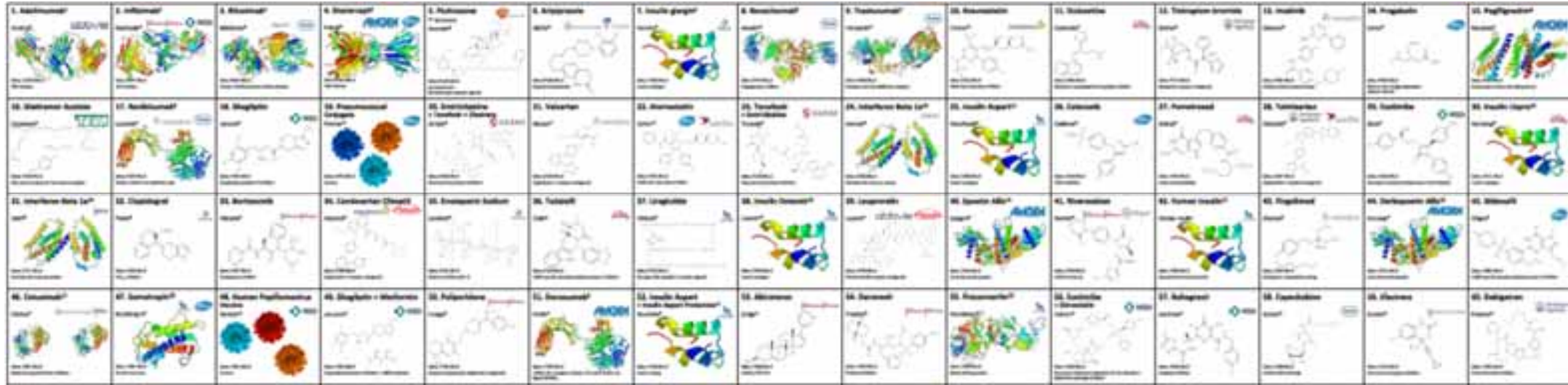


Irreverzibilis fehérjemódosítások a gyógyszerkutatásban: a célzott kovalens gátlószerektől az antitest-gyógyszer konjugátumokig



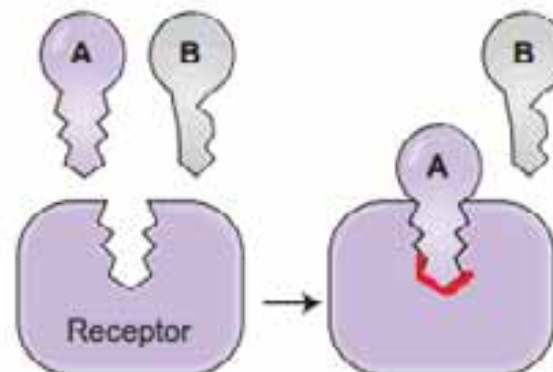
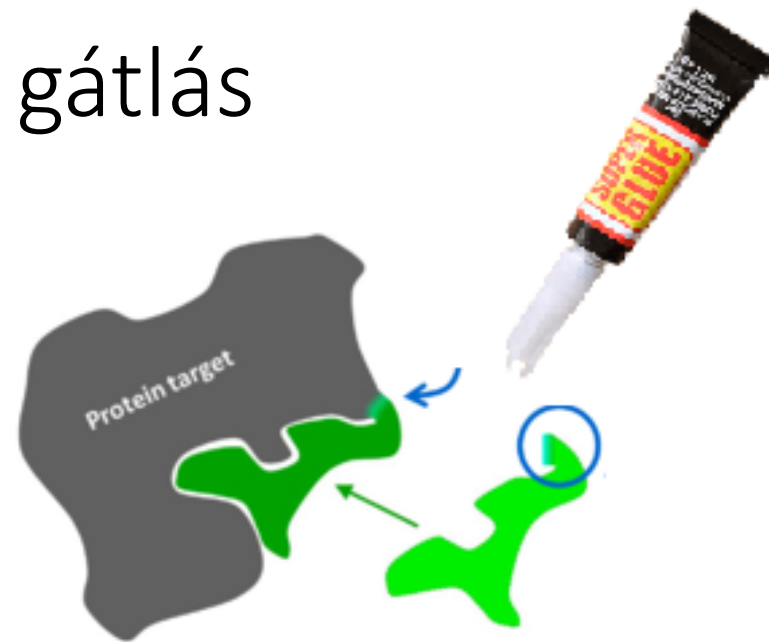
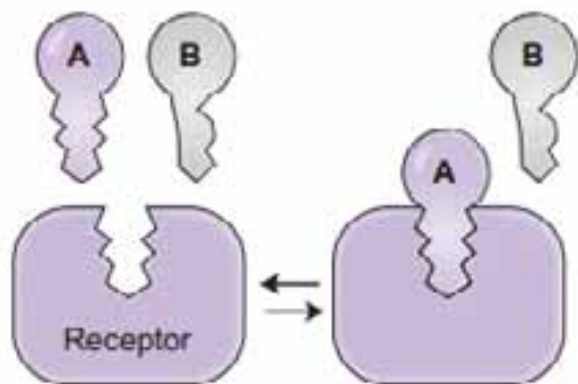
Keserű György Miklós
Gyógyszerinnovációs Központ, HUN-REN TTK

A jelenlegi gyógyszerkincs



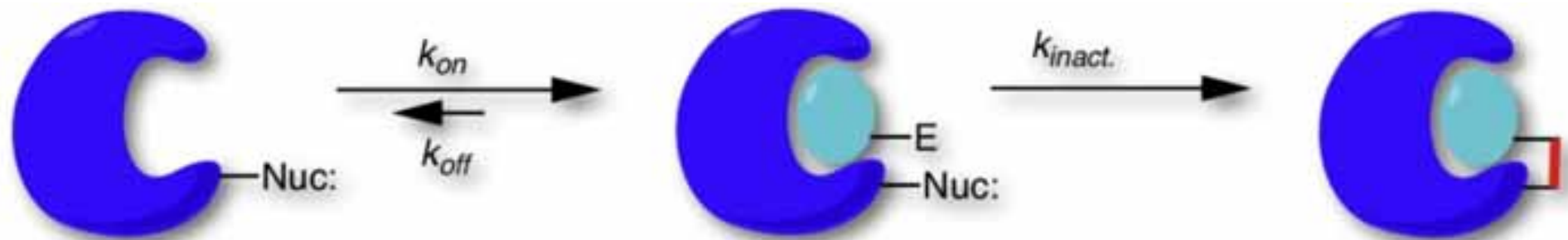
- Kismolekulák és biológiai terápiák
- Legtöbbjük hagyományos, reverzibilis hatásmechanizmussal hat
- Az irreverzibilis gátlók aránya kisebb mint 1%

Reverzibilis és irreverzibilis gátlás



Kovalens módosítások

- A célfehérjével kovalens kölcsönhatást alakítunk ki
- A kovalens kötés a fehérje nukleofil oldalláncaival jön létre (Cys-SH, Thr-OH, Lys-NH₂, Tyr-OH, His-NH)
- A molekuláris felismerési folyamatban nem-kovalens kölcsönhatások is részt vesznek
- A kötődés reverzibilis és irreverzibilis egyaránt lehet
- Alkalmazások: kovalens gátlószerek, antitest konjugátumok, kémiai biológiai próbák



Célzott kovalens (TCI) hatásmechanizmus

IRREVERSIBLE COVALENT



✗ Off-target toxicities when binding similar reactive amino acids.

✗ Immunogenic risks.

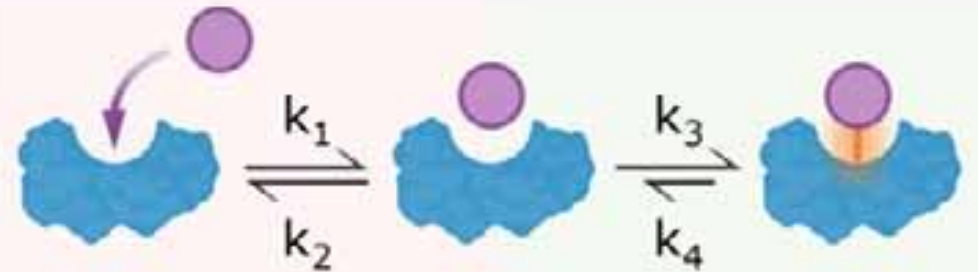
✓ Targets poorly conserved amino acids for higher selectivity.

✓ Prolonged effect.

✓ Challenging targets.

✓ Less frequent dosing.

REVERSIBLE COVALENT



✗ Lower off-target toxicities.

✗ Lower immune system activation.

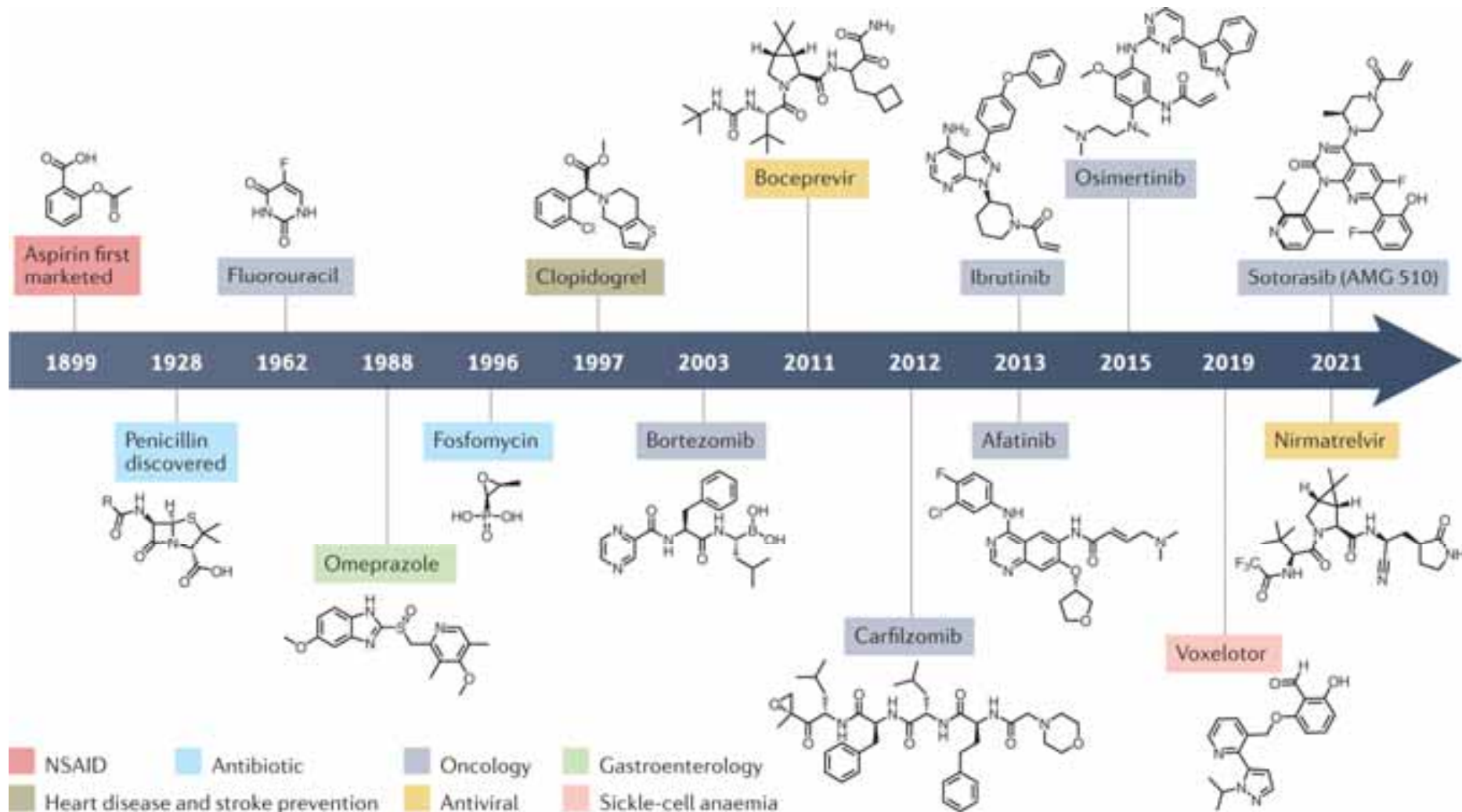
✓ Tunable kinetic selectivity.

