

Artigo

Proteínas Tirosinas Quinases: Desafios do Desenvolvimento de Fármacos para a Terapia do Câncer

Avila, C. M.; Romeiro, N. C.*

Rev. Virtual Quim., 2010, 2 (1), 59-82. Data de publicação na Web: 30 de agosto de 2010<http://www.uff.br/rvq>**Protein Tyrosine Kinases: Challenges in the Development of Drugs Aimed at Cancer Therapy**

Abstract: This paper describes recent information on protein tyrosine kinases and their importance as molecular targets in cancer therapy, as well as the challenges involved in selective binding of drugs while overcoming resistance. Special attention is given to X-ray diffraction studies of enzyme-inhibitor co-crystals, which have demonstrated new binding modes of the second generation of anticancer drugs, tyrosine kinase inhibitors.

Keywords: Protein tyrosine kinases; cancer; anticancer

Resumo

Este trabalho descreve informações recentes sobre as proteínas tirosinas quinases e sua importância como alvos moleculares na terapia do câncer. Atenção especial é dada aos estudos de difração de raios-X de complexos inibidores-enzimas que elucidaram novos modos de ligação da segunda geração de fármacos anticâncer, inibidores de tirosinas quinases.

palavras-chave: Proteína tirosina quinases; câncer; anticâncer

* Universidade Federal do Rio de Janeiro, Núcleo de Pesquisas em Ecologia e desenvolvimento Social de Macaé (NUPEM), Rua Rotary Club, s/no. São José do Barreto-CEP: 27901-000 - Macaé, RJ – Brasil.

✉ nelilma@iq.ufrj.br

DOI: [10.5935/1984-6835.20100007](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20100007)

Proteínas Tirosinas Quinases: Desafios do Desenvolvimento de Fármacos para a Terapia do Câncer

Carolina M. Avila,^a Nelilma C. Romeiro^{a,b,*}

^aLASSBio, Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Caixa Postal 68023, 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

^bNUPEM, Núcleo de Pesquisas em Ecologia e desenvolvimento Social de Macaé, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rua Rotary Club, s/no. São José do Barreto, 27901-000, Macaé, RJ, Brasil.

*nelilma@iq.ufrj.br

Recebido em 06 de julho de 2009. Aceito para publicação em 10 de novembro de 2009

1. Introdução
2. Estrutura e função das tirosinas quinases receptores (RTKs)
3. Estrutura e função das tirosinas quinases não-receptores (NRTKs)
4. Inibidores de tirosinas quinases (TKIs)
5. Modos de ligação revelados pelas estruturas tridimensionais das PTKs obtidas por difração de raios-X
6. Anticorpos monoclonais como fármacos anti-RTKs
7. Fontes de informações diversas sobre PTKs
8. Conclusões

1. Introdução

As proteínas tirosinas quinases (PTKs, do inglês *Protein Tyrosine Kinases*) são responsáveis pela transferência do grupo γ -fosfato do trifosfato de adenosina (ATP) a grupos hidroxila de resíduos de tirosina à grupos e substratos protéicos. Dessa forma, as PTKs são responsáveis pela fosforilação e, conseqüente, modulação da atividade enzimática. Essa ação cria sítios de ligação para o recrutamento de proteínas sinalizadoras e deflagração de uma série de eventos fisiológicos importantes.¹ Essas proteínas possuem um papel central na transdução do sinal, agindo como um ponto de apoio em uma rede complexa de moléculas sinalizadoras interdependentes que afetam a transcrição gênica no núcleo, estando relacionadas a processos fundamentais, como o ciclo celular, a proliferação, diferenciação, mobilidade e a sobrevivência ou morte celular.¹

A ligação das proteínas tirosinas quinases com o câncer está bem estabelecida, tendo sido demonstrado que PTKs-chave se encontram desreguladas em tumores, mantendo a fosforilação, que leva os sinais de transdução a um estado permanentemente ativado.^{2,3} Uma pesquisa na base de dados Scopus (<http://www.scopus.com>), no período 1990-2009, mostra o número de citações com as palavras-chave *Tyrosine Kinase* e *Tyrosine Kinase and Cancer*, comprovando a crescente importância do estudo dessas proteínas (Figura 1).

Devido à organização celular diferenciada, as PTKs são geralmente divididas em proteínas quinases receptores (RTKs, do inglês *Receptor Tyrosine Kinases*) e proteínas quinases não-receptores (NRTKs, do inglês *Non-Receptor Tyrosine Kinases*). Exemplos das RTKs, são o receptor de insulina e receptores do fator de crescimento (GFRs), como o receptor do fator de

crescimento epidérmico (EGFR), receptor do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR), receptor do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGFR) e receptor do fator de crescimento do endotélio

vascular (VEGFR).⁴ Exemplos das PTKs não-receptores, que são componentes intracelulares, são as proteínas Src, Jak, Abl, Fak, Fps, Csk, Syk e Btk.⁵

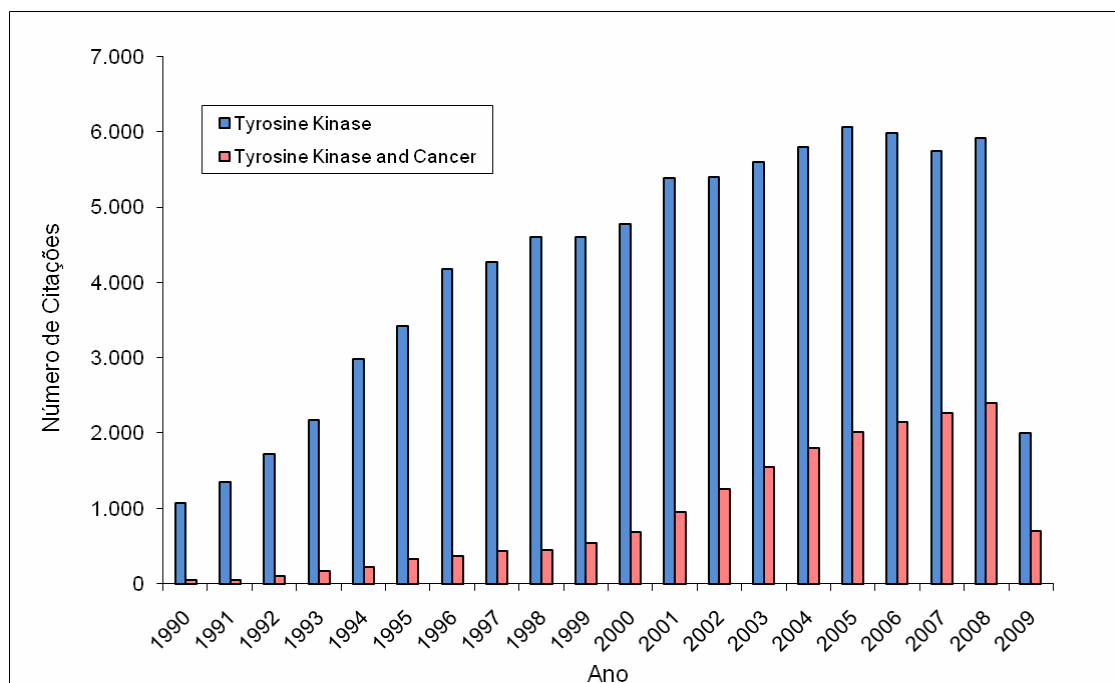


Figura 1. Número de citações no período de 1990 a 2009 relacionadas às proteínas tirosinas quinases (PTKs) e câncer

2. Estrutura e função das tirosinas quinases receptores (RTKs)

As RTKs têm um papel importante não apenas como reguladores-chave de processos celulares normais, mas também no desenvolvimento e na progressão de vários tipos de câncer. A amplificação genética, a super-expressão de RTKs ou ainda alterações funcionais causadas por mutações nos genes correspondentes, entre outros fatores, contribuem para a sinalização constitutiva, resultando no crescimento celular desregulado e câncer.⁶⁻⁸ Estruturalmente, as RTKs possuem um domínio extracelular, um domínio intramembranar e um domínio quinase intracelular, entre outros. Portanto, essas proteínas não são apenas receptores de superfície celular, mas também funcionam como enzimas tirosinas quinases, sendo ativadas pela ligação do ligante ao domínio extracelular, seguido de dimerização dos receptores, facilitando a fosforilação no domínio citoplasmático.⁹ A Figura 2 mostra um esquema simplificado do mecanismo de ativação do EGFR, seguido de ativação da proteína RAS e da via das MAPKs (do inglês *mitogen activated protein*

kinase), levando, em última instância, à ativação de proteínas (como as ciclinas) no núcleo e à divisão celular (Figura 2).

Devido à importância biológica das RTKs nos processos de sinalização celular, a sua atividade catalítica deve ser controlada rigorosamente. Alguns dos processos de regulação dessas proteínas são realizados pelo domínio quinase, pois o estado de fosforilação controla a atividade quinase diretamente.¹¹ Além disso, o estado de fosforilação das tirosinas do receptor influencia a ligação de substratos e outras moléculas adaptadoras, estando também ligado à ação reguladora de proteínas fosfatases.¹²⁻¹³ Finalmente, outra forma de regulação da atividade das RTKs nas células é a *diminuição do número de receptores*, que acontece após ligação do ligante ao RTKs, acelerando a endocitose dos complexos formados.¹⁴ A Figura 3 ilustra o receptor de insulina, em complexo com seu substrato peptídico (Y(PO)) e um análogo do ATP (AM1-PMP),¹⁵ estando fosforilado no resíduo de tirosina 1163.¹⁶

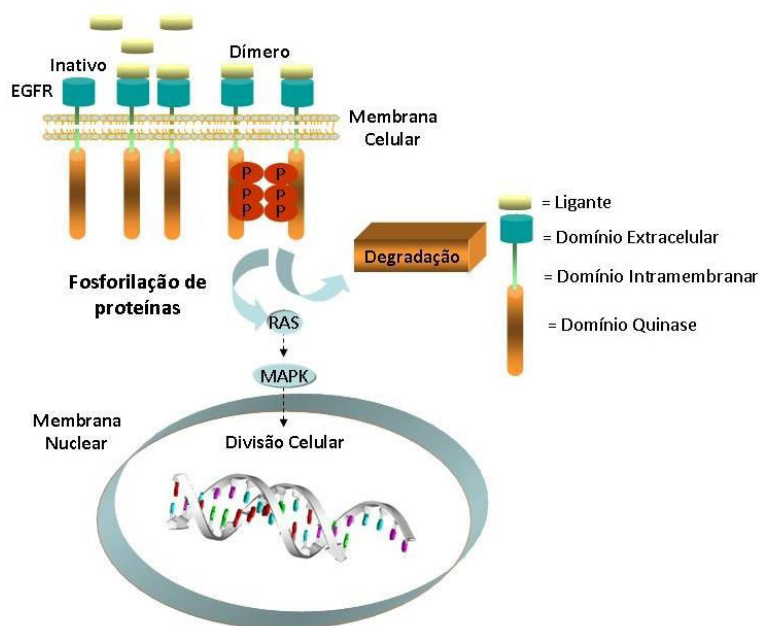


Figura 2. Mecanismo simplificado de ativação do EGFR [adaptado da Ref. 10, Copyright © 2009, com permissão da International Journal of Medical Sciences]

