

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

ELAINE FIGARO ROSINO

Fármacos antitumorais inibidores de quinases:
uma visão da Química Medicinal

Ribeirão Preto
2022

ELAINE FIGARO ROSINO

Fármacos antitumorais inibidores de quinases:
uma visão da Química Medicinal

Versão Original

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto para
obtenção do título de Bacharel em
Farmácia Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Carvalho

Ribeirão Preto
2022

Trabalho aprovado pela Comissão de Graduação da FCFRP/USP
Autorizo a reprodução e a divulgação deste trabalho, contanto que citada a fonte.

Catálogo na publicação
Biblioteca
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

ROSINO, Elaine Figaro. **Fármacos antitumorais inibidores de quinases:** uma visão da Química Medicinal. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia Bioquímica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a).	_____
Instituição:	_____
Julgamento:	_____

Prof(a). Dr(a).	_____
Instituição:	_____
Julgamento:	_____

Prof(a). Dr(a).	_____
Instituição:	_____
Julgamento:	_____

AGRADECIMENTOS

A todos os professores que conheci desde a minha infância, pois sem dúvida eles formaram o alicerce do meu conhecimento.

À Universidade de São Paulo pelo apoio à permanência estudantil.

Aos docentes e técnicos de laboratório da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto que contribuíram com o meu aprendizado durante a graduação.

Em especial à professora Ivone, minha orientadora, pela paciência e compreensão nos momentos em que estive ausente; por acreditar na minha capacidade em realizar este trabalho; e, acima de tudo, pelo dom de ensinar.

Dedico este trabalho à minha querida mãe, Luzia Gracinda Figaro, por mostrar a importância de estudar e correr atrás dos meus sonhos.

RESUMO

ROSINO, Elaine Figaro. **Fármacos antitumorais inibidores de quinases:** uma visão da Química Medicinal. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Farmácia e Bioquímica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

O câncer é uma doença caracterizada por falhas nos mecanismos de reparo a danos celulares que contribuem para a indiferenciação celular. Os inibidores de proteínas quinases compõem uma classe terapêutica importante no combate ao câncer. As proteínas quinases são enzimas responsáveis pela fosforilação de substratos envolvidos nas vias de sinalização celular. As vias Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK), PI3K/PKB (Akt)/mTOR, PLC/IP3/DAG/PKC e JAK/STAT estão envolvidas no crescimento e na proliferação celular. A ativação dessas vias depende da ativação de receptores acoplados a tirosina quinases. A desregulação desse processo pode conduzir à proliferação celular e ao câncer. Os fármacos antitumorais que inibem tirosina quinases e quinases relacionadas ao processo *downstream* são objeto de estudo deste trabalho, o qual aborda fármacos consagrados na literatura e em uso clínico. Várias quinases carecem de inibidores. PI3K e JAK são quinases que apresentam ao menos um fármaco antitumoral aprovado para uso clínico, enquanto ERK não possui inibidor para uso clínico. Dentre os receptores de tirosina quinase, o receptor do fator de crescimento epidermal humano (EGFR) se destaca por apresentar vários inibidores de tirosina quinase, assim como a proteína tirosina quinase citoplasmática Abl-Bcr. É válido ressaltar que nenhum fármaco é eficaz como monoterapia.

Palavras-chave: Receptores tirosina quinases. Inibidores de tirosina quinase. Drug design. Câncer.

