», т. е. геномные локусы, кодирующие белки или белковые домены, способные быть мишенью для лекарств [8]. В последнее время наиболее продуктивными «druggable»

мишенями для лекарств стали протеинкиназы (рецепторные и цитоплазматические), ионные каналы, протеазы, G-белковые рецепторы и некоторые другие типы белков. С другой стороны, прогресс в понимании структуры и механизмов действия многих белков в норме и при патологии позволил кардинально изменить методологию и технологию получения новых лекарственных препаратов, что существенно ускорило процесс их разработки (см. Приложения 1 и 2).

## Приложение 2. Современные методы создания новых лекарств (часть 2)

Поэзия — та же добыча радия. В грамм добыча, в год труды.  
Изводишь единого слова ради тысячи тонн словесной руды.  
Владимир Маяковский

В процессе виртуального скрининга обычно отбирается большое число различных вариантов структур, обладающих потенциальной активностью по отношению к белку-мишени. Поэтому двумя другими важнейшими этапами драг-дизайна являются высокопроизводительные методы синтеза из «строительных блоков» необходимых соединений и отбора (скрининга) среди них наиболее активных.

Для получения большого количества новых органических соединений около 20 лет назад были разработаны новые технологии органического синтеза на основе так называемой комбинаторной химии. Принципы комбинаторного синтеза во многом были позаимствованы у генной инженерии: 1) получение тотальных «библиотек», содержащих огромное число уникальных клонов, несущих амплифицированные копии различных фрагментов геномной ДНК; 2) применение эффективного скрининга для изоляции из этих «библиотек» последовательности ДНК любого гена. Такой подход, в конечном счете, предопределил последующий прогресс во многих дисциплинах, в том числе и в молекулярной онкологии. Аналогичный принцип применительно к органической химии позволяет быстро синтезировать обширные «библиотеки», содержащие огромное число химических соединений, обладающих схожей структурой и потенциально способных быть активными по отношению к определенным биологическим мишеням. На практике комбинаторный синтез представляет собой одновременное получение большого числа соединений (сотен и даже тысяч), используя для этого многочисленные сочетания различных «строительных блоков». Синтез проводят в специальных блоках (microfluidic chips) с большим числом ячеек, этот процесс роботизирован, так же как и процедура скрининга синтезированных соединений [35]. Все члены определенной «библиотеки» химических соединений, как правило, имеют одинаковую базовую структуру (аналог фармакофора — молекулярного «остова», играющего важную роль в биологической активности лекарства), но отличаются между собой комбинациями различных дополнительных элементов (рис. II). Определенное сочетание таких элементов существенно для многих характеристик лекарственного препарата. Например, оно может влиять на сродство (аффинность) к мишени, что очень важно для лекарств, так как эффективность их связывания с мишенью должна быть значительно выше, чем у природных субстратов или лигандов.

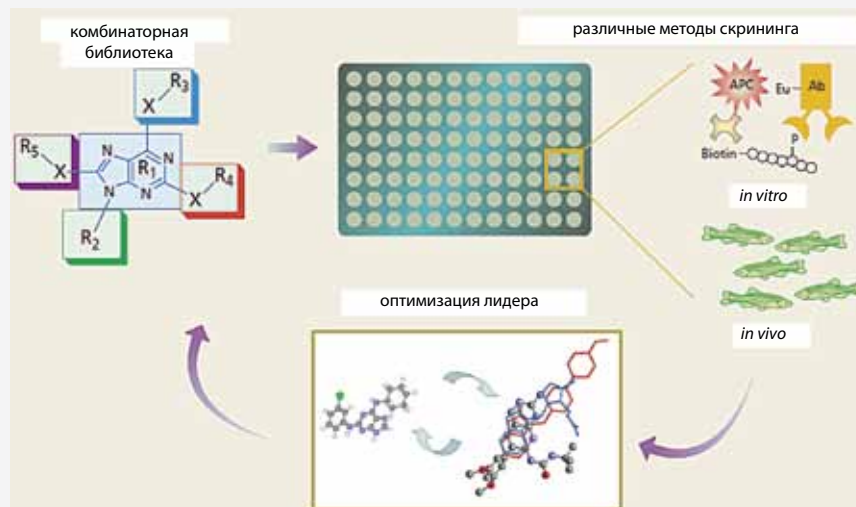


Рис. II. Схема получения лекарства из комбинаторной «библиотеки»

Слева схематично представлена комбинаторная «библиотека», включающая в себя набор синтезированных соединений, имеющих общий базовый элемент — аналог фармакофора (в центре, выделен голубым фоном) и отличающихся сочетаниями различных дополнительных группировок (показаны разными цветами). В центре вверху показан 96-луночный блок с тест-системой для анализа *in vitro* биологической активности различных соединений из «библиотеки». В результате масштабного скрининга *in vitro* идентифицируются несколько соединений, обладающих нужной активностью (хиты, от англ. *hit* — попадание). Дополнительный *in vitro* и/или *in vivo* скрининг хит-соединений позволяет отобрать структурный прототип будущего лекарства — соединение-лидер (справа). Процесс оптимизации «лидера» происходит путем получения на его основе дополнительной комбинаторной «библиотеки» и нового цикла скрининга полученных модификаций лидера по их активности и другим характеристикам. В результате отбираются лекарства-кандидаты, которые подвергаются клиническим испытаниям. Рисунок адаптирован из статьи S. Ding & P. Schultz [36].