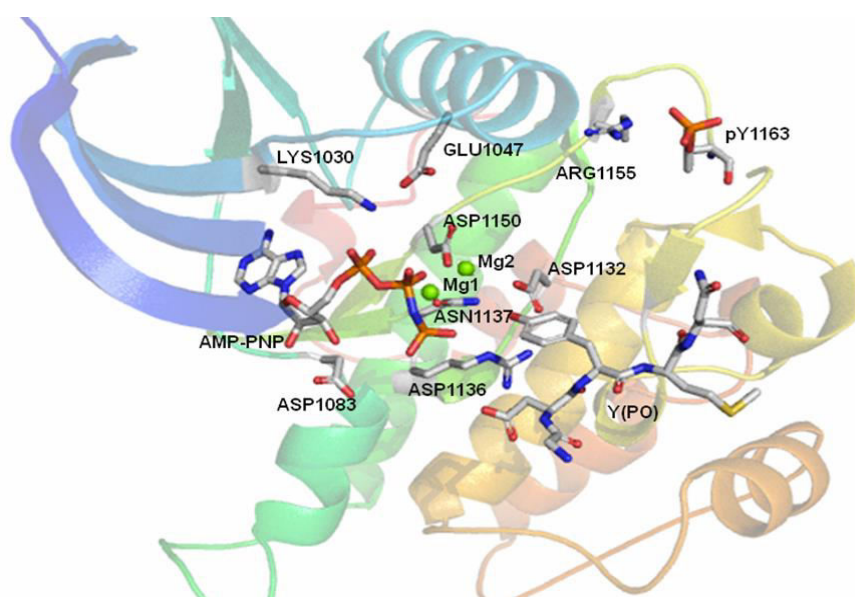


Figura 3. Receptor de insulina fosforilado em complexo com seu substrato peptídico (Y(PO)) e análogo do ATP (AM1-PMP).¹⁵ Em destaque, os resíduos do domínio catalítico e o resíduo de tirosina fosforilado (PY1163).¹⁶ Os átomos de hidrogênio foram eliminados para facilitar a visualização da figura

3. Estrutura e função das tirosinas quinases não-receptores (NRTKs)

As tirosinas quinases não-receptores (NRTKs) têm localização citoplasmática e apresentam variabilidade estrutural considerável. Possuem um domínio quinase e freqüentemente possuem vários domínios sinalizadores adicionais ou domínios de interação proteína-proteína, tais como SH2 (domínio de homologia a src 2), SH3 (domínio de homologia a src 3) e PH (domínio de homologia com

a pleckstrina, do inglês *Pleckstrin Homology*).¹⁸ O domínio tirosina quinase possui cerca de 300 resíduos e consiste de um lobo N-terminal formado por 5 folhas beta e uma hélice alfa, enquanto que o domínio C-terminal é formado principalmente por hélices alfa. O ATP se liga na cavidade entre os dois lobos e a seqüência que contém o resíduo de tirosina da proteína-substrato interage com os resíduos do lobo C-terminal.¹⁹ A Figura 4 mostra a estrutura da tirosina quinase fak, assim como seus elementos estruturais e de interação com o

substrato, ATP.²⁰⁻²¹

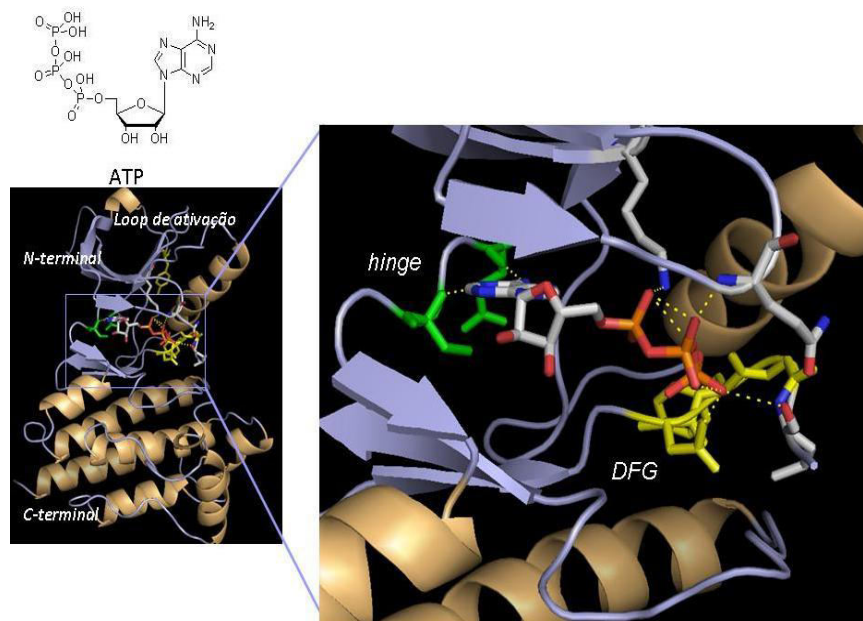


Figura 4. Estrutura da PTK fak, assim como seus elementos estruturais e de interação com o substrato ATP.^{20,22} Resíduos em verde estão localizados na região *hinge*, de dobradura, que conecta os domínios N- e C- terminais; resíduos em amarelo compõem a região conservada DFG na alça catalítica (Aspartato/D, Fenilalanina/F, Glicina/G) do domínio quinase. O resíduo de tirosina, catalítico, está em amarelo, próximo à alça de ativação. Os átomos de hidrogênio foram eliminados para facilitar a visualização. Ligações hidrogênio estão representadas por linhas pontilhadas amarelas

A ativação das NRTKs é complexa (Figura 5), envolvendo interações heterólogas proteína-proteína para permitir a trans-fosforilação. Por exemplo, pode ocorrer a ligação de um ligante extracelular a um receptor não proteína tirosina quinase (e.g., uma citocina se ligando a um receptor de citocinas) ou a ativação de receptor de células T, levando à

associação e ativação de uma série de moléculas PTKs solúveis e presentes no meio intracelular (e.g., p53/p56^{lck}, p60^{src}, p70^{zap}). As quinases src, por exemplo, estão envolvidas no crescimento celular e a atividade das fak está associada à adesão celular (Figura 5).²¹

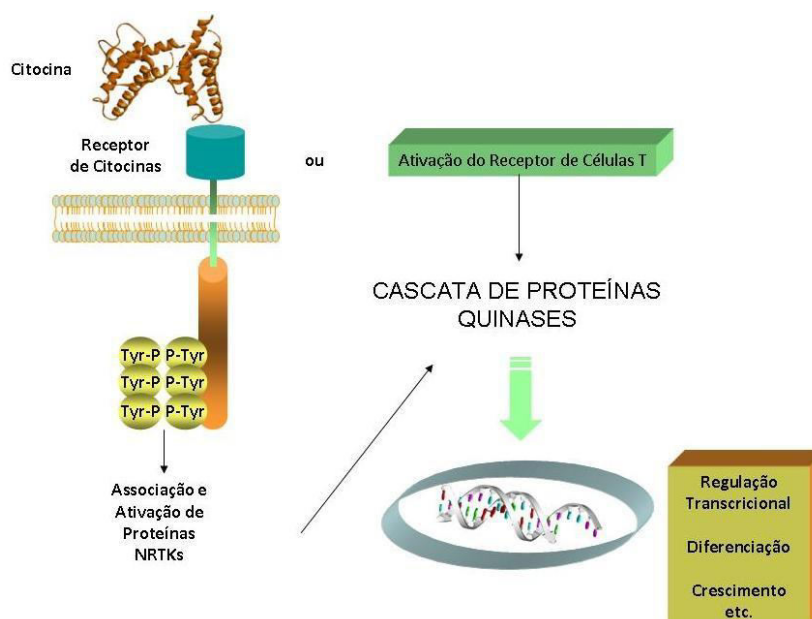


Figura 5. Esquema mostrando alguns mecanismos de ativação das NRTKs

4. Inibidores de tirosinas quinases (TKIs)

Vários inibidores de tirosinas quinases (TKIs, do inglês *Tyrosine Kinase Inhibitors*) com atividade antitumoral encontram-se disponíveis (Tabela 1). Entre eles, o imatinibe (Gleevec®),²⁴ que teve grande destaque quando do seu lançamento para o tratamento da leucemia mieloide crônica (CML, do inglês *Chronic Myeloid Leukemia*), marcando a era dos “-tinibes”, inibidores de tirosinas quinases.²⁵ Por outro lado, a resistência associada ao tratamento com este fármaco levou ao aparecimento de inibidores de segunda geração, em geral tendo como alvo mais de uma quinase, os chamados inibidores multi-quinases, como o lapatinibe (GW-572016),²⁶ inibidor de EGFR, HER2/neu e ErbB-2; canertinibe (CI-1033) inibidor de EGFR,²⁷ nilotinibe (AMN107, Tassigna®),^{28,29} inibidor de Bcr-Abl, PDGF-R e c-kit e o dasatinibe (BMS-354825, Sprycel®), inibidor de Bcr-Abl e de src quinases, entre outros.³⁰ A Tabela 1 mostra os inibidores de TKIs, seus principais alvos moleculares, indicação terapêutica e fase de desenvolvimento em que se encontram.³¹⁻⁴²

A observação das estruturas moleculares desses inibidores permite identificar núcleos nitrogenados em comum para a maioria deles (Tabela 1). Por exemplo, lapatinibe (**2**),²⁶ canertinibe (**3**),²⁷ gefitinibe (**6**),³¹ erlotinibe (**7**),³² tandutinibe (**8**)³³ e cediranibe (**11**)³⁶ possuem núcleos quinazolínicos, e o Vatalanib (**9**)³⁴ possui o núcleo ftalazínico (Tabela 1). Essa característica farmacofórica em comum foi inserida nessa classe de substâncias visando mimetizar o anel adenina do substrato ATP e facilitar a ligação na região *hinge* (de dobradura, conectando os domínios N- e C- terminal) do sítio catalítico.⁴⁶ Adicionalmente, a maioria dos inibidores, como por exemplo o imatinibe (**1**) apresenta um grupo amino terciário, sendo administrados na forma de sal, para um melhor perfil de absorção por via oral.