ABSTRACT

ROSINO, Elaine Figaro. **Kinase-inhibiting antitumor drugs: a view of Medicinal Chemistry**. 2022. Course Conclusion Paper (Bachelor Degree in Pharmacy and Biochemistry) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Cancer is a disease characterized by failures in cellular damage repair mechanisms that contribute to cellular undifferentiation. Protein kinase inhibitors make up an important therapeutic class in the fight against cancer. Protein kinases are enzymes responsible for phosphorylating substrates involved in cell signaling pathways. The Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK), PI3K/PKB (Akt)/mTOR, PLC/IP3/DAG/PKC and JAK/STAT pathways are involved in cell growth and proliferation. Activation of these pathways depends on the activation of receptor-coupled tyrosine kinases. Deregulation of this process can lead to cell proliferation and cancer. The antitumor drugs that inhibit tyrosine kinases and kinases related to the downstream process are the object of the study of this paper, which discuss the drugs established in the literature and in clinical use. Several kinases lack inhibitors. PI3K and JAK are kinases that have at least one antitumor drug approved for clinical use, whereas ERK has no inhibitor for clinical use. Among the tyrosine kinase receptors, the human epidermal growth factor receptor (EGFR) stands out for having several tyrosine kinase inhibitors, as well as the cytoplasmic protein tyrosine kinase Abl-Bcr. It is worth noting that no drug is effective as a monotherapy.

Keywords: Receptor tyrosine kinase. Tyrosine kinase inhibitors. Drug design. Cancer.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 TIROSINA QUINASES: COMBINAÇÃO DE RECEPTOR E ENZIMAS	12
2.1 Processos de sinalização	13
2.2 Vias de sinalização	15
2.2.1 Ras / Raf / MEK / ERK (MAPK)	17
2.2.2 PI3K / PKB (Akt) / mTOR	17
2.2.3 PLC, IP3 / DAG / PKC	18
2.2.4 JAK / STAT	19
3 INIBIDORES DE QUINASES	20
3.1 Inibidores de EGFR (HER1)	23
3.1.1 Gefitinibe (Iressa®, AstraZeneca)	23
3.1.2 Erlotinibe (Tarceva®, Roche)	24
3.2 Inibidores de EGFR (HER1) e HER2	25
3.2.1 Lapatinibe (Tykerb®, Glaxosmithkline)	25
3.2.2 Afatinibe (Giotrif®, Boehringer Ingelheim)	26
3.2.3 Rociletinibe (não aprovado)	26
3.2.4 Osimertinibe (Tagrisso®, AZMED)	27
3.3 Inibidor de HER1/2, VEGFR e RET	27
3.3.1 Vandetanibe (ZD6474) (Caprelsa®, AstraZeneca)	27
3.4 Inibidores de Abl-Bcr, Kit e PDGFR	28
3.4.1 Imatinibe (Gleevec®, Novartis)	28
3.4.2 Nilotinibe (Tasigna®, Novartis)	30
3.5 Inibidores de Abl-Bcr e Src	30
3.5.1 Dasatinibe (BMS-354825) (Sprycel®, Bristol)	30
3.5.2 Bosutinibe (Bosulif®, Wyeth Pharmaceutical)	32
3.5.3 Ponatinibe (Iclusig®, ARIAD Pharmaceuticals)	32
3.6 Inibidores de múltiplas TK	32
3.6.1 Sorafenibe (Nexavar®, Bayer)	33
3.6.2 Regorafenibe (Stivarga®, Bayer)	34
3.7 Inibidores de Raf	34
3.7.1 Vemurafenibe (Zelboraf®, Genentech)	35
3.7.2 Dabrafenibe (Tafinlar & Rafinlar, Novartis)	35

3.8 Inibidores de MEK.....	35
3.8.1 Cobimetinibe (Cotellic®, Genentech).....	36
3.9 Inibidores de mTOR.....	36
3.9.1 Rapamicina (Rapamune®, Wyeth Pharmaceuticals).....	37
3.10 Inibidores de PI3K.....	37
3.10.1 Idelalisibe (Zydelig®, Gilead Sciences).....	37
3.10.2 Ibrutinibe (Imbruvica®, Pharmacyclics).....	38
3.11 Inibidor de ALK.....	38
3.11.1 Crizotinibe (Xalkori®, Pfizer).....	38
3.12 Inibidor de JAK.....	39
3.12.1 Ruxolitinibe (Jakavi®, Novartis).....	39
4 CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

Câncer é caracterizado por proliferação descontrolada de células, levando a perda de diferenciação e a imortalização celular. Quanto menos diferenciado um tecido, pior o prognóstico para o paciente. Proto-oncogenes são genes responsáveis por codificar proteínas que atuam na regulação do ciclo celular e na diferenciação. Mutações podem conduzir um proto-oncogene a tornar-se um oncogene que codifica proteínas constitutivamente ativas. Falhas em mecanismos de reparo a danos e inativação de genes supressores de tumor contribuem para a imortalidade das células. A incorporação de material genético viral no organismo hospedeiro também pode levar à formação de oncogenes (KUMAR *et al.*, 2016, p.269-347; PATRICK, 2013, p. 514-515). Um breve histórico pode ajudar na compreensão do assunto.