✓ Targets poorly conserved amino acids for higher selectivity.

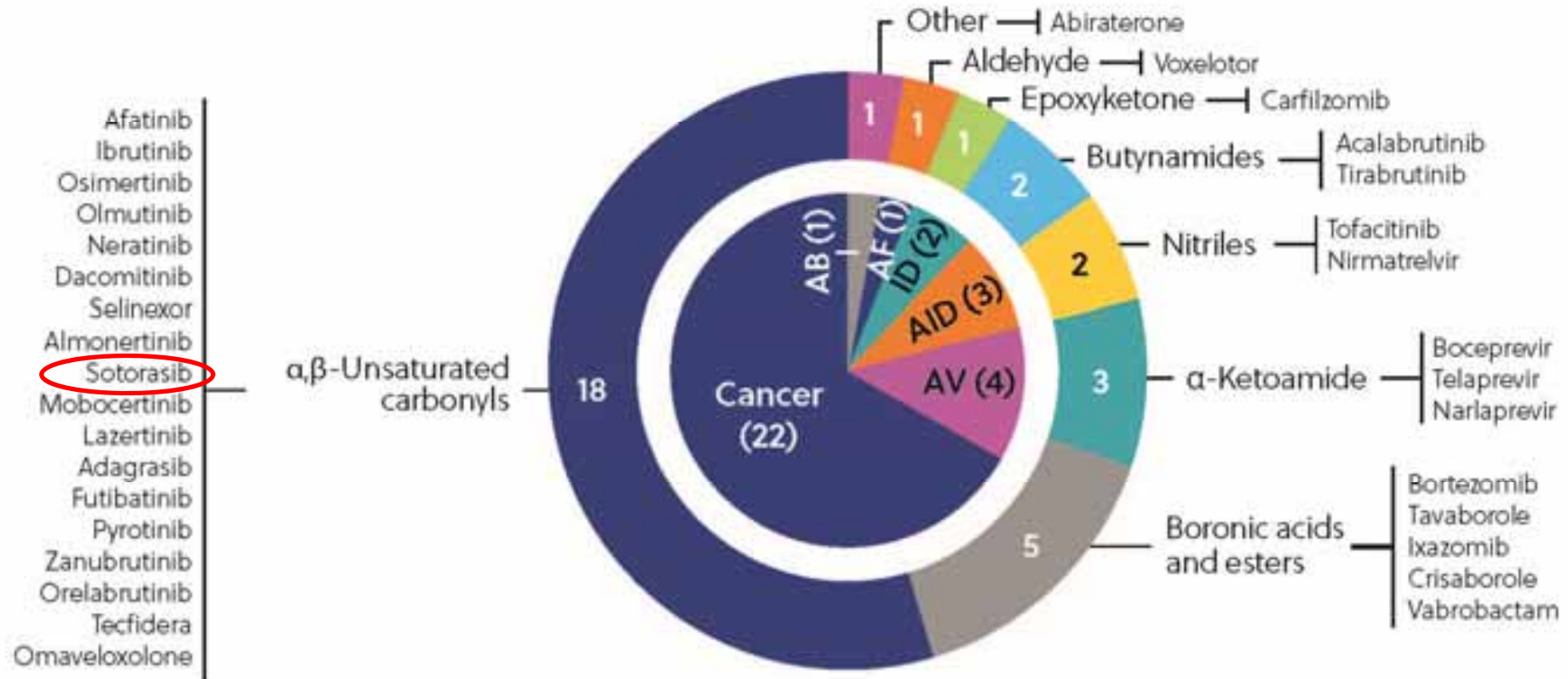
✓ Prolonged effect.

✓ Less frequent dosing.

Kovalens hatásmechanizmusú gyógyszerek



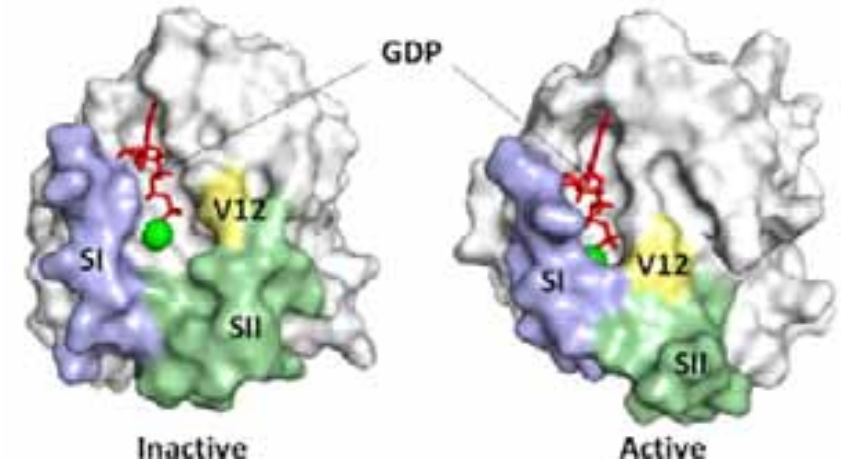
Célzott kovalens gyógyszerek



AB = Antibacterial; AF = Antifungal; ID = Inherited Disorders; AID = Auto immune disorder; AV = Antiviral

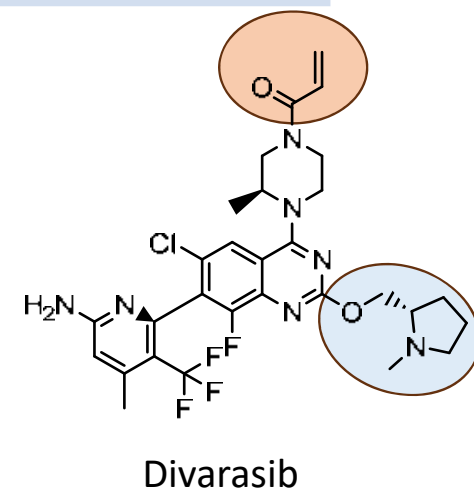
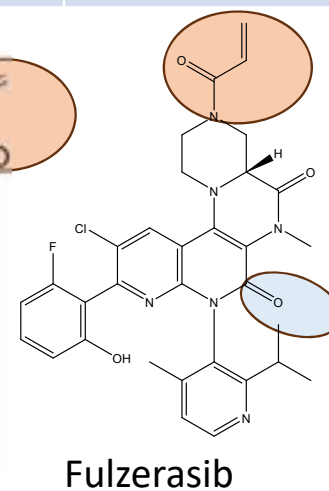
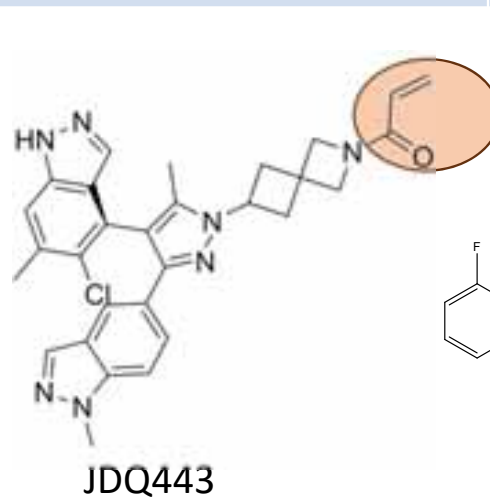
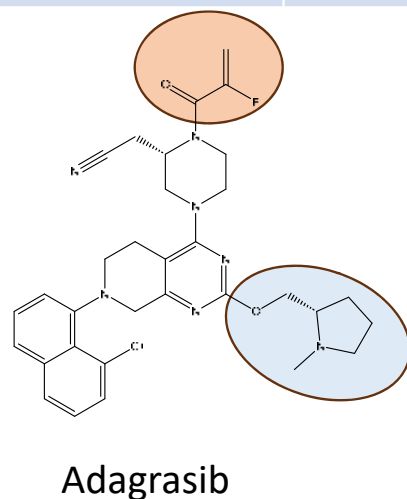
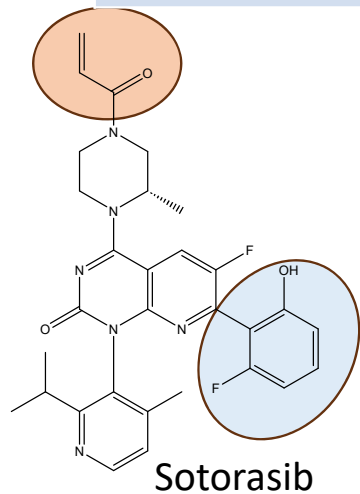
Miért jó de nehéz célpont a KRAS?

- A tumorok 30%-ban aktív mutánsa van
- A közvetlen gátlás nehéz
 - Nincsenek jól definiált kötőhelyek (PPI)
 - Változó szerkezetű dinamikus fehérje
 - Pikomolárs GTP affinitás
- A közvetett gátlás lehetősége
 - Downstream jelátvitelt moduláló vegyületek
 - Epigenetikai megközelítések (telomerázgátlók, RNS-interferencia)
 - Szintetikus letalitáson alapuló megközelítések (ciklinfüggő kinázgátlók)
 - Mindegyik kudarc az aktivitás vagy a szelektivitás hiánya miatt



KRAS G12C – a leggyakoribb onkogén mutáns

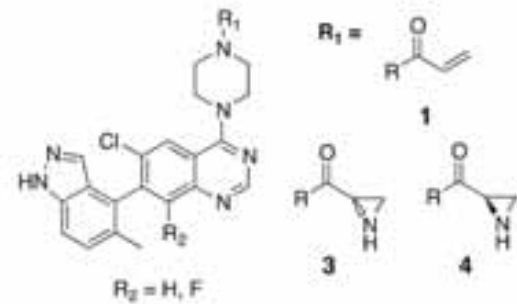
Gyógyszer	Gyártó	Státusz
Sotorasib (AMG510)	Amgen	jóváhagyott
Adagrasib (MRTX849)	Mirati therapeutics	Jóváhagyott
JDQ443	Novartis	F3
Divarasib	Genentech	F3
Fulzerasib	Innovent Biologics	F3