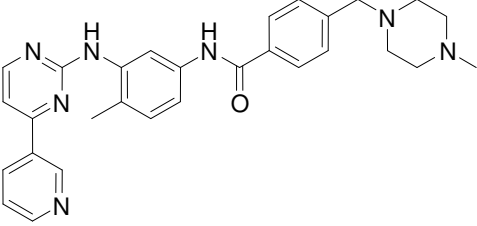
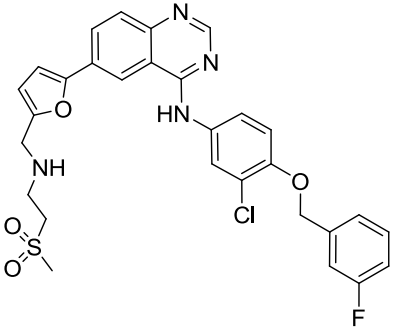
Assim como é observado para as bactérias e antibióticos, as células tumorais possuem diversos possíveis mecanismos de resistência ao uso de fármacos anticâncer, tais como a aquisição de mutações secundárias nas quinases, aumento do efluxo e metabolismo dos fármacos, utilização de vias sinalizadoras alternativas e aumento da expressão

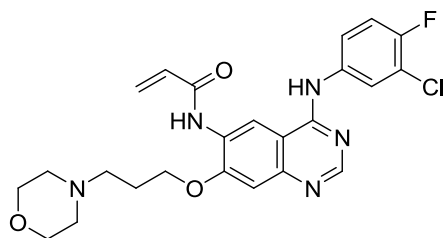
oncogênica.⁴⁷⁻⁴⁸ A principal mutação observada em pacientes com CML gerada pelo tratamento com o imatinibe envolve o resíduo denominado *gatekeeper* (Treonina/Thr 315). Inibidores como o nilotinibe e o dasatinibe, por exemplo, são insensíveis a várias mutações secundárias, mas sensíveis a Thr315→Ile. Sugere-se que a localização da Thr315, na abertura da bolsa hidrofóbica na parte de trás da cavidade de ligação do ATP é responsável por isso. Mutações em resíduos equivalentes já foram observadas para diversas outras quinases, *i.e.* c-kit (Treonina/Thr670→Isoleucina/Ile) e PDGFRA (Treonina/Thr674→Isoleucina/Ile), também oriundas da terapia com o imatinibe.⁴⁸⁻⁴⁹

Geralmente, os TKIs competem pelo sítio de ligação do ATP no sítio catalítico de várias tirosinas quinases oncogênicas, possuem um perfil terapêutico seguro, além de poderem ser combinados com outras quimioterapias ou radiação.⁵⁰ Um dos principais desafios no desenvolvimento de fármacos inibidores de proteínas tirosinas quinases é a seletividade, já que há cerca de 90 tirosinas quinases codificadas no genoma humano,⁵¹ sendo que todas geralmente utilizam o ATP como substrato para a transferência do fosfato.⁵² Portanto, como seria esperado, a topologia do sítio de ligação do ATP é altamente conservada, contendo muito pouca variação na constituição dos seus resíduos de aminoácidos, sendo bastante difícil obter a seletividade da ligação.⁵³⁻⁵⁵

Tem sido demonstrado que, de maneira geral, inibidores de segunda geração apresentam um modo de interação com o domínio quinase diferenciado do modo de ligação dos inibidores de primeira geração, levando a afinidade aumentada às quinases tipo Abl resistentes ao imatinibe.⁵⁶⁻⁵⁷ Inibidores de primeira geração das tirosinas quinases, conforme mencionado anteriormente, se ligam de maneira competitiva ao sítio de ligação ao ATP. Uma tríade importante, presente na alça de ligação ao ATP, composta pelos resíduos de aminoácidos aspartato 381 (Asp/D381), fenilalanina 382 (Phe/F382) e glicina 383 (Gly/G383), DFG, em código de uma letra, encontra-se em uma orientação típica da conformação ativa das proteínas quinases, denominada *DFG-in* (Figura 6A).⁵⁸⁻⁵⁹

Tabela 1. Inibidores de PTKs selecionados, seus alvos principais, uso terapêutico e fase de desenvolvimento

Inibidor	Alvos Principais	Principais Usos Terapêuticos	Fase de Desenvolvimento
 <p>imatinibe (Gleevec®, Glivec®, 1)²⁴</p> <p>4-[[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-fenil]benzamida</p>	Bcr-Abl/c-kit/PDGFR	Leucemia Mielóide Crônica Tumores Gastrointestinais	Liberado para uso em 18/04/2003 ⁴³
 <p>lapatinibe (GW-572016, Tykerb®, 2)²⁶</p> <p>6-(5-((2-(metilsulfonil)etilamino)metil)furan-2-il)-N-(4-(3-fluorobenzilóxi)-3-clorofenil)quinazolin-4-amina</p>	EGFR e HER2/neu ErbB-2	Câncer de mama avançado	Liberado para uso em 13/03/2007 ⁴³

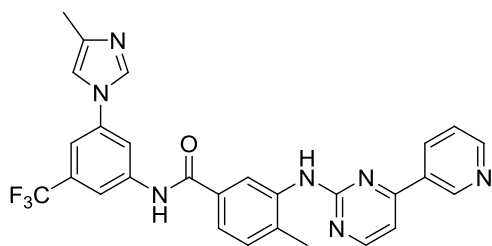
canertinibe (CI-1033 **3**)²⁷

N-(4-(3-cloro-4-fluorofenilamino)-7-(3-morfolinopropóxi)quinazolin-6-il)acrilamida

EGFR e
Pan-erbB

Câncer de mama
Câncer de pulmão

Fase II⁴⁴

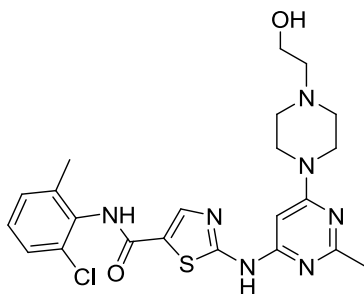
nilotinibe (AMN107, Tasigna®, **4**)^{28,29}

4-metil-*N*-[3-(4-metil-1*H*-imidazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil]-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-benzamida

Bcr-Abl

Leucemia
Mieloide Crônica
em pacientes
resistentes ou
intolerantes à
terapia com
Imatinibe

Liberado para uso
em 29/10/2007⁴³

dasatinibe (BMS-354825, Sprycel®, **5**)³⁰

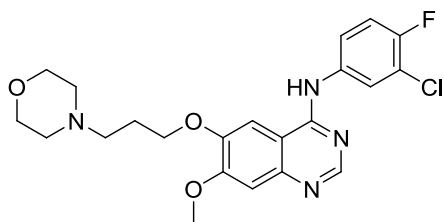
N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazol carboxamida

Bcr-Abl e
Src

Leucemia
Mieloide Crônica
em pacientes
resistentes ou
intolerantes à
terapia com
Imatinibe

Leucemia
Linfoblástica
aguda

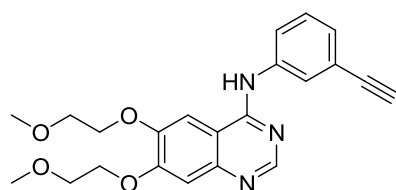
Liberado para uso
em 28/06/2006⁴³

gefitinibe (Iressa®, ZD-1839, **6**)³¹

N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-metoxi-6-(3-morfolin-4-il-propóxi)quinazolin-4-amina

EGFR

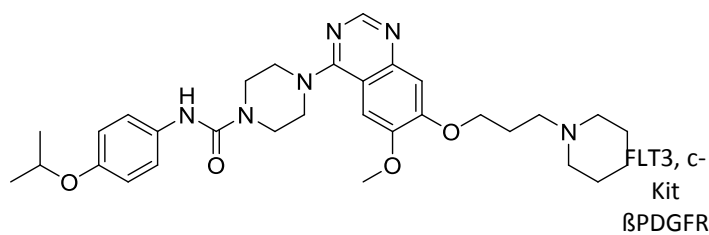
Câncer de pulmão

Liberado para uso em 05/05/2003⁴³erlotinibe (Tarceva®, **7**)³²

N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)quinazolin-4-amina

EGFR

Câncer de pulmão

Liberado para uso em 18/11/2004⁴³tandutinibe (CT53518, MLN518, **8**)³³

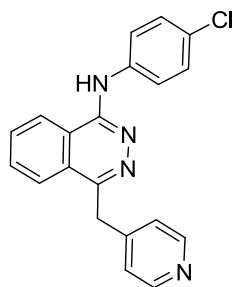
4-(7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-6-metoxiquinazolin-4-il)-*N*-(4-isopropóxi)fenil)piperazina-1-carboxamida

FLT3, c-Kit
βPDGFR

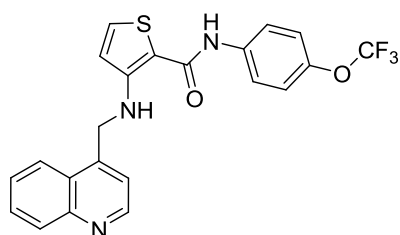
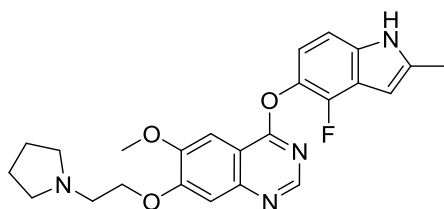
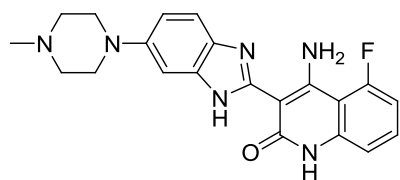
Glioblastoma

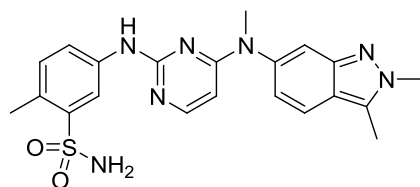
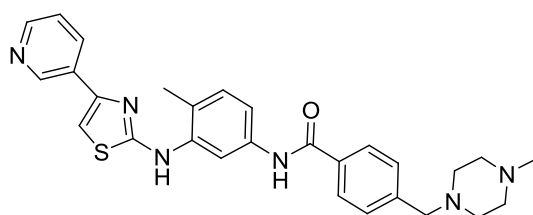
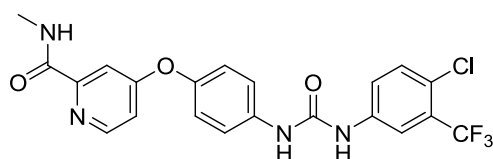
Glioma

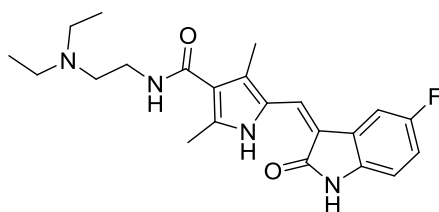
Fase I/ II⁴⁴

vatalanibe (PTK787, ZK 222584, **9**)³⁴*N*-(4-clorofenil)-4-((piridin-4-il)metil)ftalazin-1-aminaMulti-
quinases
VEGFR

Meningioma

Câncer de
pâncreasFase I/II⁴⁴OSI930 (**10**)³⁵3-((quinolin-4-il)metilamino)-*N*-(4-(trifluorometoxi)fenil)tiofeno-2-carboxamidac-Kit e
VEGFRCâncer de pulmão
e cólonFase I⁴⁴cediranibe (AZD2171, recentin®, **11**)³⁶7-(2-(pirrolidin-1-il)etoxi)-4-(4-fluoro-2-metil-1*H*-indol-5-ilóxi)-6-metoxiquinazolinaVEGF-
1,2,3Câncer dos rins,
pulmão e cólonFase II/III⁴⁵dovitinibe (TKI258, CHIR-258, **12**)³⁷4-amino-5-fluoro-3-(6-(4-metilpiperazin-1-il)-1*H*-benzo[d]imidazol-2-il)quinolin-2(1*H*)-onaVEGFR,
FGFR3,
PDGFR e
c-kitCâncer dos rins e
de próstataFase I/II⁴⁵

pazopanibe (GW786034, **13**)³⁸VEGFR,
PDGFR e
kitCâncer do
pulmão, câncer do
epitélio ovariano,
câncer renalFase II/III⁴⁵5-[[4-[(2,3-dimetilindazol-6-il)-metilamino]pirimidin-
2-il]amino]-2-metilbenzenosulfonamidamasitinibe (AB1010, **14**)³⁹c-kit,
PDGFR e
FGFR3Câncer de
pâncreas,
Gastrointestinal,
mastocitoseFase III⁴⁵N-(3-(4-(piridin-3-il)tiazol-2-il-amino)-4-metilfenil)-4-
((4-metilpiperazin-1-il)metil)benzamidasorafenibe (nexavar®, BAY 43-9006, **15**)⁴⁰Raf,
PDGF,
VEGFR-2,
VEGFR-3
e c-KitCâncer de fígado

Câncer renal
avançadoLiberado para uso
em 20/12/2005⁴³1-(4-(2-(metilcarbamoil)piridin-4-ilóxi)fenil)-3-(4-
cloro-3-(trifluorometil)fenil)uréiasunitinibe (Sutent®, **16**)⁴¹Multi-
quinases:
PDGF-
R/VEGF-R