Прогресс в выявлении молекулярных клеточных мишеней привел к созданию на их основе тестовых систем, которые можно использовать для быстрого *in vitro* анализа активности соединений в качестве лекарств-кандидатов. Эти тестовые системы могут представлять собой, например, анализируемый белок-мишень с его субстратом, причем последний модифицирован таким образом, что это дает возможность легко определять активность белка (скажем, по изменению окраски). Такая технология фармакологических испытаний получила название «высокопроизводительный скрининг» (HTS, *high throughput screening*). HTS позволяет очень быстро и достаточно дешево отбирать из сотен тысяч и даже из миллионов соединений молекулы, которые обладают активностью против определенных клеточных мишеней.

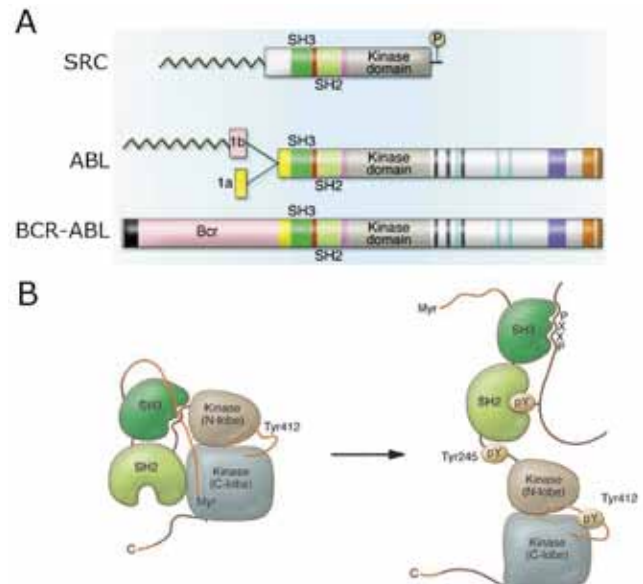
После проведения скрининга «библиотеки» из нее обычно отбирается несколько соединений, так называемых соединений-лидеров (*lead compounds*), которые обладают заметной активностью по отношению к данной мишени. Для улучшения биологической активности и других фармацевтических характеристик (например, доступности или токсичности) выявленного соединения-лидера (оптимизация лидера) также используется комбинаторный синтез, который позволяет проводить быструю и разнообразную модификацию лидера [32].

Кроме классических таргетных препаратов, которые целенаправленно синтезируются в качестве агентов, способных специфично связываться с определенными функциональными доменами патогенных белков, к этой группе лекарств можно отнести и некоторые другие соединения. Например, препараты, которые нацелены на молекулы, участвующие в формировании определенного клеточного фенотипа. К таким лекарствам относится, в частности, моноклональное антитело ритуксимаб (rituximab), мишенью которого является CD20 антиген поверхности В-клеток, и которое применяют для лечения В-клеточных неходжкинских лимфом (В-НХЛ), хронического лимфолейкоза (ХЛЛ) и некоторых других заболеваний [9]. К таргетным препаратам можно также отнести и полностью трансретиноевую кислоту (**all-trans retinoic acid**, ATRA), которую применяют при терапии острого промиелоцитарного лейкоза. В данном случае ATRA в терапевтической концентрации, которая значительно превышает физиологический уровень, вызывает переключение активности онкогенного PML-RAR-белка, возникающего при хромосомной транслокации t(15;17)(q22;q21), от репрессии к активации транскрипции генов-мишеней нормального ядерного рецептора ретиноевой кислоты – RAR $\alpha$ . Такое переключение приводит к дифференцировке злокачественных промиелоцитов и ремиссии заболевания [10].

Более подробно технология драг-дизайна таргетных препаратов (см. Приложения 1 и 2) будет рассмотрена на примере самого успешного их применения, а именно на примере ингибиторов цитоплазматической тирозинкиназы BCR-ABL, являющейся триггером развития хронического миелолейкоза (ХМЛ) и Ph<sup>+</sup> острых лейкозов (см. таблицу).

### Ингибиторы связывания тирозинкиназы BCR-ABL с аденозинтрифосфатом

Хромосомная транслокация t(9;22)(q34;q11), сопровождающаяся генерацией так называемой филадельфийской хромосомы (Ph, 22q-), а также продукты этой транслокации (химерные гены и белки BCR-ABL) являются излюбленными объектами многих гематологов и молекулярных онкологов. С этой патологией связаны многие фундаментальные открытия, которые существенно продвинули нас в понимании молекулярных процессов, происходящих в клетках при их опухолевой трансформации. Проблемам, так или иначе связанным с молекулярными аспектами биологии ХМЛ и Ph<sup>+</sup> острых лейкозов, посвящено множество обзоров, поэтому не будем повторяться, а направим читателя к некоторым из них [11–15]. На рис. 1 приведена основная информация о структуре белков ABL и BCR-ABL, которая будет необходима для рассмотрения процессов создания и применения таргетных препаратов, направленных против этих белков. Некоторые важные моменты, касающиеся активных и автоингибирующих