Cientistas descobriram que o vírus causador de sarcoma em fibroblastos de aves (ASV do inglês avian sarcoma virus) compartilha sequências de pares de bases nitrogenadas com células saudáveis e que a sequência responsável por codificar a transformação oncogênica não é compartilhada. O estudo levantou a hipótese de que, ao longo da evolução, um genoma viral incorporado ao material genético de uma espécie aviária ancestral poderia sofrer mutações favoráveis à atividade tumoral (VOGT *et al.*, 1976). O avanço na área de genética molecular e de biologia celular e molecular, nas últimas décadas, foi crucial para fundamentar essa teoria.

Pesquisadores identificaram que o vírus do sarcoma de Rous (RSV) possui um gene src responsável pela formação de tumores em células de pássaros *in vitro* e que o gene sarc apresenta homologia variável na sequência de nucleotídeos e está presente em células saudáveis de todos os vertebrados. Descobriram que ambos os genes codificam uma proteína quinase responsável por fosforilar resíduos de tirosina. As células que continham o gene src apresentavam maior quantidade de tirosinas fosforiladas, favorecendo a atividade oncogênica (HUNTER; SEFTON, 1980). Na década de 1980 apenas quinases capazes de fosforilar resíduos de serina e treonina eram conhecidas e histidinas quinases também não eram descritas.

Constatou-se que uma linhagem de células tumorais humanas (A431), que continha a proteína oncogênica src e maior expressão de proteínas receptoras para fator de crescimento epidermal (EGFR), apresentava atividade de proteína tirosina quinase (TK) mais exacerbada, após aplicação do fator de crescimento epidermal (EGF) *in vitro*. Observou-se a fosforilação de resíduos de tirosina intrínsecos ao

receptor de EGF (HUNTER; COOPER, 1981). Uma das hipóteses corretamente levantada neste estudo foi a possibilidade de existir cadeias de proteínas tirosina quinases capazes de fosforilar sequencialmente diversos substratos. Os avanços no campo da bioquímica contribuíram para entender os mecanismos de fosforilação.

As quinases constituem importantes proteínas responsáveis por fosforilar substratos envolvidos na regulação do ciclo celular. A fosforilação deve ser capaz de ativar ou inibir a transdução de sinal das vias de sinalização celular de modo eficiente para suprir as necessidades das células. A fosforilação em excesso e as mutações ao acaso favorecem a carcinogênese. A ineficiência de mecanismos apoptóticos propaga o dano às células filhas que também podem sofrer mutações. Os inibidores de tirosina quinases (TKI) compõem importante classe terapêutica no combate à proliferação e sobrevivência de células tumorais.

Os inibidores em uso clínico são utilizados para tratar tumores sólidos e hematológicos, como câncer de pulmão de células não pequenas; pulmão refratário; pâncreas; mama avançado ou metastático positivo para EGFR2; células do estroma gastrointestinal; melanoma; leucemia mielocítica crônica; leucemia linfocítica aguda; policitemia vera; linfoma anaplásico; entre outros. Há TKI que possuem a vantagem de atravessar a barreira hematoencefálica, uma vez que anticorpos monoclonais não têm essa propriedade (WELLSTEIN *et al.*, 2019, cap. 67; PATRICK, 2013, cap. 21).