A reaktív csoportok szerepe fontos

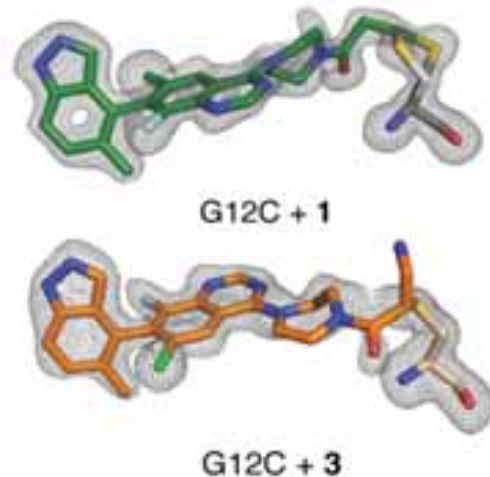
Reakciótípus

- funkcionalitás



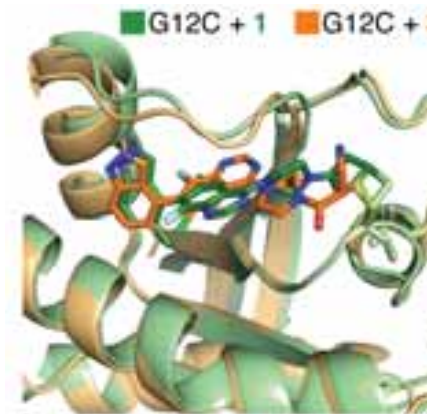
Mechanizmus

- reaktivitás



Termék

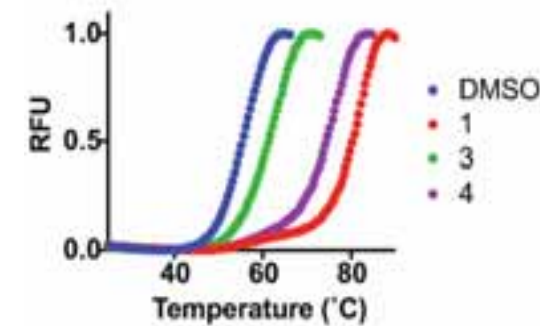
- konformáció



Hatékonyság

- kötődés

Termális stabilitás teszt



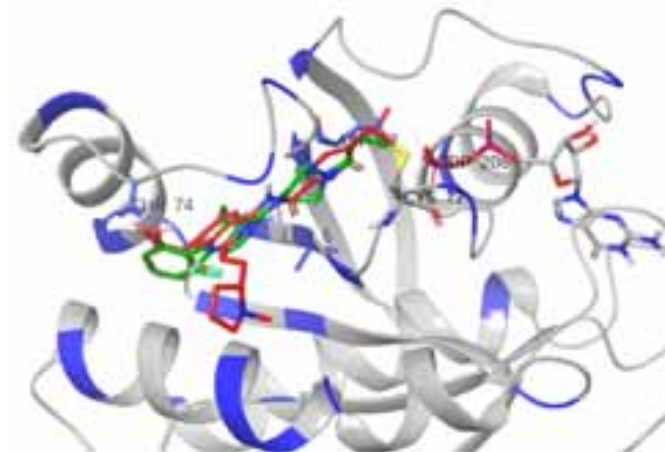
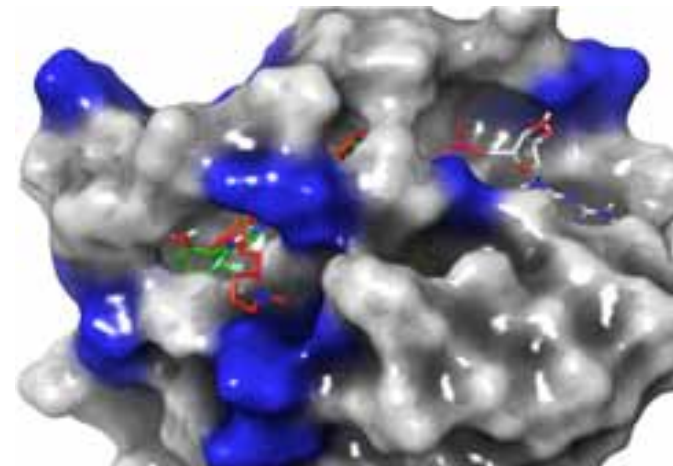
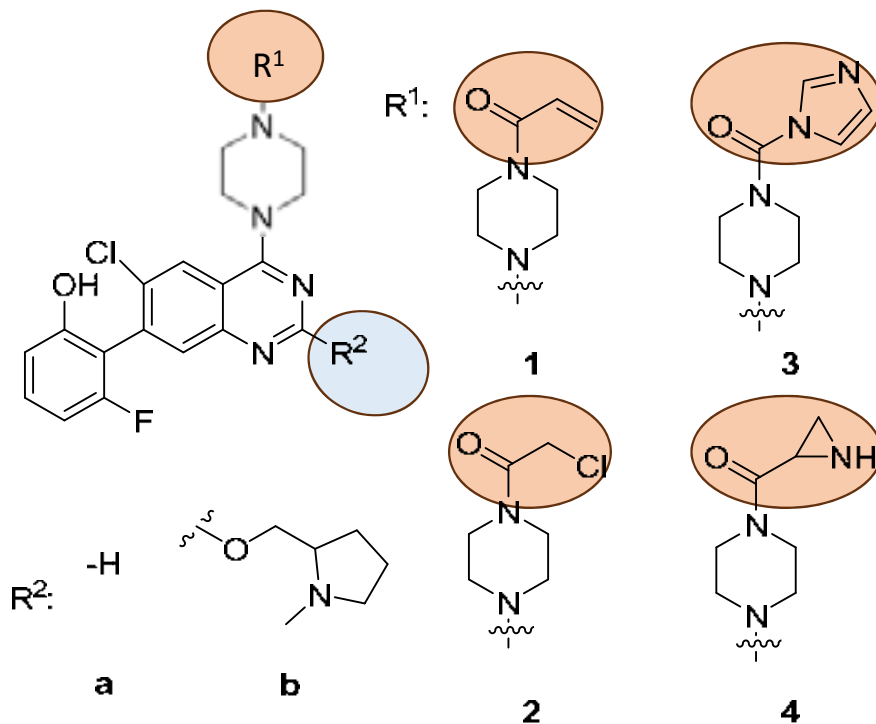
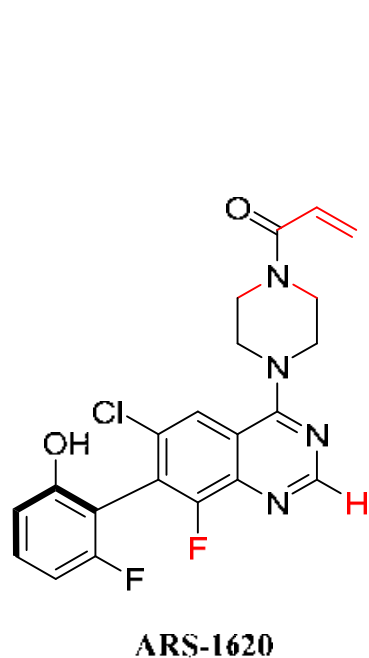
Szerves kémia: reakció nukleofilekkel a β -szén atomon

Kémiai biológia (enzim környezet, vizes közeg):

Michael akceptorokkal reakció a β -szén atomon. Aziridinekkel: Gyűrűfelníylás és reakció az α -szén atomon

Eltérő biokémiai hatékonyság

A reverzibilis és kovalens kölcsönhatások szerepe



Kötődési hatékonyság



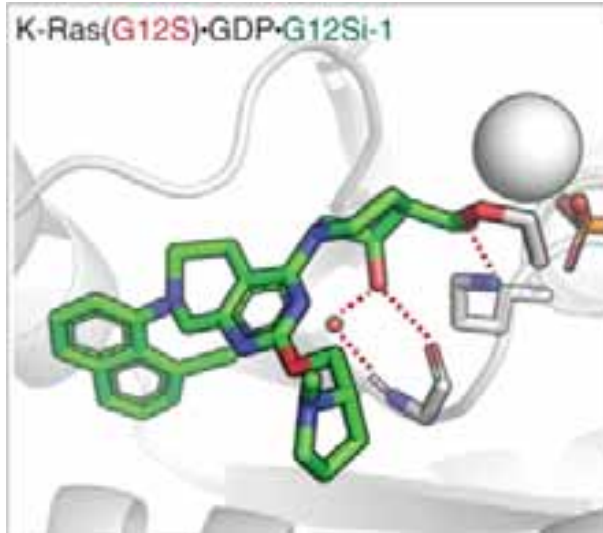
Vegyületek	IC ₅₀ (uM)	K _i (uM)	k _{inact} (0.001s ⁻¹)	k _{inact} /K _i (M ⁻¹ s ⁻¹)
1a akrilamid	0.827±0.137	34.8±9.3	10.1±1.0	290.2±82.7
1b akrilamid	0.520±0.108	107.6±10.7	31.7±4.1	294.6±48.1
2a acylimidazol	0.305±0.040	40.1±11.7	19.2±0.9	478.8±141.5
2b acylimidazol	0.642±0.115	147.9±10.3	14.9±1.9	100.7±14.6
3a Cl-acetamid	67.4±11.3	40.9±16.7	0.4±0.1	9.8±4.7
3b Cl-acetamid	243.2±52.4	42.2±9.9	0.13±0.01	3.1±0.7
4a aziridin	198±39.0	22.2±1.8	0.091±0.002	4.1±0.3
4b aziridin	84.4±18.9	112.2±30.1	1.7±0.30	15.2±4.9

Hatékonyág és szelektivitás

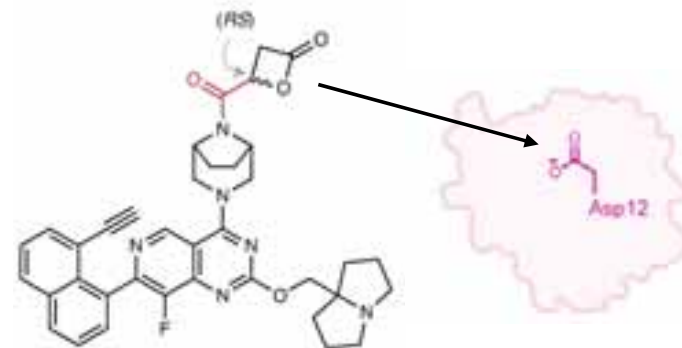
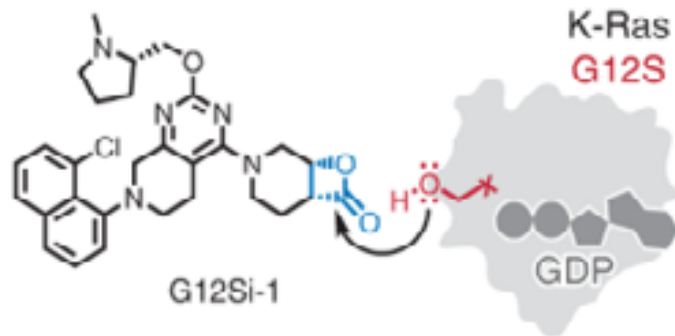
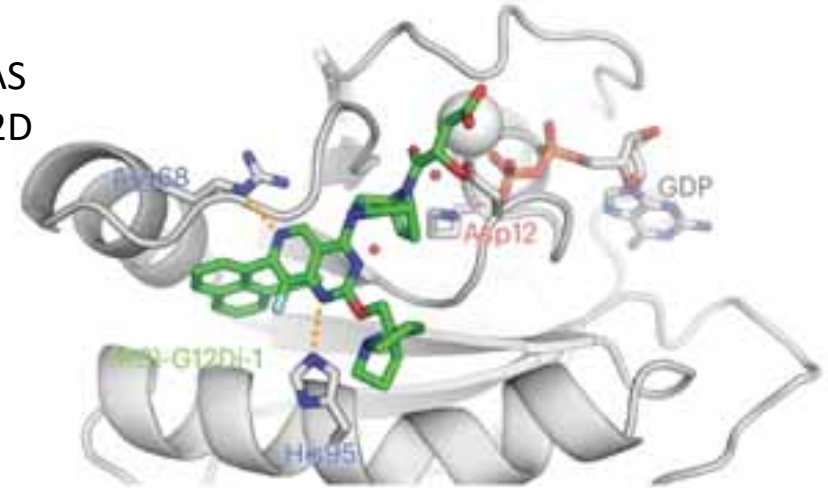
	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	ARS-1620
	IC ₅₀ [μM]								
LCLC-103H (-)	34.0	82.0	7.5	4.2	47.1	41.6	78.9	91.8	20.24
MiaPaca2 (KRAS G12C)	1.8	0.53	3.1	3.2	20.4	8.8	19.8	48.2	0.14
H358 (KRAS G12C)	2.3	1.1	2.7	1.8	27.4	9.9	27.1	90.0	0.31
	Szelektivitások KRAS ^{G12C} vs KRAS ^{WT}								
MiaPaca2 (KRAS G12C)	18.9	154.7	2.4	1.3	2.3	4.7	4.0	1.9	140.6
H358 (KRAS G12C)	14.8	74.5	2.8	2.3	1.7	4.2	2.9	1.0	66.3