**Рис. 1.** Доменная структура SRC, ABL и BCR-ABL протеинкиназ (A) и схема неактивной и активной конформации ABL (B)

(A) SRC- и ABL-киназы имеют участки с высокой гомологией (~ 50 %, выделены более темным общим фоном), которые включают тирозинкиназный домен (kinase domain), SRC гомологичный 2 (SH2, SRC homology) и SH3-домены (см. [2], рис. 3). Две изоформы ABL продуцируются в результате альтернативного сплайсинга с включением в белок одного из двух первых ABL-экзонов (1a или 1b). Изоформа ABL1b содержит на N-конце сайт миристилирования (Myr, см. [2], Приложение 1), что предопределяет клеточную локализацию разных изоформ белка: модифицированный миристалом (показан волнистой линией) ABL1b изоформа белка может связываться с мембранами, и локализована преимущественно в цитоплазме, а ABL1a изоформа – в ядре. ABL в отличие от белков SRC-семейства имеет протяженный C-конец, на котором локализовано много функциональных доменов и мотивов: 3 пролин-богатые области (PxxP, показаны серыми полосками) являются стыковочными сайтами для SH3-доменов других белков; 3 сигнала ядерной локализации (NLS, nuclear localisation signals, голубые полоски); домен связывания с ДНК (фиолетовая полоска) и домены связывания с G- и F-актином (коричневые полосы), разделенные сигналом экспорта из ядра (NES, nuclear export signal, белая полоска). На N-конце BCR-ABL-белка расположен домен димеризации, привнесенный в химерный белок BCR (черная полоска). (B) Схема автоингибирующей (слева) и активной (справа) конформации ABL-киназы (подробности см. [2], рис. 3). Миристалм участвует в поддержании автоингибирующей конформации, связываясь с аллостерическим сайтом в С-половине киназного домена. Сближение белка с миристалм-специфичными мембранными микродоменами («плотиками», см. [2], Приложение 1) приводит к связыванию Myr с мембраной и дестабилизации конформации автоингибирования. Рисунок адаптирован из статьи Т. Hunter [15].

конформаций протеинкиназ, а также их функционирования в клетке в норме и при гемобластозах, были рассмотрены в предыдущих лекциях [2, 3].

Лечение ХМЛ в хронической фазе с помощью специфичных таргетных препаратов, которые являлись конкурентными ингибиторами связывания аденозинтрифосфата (АТФ) с онкогенной тирозинкиназой BCR-ABL, стало ключевым моментом в медицине последних 10-летий, что привело, с одной стороны, к появлению надежды на возможность успешно противодействовать не только онкологическим, но и другим тяжелым заболеваниям человека, а с другой стороны, породило

целую индустрию разработки новых лекарств для таргетной терапии. Однако сегодня можно сказать, что многие ожидания не оправдались, а массированное изготовление и клинические испытания таргетных препаратов, направленных против различных онкогенных белков-мишеней, поставили больше вопросов, нежели дали приемлемые положительные результаты. На некоторые из этих вопросов мы попытаемся ответить в этой лекции.

Было показано, что первый из препаратов этого ряда, разрешенный для клинического использования, иматиниб, давал очень хорошие результаты у больных в хронической фазе ХМЛ, но уже в фазе акселерации, и тем более в фазе бластного криза его эффект был практически идентичен традиционным методам химиотерапии. Возможный ответ на этот парадокс кроется в особенностях течения и эволюции ХМЛ, а также в некоторых исключительных качествах BCR-ABL-белка, являющегося триггером опухолевой трансформации при этом заболевании.

Действительно, сравнение структур 2 потенциально опухолеродных цитоплазматических тирозинкиназ SRC и ABL показывает, что они существенно различаются (рис. 1). Белок ABL по сравнению с белками SRC-семейства имеет очень протяженный С-конец, который содержит большое число различных функциональных доменов и мотивов. Эта особенность ABL-белка позволяет ему связываться и активировать (фосфорилировать) значительно большее количество разнообразных белков-мишеней. Причем это будут не только эффекторные белки путей сигнальной трансдукции (наиболее обычные мишени для SRC), но и белки, участвующие в клеточном ответе на повреждения ДНК, регуляции клеточного цикла и апоптоза, белки-эффекторы клеточной адгезии и миграции. Все эти многочисленные функции ABL тонко регулируются в клетке не только с помощью традиционных для протеинкиназ конформационных ограничений [3], но и с помощью контроля генной транскрипции, в результате которого могут синтезироваться 2 изоформы белка (ABL1a и ABL1b), локализующиеся в разных клеточных компартментах и выполняющие разные функции (рис. 1) [16]. Такая широкая палитра активностей позволяет ABL в случае его конститутивной активации самостоятельно индуцировать в клетке процессы малигнизации. Это делает ХМЛ, во всяком случае на первичных этапах своего развития (хроническая фаза), классическим примером опухоли, обладающей свойствами «онкогенной зависимости» (oncogene addiction) (см. Приложение 3) [17–19]. В онкоген-зависимом состоянии опухолевые клетки крайне чувствительны к препаратам, которые ингибируют активность онкогена, контролирующего основные клеточные пути пролиферации и/или выживания в этих клетках. Быстрая и эффективная инактивация онкобелка во время таргетной терапии приводит клетки опухоли в состояние «онкогенного шока» (oncogenic shock), вызывая их гибель в результате необратимого

апоптоза. Таким образом, складывается впечатление, что наличие у опухоли онкогенной зависимости является ее ахиллесовой пятой и важным обоснованием применения целенаправленной молекулярной терапии. Поэтому тестирование опухолей на наличие таких свойств – важный этап исследований больного, необходимый для повышения эффективности разрабатываемых сегодня новых методов лечения [18].