Câncer GI

Liberado para uso
em 26/01/006⁴³N-(2-(dietilamino)etil)-5-((Z)-(5-fluoro-2-oxoindolin-
3-ilideno)metil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxamida

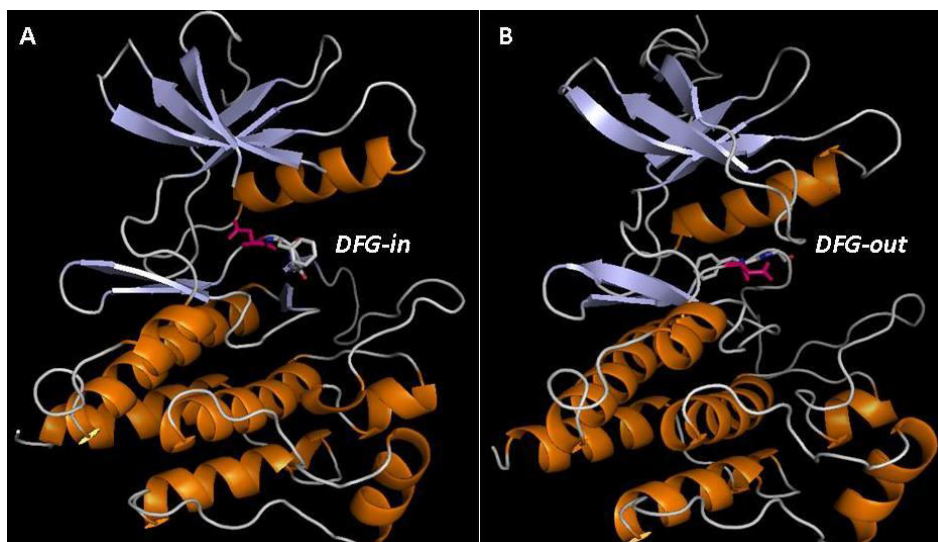


Figura 6. Caracterização Estruturas cristalográficas de tirosinas quinases mostrando as conformações ativa (A, *DFG-in*)⁶⁰ e inativa (B, *DFG-out*).⁶¹ O resíduo Asp381 (D381) é tomado como referência, em magenta. Os átomos de hidrogênio foram eliminados para facilitar a visualização

5. Modos de ligação revelados pelas estruturas tridimensionais das PTKs obtidas por difração de raios-X

Estudos de difração de raios-X de cristais de enzimas e inibidores co-cristalizados têm sido extremamente úteis em fornecer detalhes do reconhecimento molecular e explicações para demonstrar o mecanismo de resistência de mutantes da proteína de fusão Bcr-Abl, alvo do imatinibe, entre outros TKIs. O conhecimento dos modos de interação diferenciados de diversos TKIs, auxiliados pela análise e comparação de estruturas cristalográficas da Abl quinase e da c-src, levou à definição dos inibidores de tirosinas quinases como de Tipo I, que se ligam à conformação ativa das TKs (*DFG-in*) (Figura 6A) e Tipo II, que se ligam à conformação inativa das mesmas (*DFG-out*) (Figura 6B). Os inibidores do Tipo I se ligam ao sítio de ligação do ATP através da formação de ligação hidrogênio na região *hinge* do domínio quinase, formada pela junção dos resíduos N- e C-terminais, e também por interações hidrofóbicas nessa região e na vizinhança da região ocupada pelo anel adenina do ATP, na conformação ativa do domínio quinase (*DFG-in*).⁶¹

Esses estudos mostraram que o imatinibe se liga e estabiliza a conformação *DFG-out* (Figura 6B), interagindo com a cadeia lateral aromática do resíduo conservado de fenilalanina da tríade DFG, deslocando a alça de ativação de sua posição normal, forçando-o a adotar uma conformação do tipo-substrato na qual essa subunidade é rotacionada cerca de 180 graus,

criando uma bolsa hidrofóbica próxima ao resíduo *gatekeeper*, Thr315, denominada de sítio de ligação alostérico.⁶¹ Como os resíduos de aminoácidos na cavidade de ligação ao ATP não ficam orientados de modo a permitir a transferência do grupo fosfato para a catálise e a alça de ativação está em uma conformação que bloqueia a aproximação do ATP e de substratos, a quinase encontra-se na forma inativa.

Também já foi demonstrado que os inibidores do Tipo II típicos também usam o sítio de ligação do ATP, porém possuem elementos funcionais capazes de explorar interações por ligação hidrogênio específicas, além de realizarem interações hidrofóbicas na região dos resíduos DFG próximos à alça de ativação, no sítio alostérico criado pela indução ou reconhecimento de uma conformação distinta (*DFG-out*) daquela utilizada para a transferência do fosfato do ATP (*DFG-in*), oriunda da interação com o resíduo de aspartato da tríade DFG (Asp283). Entretanto, ensaios de inibição de quinases *in vitro* sugerem que os inibidores do Tipo I são capazes de reconhecer as conformações ativa (*DFG-in*) e inativa (*DFG-out*) das quinases.⁶¹

A análise de estruturas cristalográficas de inibidores de Tipo II conhecidos mostra que todos eles possuem uma ligação hidrogênio envolvendo um grupo amida ou uréia com os resíduos do sítio alostérico: uma ligação hidrogênio com a cadeia lateral de um resíduo de glutamato conservado, na hélice- α C e a outra com a amida do esqueleto peptídico de um resíduo de aspartato, na tríade DFG. Todos os inibidores do Tipo II também possuem uma segunda subunidade hidrofóbica que forma

interações de van der Waals no sítio alostérico e que está localizada imediatamente após um par doador-aceptor de ligação hidrogênio. Finalmente, os inibidores do Tipo II também podem interagir por uma ou duas ligações hidrogênio na região de interação da adenina do ATP, na região *hinge*, de modo análogo às interações de inibidores do Tipo I.⁶²

A maioria das estruturas tridimensionais de TKs co-cristalizadas com inibidores do Tipo II apresenta a alça de ativação na conformação inativa. Como a região da alça de ativação (DFG) é menos conservada entre os domínios quinases, levantou-se a hipótese de que esse sítio alostérico poderia representar uma ferramenta importante para o planejamento de TKIs seletivos. A partir dessas estruturas observou-se que o equilíbrio entre a conformação ativa, *DFG-in*, e inativa, *DFG-out*, pode ser modulado através de fosforilação da alça de ativação, interações proteína-proteína ou pela interação de inibidores com as tirosinas quinases.⁶³

A Figura 7 mostra os modos de ligação do dasatinibe,⁶⁰ um inibidor do Tipo I e o imatinibe, um inibidor do Tipo II.⁶⁴ Pela observação dos modos de ligação, está bastante claro que o dasatinibe se liga próximo à região do *hinge*, no sítio de ligação do ATP, posicionando seu núcleo pirimidinila de modo a interagir por ligações hidrogênio, de modo análogo ao anel adenina do ATP (Figura 7A), enquanto que o

imatinibe explora interações em regiões mais distantes desse sítio, na região alostérica (Figura 7B). Esses modos de interação distintos se pronunciam ao se observar que a cadeia lateral *N*-hidroxietil-piperazina do dasatinibe encontra-se próxima aos resíduos Phe317, Met318 e Tyr320 (Figura 7A), na região *hinge*, enquanto a cadeia lateral *N*-metil-piperazina do imatinibe interage próximo à região conservada da tríade DFG, formando ligações hidrogênio com o esqueleto peptídico dos resíduos de aminoácidos Phe359, Ile360 e His361, no sítio alostérico, e interagindo com Glu286, em um modo típico de inibidores do Tipo II.⁶⁴ Cabe ressaltar a sua interação por ligação hidrogênio envolvendo o grupo amino e o resíduo *gatekeeper* Thr315, origem da freqüente mutação dessa posição. Além disso, é possível observar interação hidrofóbica adicional com Phe359, típica de inibidores do Tipo II (Figura 7B).

Embora tenha sido observado que a maioria dos inibidores de quinases se ligue como Tipo I ou II,^{63, 65} existem relatos de modos de ligação inusitados. Um bom exemplo é o modo de ligação do lapatinibe, que se liga ao domínio quinase do EGFR em um modo único, numa conformação inativa na qual a hélice C se encontra deslocada e a tríade DFG não adota a conformação dobrada (*DFG-out*) típica da interação de inibidores do Tipo II (Figura 8).⁶⁶

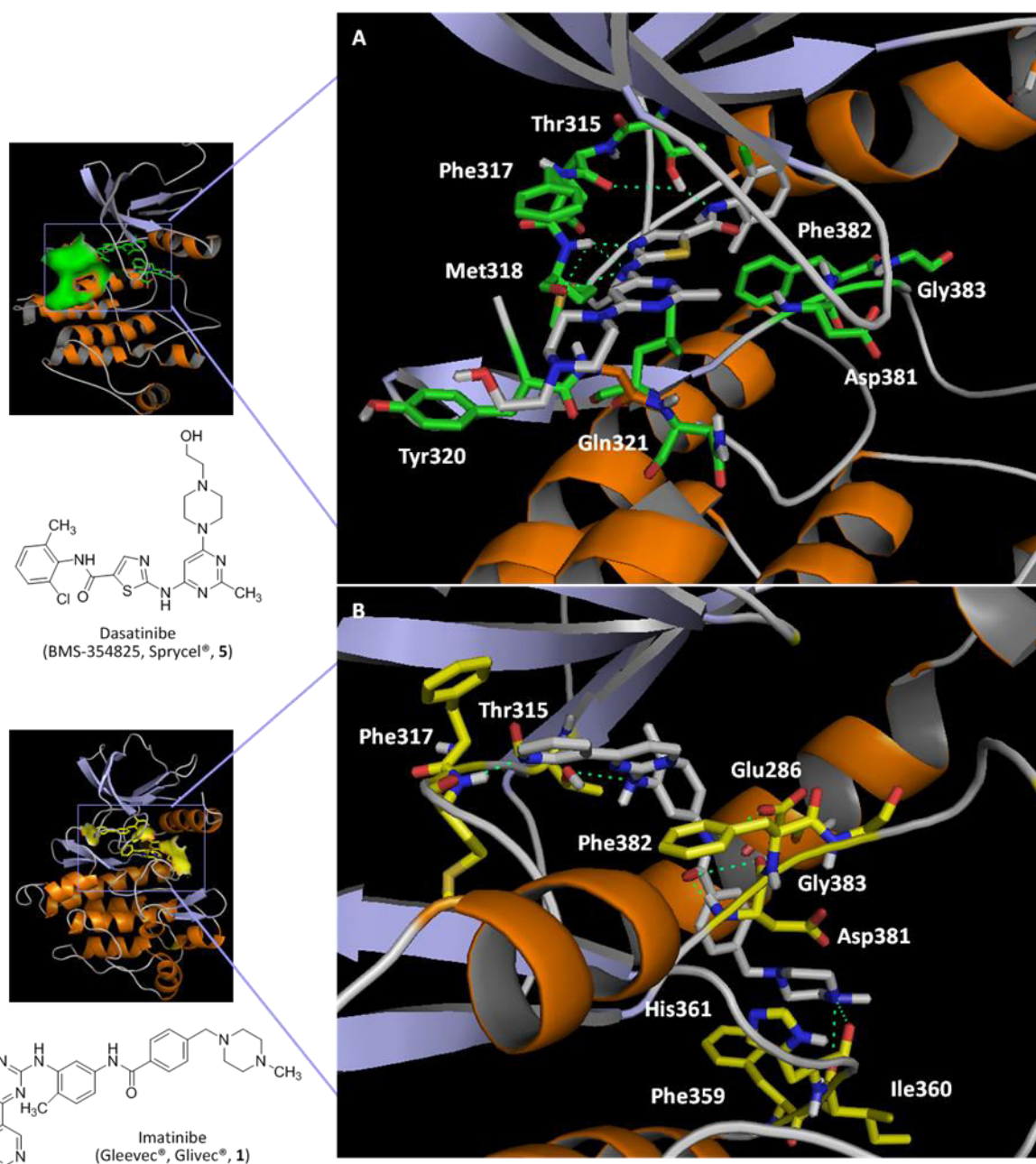


Figura 7. Comparação entre os modos de ligação do dasatinibe (A),⁶⁰ um inibidor do Tipo I, e o imatinibe (B),⁶⁴ um inibidor do Tipo II, com a Abl. Os átomos de hidrogênio foram eliminados para facilitar a visualização. Ligações de hidrogênio estão representadas por linhas pontilhadas verdes