Receptores TK constitutivamente ativos ou que não possuem domínio de ligação ao ligante, não respondem ao tratamento com anticorpos monoclonais; nestes casos, os TKI são a única opção. A resistência a fármacos inibidores de quinases pode acarretar na ativação de vias de sinalização alternativas em que os TKI atuam de modo satisfatório (WELLSTEIN *et al.*, 2019, p.1489). Por outro lado, mutações nos receptores de TK podem impedir a ligação de TKI no sítio alvo (WELLSTEIN *et al.*, p.1484). Apesar disso, TKI apresentam seletividade e especificidade variáveis; por exemplo, ocorrência de resistência a um alvo, eles ainda podem servir para atuar em outros alvos (WELLSTEIN *et al.*, 2019, p.1495).

O objetivo deste trabalho é analisar os fármacos antitumorais inibidores de quinases que atuam em vias de sinalização relacionadas aos receptores tirosina quinases. O conhecimento da relação entre estrutura e atividade, bem como o planejamento e o mecanismo molecular de atuação de tais inibidores será importante para identificar potenciais alvos moleculares e estimular os pesquisadores a desenvolver fármacos mais eficazes e menos tóxicos.

2 TIROSINA QUINASES: COMBINAÇÃO DE RECEPTOR E ENZIMA

Existem receptores de superfície celular e receptores intracelulares. Os primeiros são subdivididos em receptores acoplados a proteínas G (GPCR), receptores serina-treonina quinases e receptores tirosina quinases. O segundo tipo de receptores compõem os receptores nucleares.

Os receptores tirosina quinases da superfície celular atuam diretamente no crescimento, na diferenciação e na proliferação celular; enquanto os receptores serina-treonina quinases são responsáveis por inibir a proliferação celular. Os GPCR modulam a abertura de canais iônicos, a síntese e a clivagem de glicogênio, controlam a proliferação e a sobrevivência celular, atuam na clivagem de lipídeos, medeiam processos de dor e inflamação, entre outras respostas.

Os receptores nucleares são ativados por hormônios lipossolúveis e controlam fatores de transcrição que podem estar associados à proliferação tumoral, mas não serão objeto de estudo deste trabalho. Receptores serina-treonina quinases e GPCR também não serão objeto de estudo.

Receptores de superfície celular transmitem um sinal do meio extracelular para o meio intracelular, após interação com os correspondentes ligantes. O sinal pode ser proveniente da interação de um ligante proteico, como um hormônio ou um fator de crescimento, o qual se liga ao domínio de ligação do receptor. Esses receptores basicamente apresentam uma porção *N*-terminal extracelular, uma região transmembrana, e uma porção *C*-terminal intracelular.

Os receptores acoplados a enzimas tirosina quinases são proteínas que atravessam a membrana uma única vez e se dividem em 2 tipos: receptores tirosina quinases (TKR), cujo domínio tirosina quinase é intrínseco e, por isso, apresentam função dupla de receptor e enzima; e receptores associados a tirosina quinases (NRTK, do inglês nonreceptor tyrosine kinases), os quais não apresentam domínio tirosina quinase, porém, associam-se de forma não covalente a proteínas tirosina quinases livres no citoplasma e, portanto, essas proteínas são tirosina quinases não-receptores com atividade apenas enzimática (ALBERTS *et al.*, 2017, p. 850 e 862).

Os ligantes de receptores de TK são a insulina e os fatores de crescimento, entre eles destacam-se: fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento neuronal (NGF).

As citocinas são exemplos de ligantes de receptores associados a tirosina quinases não-receptores (NRTK), entre as quais destacam-se: interleucinas (IL), hormônio de crescimento (GH), fator de necrose tumoral (TNF), fator estimulante de colônias (CSF), eritropoietina (EPO), interferon (INF), prolactina, entre outros.

2.1 Processos de sinalização

Entre os receptores de tirosina quinase (TKR), a ligação do ligante promove modificação conformacional dos receptores, permitindo a aproximação e a ativação dos domínios TK intracelular pela fosforilação de resíduos de tirosina na alça de ativação que recobre o sítio ativo. A mudança de formato destes domínios expõe uma cavidade catalítica que permite a entrada do substrato a ser fosforilado e, uma cavidade próxima, conhecida como região de cofator, onde o ATP se posiciona para transferir seu último resíduo de fosfato (γ -fosfato) do grupo trifosfato para um grupo hidroxila do substrato. A possibilidade de acesso à cavidade catalítica refere-se a conformação ativa da enzima. Em muitos casos, o substrato a ser fosforilado pode ser a própria porção intracelular da TK.