Лейкозные клетки при ХМЛ, как и клетки других неоплазий, в процессе развития опухоли могут приобретать дополнительные мутации [20], которые увеличивают их генетическую пластичность – клетки быстрее накапливают новые геномные aberrации, активируют иные, «резервные» сигнальные пути выживания, что, в свою очередь, приводит к утрате их онкогенной зависимости. Все эти процессы, разворачивающиеся на терминальных стадиях эволюции опухоли (фаза бластного криза при ХМЛ), приводят к существенному повышению резистентности лейкозных клеток к таргетной терапии, направленной против активности белка BCR-ABL. С этой точки зрения нет ничего неожиданного в том, что при ХМЛ на стадиях акселерации и бластного криза ответ на терапию иматинибом чаще всего был очень слабым.

Другой неожиданностью применения иматиниба для лечения ХМЛ стали результаты анализа случаев рецидивов заболевания после курса терапии. Рецидивные опухоли почти всегда приобретали устойчивость к иматинибу, и в большинстве случаев эта резистентность была результатом мутаций в киназном домене BCR-ABL, которые приводили к уменьшению эффективности связывания ингибитора с активным центром фермента [11, 21]. Мутациям подвергались в основном кодоны, которые кодировали аминокислотные остатки, формирующие АТФ-связывающий «карман» или Р-петлю в активном центре BCR-ABL [3]. К наиболее драматичному снижению (более чем в 20 раз) констант ингибирования (рис. 2B) иматинибом BCR-ABL приводили мутации T315I (замена треонина на изолейцин в 315 аминокислотном остатке) в АТФ-связывающем «кармане», а также Y253H (замена тирозина на гистидин) и E255V (замена глутамина на валин) в Р-петле активного центра тирозинкиназы. В рамках дарвинизма объяснить такое «целенаправленное» мутирование в определенном геномном локусе довольно трудно, тем более что общий уровень мутагенеза в резистентных к иматинибу лейкозных субклонах не был существенно выше, чем в других лейкозных клетках. Обычно такого рода феномены объясняют так – в опухолевой популяции еще до курса терапии могли существовать клетки, несущие мутации данного типа, из которых впоследствии и сформировался рецидивный, устойчивый к ингибитору лейкозный субклон. Однако следует отметить, что прямых экспериментальных доказательств наличия в первичных ДНК-пробах (взятых до начала лечения) мутаций, придающих резистентность к иматинибу, пока не получено...

Приложение 3. Онкогенная зависимость

В течение всей своей жизни клетка получает из окружающей среды и генерирует сама многочисленные сигналы, побуждающие ее к различному поведению – размножению, росту, покою, старению и даже смерти. Такое балансирование клеток между жизнью и смертью лучше всего иллюстрируется состоянием В-клеток в герминативных центрах, где в условиях постоянной внешней индукции процессов апоптоза, осуществляемой цитотоксическими Т-киллерами, выживают только В-клетки с высокой авидностью, которая позволяет им генерировать повышенный уровень BCR-сигнализации (см. [4], Приложение 2). В процессе развития опухоли ее клетки приобретают большое число различных геномных aberrаций, многие из которых дают им преимущество в росте и выживаемости по сравнению не только с нормальными клетками организма, но и с другими клетками опухоли. Чаще всего мутациям подвергаются протоонкогены и гены-супрессоры опухоли, причем в каждой опухоли в процессе ее эволюции формируется уникальный спектр активированных и инактивированных с помощью разных механизмов онкогенов и генов-супрессоров соответственно [1, 20]. Однако клетки некоторых опухолей могут длительное время существовать в состоянии, когда их жизнедеятельность во многом определяется конститутивной активацией одного онкогена, приводящей, в свою очередь, к аномально высокому уровню сигнализации какого-то одного пути выживания. Такое состояние опухолевых клеток называется «онкогенной зависимостью» (oncogene addiction) и оно характеризуется тем, что инактивация каким-либо образом данного онкогена в этих клетках неминуемо приведет к их гибели (рис. III) [17–19].

Явление «онкогенной зависимости» было подтверждено для нескольких онкогенов на мышиных моделях и опухолевых клетках человека. К таким онкогенам относятся c-MYC (неходжкинские лимфомы, Т-ОЛЛ, ОМЛ и остеогенная саркома), BCR-ABL (Ph<sup>+</sup> лейкозы), H-RAS (меланома), K-RAS (рак легких) и HER2 (рак груди) [18, 19]. Для всех этих опухолевых моделей показано, что инактивация индуцирующих развитие опухоли онкогенов или ингибирование синтезирующихся с них онкобелков приводили к гибели опухолевых клеток или к их реверсии в сторону нормального фенотипа. Кроме того, появляется все больше данных, которые подтверждают, что наличие или отсутствие статуса «онкогенной зависимости» у опухоли может играть решающую роль в эффективности применения таргетных препаратов при антираковой терапии.