A módszertannal más mutánsok is támadhatók

KRAS
G12S



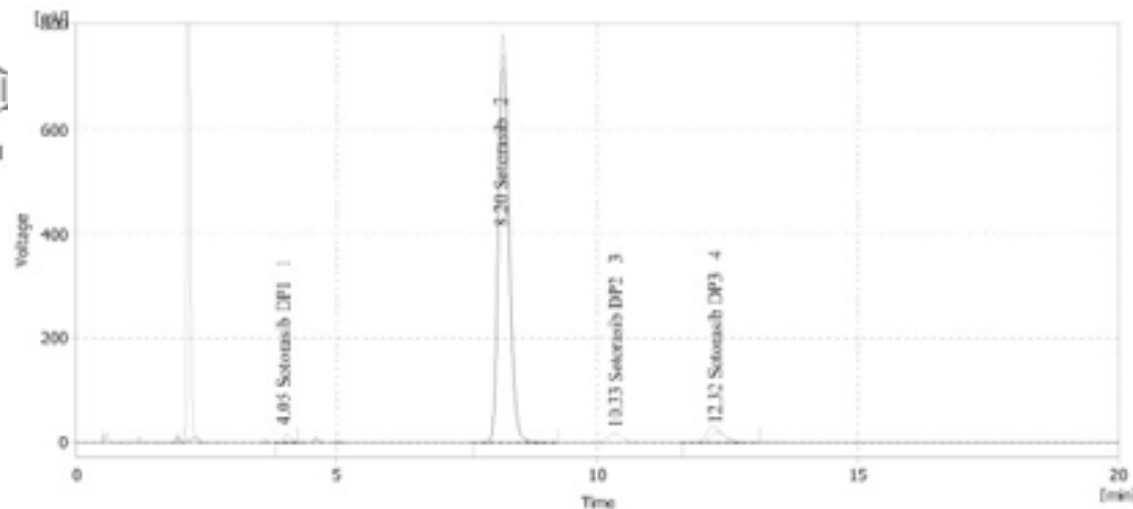
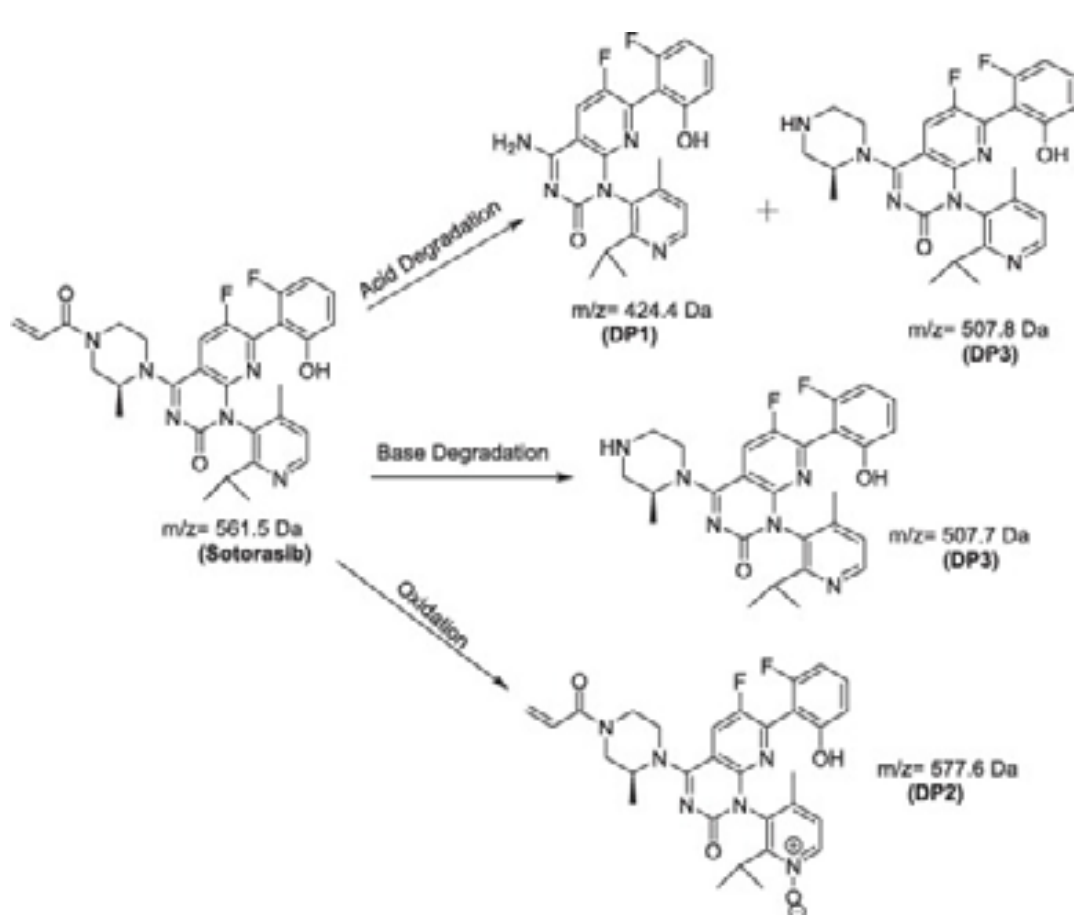
KRAS
G12D



Kihívások kovalens inhibitorok fejlesztésnél: PK

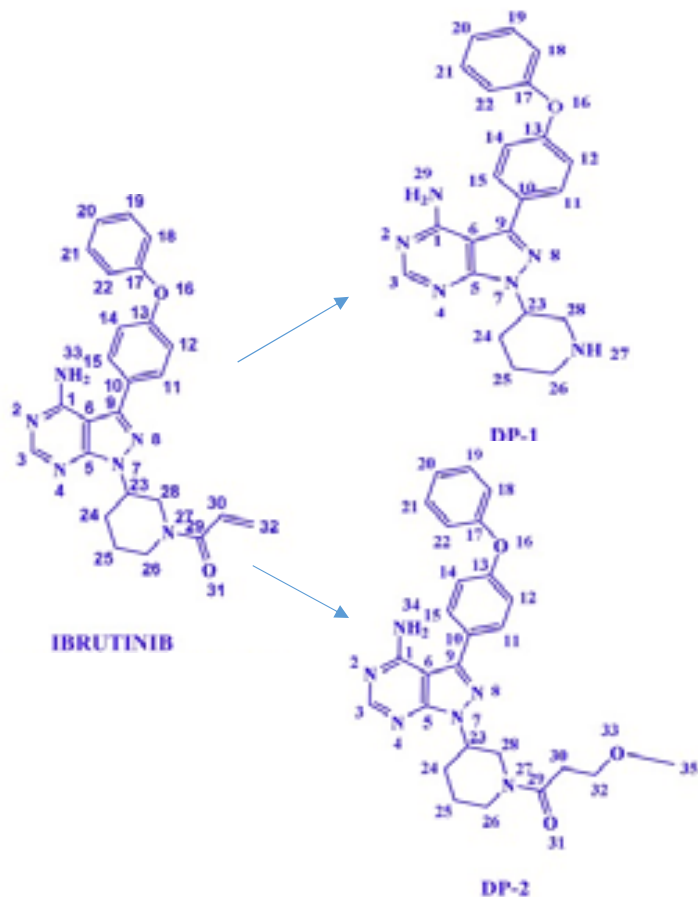
- Citokróm P450 által közvetített reakciókból származó reaktív metabolitok képződésének lehetősége
- Glutation (GSH) konjugációs potenciál nem enzimatis és/vagy GSH-S-transzferáz (GST) által közvetített mechanizmusok révén
- Jellemző az extrahepatikus clearance
- In vitro CL-vizsgálatokban alkalmazott hagyományos mátrixokból, például rekombináns humán CYP-enzimekből, máj-mikroszómákból, máj-S9-frakciókból vagy hepatocita-inkubációkból extrapolált adatok jellemzően nem reprezentálják az in vivo CL-t.
- Nem hagyományos kiválasztási útvonal a fehérjékhez, például az albuminhoz való kovalens kötődés lehetősége, ami lassú kiválasztódáshoz vezet

Minőisgbiztosítási kihívások: Stabilitásvizsgálat - Sotorasib



Degradation condition	Sotorasib	
	% assay	%Deg
Acid degradation	82.5	17.5
Alkali degradation	82.2	17.8
Peroxide degradation	81.4	18.6
Reduction degradation	83.1	16.9
Thermal degradation	86.1	13.9

Minőségbiztosítási kihívások: Stabilitásvizsgálat - Ibrutinib



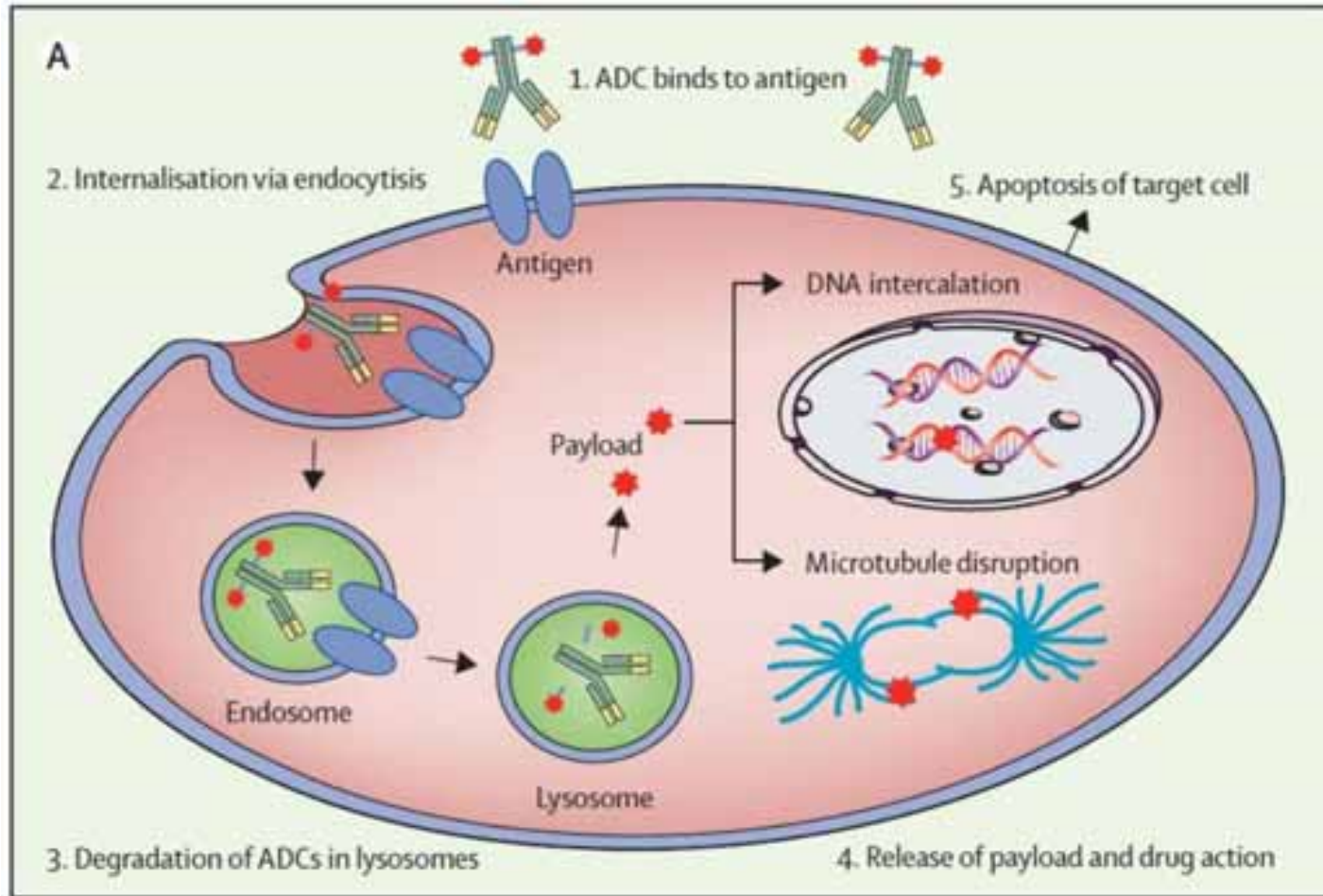
Stress conditions	Concentration of stressor	Exposed to	Duration	Formation of degradation products (DP)
Acidic	1 N HCl	RT	24h	No degradation
		60 °C	1hr	DP-1
Basic	1 N NaOH	RT	24h	No degradation
		60 °C	1hr	DP-1 and DP-2
Oxidation	5% H ₂ O ₂	RT	24h	No degradation
		60 °C	3hrs	
Photolytic	UV	RT	48h	No degradation
Thermal	Temperature	90 °C	24 hrs	No degradation

