# S49076 – nový vysoko-aktívny inhibítor MET, AXL a FGFR tyrozín kináz

## Slide I

Tyrozín kinázové receptory – interakcia s príslušnými extracelulárnymi ligandami, aktivácia kaskády fosforylačnej aktivácie signalizačných proteínov.

Aberantná aktivácia určitých tyrozín kinázových receptorov je spätá s progresiou tumorového rastu – zaujímavý terapeutický cieľ z hľadiska liečby rakovinových ochorení.

**MET** receptor – aktivujúci ligand **HGF** (hepatocyte growth factor), indukuje aktiváciu proteínu **GAB1**, ktorý ovplyvňuje tubulogenézu, bunkový rast a apoptózu, indukuje aj aktiváciu signalizačných dráh (PI3K)-AKT-mTOR a RAS-RAF-MEK-ERK, ktoré ovplyvňujú bunkové „prežívanie“, proliferáciu, migráciu a angiogenézu. Deregulácia (obmedzenie regulačných zásahov) MET signalizácie v dôsledku nadexpresie MET a HGF vedie k rozvoju rakovinových ochorení. Prítomnosť zmutovaných MET receptorov bola zaznamenaná o mnohých typov rakovinových buniek – dôležitá úloha MET v procese tumorogenézy.

**AXL** receptor – je členom TAM (TYRO3, AXL, MER) TK rodiny, aktivujúci ligand **GAS6** (growth-arrest-specific gene 6), aktivovaný AXL receptor indukuje aj aktiváciu signalizačných dráh (PI3K)-AKT-mTOR a RAS-RAF-MEK-ERK, ktoré ovplyvňujú „prežívanie“, proliferáciu a migráciu rakovinových buniek *in vitro* a tumorovú angiogenézu a metastázovanie *in vivo*. Receptory AXL a MER sa podieľajú aj na regulácii interakcií tumorových stromálnych buniek (podporné „prepojovacie“ tkanivá nachádzajúce sa v každom orgáne – fibroblasty, pericyty ...) prostredníctvom sekrécie cytokínov. Nadexpresia AXL a GAS6 predstavuje jeden z kľúčových mechanizmov vedúcich k aktivácii mnohých typov rakovinového bujnenia.

**FGFR** (fibroblast growth factor receptor) – prostredníctvom aktivácie proteínu FRS2 a signalizačných dráh (PI3K)-AKT-mTOR a RAS-RAF-MEK-ERK ovplyvňuje bunkové delenie, „prežitie“, migráciu a diferenciáciu. FGFR aktivácia vedie k angiogenéze a patogenéze (chorobné zmeny v organizme spôsobujúce rakovinu) mnohých typov tumorov. K aktivácii FGFR dochádza v dôsledku mutácie, amplifikácie alebo nadexpresie týchto receptorov, prípadne ich ligandov.

**Koncepty popisujúce spoločnú úlohu a kooperáciu MET, AXL/MER a FGFR TK pri rakovinovom raste.**

**1. koncept:** Okrem toho, že spomínané receptory buď priamo alebo nepriamo interagujú na bunkovom povrchu, aj signalizačné dráhy, ktoré spúšťajú, koordinovane (navzájom sa ovplyvňujúc) vedú k tumorovej progresii.

**2.** **koncept:** Aktuálne výskumy dokázali významnú úlohu MET, AXL/MER a FGFR TK pri rezistencii voči rôznym typom protirakovinovej liečby (jednotlivo alebo kooperatívne).

## Slide II

Spracovaný článok popisuje farmakologické vlastnosti S49076 – nového, aktívneho, ATP-kompetitívneho inhibítora MET, AXL/MER a FGFR 1, 2, 3 TK (momentálne vo fáze 1 - klinického testovania). **Obrázok inhibítora**. S49076 preukázateľne inhibuje autofosforyláciu spomínaných TK receptorov a tým pádom aj ich signalizačné dráhy *in vitro* aj *in vivo*, blokuje rast a migráciu buniek vykazujúcich nadexpresiu spomínaných TK receptorov a vykazuje vysokú protirakovinovú aktivitu v testoch na modelových tumoroch („human tumor xenograft“ – ľudské rakovinové bunky sú transplantované pod kožu alebo, v závislosti od typu rakoviny, do príslušného orgánu imunodeficientných myší).

## Slide III

**S49076 je aktívnym inhibítorom všetkých prirodzených aj zmutovaných izoforiem MET, AXL, MER a FGFR 1, 2, 3 TK.** S49076 bol objavený prostredníctvom medicínsko-chemického výskumu za pomoci štruktúrno-biologických analýz a molekulového modelovania (cieľom výskumu bola identifikácia nových aktívnych inhibítorov MET). Väzbové interakcie ligandu S49076 v ATP-väzbovom mieste MET TK boli definované pomocou X-Ray analýzy kryštálov komplexov MET TK a analógov S49076. (**Figure 1.**)

Rádiometrická analýza ukázala, že S49076 je schopný efektívne inhibovať MET, AXL, MER a FGFR 1, 2, 3 s hodnotami IC50 pod 20 nmol/L. Dôležitý je aj fakt, že inhibičná aktivita voči všetkým testovaným klinicky relevantným izoformám MET a FGFR 1, 2 je veľmi podobná. (**Table 1.**)

Väzbová selektivita S49076 bola testovaná na vzorke 442 ľudských prirodzených a zmutovaných tyrozín kináz. Zistilo sa, že okrem cieľovej skupiny kináz (MET, AXL/MER, FGFR 1, 2, 3) bolo na úrovni IC50 pod 100 nmol/L inhibovaných iba 6 % zo všetkých testovaných kináz.