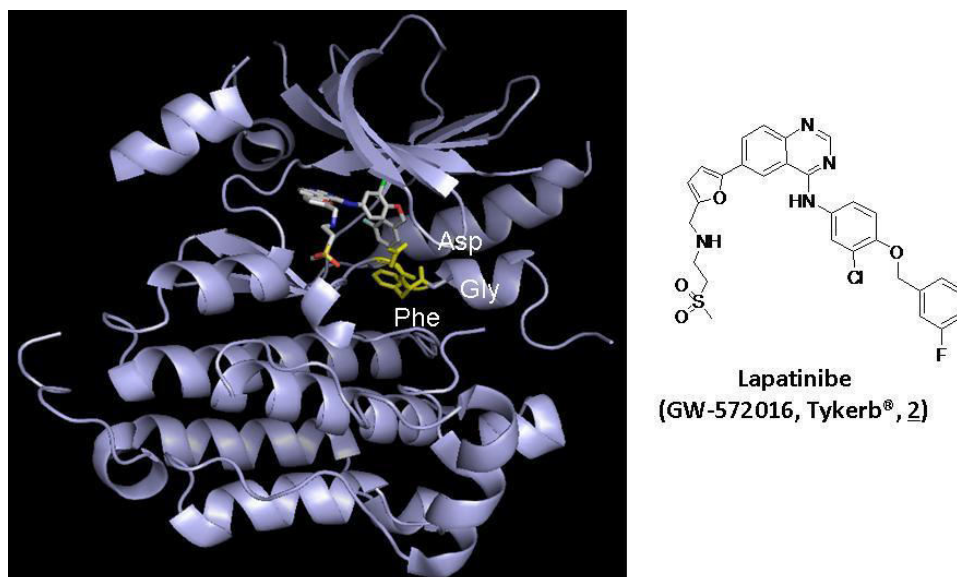


Figura 8. Conformação da tríade DFG (em amarelo) observada no co-cristal entre o lapatinibe, um inibidor de tirosinas quinases do Tipo II, e EGFR.⁶⁶ Os átomos de hidrogênio foram eliminados para facilitar a visualização

Inibidores de c-Src da classe das pirazolil-uréias que se ligam somente ao sítio alostérico já foram descritos, tendo sido denominados inibidores do Tipo III (**17**, **18**, Figura 9). Tal modo de ligação também já havia sido observado para uma classe de inibidores de P38 MAPK, cujas estruturas triarila foram utilizadas como modelo molecular para o planejamento de TKIs.⁶⁷⁻⁶⁸ Essas moléculas se ligam distante do sítio de ligação do ATP e interagem principalmente por ligação hidrogênio com Glu310 e Asp404, além de estarem próximas a Phe406 (Figura 9A,B). Cabe

ressaltar a orientação da fenilalanina da tríade DFG, bloqueando o acesso ao sítio catalítico (Figura 9A,B). Outros exemplos recentes de modos de interação diferenciados referem-se aos inibidores de fak, TAE226 (**19**) e PF-562271 (**20**), da classe das *bis*-amino pirimidinas, cuja ligação leva o domínio DFG a adotar uma conformação helicoidal (Figura 10). Mais uma vez, esses dados reforçam a importância dos estudos de cristalografia de raios X no planejamento racional de fármacos.⁶⁹⁻⁷⁰

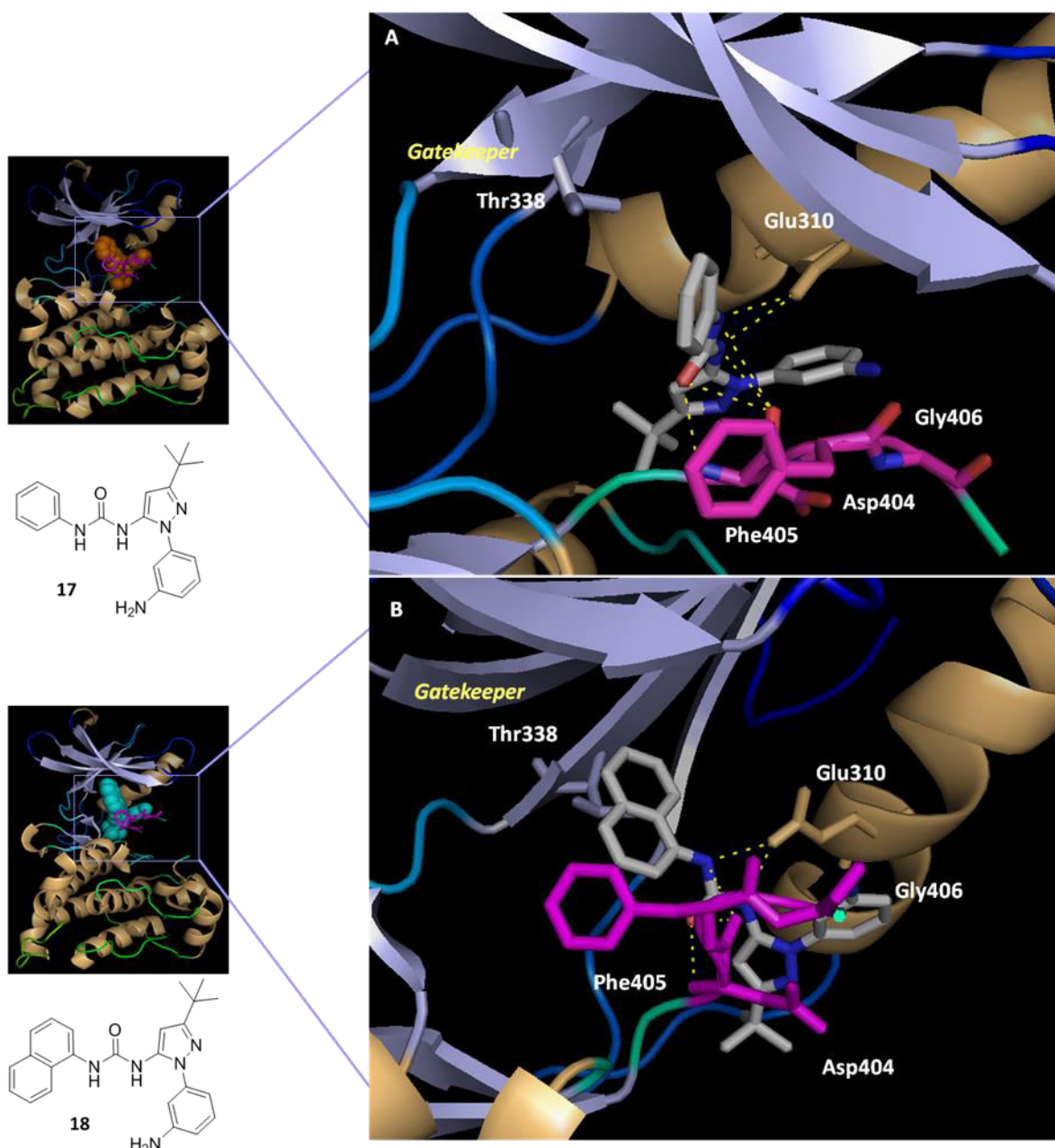


Figura 9. Inibidores da classe das pirazolil uréias do Tipo III (**17**, A; **18**, B) e suas interações no sítio alostérico da quinase s-Src.⁶⁷⁻⁶⁸ Resíduos da tríade DFG em magenta. Os átomos de hidrogênio foram eliminados para facilitar a visualização

Baseado nos modos de ligação de TKIs observados por dados de difração de raios X de cristais, e comparação com a estrutura molecular de inibidores do Tipo I, foi feita a proposição de um farmacóforo visando o desenho racional de TKIs do Tipo II (Figura 11).^{71,63} O farmacóforo envolve uma região aceptora-doadora de ligação hidrogênio, ligada a um anel que contém elementos funcionais capazes de interagir com resíduos de aminoácidos da região de *hinge* das tirosinas quinases, uma subunidade hidrofóbica que pode estar conectada a outra região doadora-aceptora de ligação hidrogênio através de um grupo espaçador e essa mesma região está ligada a outra

subunidade hidrofóbica, que visa realizar interações hidrofóbicas fora do sítio de ligação do ATP, na região alostérica (Figura 11). A diferença principal entre os inibidores do Tipo I e do Tipo II é a presença da região doadora-aceptora de ligação ligada à subunidade HM2, de interação hidrofóbica. Outro modelo farmacofórico para ligantes do Tipo II utilizando inibidores de tie2 também foi proposto recentemente, utilizando o programa “HipHop” (Figura 12).⁷² Esse modelo mostra a relação espacial entre os grupos farmacofóricos das moléculas visando interação no sítio ATP e na região alostérica.

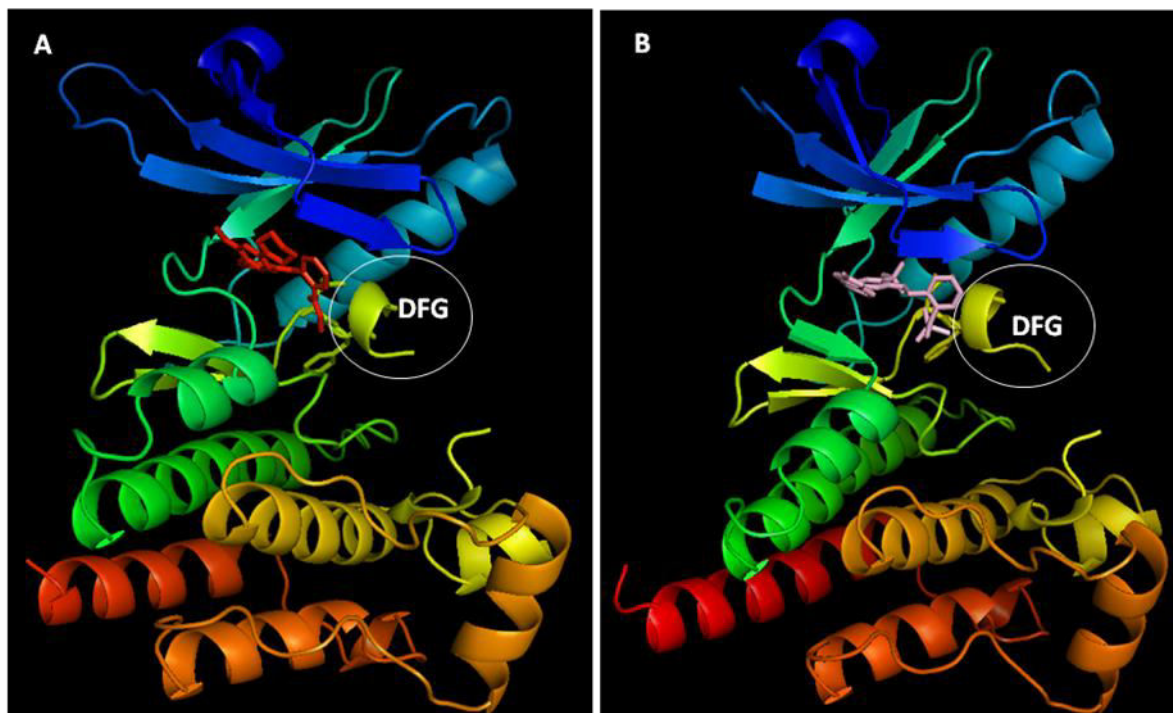


Figura 10. Conformação helicoidal do domínio DFG (círculo) na ligação dos inibidores TAE226, **19** (A, vermelho)⁶⁹ e PF-562271, **20** (B, rosa).⁷⁰ Os átomos de hidrogênio foram eliminados para facilitar a visualização