Magic bullet koncepció: antitestek jelölése

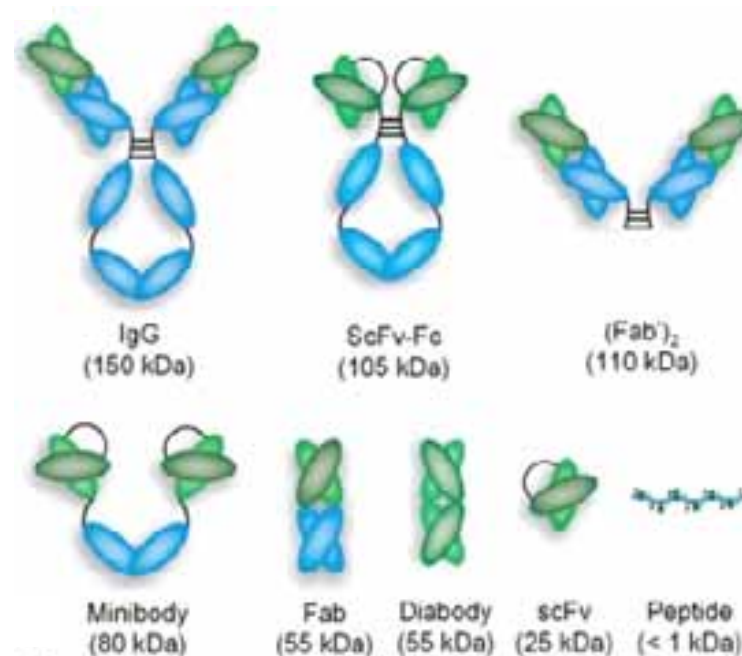
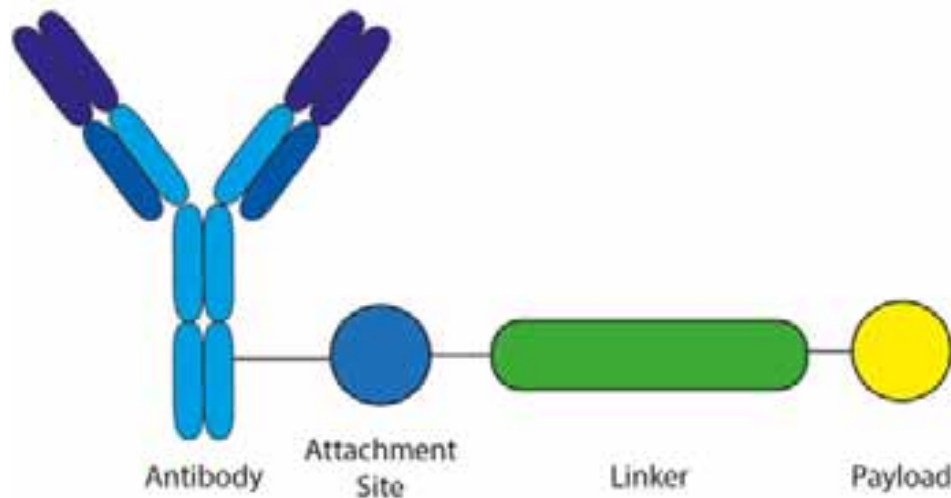
- Paul Ehrlich: Zauberkugel
- „Olyan szer, amely közvetlenül a baktériumokat találja el anélkül, hogy károsítaná a testet”
- Az antitest mint csodafegyver
 - Szelektív a kívánt antigén ellen
 - Önmagában is terápiás hatású lehet
 - A gyógyszerek konjugációja javítja ezt a hatást
 - Célzott tumorterápia - ADC-k
 - Az ADC-k 1970-ben kezdtek el fejlődni, miután a monoklonális antitestek előállításáról beszámoltak
 - A mAb-k szelektivitásának és az erősen citotoxikus szerek hatékonyságának ötvözése
 - Jelenleg gyorsan bővülő terület (2024: 10 Mrd USD, 15% növekedési ráta)



AZ ADC-k hatásmechanizmusa



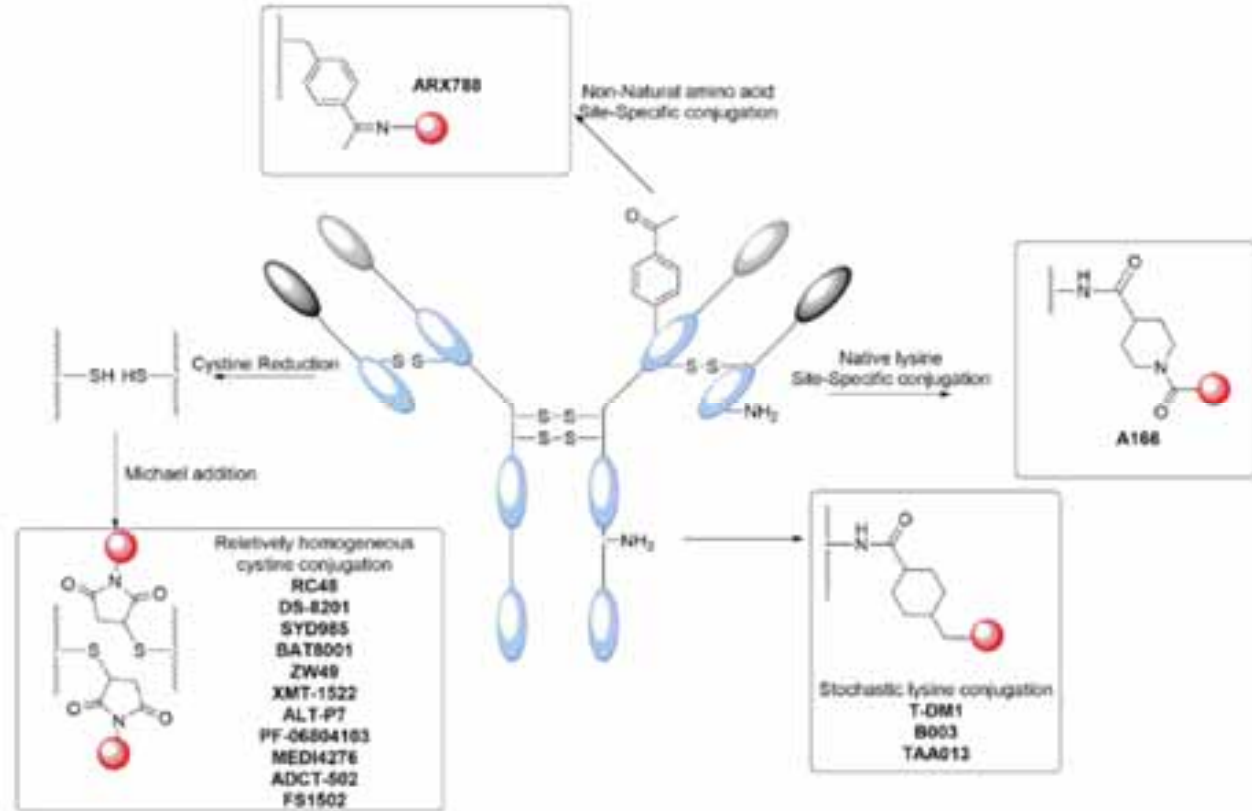
Az ADC-k szerkezete



- **Antitest:**
 - jó a szelektivitása és felezési ideje
 - A tumorba való behatolás javítása érdekében elkezdtek kisebb típusokat fejleszteni (pl. Fab, mini-, nano- és diabody)
 - Az antitesteket fehérjékre, kismolekulákra, aptamerekre próbálják módosítani
- **Kapcsolódási hely:**
 - Nem szelektív helyen: Lys és Cys
 - Szelektív helyen: Linker a konjugálószer és a hasznos teher között
- **Hasítható és nem hasítható payload:**
 - többféle a célpont és a kívánt mechanizmus szerint

Antitest-gyógyszer kapcsolás

- Nem helyszelektív módszerek: az antitestek módosításának első technikája
 - Cisztein-módosítás: konjugáció redukált ciszteinekhez maleimidekkel (15 engedélyezett ADC-ből 10).
 - Lizin-módosítás: szabad aminos csoportok acilálása (15 jóváhagyott ADC-ből 5)
- Helyszelektív módszerek:
 - Tervezett tiolok (THIOMAB): már klinikai vizsgálatok folynak.
 - Nem természetes aminosavak
 - Glikán módosítás
 - Cisztein rebridging: a láncok közötti diszulfidhíd redukciója és összekapcsolása.



Kapcsolóelemek

- Nem bontható linker:

- Tioéter vagy maleimidokaproil
- A jóváhagyott ADC-k közül csak a Kadcyła és a Blenrep esetében
- A célsejtektől függ, aminosavakat hagy a hatóanyaghoz kötődve
- Hosszú felezési idő (10 nap)

- Enzimatisz felzabadulás:

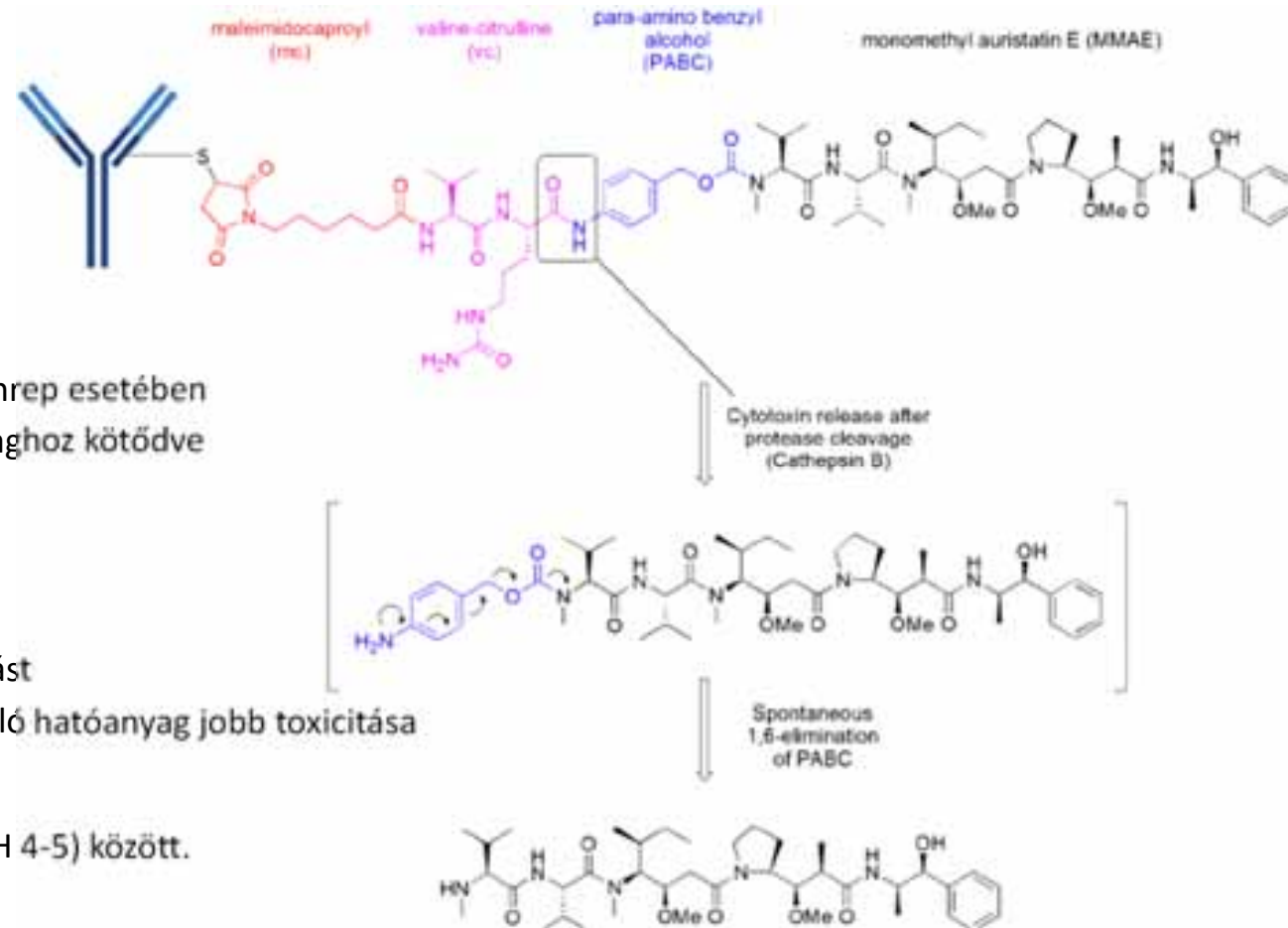
- Valin-citrullin peptid lebontása katepszin B által
- Nincsenek enzimek a vérben, ami javítja a stabilitást
- Stabil, hosszú felezési idő (10 nap) és a felzabaduló hatóanyag jobb toxicitása

- Savérzékeny felzabadulás:

- különbség a plazma (pH~7,4) és a tumorszövet (pH 4-5) között.
- Hidrazonok
- Alacsony felezési idő (2 nap)

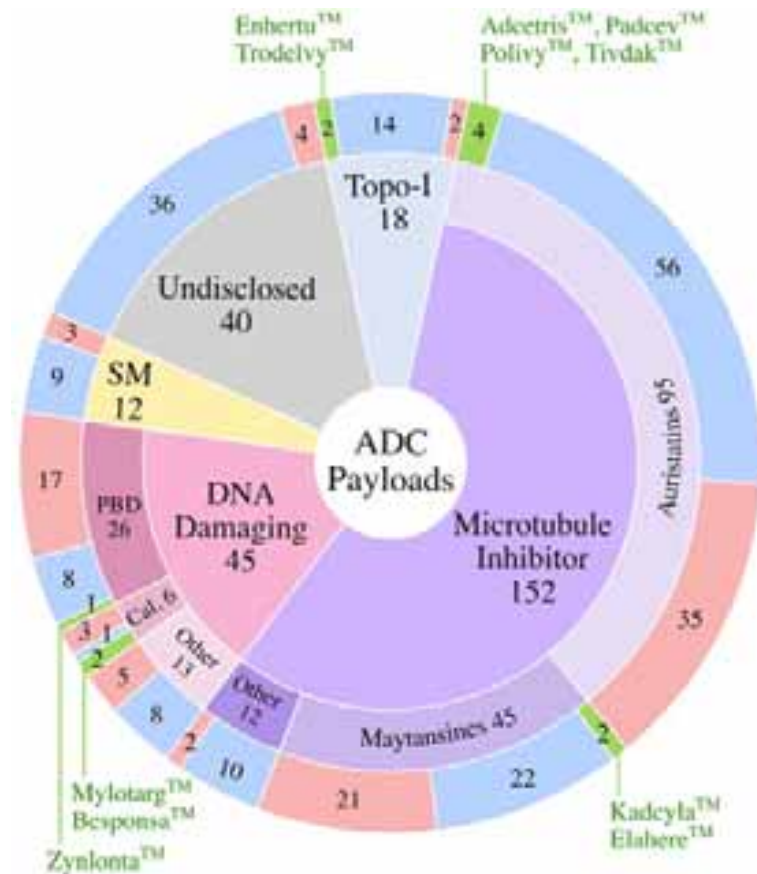
- Glutathion-érzékeny felzabadulás

- Reagál a citoplazma magas GSH-koncentrációjával
- Diszulfidhidakra van szükség
- Az oldhatóság érdekében PEG-láncokat lehet bevinni a linker részbe



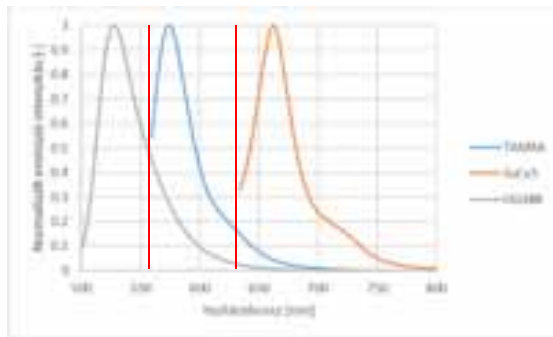
Konjugált gyógyszerek

- Citotoxikus gyógyszerek
 - DNS károsító szerek
 - Microtubulus polimerizációs szerek
 - Topoizomeráz gátlók
- Nem citotoxikus gyógyszerek
 - Szteroidok: rheumatoid arthritis, Phase II.
 - Antibiotikumok: *Staphylococcus aureus*, Phase I.
 - Oligonucleotidok: gene-csendesítés, Phase I.
 - Immuno-stimulátorok: Toll-like receptor (TLR) agonisták vagy interferon ggén stimulátorok (STING), Phase I.
 - PROTAC: preklinikai fejlesztés alatt
- Radioimmuno-konjugátumok: ^{131}I , ^{90}Y , ^{177}Lu

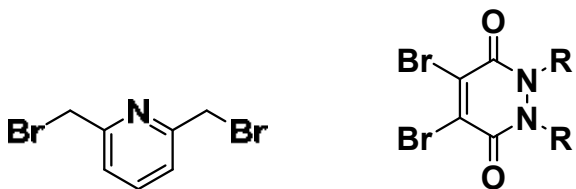
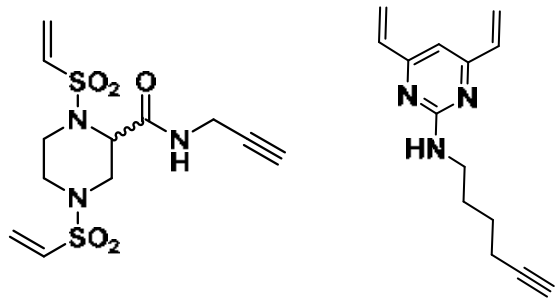
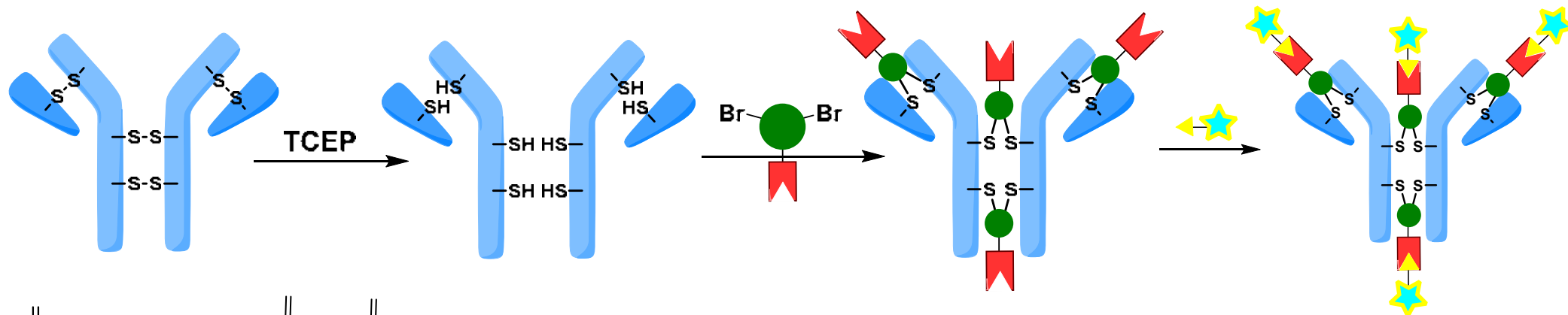


ADC alapú in situ tumordiagnosztika

- » Az emlőrák a nők leggyakoribb daganatos betegsége
- » HER2, ER és PR: három receptor az esetek többségében jelen van, amelyeket a patológiai vizsgálatok során is keresnek
- » antiHER2, antiER és antiPR antitestek rendelkezésre állnak
- » Felhasználás *in vitro* és *ex vivo* sejtjelölésre, műtéti diagnosztika fejlesztése



Konceptió

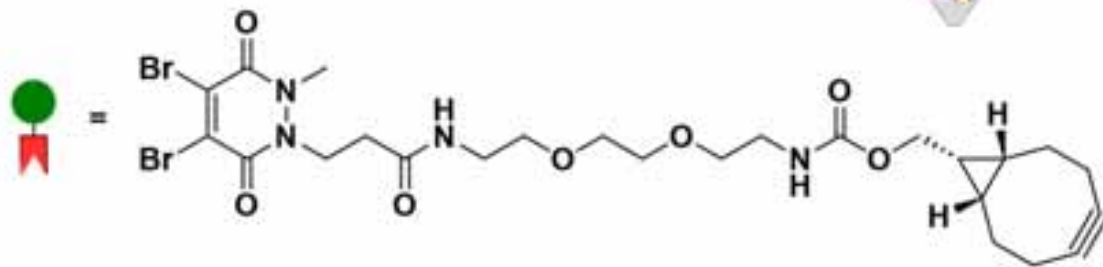
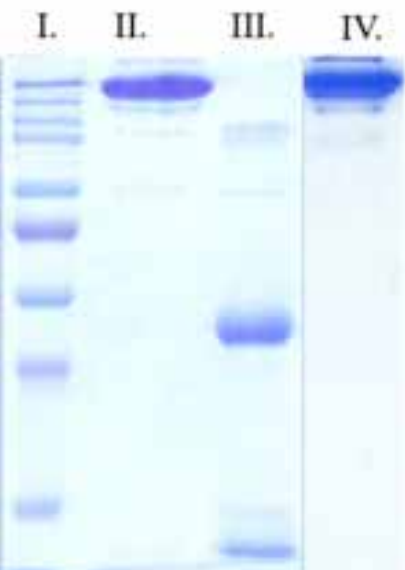
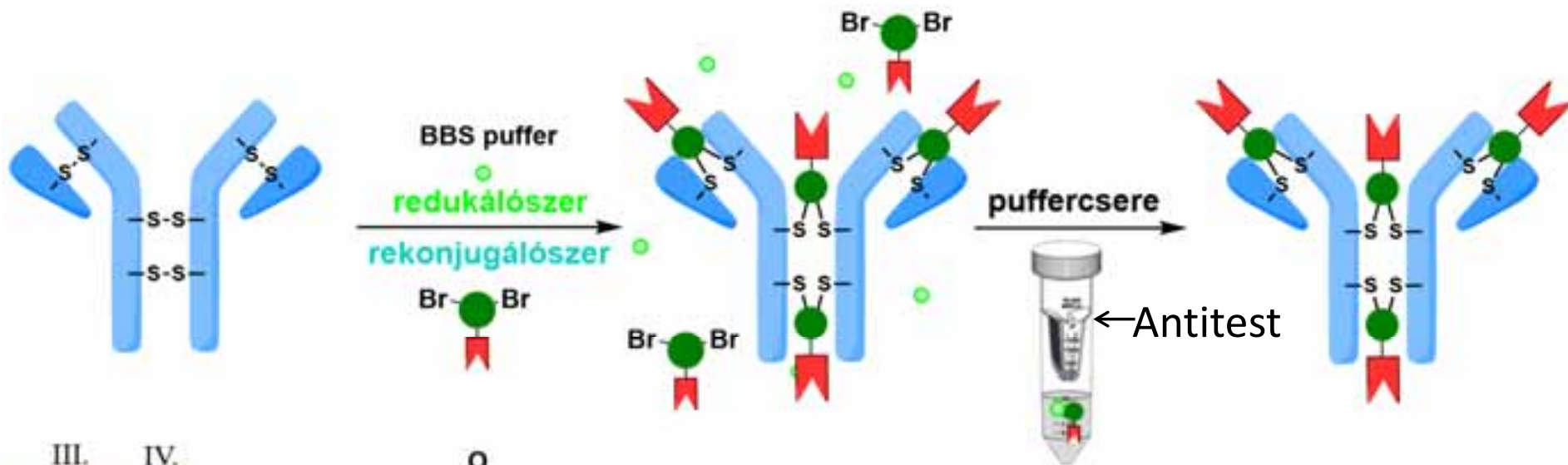