## Slide IV

**S49076 selektívne inhibuje MET, AXL a FGFR 1, 2, 3 signalizáciu v rakovinových bunkách.** Schopnosť látky S49076 inhibovať aktiváciu TK receptorov MET, AXL a FGFR 1, 2, 3 bola testovaná na kmeňoch rakovinových buniek, ktoré obsahujú konštantne aktivované formy spomínaných TK receptorov alebo formy aktivované po prídavku príslušných ligandov.

Autofosforylácia **MET** (Tyr1234/1235 – C-terminálna cytoplazmatická doména) bola detekovaná pomocou Western blot analýzy H441 NSCLC buniek – MET je nadexprimovaný a konštantne aktívny.

Po 2 hodinách inkubácie s S49076 – úplná inhibícia MET 10 nmol/L, IC50 2 nmol/L (denzitometrická analýza).

Dôležitým prvkom signalizačnej dráhy spúšťanej receptorom MET je proteín **GAB1**, ktorý je fosforylovaný (MET receptorom) na Tyr627. Predpokladaná inhibícia fosforylácie GAB1 proteínu bola tiež zaznamenaná. (**Fig. 2A**)

Inhibícia autofosforylácie **MET** (Tyr1349 – C-terminálna cytoplazmatická doména) látkou S49076 bola zaznamenaná v GTL-16 bunkách rakoviny žalúdka. S hodnotami IC50 3 nmol/L a IC90 10 nmol/L (ELISA – Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay). (**Fig. 2B**)

Úroveň inhibícia TK receptora **AXL** prostredníctvom S49076 bola detekovaná pomocou imunologického testu ELISA (bunky MEF s exprimovaným ľudským AXL). Hodnota IC50 56 nmol/L. (**Fig. 2C**)

Aktivácia AXL receptora indukovaná naviazaním GAS6 ligandu vedie k spusteniu príslušnej signalizačnej dráhy prostredníctvom fosforylácie AKT (Protein Kinase B) na Ser473. GAS6 ligand sa však viaže (aktivuje) aj na zvyšné dva receptory rodiny TAM – MER a TYRO3.

Detekcia špecificity inhibície **AXL** receptora v rakovinových bunkách prostredníctvom S49076 – identifikácia buniek, v ktorých je aktivácia AKT sprostredkovaná GA6 ligandom umožnená striktne AXL receptorom. Za týmto účelom bola použitá metóda siRNA na inhibíciu expresie AXL, MER a TYRO3 jednotlivo alebo všetkých naraz (bunky rakoviny prsníka MDA-MB-231). Nasledovalo pridanie GAS6 ligandu a vyhodnotenie AKT fosforylácie prostredníctvom Western blot analýzy.

Výsledok – zatiaľ čo inhibícia AXL expresie úplne zamedzila fosforylácii AKT po pridaní GAS6 ligandu, inhibícia expresie MER a/alebo TYRO3 nemala takmer žiadny efekt. Z toho vyplýva, že AXL je hlavným mediátorom fosforylácie AKT.

V tomto biologickom modeli (inhibícia expresie MER/TYRO3, exprimovaný len AXL) látka S49076 inhibovala AXL signalizáciu prostredníctvom AKT s IC50 33 nmol/L.

Ďalšie overenie selektivity látky S49076 na MET a AXL signalizáciu. Bunky MDA-MB-231 obsahujúce S49076 boli stimulované pomocou HGF – aktivácia MET alebo EGF – aktivácia EGFR. Podľa očakávaní, AKT fosforylácia bola (na nmol úrovni) inhibovaná za prítomnosti HGF, zatiaľ čo v prípade EGFR/EGF aktivácie nebola zaznamenaná žiadna inhibícia ani pri použití viac ako 1 µmol/L množstva látky S49076. (**Fig. 2D**)

Inhibícia receptorov **FGFR 1, 2, 3** (a ich príslušných signalizačných dráh) bola testovaná na rakovinových bunkách, ktoré sú schopné individuálne nadexprimovať jednotlivé uvedené receptory. Bunky H1703 NSCLC disponujú vysokým obsahom **FGFR 1**, ktorý možno aktivovať prídavkom ligandu FGF2. SNU-16 bunky rakoviny žalúdka a RT-112 bunky rakoviny močového mechúra obsahujú konštantne aktivované formy receptorov **FGFR 2, 3**. Vo vyššie uvedených bunkách látka S49076 účinne inhibovala autofosforyláciu receptorov na zvyškoch Tyr653/654 a forsforyláciu proteínu **FRS2** na zvyšku Tyr436 (FGFR-specific adaptor protein). Na základe denzitometrickej analýzy bola stanovená hodnota IC50 v rozmedzí 50 – 200 nmol/L. Bola zaznamenaná aj znížená intenzita fosforylácie príslušných signalizačných proteínov **ERK 1, 2** na zvyškoch Thr202 a Tyr204. (**Fig. 2E - G**)