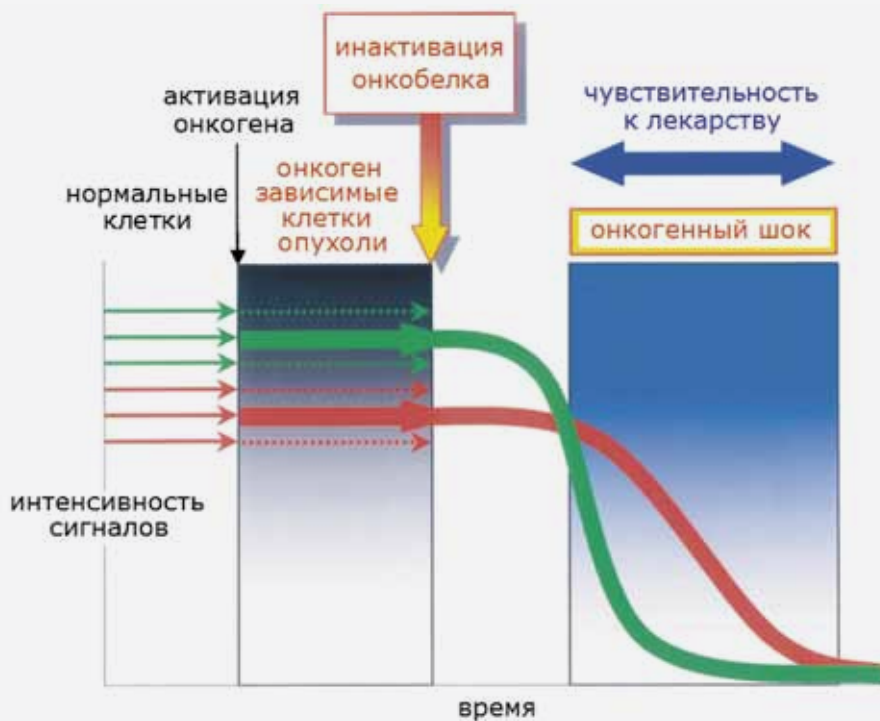
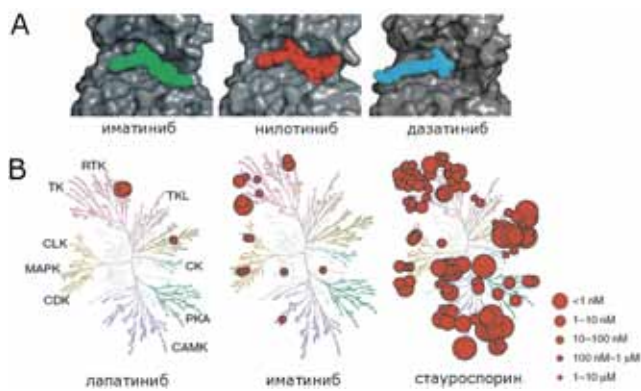


Рис. III. Схема, показывающая соотношение между онкогенной зависимостью и онкогенным шоком

В нормальных клетках многочисленные сигналы выживания (зеленые стрелки) преобладают над различными проапоптотическими стимулами (красные стрелки). В раковых клетках активация онкогена может приводить к аномальной активации одного из сигнальных путей выживания. Такое доминирующее положение одного из сигнальных путей (толстая зеленая стрелка) может привести к постепенной атрофии других путей выживания (пунктирные зеленые стрелки) и формированию состояния «онкогенной зависимости». В клетках существуют компенсационные механизмы сигналов смерти (пунктирные красные стрелки), а в онкогенно-зависимых клетках, вероятно, один из таких сигнальных путей (в норме уравновешивающий доминирующий в них сигнал выживания) может быть усилен (толстая красная стрелка). В состоянии онкогенной зависимости активированный путь выживания, контролируемый онкогенным белком, преобладает над проапоптотическими стимулами. При быстрой инактивации онкогенного белка, например с помощью эффективной таргетной терапии, возникает состояние «онкогенного шока» (oncogenic shock), при котором резкое затухание доминирующих сигналов выживания приводит к гибели клеток. Это связано с тем, что реакция проапоптотических клеточных путей на неожиданно сильное ослабление сигналов выживания будет более инертной. Таким образом, в течение определенного времени «уязвимости» (обозначено синей двусторонней стрелкой) проапоптотические сигналы будут преобладать над сигналами выживания и индуцировать необратимый апоптоз опухолевых клеток. Рисунок адаптирован из статьи S. Sharma & J. Settleman [37].



**Рис. 2.** Структура активного центра *ABL*-киназы в комплексе с различными ингибиторами (А) и селективность некоторых ингибиторов киназ (В)

(А) Показана поверхность кристаллических структур *ABL*-киназы в комплексе с иматинибом (зеленый), нилотинибом (красный) и дазатинибом (синий). Аминокислотные остатки *P*-петли и петли активации не показаны (см. также [3], глава 2, рис. 1).

(В) Различная селективность ингибиторов киназ показана на дендрограмме киназ — так называемой «киноме» (*kinome*), которая представляет собой условное изображение всех протеинкиназ человека, сгруппированных по родственному белковому семейству («ветки» киномого «дерева»). Справа — графическое изображение констант ингибирования ( $IC_{50}$  представляет собой концентрацию лекарства, которая требуется для 50 % ингибирования фермента). Чем меньше величина  $IC_{50}$ , тем эффективней ингибитор (здесь — больше диаметр красных кружков). Из диаграммы видно, что наиболее избирательным ингибитором является лапатиниб (фирменное название — *Tykerb*), который является высокоспецифичным ингибитором *HER2* и *EGFR* (см. таблицу). Специфичность иматиниба ниже, кроме *ABL* и *BCR-ABL* он в той или иной степени ингибирует другие цитоплазматические тирозинкиназы (*TK*), некоторые рецепторные тирозинкиназы (*RTK*) и киназы из других семейств. Очень активным, но неселективным ингибитором большого числа протеинкиназ является природный антибиотик стауроспорин.