Diszulfid-híd módosítási technika (rekonjugáció)

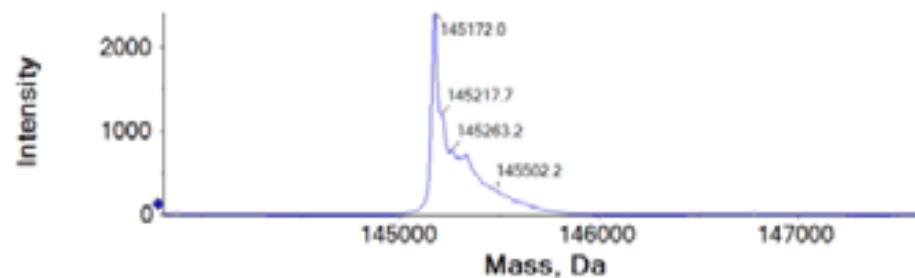
Redukáljuk a diszulfid-kötést és kismolekulával újraépítjük a kén-hidakat

- Helyszelektív
- Adott számú rekonjugálószer épül be
- Ható-, jelölőanyag vagy klikkelhető csoport építhető be

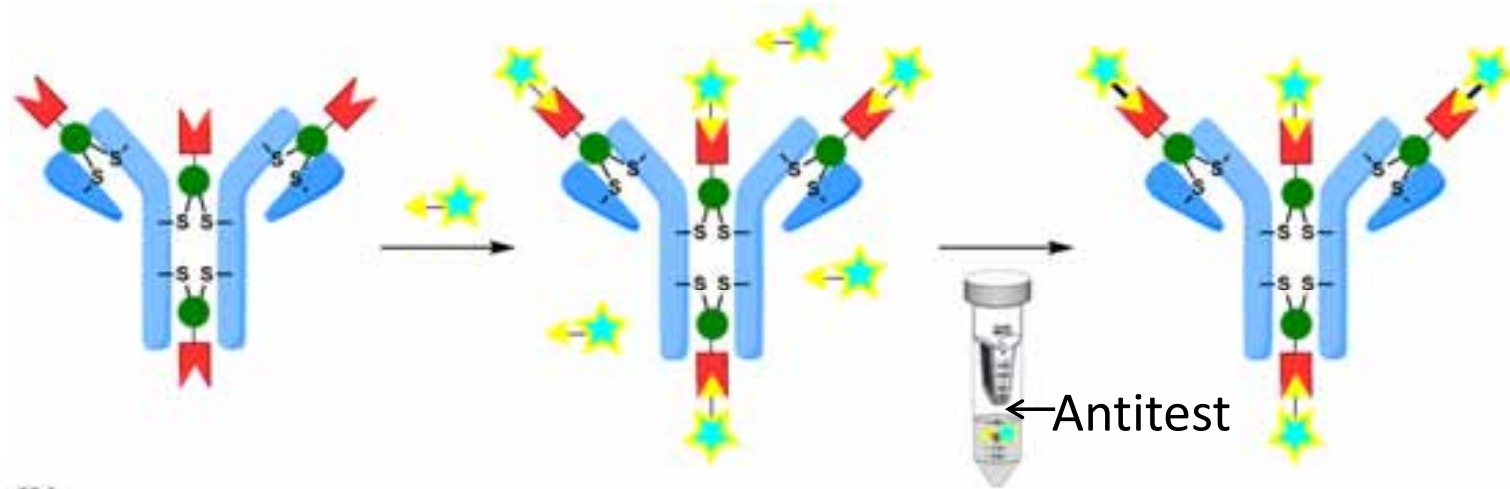
Trastuzumab (antiHER2) rekonjugálása



- I. Protein referencia
- II. Natív trastuzumab
- III. Redukált trastuzumab
- IV. Rekonjugált trastuzumab

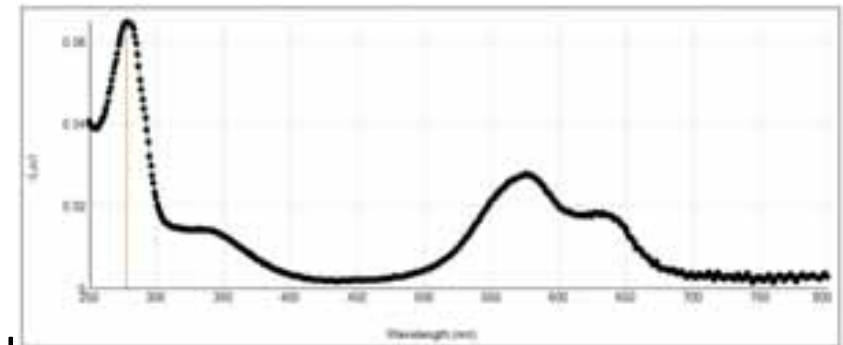


Klikk reakció rekonjugált antitesten



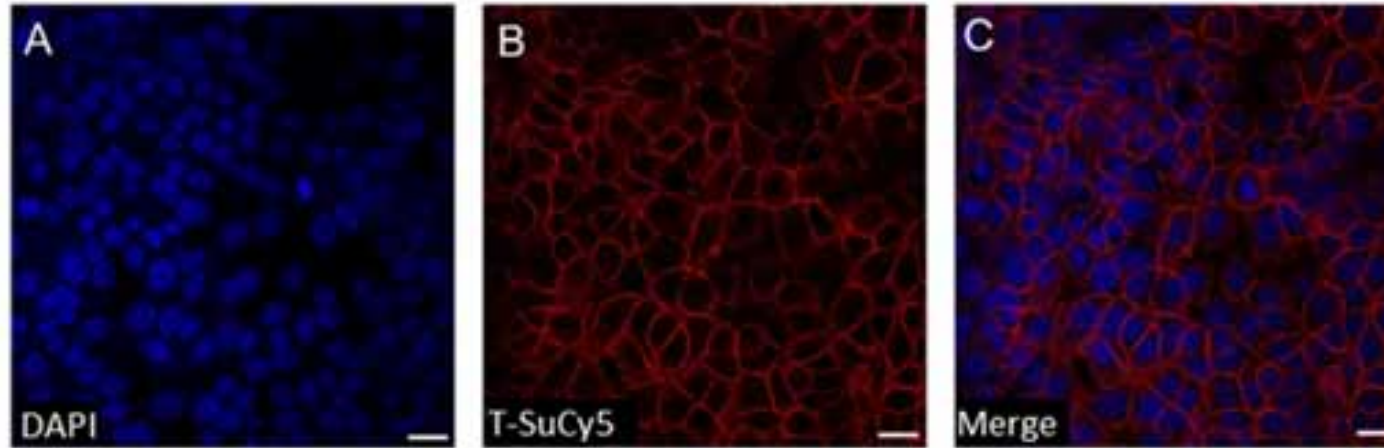
★ = OG488-azid, 5-TAMRA-azid, SuCy5-azid

- I. Protein referencia
- II. Natív trastuzumab
- III. Redukált trastuzumab
- IV. Rekonjugált trastuzumab
- V. Klikk reakció után UV lámpa alatt

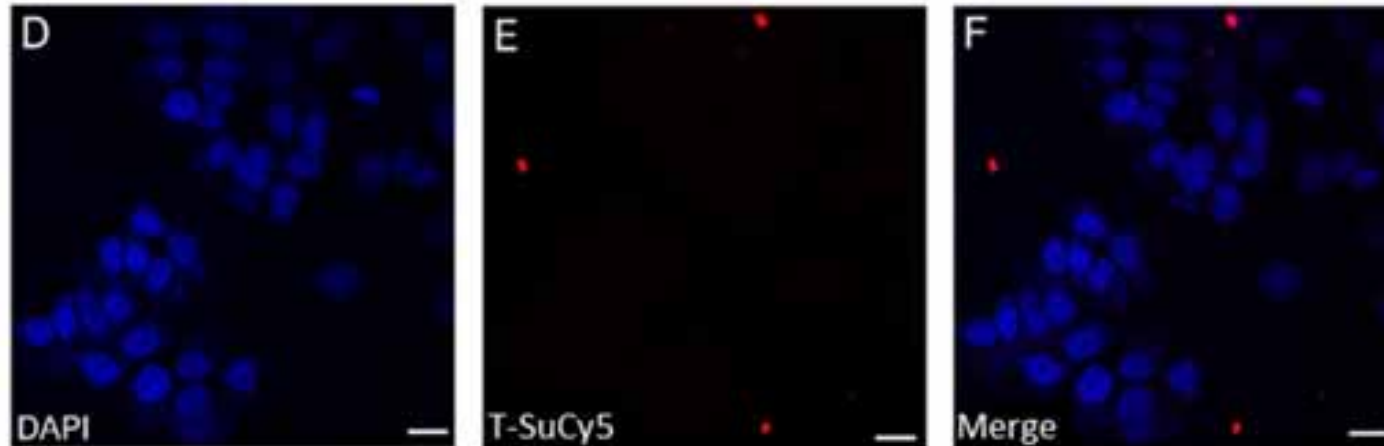


Trastuzumab konjugátum – in vitro

SKOV-3

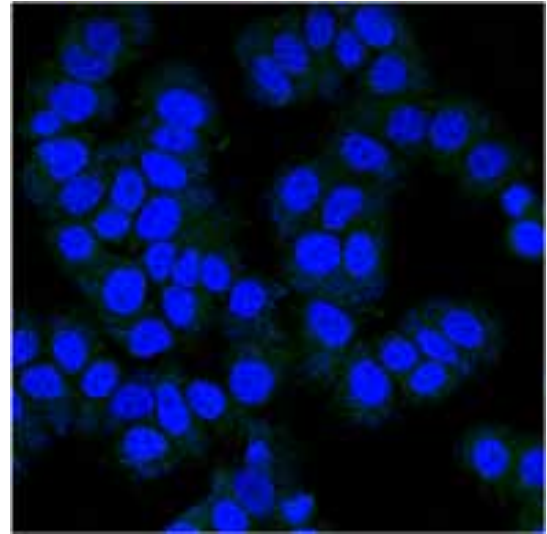
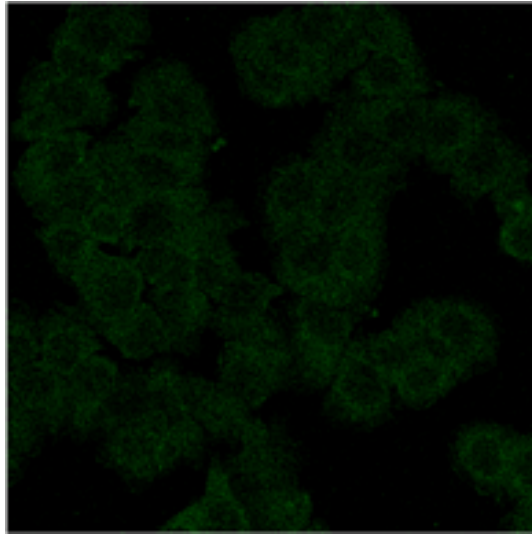
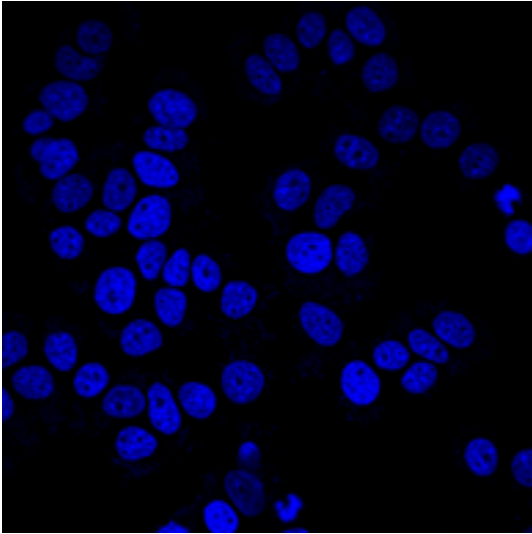