Veľké množstvo v súčasnosti klinicky testovaných „multitarget“ inhibítorov účinne inhibuje receptor **VEGFR2**. Tento receptor zohráva kľúčovú úlohu v procese tumorového angiogénneho rastu a okrem toho sa výrazne podieľa aj na fyziologickej regulácii cievneho tonusu (popisuje kontrakčnú aktivitu cievneho hladkého svalstva) – inhibícia VEGFR2 receptora ovplyvňuje maximálnu tolerovanú dávku „molekúl inhibítora“. Receptor VEGFR2 sa nenachádzal v kinázovom inhibičnom profile pre zlúčeninu S49076 (neviaže sa na VEGFR2).

Potvrdenie „neinterakcie/neinhibície“ S49076 – **VEGFR2** na bunkovej úrovni – ELISA analýza intracelulárnej (HUVEC – Human Umbilical Vein Endothelial Cells) autofosforylácie VEGFR2 na zvyšku Tyr1054 za prítomnosti S49076 (inkubácia VEGFR2 s S49076 potom pridané VEGF). Nameraná hodnota IC50 pre S49076 bola 1.9 µmol/L (pre **nintedanib** – duálny VEGFR/FGFR inhibítor je IC50 rovné 0.5 nmol/L). (**Fig. 2H**)

## Slide V

**S49076 je aktívny v biologických modeloch, ktoré vykazujú rezistenciu na bevacizumab a úplne inhibuje rast rakoviny hrubého čreva (**xenotransplantáty – pravdepodobne ľudské tumorové bunky transplantované do myši**) v kooperácii s bevacizumabom.**

**Bevacizumab** predstavuje oficiálne schválené protirakovinové (kombinatoriálne) liečivo fungujúce na základe VEGF antagonizmu. Odozva na liečbu touto látkou je len čiastočná (nie u všetkých pacientov funguje) a jeho účinok je časovo limitovaný (krátkodobý).

Testy uskutočnené na xenotransplantátoch karcinómu hrubého čreva HT-29 ukázali na konci liečby 71 % inhibíciu rastu tumoru (bevacizumab podávaný dvakrát týždenne). (**Fig. 6A**) Vzhľadom na to, že bunky HT-29 exprimujú receptory VEGFR1 aj VEGFR3, inhibičný efekt bevacizumabu môže byť výsledkom kombinácie efektu na tumorovú vaskulatúru a efektu priamo na tumorové bunky (migrácia, proliferácia, prežitie...).

Látka S49076 samostatne pri dennej dávke 100 mg/kg ukázala na konci liečby len čiastočnú 65 % inhibíciu. Táto skutočnosť bola očakávaná, vzhľadom na to, že analyzovaný typ tumoru (HT-29) ukázal len slabú odozvu na S49076 inhibíciu na monovrstve agaru aj na trojrozmernej agarovej kultúre. Avšak, kombinovaná terapia využívajúca bevacizumab aj látku S49076 súčasne viedla takmer k úplnej inhibícií tumorového rastu!

Na analýzu S49076 senzitivity tumorov s nadobudnutou rezistenciou na bevacizumab (po 2 až 3 týždňovej liečbe bevacizumabom) boli použité xenotransplántáty buniek rakoviny hrubého čreva LS-174T. (**Fig. 6B**) V tomto biologickom modeli mala následná aplikácia látky S49076 za následok kompletnú inhibíciu tumorového rastu – toto naznačuje „prepnutie“ tumoru zo závislosti na VEGFR signalizácii a angiogenéze na závislosť na signalizácii MET, AXL alebo FGFR.

## Slide VI

**Záver.** Receptory MET, AXL a FGFR boli identifikované ako dôležité mediátory progresie tumorového rastu v prípade mnohých typov rakovinových ochorení. Tieto receptory pôsobia pri aktivácii príslušných bunkových signalizačných dráh buď samostatne alebo synergicky. Hlavné uplatnenie inhibície týchto RTK spočíva v prípade rakovinových ochorení kde bola zaznamenaná primárna alebo získaná rezistencia voči doposiaľ používaným terapeutickým postupom (vrátane tých, ktoré sú zamerané na inhibíciu iných typov RTK). Liečivo, ktoré je schopné simultánne atakovať MET, AXL a FGFR receptory predstavuje potenciálny benefit nie len pre pacientov, u ktorých dochádza k individuálnej aktivácii jedného z týchto receptorov, ale aj pre pacientov, u ktorých sa na dosiahnutie maximálne terapeutickej efektivity vyžaduje kombinovaná inhibícia spomínaných RTK.

Na základe spomínaných predklinických štúdií indikujúcich zaujímavý farmakologický profil látky S49076, v súčasnosti prebieha u onkologických pacientov 1. fáza klinických štúdií.