Аббревиатуры основных семейств протеинкиназ, изображенных на «дерево «киномы» (слева): *SAMK* — calcium/calmodulin-dependent kinases; *CDK* — cyclin-dependent kinases; *CK* — casein kinase family; *CLK* — CDK-like kinases; *MAPK* — mitogen-activated protein kinases; *PKA* — protein kinase A family; *RTK* — receptor tyrosine kinases; *TK* — nonreceptor tyrosine kinases; *TKL* — tyrosine kinase-like kinases.

Рисунок адаптирован из статей E. Weisberg et al. [22] и I. Collins & P. Workman [23].

Для преодоления проблемы возникновения устойчивости к иматинибу, а также для увеличения специфичности и чувствительности лекарств были получены новые конкурентные ингибиторы *BCR-ABL* — нилотиниб и дазатиниб. Эти препараты также имеют сродство с АТФ-связывающим «карманом», но их константы ингибирования *BCR-ABL* превосходят иматиниб в 20 (нилотиниб) и даже в 300 раз (дазатиниб) [11]. Это связано с тем (рис. 2А), что конкурентные ингибиторы занимают немного различающиеся положения в АТФ-связывающем «кармане» белка. На рис. 2А показана схема локализации всех 3 конкурентных ингибиторов в активном центре *BCR-ABL*, из которой видно, что эти соединения занимают здесь немного различающиеся положения (они как бы «ползают» по активному центру). Такое разное позиционирование может приводить к тому, что некоторые мутации, которые придавали белку устойчивость к иматинибу, не будут оказывать существенного влияния на эффективность связывания но-

вых ингибиторов с ферментом, так как в данном случае эти мутировавшие аминокислоты могут не участвовать во взаимодействиях белок–ингибитор. Однако 1 мутация (Т315I) оказалась «роковой» и для этих лекарственных препаратов, вызывая снижение их сродства к ферменту более чем в 200 раз [11]. Несмотря на наличие определенной перекрестной чувствительности разных ингибиторов к некоторым мутациям, вызывающим резистентность к иматинибу, применение комбинированной терапии с использованием сочетаний различных таргетных препаратов способно существенно снизить риск рецидива заболевания.

### Ингибиторы протеинкиназ иного типа

Ранее мы уже отмечали, что использование АТФ в качестве прототипа ингибиторов протеинкиназ может приводить к низкой специфичности таргетных препаратов. Эти опасения вызваны тем, что все киназы имеют АТФ-связывающие участки, и ингибиторы подобного типа могут в той или иной степени взаимодействовать и инактивировать целый ряд нормальных клеточных протеинкиназ, вызывая, таким образом, побочные цитотоксические эффекты [3]. Наглядная иллюстрация различной специфичности конкурентных ингибиторов протеинкиназ представлена на рис. 1В. Однако такая мультикиназная активность некоторых ингибиторов позволяет использовать эти препараты для лечения нескольких заболеваний. Так, например, иматиниб достаточно успешно используется при таргетной терапии стромальных опухолей желудочно-кишечного тракта (*GIST*, см. таблицу). А ингибитор *VX-680/МК-0457*, который был разработан для инактивации некоторых киназ клеточного цикла, неожиданно показал активность против Т315I мутантной *BCR-ABL*-киназы, что позволило применить этот препарат для лечения рецидива ХМЛ у пациентов с иматиниб-устойчивым фенотипом [24]. В обоих случаях открытие «побочной» активности этих препаратов было сделано после их клинического испытания по другим показаниям. Поэтому доклиническая проверка специфичности получаемых ингибиторов с использованием тест-систем, содержащих большую часть ферментов «киномы» человека (рис. 2В), может существенно расширить палитру возможного клинического применения имеющихся таргетных препаратов.

В лекции № 3, которая вышла из печати в конце лета 2011 г., было высказано предположение о том, что специфичность таргетных препаратов, мишенью которых станут разнообразные неактивные конформации протеинкиназ, будет значительно выше современных конкурентных ингибиторов [3]. А уже через пару месяцев появилась публикация, в которой сообщалось о первых попытках получить соединения такого типа [25]. В этой работе описана альтернативная стратегия «нацеливания» на регуляторные модули *BCR-ABL*, которая может служить хорошим дополнением к терапии конкурентными ингибиторами. Авторы получили мини-антитело (*mono body*), которое стабилизирует ав-

тоингибирующую конформацию тирозинкиназы. Дело в том, что для формирования активной конформации фермента необходимо определенное взаимодействие между SH2 и киназными доменами BCR-ABL, при котором образуется специфичная контактная поверхность (интерфейс) между этими доменами. Нарушение такого интерфейса приводит к дестабилизации активной конформации белка и инактивации тирозинкиназной активности. Полученное мини-антитело обладает способностью «вклиниваться» между SH2 и киназными доменами BCR-ABL, нарушая тем самым их взаимодействие. Это мини-антитело высокоспецифично и образует с белком очень стабильные комплексы, что приводит к полному ингибированию киназной активности BCR-ABL как *in vitro*, так и в первичных ХМЛ-клетках, вызывая их апоптоз. Неудобство полученного агента для клинического применения заключается в том, что самостоятельно проникать в клетку, как это делают низкомолекулярные конкурентные ингибиторы, он не может. Поэтому в экспериментах *in vivo* его приходилось вводить в клетки с помощью трансфекции. Но важен сам факт, что агенты, дестабилизирующие активную конформацию протеинкиназ, обладают значительным терапевтическим потенциалом.