MDA-MB-231

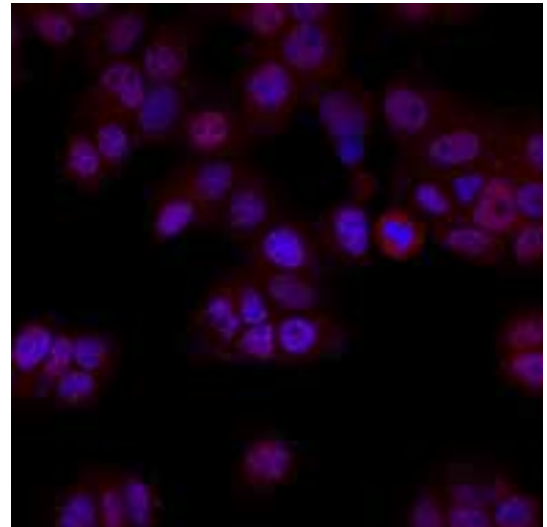
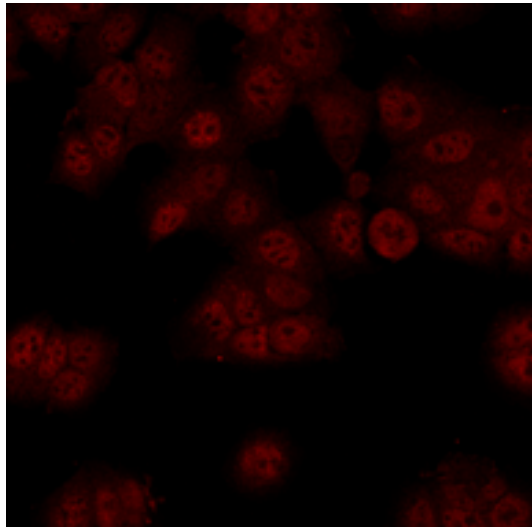
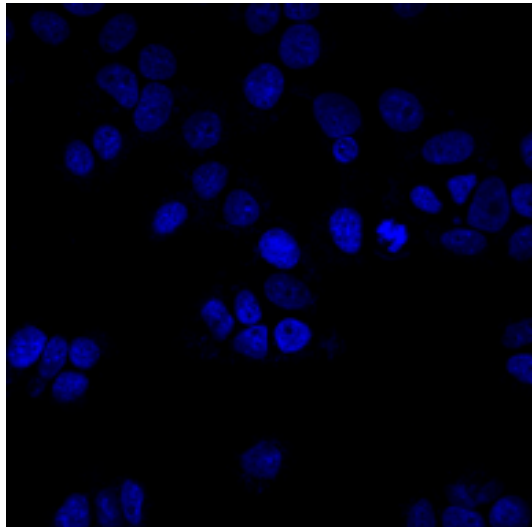


antiER és antiPR konjugátumok – in vitro

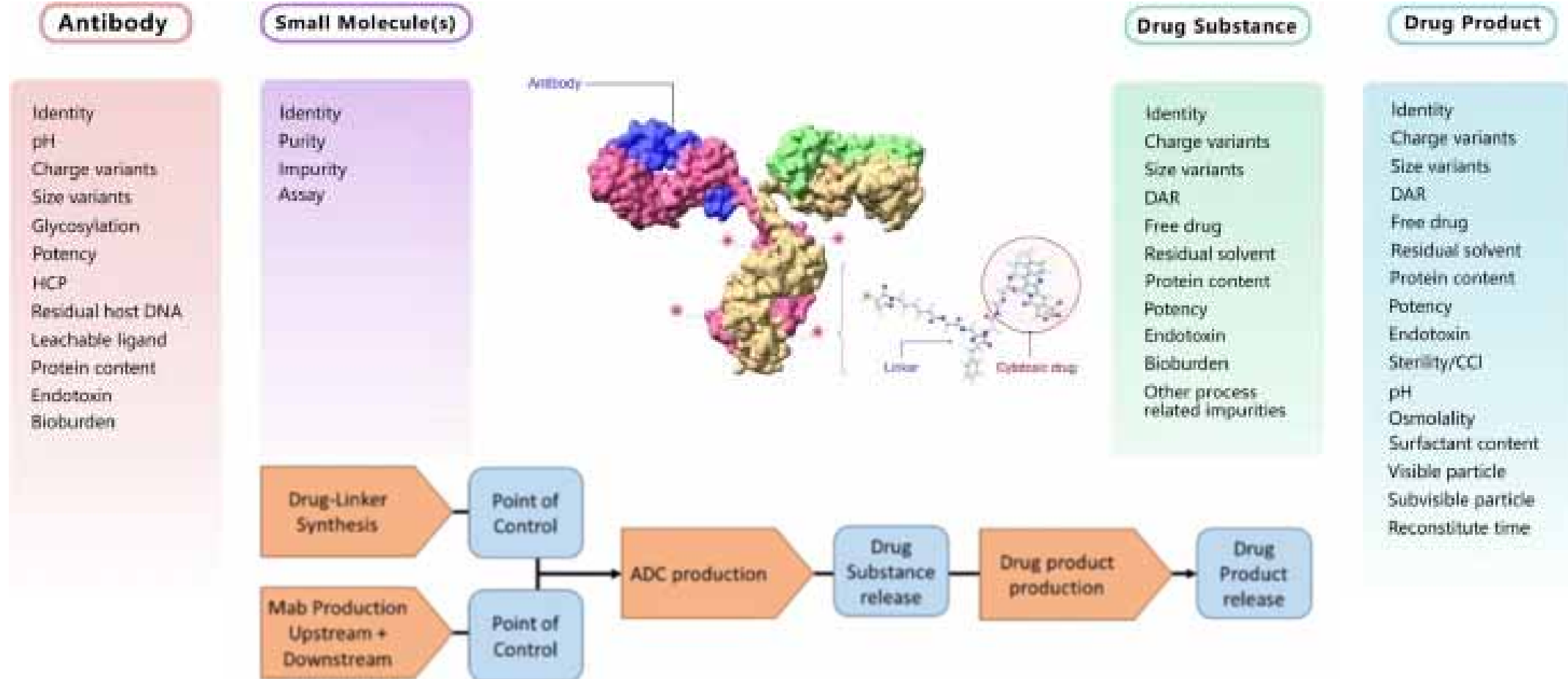
AntiER-OG



AntiPR-TAMRA

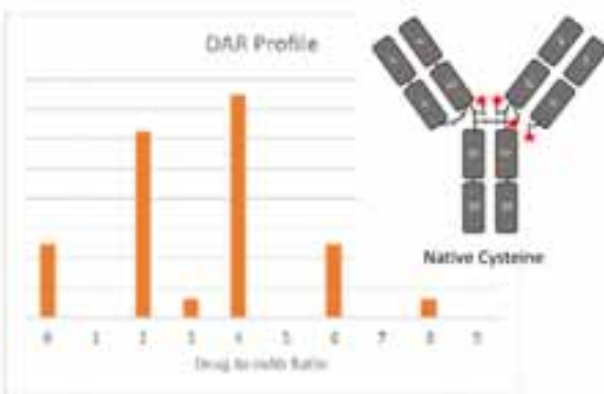
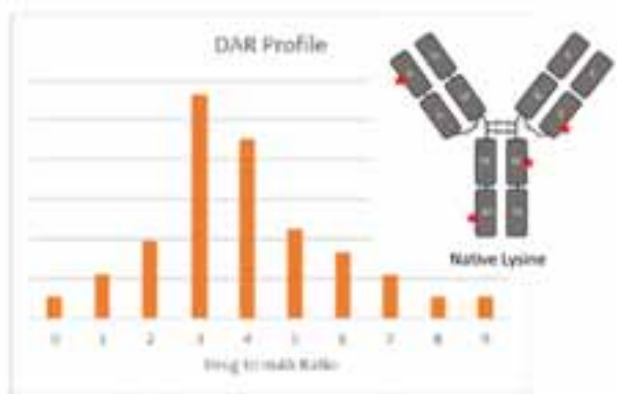


Minősegbiztosítási kihívások: ADC vs kismolekulás gyógyszerek



Minőisegbiztosítási feladatok

- Átlagos DAR érték: gyógyszer-antitest arány
 - Befolyásolja a hatékonyságot, biztonságosságot és a PK tulajdonságokat
 - UV-Vis spektroszkópia, Hidrofób interakciós kromatográfia (HIC), fordított fázisú folyadék kromatográfia (RPLC), MS kapcsolt méretkizárásos kromatográfia (SEC-MS)
- Konjugátum-eloszlás
 - Az antitestben változó számú és lokalizációjú konjugációs hely lehetséges
 - Az ADC platform befolyásolja (Lizin célzott, láncközi cisztein célzott, helyspecifikus)
- Tisztaság
 - Szabad gyógyszer koncentráció (gyógyszer és gyógyszer-linker formában)
 - Az antitest méret és töltésvariánsai (fragmentumok és aggregátumok)
 - Glykolizációs módosulások
 - Oxidációs és szekvencia variánsok



Minősegbiztosítási feladatok

- Szennyezésprofil vizsgálatok
 - Stabilitásvizsgálatok hatóanyag és készítmény szinten
 - Maradék oldószer mennyiség a hidrofób gyógyszerek kapcsolásából
 - Konjugálható szennyezések (a gyógyszer/linker gyártás során)
 - Nem konjugálható szennyezések (gyógyszer, linker, gyógyszer-linker) hagyományos követése
 - Egyéb gyártási szennyezések
- További monitoring követelmények: szín, tisztaság, endotoxin szint, sterilitás, látható részecskék, nem látható részecskék, pH, ozmolaritás, extrahálható térfogat, szilárd töltőtömeg, feloldási idő, nedvesség ...



Összefoglalás

- A fehérjék irreverzibilis módosítása új terápiás lehetőségeket teremt
 - Célzott kovalens inhibitorok
 - Antitest-gyógyszer konjugátumok
- A célzott kovalens inhibitorok nagy hatékonyságot, szelektivitást és hosszú hatástartamot biztosíthatnak nehezen befolyásolható célpontokon
- Az antitest-gyógyszer konjugátumok egyesítik az antitest-antigén reakció specificitását és a konjugált gyógyszer nagy hatékonyságát
- Minőségbiztosítási oldalról mindkét megközelítés speciális kihívásokat hordoz, amelyre a hatóanyag és késztermék oldalon egyaránt fel kell készülni



Köszönöm megtisztelő figyelmüket