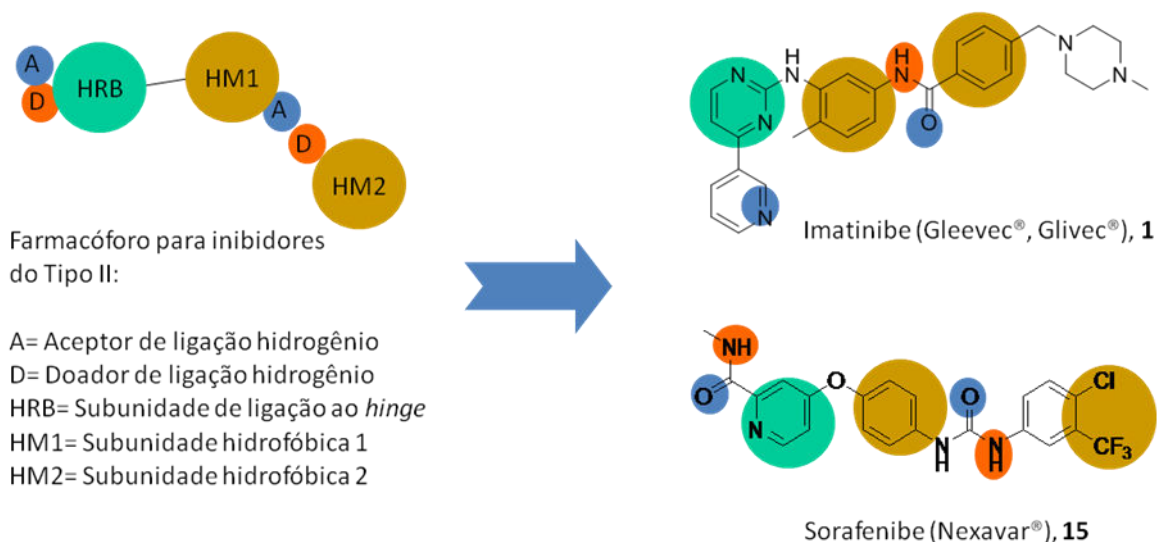


Figura 11. Farmacóforo proposto para TKIs do Tipo II, exemplificados pelo imatinibe e pelo sorafenibe. [adaptado das Referências 63 e 71, Copyright © 2009, com permissão da Nature Publishing Group e da Elsevier]

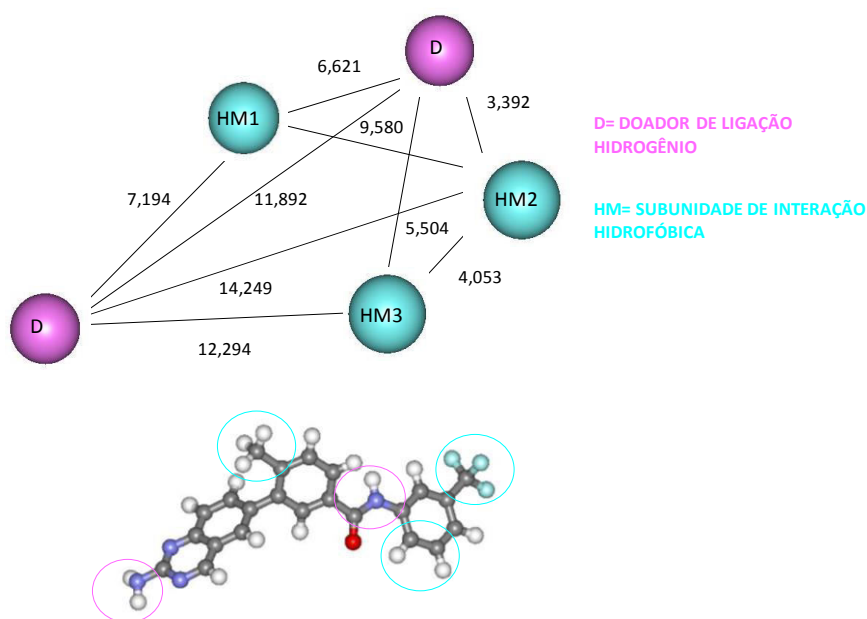


Figura 12. Modelo farmacofórico para inibidores do Tipo II, de proteínas tirosinas quinases tie2. Molécula mais ativa do banco de dados representadas em bola-palito. Esferas magenta= sítio doador de ligação hidrogênio; esferas ciano= sítio de interação hidrofóbica. Distâncias em ângstrons (Å). [adaptado da Referência 72, Copyright © 2009, com permissão da Elsevier]

Dando continuidade aos métodos de planejamento de inibidores de tirosinas quinases do Tipo II, a Figura 13 mostra exemplos de inibidores de tirosinas quinases de segunda geração que possuem o esqueleto molecular típico dos inibidores do Tipo I

(em preto), porém foram modificados pela adição de um grupo amida ou uréia e uma subunidade hidrofóbica (em laranja), tornando-se inibidores do Tipo II, mais seletivos.⁷¹

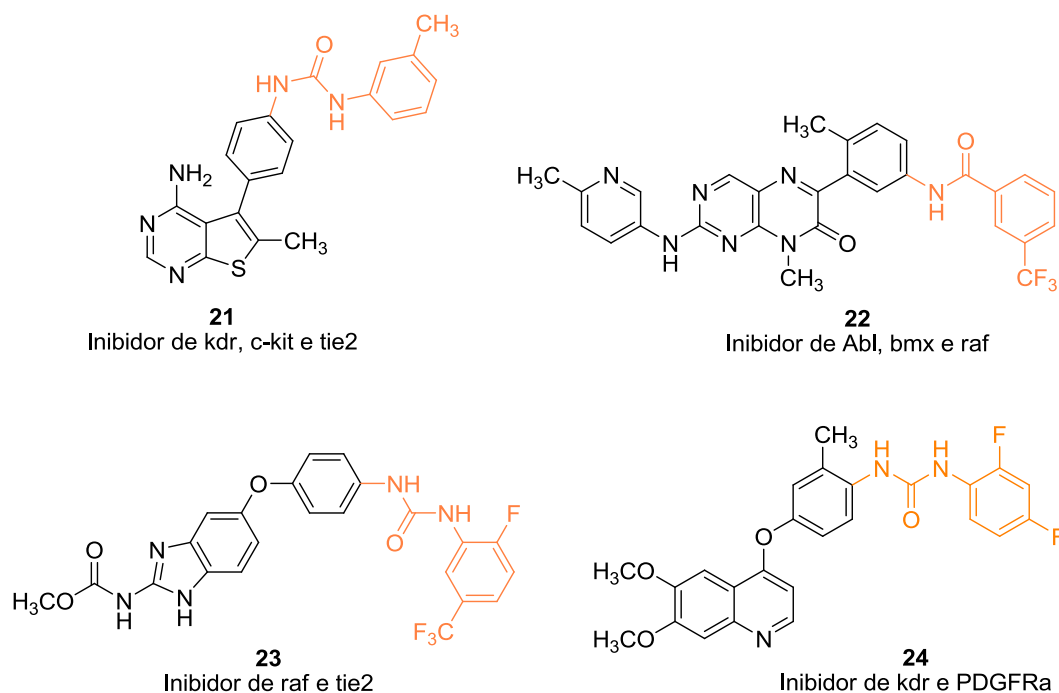


Figura 13. Inibidores de tirosinas quinases de segunda geração, do Tipo II, mais seletivos. Subunidades em preto representam o esqueleto molecular típico de inibidores do Tipo I e em laranja representam modificações moleculares introduzidas no planejamento de inibidores do Tipo II.

Finalmente, uma classe de TKIs diferenciada compreende moléculas que são capazes de formar uma ligação covalente no sítio ativo das quinases, geralmente através de uma reação com um resíduo de cisteína (Figura 13). Exemplos dessa classe de inibidores são o HKI-272 (neratinibe, 25)⁷² e o CL-387785 (26),⁷³ que foram desenvolvidos visando à ligação com um resíduo de cisteína de ocorrência rara, localizado no sítio de ligação do ATP do EGFR. Em comum aos dois inibidores está a presença de funções passíveis de sofrerem um ataque nucleofílico do átomo de enxofre do resíduo de cisteína, *i.e.* ligação dupla da função carbonila α,β insaturada e ligação tripla vizinha a carbonila (Figura 14). Vários outros trabalhos com estruturas tridimensionais de PKs têm auxiliado na compreensão dos modos de ligação de fármacos inibidores de tirosinas quinases de segunda geração e no desenho de novos fármacos.⁷⁴⁻⁸⁶

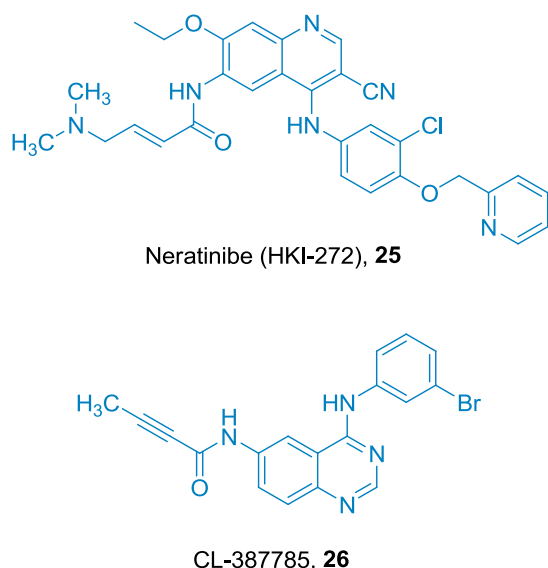


Figura 14. Inibidores irreversíveis de PTKs

6. Anticorpos monoclonais como fármacos anti-RTKs

Uma das estratégias terapêuticas utilizadas no

combate às células tumorais é o uso de anticorpos monoclonais (mAbs, do inglês *monoclonal Antibodies*). Essas moléculas são direcionadas ao domínio extracelular das RTKs, agindo através do bloqueio da interação ligante-receptor, inibindo a sinalização das RTKs induzida pelo ligante e aumentando a modulação e internalização dos receptores. Alguns exemplos em uso clínico ou fase de avaliação são a herceptina (Trastuzimab®), um mAb contra ErbB2/HER2, cetuximab® e bevacizumab, contra ErbB1/EGFR e panitumumab.⁸⁷⁻⁸⁸

Uma das resultantes do uso desse tipo de estratégia no combate ao câncer é a deflagração da resposta imune, como a lise celular mediada pelo sistema complemento, além de disparar a citotoxicidade dependente de anticorpos em macrófagos, ou células *natural killer*. Essas moléculas também são capazes de alterar o padrão de sinalização intracelular da célula tumoral-alvo, podendo levar a apoptose e/ou à inibição do crescimento.⁸⁹ Entretanto, assim como observado no uso de pequenas moléculas, TKIs, para o tratamento do câncer, também tem sido observada resistência no uso terapêutico desses fármacos, com observação de remissão e eventual progressão da doença, quando os mesmos são utilizados individualmente. Como alternativa, seu uso em terapias combinadas parece ser bastante benéfico, auxiliando na diminuição da resistência a fármacos antitumorais.⁹⁰ Outras terapias anti-PTKs para o tratamento do câncer também estão disponíveis e envolvem terapia genética.⁹¹⁻⁹²

7. Fontes de informações diversas sobre PTKs

Devido à rápida expansão do conhecimento acerca de proteínas quinases, tanto em relação a genes, função, inibidores e outras informações diversas, a Tabela 2 reporta alguns sítios da internet que são de interesse para o estudo de PTKs.