Регуляция ферментативной активности путем взаимодействия с белковыми доменами, которые не относятся к каталитическому центру, называется аллостерической. Поэтому описанное выше мини-антитело относится к аллостерическим таргетным препаратам. Ранее были описаны другие аллостерические таргетные агенты, мишенью которых являлась тирозинкиназа BCR-ABL [26, 27]. Например, одним из аллостерических регуляторных сайтов ABL-белка является «карман» на поверхности С-половины киназного домена, который взаимодействует с миристатином (остаток миристиновой кислоты, см. [2], Приложение 1) при формировании стабильной автоингибирующей конформации (рис. 1B). Удаление миристата из этого «кармана» при его связывании с мембраной в определенных компартментах клетки приводит к дестабилизации и разрушению автоингибирующей конформации ABL и резкому увеличению киназной активности. В гибридном белке BCR-ABL сайт миристилирования (к которому прикрепляется миристат при модификации белка, в ABL он находится в экзоне 1b) отсутствует, так как он удаляется при хромосомной транслокации (рис. 1A). Поэтому было высказано предположение, что химические соединения, способные прочно связываться с миристат-«карманом», могут восстанавливать некоторые автоингибирующие свойства, утерянные BCR-ABL. Однако первые созданные агенты (например, GNF2), взаимодействующие с миристат-«карманом», оказались не очень удачными, так как многие BCR-ABL-мутации, устойчивые к конкурентным ингибиторам (в том числе и T315I), каким-то загадочным образом были резистентны к GNF2.

Сегодня предпринимаются попытки создать эффективные аллостерические ингибиторы BCR-ABL, ориентированные не только на миристат-«карман» или поверхность взаимодействия между SH2 и киназными доменами, но и на N-концевой домен олигомеризации в BCR-части онкобелка BCR-ABL [27]. Этот домен очень важен для реализации конститутивной активации BCR-ABL, так как димеризация этого белка приводит к сближению и перекрестному фосфорилированию киназных доменов ABL, что приводит к активации тирозинкиназы. Данный процесс аналогичен активации рецепторных протеинкиназ в результате их димеризации при связывании с лигандом [2, 3]. Создание обширного набора таргетных препаратов, нацеленных на различные функциональные домены онкобелков, позволит в будущем принимать рациональные решения для получения хороших результатов путем дифференциального сочетания лекарств с различной специфичностью.

Стоит также отметить факты, которые свидетельствуют о том, что опухолевые клетки могут совершенно по-разному реагировать на фактически идентичное воздействие (ингибирование киназной активности препаратами, нацеленными на АТФ-связывающий участок белка) в зависимости от того, какая протеинкиназа подвергается атаке. Например, белок-«многостаночник» BCR-ABL, имеющий много разных клеточных мишеней, и активность которого определяет онкогензависимый характер опухоли, является важнейшим фактором поддержания опухолевого статуса клетки. Потеря его активности для клеток неприемлема, поэтому стратегия лекарственной резистентности реализуется в виде мутаций аминокислот в активном центре фермента, что приводит к ухудшению его связывания ингибиторами и восстановлению онкогенной активности. В то время как применение ингибитора вемурафениба, специфично инактивирующего серин-треониновую протеинкиназу B-RAF, для лечения метастатической меланомы, клетки которой имеют активирующие мутации в гене B-RAF (см. таблицу), часто сопровождалось другими ответами на терапию. Белки RAF являются важнейшими компонентами RAS-RAF-МЕК-ERK-пути сигнальной трансдукции – основного индуктора пролиферации клеток (см. [3], рис. 2), поэтому ингибирование RAF должно приводить к затуханию этого сигнального пути и торможению клеточного деления. Однако совершенно парадоксальным оказался тот факт, что клетки опухоли, ставшие резистентными к препарату, показывали существенное увеличение МЕК-ERK-сигнализации и клеточной пролиферации [28]. Исследование этого парадокса выявило удивительную генетическую пластичность клеток меланомы, которая позволяла им с помощью различных механизмов преодолевать влияние ингибитора. И хотя B-RAF является важным компонентом сигнальной трансдукции, стратегия обретения опухолевыми клетками резистентности была связана не с восстановлением былой онкогенной ак-



тивности B-RAF, а с компенсацией этой потери с помощью активации других компонентов сигнального пути [29]. Все дополнительные aberrации, приобретенные (или отобранные) клетками опухоли под селективным давлением терапии, приводили к одному результату – поддержанию аномально высоких уровней RAS-RAF-MEK-ERK-сигнализации и клеточной пролиферации, т. е. к восстановлению (правда, уже в более агрессивной форме) прежнего опухолевого фенотипа.

### Заключение

*Пациент является наиболее важным фактором, определяющим терапевтическую эффективность.*

Гиппократ (цитируется по [30])

Очевидно, что онкогематология является первой медицинской дисциплиной, которая вплотную подошла к реализации стратегии, известной сегодня как «персонализированная медицина» (personalized medicine), при которой выбор лечения для каждого пациента осуществляется индивидуально. Воз-

можность применения такого подхода отражает многие достижения в онкологии и связанных с ней дисциплинах: 1) прогресс в познании молекулярной и генетической природы опухолей; 2) появление технологий выявления опухоль-специфичных и прогностических биомаркеров, позволяющих проводить более дифференцированную стратификацию пациентов и осуществлять постоянный контроль за ходом терапевтического процесса; 3) возникновение индустрии разработки новых лекарственных препаратов для таргетной терапии. Все это позволяет отойти от эмпирической модели лечения – «один препарат подходит всем» – к целенаправленному индивидуальному подходу, основанному на рациональном клиническом применении высокоспецифичных противоопухолевых лекарств в сочетании с постоянным диагностическим тестированием процесса терапии на клеточном и молекулярном уровнях [31]. Все вышесказанное представляет собой следующий шаг в улучшении качества оказания медицинской помощи онкологическим больным.

## Л и т е р а т у р а

1. Домнинский Д.А. Молекулярные механизмы лейкогенеза (цикл лекций для врачей). Лекция № 1. Онкогематол 2010;4:49–56.
2. Домнинский Д.А. Молекулярные механизмы лейкогенеза. Лекция № 2. Механизмы реализации сигнальной трансдукции. Онкогематол 2011;1:76–84.
3. Домнинский Д.А. Молекулярные механизмы лейкогенеза. Лекция № 3. Гемобласты миелоидного происхождения. Онкогематол 2011;3:82–93.
4. Домнинский Д.А. Молекулярные механизмы лейкогенеза. Лекция № 4. Гемобласты лимфоидного происхождения. Онкогематол 2011;4:39–49.
5. Martini M., Vecchione L., Siena S. et al. Targeted therapies: how personal should we go? Nat Rev Clin Oncology 2012;9:87–97.
6. Dancey J., Bedard P., Onetto N., Hudson T. The genetic basis for cancer treatment decisions. Cell 2012;148:409–20.
7. Переводчикова Н. Таргетные препараты и их место в современной терапии опухолевых заболеваний. Клинич онкогематол 2009;2:367–73.
8. Billingsley M. Druggable targets and targeted drugs: enhancing the development of new therapeutics. Pharmacology 2008;82:239–44.
9. Oflazoglu E., Audoly L. Evolution of anti-CD20 monoclonal antibody therapeutics in oncology. MAbs 2010 Jan–Feb;2(1):14–9.
10. Licht J. Acute promyelocytic leukemia – weapons of mass differentiation. New Engl J Med 2009;360:928–30.
11. Quintas-Cardama A., Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. Blood 2009;113:1619–30.
12. Melo J., Barnes D. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. Nat Rev Cancer 2007;7:441–53.
13. Hazlehurst L., Bewry N., Nair R., Pinilla-Ibarz J. Signaling networks associated with BCR-ABL dependent transformation. Cancer Control 2009;16:100–7.
14. Frazer R., Irvine A., McMullin M. Chronic myeloid leukaemia in the 21st century. Ulster Med J 2007;76:8–17.
15. Hunter T. Treatment for chronic myelogenous leukemia: the long road to imatinib. J Clin Invest 2007;117:2036–43.
16. Colicelli J. ABL tyrosine kinases: evolution of function, regulation and specificity. Sci Signal 2010;3:re6.
17. Sharma S., Settleman J. Exploiting the balance between life and death: targeted cancer therapy and «oncogenic shock». Biochem Pharm 2010;80:666–73.
18. Weinstein I., Joe A. Oncogene addiction. Cancer Res 2008;68:3077–80.
19. Luo J., Solimini N., Elledge S. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. Cell 2009;136:823–37.
20. Hanahan D., Weinberg R. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011;144:646–74.
21. O'Hare T., Eide C., Deininger M. BCR-ABL kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. Blood 2007;110:2242–9.
22. Weisberg E., Manley P., Cowan-Jacob S. et al. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. Nat Rev Cancer 2007;7:345–56.
23. Collins I. & Workman P. New approaches to molecular cancer therapeutics. Nat Chem Biol 2006;2:689–700.
24. Karaman M., Herrgard S., Treiber D. et al. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. Nat Biotechnol 2008;26:127–32.
25. Grebien F., Hantschel O., Wojcik J. et al. Targeting the SH2-kinase interface in Bcr-Abl inhibits leukemogenesis. Cell 2011;147:306–19.
26. Hassan Q., Sharma S., Warmuth M. Allosteric inhibition of BCR-ABL. Cell Cycle 2010;9(18):3710–4.
27. Hantschel O. Allosteric BCR-ABL inhibitors in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: novel opportunities for drug combinations to overcome resistance. Haematologica 2012;97:157–9.
28. Cox A., Der C. The Raf inhibitor paradox: unexpected consequences of targeted drugs. Cancer Cell 2010;17:221–3.
29. Cox A., Der C. The RAF inhibitor paradox revisited. Cancer Cell 2012;21:147–9.
30. Jackson D., Sood A. Personalized cancer medicine – advances and socio-economic challenges. Nat Rev Clin Oncol 2011;8:735–41.
31. Thangue N., Kerr D. Predictive biomarkers: a paradigm shift towards personalized cancer medicine. Nat Rev Clin Oncol 2011;8:587–96.
32. Bleicher K., Bohm H-J., Muller K., Alanine A. Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. Nat Rev Drug Discovery 2003;2:369–78.
33. Чугунов А. Драг-дизайн: как в современном мире создаются новые лекарства. Биомолекула 2004 (<http://www.biomolecula.ru/content/15>).
34. Schneider G., Fechner U. Computer-based de novo design of drug-like molecules. Nat Rev Drug Discovery 2005;4:649–63.
35. Dittrich P., Manz A. Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery. Nat Rev Drug Discovery 2006;5(3):210–8.
36. Ding S., Schultz P. A role for chemistry in stem cell biology. Nature Biotechnology 2004;22:833–40.
37. Sharma S., Settleman J. Oncogene addiction: setting the stage for molecularly targeted cancer therapy. Genes Dev 2007;21:3214–31.