Tabela 2. Sítios que contêm informações diversas acerca de PTKs

Nome	Endereço Eletrônico	Informação
Kinase.com	http://www.kinase.com/	Genômica, evolução e análise em larga escala de PKs
Kinase Pathway Database	http://kinasedb.ontology.ims.u-tokyo.ac.jp:8081/	Banco de dados integrado contendo seqüências de PKs, classificações, dados sobre domínios conservados e comparações entre espécies, entre outros
Kinweb (kinase database)	http://www.itb.cnr.it/kinweb/	Coleção de PKs codificadas no genoma humano
KinMutBase	http://bioinf.uta.fi/KinMutBase/	Registro de mutações em PKs relacionadas a doenças
National Cancer Institute	http://www.cancer.gov/	Informações sobre triagens clínicas, fármacos, etc.
The Protein Kinase Resource	http://pkr.genomics.purdue.edu/pkr/Welcome.do	Bancos de dados de estruturas de PKs e outros dados relacionados
The Kinase Knowledgebase (KKB)	http://www.eidogen-sertanty.com/products_kinasekb.html	Banco de dados de estrutura-atividade de PKs e dados de síntese química
Kinase Validation Data	http://www.eidogen-sertanty.com/kinasednld.php	Dados de estrutura-atividade de PKs
Kinase3D	http://www.kinase3d.org/	Banco de dados de modelos comparativos 3D de PKs
Kinase/TIP	http://www.eidogen-sertanty.com/products_tip_content.html	Banco de dados com milhares de estruturas, co-complexos e modelos relacionados ao Kinoma Humano
KinaseCentral	http://www.kinasecentral.com/	Inibidores de PKs em desenvolvimento
Orientation of Proteins in Membranes Database (OPM)	http://www.opm.phar.umich.edu/	Fornecer o arranjo espacial de proteínas de membrana em relação ao núcleo hidrocarboneto da bicamada lipídica
PDBTM Database	http://pdbtm.enzim.hu/	Banco de dados de proteínas transmembrana
PDB-The Protein Data Bank	http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do	Banco de dados de estruturas de proteínas

8. Conclusões

O desafio no desenvolvimento de moléculas terapêuticamente úteis para o tratamento do câncer é demonstrado claramente pela ampla gama de proteínas tirosinas quinases alteradas em processos oncogênicos. O desenvolvimento de resistência a fármacos inibidores de tirosinas quinases estimula a busca por novos inibidores, com modo de ligação distinto daqueles fármacos de primeira geração, como o imatinibe. Nesse contexto, estudos de difração de raios X de moléculas co-cristalizadas com seus alvos, evidenciando a afinidade das mesmas por conformações distintas dos domínios quinases, na região da alça catalítica, é uma ferramenta importante para o planejamento de fármacos mais seletivos e insensíveis a mutações desenvolvidas pelas proteínas. Cabe ressaltar a importância das estratégias utilizadas no desenvolvimento de inibidores de tirosinas quinases, facilitadas pela disponibilidade de bancos de dados de estruturas tridimensionais de proteínas e de fontes diversas de informação, essenciais em uma área da ciência cuja quantidade de dados novos cresce rapidamente.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio dos seguintes órgãos: IM-INOVAR (#420.015/2005-1, Br); INCT-INOVAR (#573.564/2008-6); CNPq.

Referências Bibliográficas

- ¹ Baselga J. *Science*. **2006**, *312*, 1175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ² Prenzel, N.; Fischer, O. M; Streit, S.; Hart, S.; Ullrich, A. *Endocr. Relat. Cancer*. **2001**, *8*, 11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³ Slichenmyer, W. J; Fry, D. W. *Semin. Oncol*. **2001**, *28*, 67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴ Bennisroune, A.; Gardin, A.; Aunis, D.; Cremel, G.; Hubert, P. *Crit. Rev. Oncol. Hematol*. **2004**, *50*, 23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵ Robinson, D. R.; Wu, Y. M.; Lin, S. F. *Oncogene*. **2000**, *19*, 5548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶ Ullrich, A.; Schlessinger, J. *Cell* **1990**, *61*, 203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷ Cantley, L. C.; Auger, K. R.; Carpenter, C. L.; Duckworth, B.; Graziani, A.; Kapeller, R.; Soltoff, S. *Cell* **1991**, *64*, 281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁸ Vlahovic, G.; Crawford, J. *Oncologist* **2003**, *8*, 531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁹ Heldin, G. H. *Cell* **1995**, *80*, 213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁰ Paul, M. K.; Mukhopadhyay, A. K. *Int. J. Med. Sci*. **2004**, *1*, 101. [[Link](#)] [[PubMed](#)]
- ¹¹ Hubbard, S. R.; Mohammadi, M.; Schlessinger, J. *J. Biol. Chem*. **1998**, *273*, 11987. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹² Hunter, T. *Cell* **1995**, *80*, 225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹³ Ostman, A.; Bohmer, F. D. *Trends Cell. Biol*. **2001**, *11*, 258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁴ Waterman, H.; Yarden, Y. *FEBS Lett*. **2001**, *490*, 142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁵ Hubbard, S. R.; Till, J. H. *Annu. Rev. Biochem*. **2000**, *69*, 373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁶ Hubbard, S. R. *EMBO J*. **1997**, *16*, 5572. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁷ Hubbard, S. R. *Curr. Opin. Struct. Biol*. **2002**, *12*, 735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁸ Schenk, P. W.; Snaar-Jagalska, B. E. *Biochim. Biophys. Acta*. **1999**, *1449*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁹ Johnson, L. N.; Lowe, E. D.; Noble, M. E.; Owen, D. J. *FEBS Lett*. **1998**, *430*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁰ PDB ID: 2IJM. Andersen, C. B.; Ng, K.; Ficarro, S.; Vu, C.; Choi, H-S.; He, Y.; Spraggon, G.; Gray, N.; Lee, C. C.; To be published. [[CrossRef](#)]
- ²¹ Chung, T. D.; Broaddus, W. C. *Mol. Interv*. **2005**, *5*, 15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²² Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. *Nucleic Acids Res*. **2000**, *28*, 235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²³ Tamura, T.; Koch, A. *Anti-inflam. & Allergy Agents Med. Chem*. **2007**, *6*, 47. [[CrossRef](#)]
- ²⁴ Lyseng-Williamson, K.; Jarvis, B. *Drugs* **2001**, *61*, 1765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁵ Hunter T. *J. Clin. Invest*. **2007**, *117*, 2036. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁶ Rusnak, D. W.; Lackey, K.; Affleck, K.; Wood, E. R.; Alligood, K. J.; Rhodes, N.; Keith, B. R.; Murray, D. M.; Knight, W. B.; Mullin, R. J.; Gilmer, T. M. *Mol. Cancer Ther*. **2001**, *1*, 85. [[Link](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁷ Thomas, S. M.; Grandis, J. R. *Cancer Treat. Rev*. **2004**, *30*, 255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁸ Weisberg, E.; Manley, P.; Mestan, J.; Cowan-Jacob, S.; Ray, A.; Griffin, J. D. *Br. J. Cancer* **2006**, *94*, 1765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁹ Weisberg, E.; Manley, P. W.; Cowan-Jacob, S. W.; Hochhaus, A.; Griffin, J. D. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- ³⁰ Shah, N. P.; Tran, C.; Lee, F. Y.; Chen, P.; Norris, D.; Sawyers, C. L. *Science* **2004**, *305*, 399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³¹ Sordella, R.; Bell, D. W.; Haber, D. A.; Settleman, J. *Science* **2004**, *305*, 1163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³² Kim, T. E.; Murren, J. R. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2002**, *3*, 1385. [[Link](#)] [[PubMed](#)]
- ³³ Cheng, Y.; Paz, K. *IDrugs* **2008**, *11*, 46. [[Link](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁴ Wood, J. M.; Bold, G.; Buchdunger, E.; Cozens, R.; Ferrari, S.; Frei, J.; Hofmann, F.; Mestan, J.; Mett, H.; O'Reilly, T.; Persohn, E.; Rösel, J.; Schnell, C.; Stover, D.; Theuer, A.; Towbin, H.; Wenger, F.; Woods-Cook, K.; Menrad, A.; Siemeister, G.; Schirner, M.; Thierauch, K. H.; Schneider, M. R.; Drevs, J.; Martiny-Baron, G.; Totzke, F. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 2178. [[Link](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁵ Garton, A. J.; Crew, A. P.; Franklin, M.; Cooke, A. R.; Wynne, G. M.; Castaldo, L.; Kahler, J.; Winski, S. L.; Franks, A.; Brown, E. N.; Bittner, M. A.; Keily, J. F.; Briner, P.; Hidden, C.; Srebernak, M. C.; Pirrit, C.; O'Connor, M.; Chan, A.; Vulevic, B.; Henninger, D.; Hart, K.; Sennello, R.; Li, A. H.; Zhang, T.; Richardson, F.; Emerson, D. L.; Castelhana, A. L.; Arnold, L. D.; Gibson, N. W. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 1015. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁶ Wedge, S. R.; Kendrew, J.; Hennequin, L. F.; Valentine, P. J.; Barry, S. T.; Brave, S. R.; Smith, N. R.; James, N. H.; Dukes, M.; Curwen, J. O.; Chester, R.; Jackson, J. A.; Boffey, S. J.; Kilburn, L. L.; Barnett, S.; Richmond, G. H.; Wadsworth, P. F.; Walker, M.; Bigley, A. L.; Taylor, S. T.; Cooper, L.; Beck, S.; Jürgensmeier, J. M.; Ogilvie, D. J. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 4389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁷ Trudel, S.; Li, Z. H.; Wei, E.; Wiesmann, M.; Chang, H.; Chen, C.; Reece, D.; Heise, C.; Stewart, A. K. *Blood*. **2005**, *105*, 2941. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁸ Harris, P. A.; Bloor, A.; Cheung, M.; Kumar, R.; Crosby, R. M.; Davis-Ward, R. G.; Epperly, A. H.; Hinkle, K. W.; Hunter, R. N.; Johnson, J. H.; Knick, V. B.; Laudeman, C. P.; Luttrell, D. K.; Mook, R. A.; Nolte, R. T.; Rudolph, S. K.; Szweczyk, J. R.; Truesdale, A. T.; Veal, J. M.; Wang, L.; Stafford, J. A. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁹ Soria, J. C.; Massard, C.; Magné, N.; Bader, T.; Mansfield, C. D.; Blay, J. Y.; Bui, B. N.; Moussy, A.; Hermine, O.; Armand, J. P. *Eur. J. Cancer.* **2009**, *45*, 2333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁰ Lee, J. T.; McCubrey, J. A. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* **2003**, *4*, 757. [[Link](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴¹ Sun, L.; Liang, C.; Shirazian, S.; Zhou, Y.; Miller, T.; Cui, J.; Fukuda, J. Y.; Chu, J. Y.; Nematalla, A.; Wang, X.; Chen, H.; Sistla, A.; Luu, T. C.; Tang, F.; Wei, J.; Tang, C. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴² Robak, T. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 2212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴³ Drugs@FDA. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Drugs/default.htm>>. Acesso em: 15 outubro 2009.
- ⁴⁴ <http://clinicaltrials.gov/>, acessado em 25/10/2009.
- ⁴⁵ <http://www.cancer.gov/>, acessado em 15/10/2009.
- ⁴⁶ Chen, H.; Ma, J.; Li, W.; Eliseenkova, A. V.; Xu, C.; Neubert, T. A.; Miller, W. T.; Mohammadi, M. *Mol. Cell.* **2007**, *27*, 717. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁷ Shannon, K. M. *Cancer Cell* **2002**, *2*, 99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁸ Engelman, J. A.; Settleman, J. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2008**, *18*, 73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁹ Corless C. L.; Heinrich, M. C. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2008**, *3*, 557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁰ Pao, W.; Miller, V. A.; Politi, K. A.; Riely, G. J.; Somwar, R.; Zakowski, M. F.; Kris, M. G.; Varmus, H. *PLoS Med.* **2005**, *2*, e73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵¹ Madhusudan, S. e Ganesan, T. S. *Clin. Biochem.* **2004**, *37*, 618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵² Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. *Science* **2002**, *298*, 1912. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵³ Knight, Z. A.; Shokat, K. M. *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁴ Huse, M.; Kuriyan, J. *Cell* **2002**, *109*, 275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁵ Kufareva, I.; Abagyan, R. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 7921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁶ Giles, F. J.; O'Dwyer, M.; Swords, R. *Leukemia* **2009**, *23*, 1698. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁷ Branford, S.; Rudzki, Z.; Walsh, S.; Grigg, A.; Arthur, C.; Taylor, K.; Herrmann R.; Lynch, K. P.; Hughes, T. P. *Blood* **2002**, *99*, 3472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁸ Giles, F. J.; Cortes, J.; Jones, D.; Bergstrom, D.; Kantarjian, H.; Freedman, S. J. *Blood* **2007**, *109*, 500. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁹ Landau, M.; Ben-Tal, N. *Biochim. Biophys. Acta.* **2008**, *1785*, 12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁰ Tokarski, J. S.; Newitt, J. A.; Chang, C. Y.; Cheng, J.

- D.; Wittekind, M.; Kiefer, S. E.; Kish, K.; Lee, F. Y.; Borzilleri, R.; Lombardo, L. J.; Xie, D.; Zhang, Y.; Klei, H. E. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 5790. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶¹ Levinson, N. M.; Kuchment, O.; Shen, K.; Young, M. A.; Koldobskiy, M.; Karplus, M.; Cole, P. A.; Kuriyan, J. *PLoS Biol.* **2006**, *4*, e144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶² Nagar, B.; Bornmann, W. G.; Pellicena, P.; Schindler, T.; Veach, D. R.; Miller, W. T.; Clarkson, B.; Kuriyan, J. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 4236. [[Link](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶³ Liu, Y.; Gray, N. S. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁴ Cowan-Jacob, S. W.; Fendrich, G.; Floersheimer, A.; Furet, P.; Liebetanz, J.; Rummel, G.; Rheinberger, P.; Centeleghe, M.; Fabbro, D.; Manley, P. W. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2007**, *63*, 80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁵ Eck, M. J.; Manley, P. W. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2009**, *21*, 288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁶ Wood, E. R.; Truesdale, A. T.; McDonald, O. B.; Yuan, D.; Hassell, A.; Dickerson, S. H.; Ellis, B.; Pennisi, C.; Horne, E.; Lackey, K.; Alligood, K. J.; Rusnak, D. W.; Gilmer, T. M.; Shewchuk, L. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 6652. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁷ Simard, J. R.; Klüter, S.; Grütter, C.; Getlik, M.; Rabiller, M.; Rode, H. B.; Rauh, D. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁸ Simard, J. R.; Getlik, M.; Grütter, C.; Pawar, V.; Wulfert, S.; Rabiller, M.; Rauh, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁹ Lietha, D.; Eck, M. J. *PLoS One* **2008**, *3*, e3800. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷⁰ Roberts, W. G.; Ung, E.; Whalen, P.; Cooper, B.; Hulford, C.; Autry, C.; Richter, D.; Emerson, E.; Lin, J.; Kath, J.; Coleman, K.; Yao, L.; Martinez-Alsina, L.; Lorenzen, M.; Berliner, M.; Luzzio, M.; Patel, N.; Schmitt, E.; LaGreca, S.; Jani, J.; Wessel, M.; Marr, E.; Griffor, M.; Vajdos, F. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 1935. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷¹ Okram, B.; Nagle, A.; Adrián, F. J.; Lee, C.; Ren, P.; Wang, X.; Sim, T.; Xie, Y.; Wang, X.; Xia, G.; Spraggon, G.; Warmuth, M.; Liu, Y.; Gray, N. S. *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 779. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷² Xie, Q. Q.; Xie, H. Z.; Ren, J. X.; Li, L. L.; Yang, S. Y. *J. Mol. Graph. Model.* **2009**, *27*, 751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷³ Cohen, M. S.; Zhang, C.; Shokat, K. M.; Taunton, J. *Science* **2005**, *308*, 1318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷⁴ Kwak, E. L.; Sordella, R.; Bell, D. W.; Godin-Heymann, N.; Okimoto, R. A.; Brannigan, B. W.; Harris, P. L.; Driscoll, D. R.; Fidias, P.; Lynch, T. J.; Rabindran, S. K.; McGinnis, J. P.; Wissner, A.; Sharma, S. V.; Isselbacher, K. J.; Settleman, J.; Haber, D. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 7665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷⁵ Rabindran, S. K.; Discafani, C. M.; Rosfjord, E. C.; Baxter, M.; Floyd, M. B.; Golas, J.; Hallett, W. A.; Johnson, B. D.; Nilakantan, R.; Overbeek, E.; Reich, M. F.; Shen, R.; Shi, X.; Tsou, H. R.; Wang, Y. F.; Wissner, A. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 3958. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷⁶ Kobayashi, S.; Ji, H.; Yuza, Y.; Meyerson, M.; Wong, K. K.; Tenen, D. G.; Halmos, B. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 7096. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷⁷ Kiss, R.; Polgár, T.; Kirabo, A.; Sayyah, J.; Figueroa, N. C.; List, A. F.; Sokol, L.; Zuckerman, K. S.; Gali, M.; Bisht, K. S.; Sayeski, P. P.; Keseru, G. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3598. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷⁸ Villaseñor, A. G.; Kondru, R.; Ho, H.; Wang, S.; Papp, E.; Shaw, D.; Barnett, J. W.; Browner, M. F.; Kuglstatter, A. *Chem. Biol. Drug Des.* **2009**, *73*, 466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷⁹ Antonysamy, S.; Hirst, G.; Park, F.; Sprengeler, P.; Stappenbeck, F.; Steensma, R.; Wilson, M.; Wong, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁸⁰ Hughes, T. V.; Emanuel, S. L.; O'Grady, H. R.; Connolly, P. J.; Rugg, C.; Fuentes-Pesquera, A. R.; Karnachi, P.; Alexander, R.; Middleton, S. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁸¹ Crespo, A.; Zhang, X.; Fernández, A. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4890. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁸² DiMauro, E. F.; Newcomb, J.; Nunes, J. J.; Bemis, J. E.; Boucher, C.; Chai, L.; Chaffee, S. C.; Deak, H. L.; Epstein, L. F.; Faust, T.; Gallant, P.; Gore, A.; Gu, Y.; Henkle, B.; Hsieh, F.; Huang, X.; Kim, J. L.; Lee, J. H.; Martin, M. W.; McGowan, D. C.; Metz, D.; Mohn, D.; Morgenstern, K. A.; Oliveira-dos-Santos, A.; Patel, V. F.; Powers, D.; Rose, P. E.; Schneider, S.; Tomlinson, S. A.; Tudor, Y. Y.; Turci, S. M.; Welcher, A. A.; Zhao, H.; Zhu, L.; Zhu, X. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1681. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁸³ Dai, Y.; Hartandi, K.; Ji, Z.; Ahmed, A. A.; Albert, D. H.; Bauch, J. L.; Bouska, J. J.; Bousquet, P. F.; Cunha, G. A.; Glaser, K. B.; Harris, C. M.; Hickman, D.; Guo, J.; Li, J.; Marcotte, P. A.; Marsh, K. C.; Moskey, M. D.; Martin, R. L.; Olson, A. M.; Osterling, D. J.; Pease, L. J.; Soni, N. B.; Stewart, K. D.; Stoll, V. S.; Tapang, P.; Reuter, D. R.; Davidsen, S. K.; Michaelides, M. R. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁸⁴ Mahboobi, S.; Dove, S.; Sellmer, A.; Winkler, M.;

Eichhorn, E.; Pongratz, H.; Ciossek, T.; Baer, T.; Maier, T.; Beckers, T. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2265.

[CrossRef] [PubMed]

⁸⁵ Schroeder, G. M.; An, Y.; Cai, Z. W.; Chen, X. T.; Clark, C.; Cornelius, L. A.; Dai, J.; Gullo-Brown, J.; Gupta, A.; Henley, B.; Hunt, J. T.; Jeyaseelan, R.; Kamath, A.; Kim, K.; Lippy, J.; Lombardo, L. J.; Manne, V.; Oppenheimer, S.; Sack, J. S.; Schmidt, R. J.; Shen, G.; Stefanski, K.; Tokarski, J. S.; Trainor, G. L.; Wautlet, B. S.; Wei, D.; Williams, D. K.; Zhang, Y.; Zhang, Y.; Fargnoli, J.; Borzilleri, R. M. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1251. [CrossRef] [PubMed]

⁸⁶ Velaparthi, U.; Wittman, M.; Liu, P.; Carboni, J. M.; Lee, F. Y.; Attar, R.; Balimane, P.; Clarke, W.; Sinz, M. W.; Hurlburt, W.; Patel, K.; Discenza, L.; Kim, S.; Gottardis, M.; Greer, A.; Li, A.; Saulnier, M.; Yang, Z.; Zimmermann, K.; Trainor, G.; Vyas, D. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5897. [CrossRef] [PubMed]

⁸⁷ Steeghs, N.; Nortier, J. W.; Gelderblom, H. *Ann. Surg. Oncol.*, **2007**, *14*, 942. [CrossRef] [PubMed]

⁸⁸ Krause, D. S.; Van Etten, R. A. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *353*, 172. [CrossRef] [PubMed]

⁸⁹ Cragg, M. S.; French, R. R.; Glennie, M. J. *Curr. Opin. Immunol.* **1999**, *11*, 541. [CrossRef] [PubMed]

⁹⁰ Köhne, C. H.; Lenz, H. J. *Oncologist.* **2009**, *14*, 478. [CrossRef] [PubMed]

⁹¹ Tamm, I.; Wagner, M.; Hartmann, G. *Mol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 221. [CrossRef] [PubMed]

⁹² Miyake, H.; Fujisawa, M. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2008**, *8*, 1851. [CrossRef] [PubMed]