Na conformação inativa (DFG-out), a alça de ativação que ocupa a região de ligação ao ATP expõe uma região hidrofóbica II, próxima à região hidrofóbica I. A alça de ativação apresenta três aminoácidos conservados em todas as quinases (Asp, Phe e Gly). Na conformação ativa (DFG-in), o ácido aspártico e fenilalanina são orientados em direção ao sítio de ligação ao ATP (PATRICK, 2017, p. 578). Na conformação ativa, a alça de ativação adota uma configuração estendida que permite a interação com o substrato, mas impede a exposição da região hidrofóbica II.

A fosforilação sequencial de outros resíduos de tirosina na porção C-terminal, não relacionada ao domínio TK, servem de sítios de ancoragem para proteínas das vias de sinalização (ALBERTS *et al.*, 2017, p. 850).

O receptor de insulina é formado por um dímero e cada domínio TK apresenta uma alça de ativação que recobre o sítio de ligação ao ATP no estado inativo. A mudança conformacional induzida pelo ligante permite a fosforilação cruzada de resíduos de tirosina localizados na alça de ativação, levando a outra modificação conformacional que ativa o domínio TK e expõe seu sítio de ligação ao ATP. Cada domínio TK ativo é capaz de fosforilar resíduos de tirosina adicionais na cauda

citossólica fora do domínio TK do outro receptor (LODISH *et al.*, 2008, p. 680; VOET *et al.*, 2013, p. 702-703).

O receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) sofre dimerização induzida pela ligação do fator de crescimento epidermal (EGF). A aproximação dos domínios TK não fosforilados permite que apenas uma das alças de ativação seja modificada, ativando sua atividade quinase. Somente o domínio TK ativado é capaz de fosforilar resíduos adicionais de tirosina em ambas as caudas citossólicas (ALBERTS *et al.*, 2017, p. 851-852; LODISH *et al.*, 2014, p. 728).

Receptores TK para outros fatores de crescimento sofrem dimerização induzida pelo ligante e a aproximação dos domínios TK permite que fosforilem um ao outro em resíduos de tirosina localizados na alça de ativação. Uma mudança conformacional expõe o sítio de ligação do ATP ou do substrato e ativam ambos os domínios TK, que então são capazes de fosforilar resíduos de tirosina na cauda citossólica oposta (LODISH *et al.*, 2014, p. 726).

O mesmo é observado na ligação simultânea de um ligante a 2 receptores associados a tirosina quinases (NRTK), como JAK (do inglês Just Another Kinases). Essas quinases fosforilam resíduos de tirosina na alça de ativação reciprocamente. Uma mudança conformacional expõe o sítio de ligação ao ATP e ativa o domínio TK, capaz então de fosforilar resíduos de tirosina na cauda citossólica oposta à sua localização. JAK são responsáveis por fosforilar e ativar reguladores de transcrição, conhecidos como STAT (do inglês signal transducers and activators of transcription) (LODISH *et al.*, 2008, p.672-675). Existem outras famílias de proteínas citoplasmáticas com atividade tirosina quinase enzimática, além de JAK, como exemplo temos a família Src, Abl, Fak, Btk, entre outras, com funções celulares diversas.

A maioria das proteínas apresenta um domínio SH2 (do inglês Src homology 2), responsável pela ligação à fosfotirosina no sítio de ancoragem dos receptores acoplados a enzimas TK na região intracelular. O domínio SH2 apresenta homologia com um domínio da proteína Src, uma tirosina quinase codificada por um oncogene expresso em sarcoma de aves. Src foi a primeira proteína a ter esse domínio analisado e este fato explica a origem do nome SH2 (src homology two). Diferenças na sequência de aminoácidos no bolsão hidrofóbico do domínio SH2 das proteínas determinam a especificidade de ligação ao resíduo alvo de fosfotirosina (LODISH *et al.*, 2008, p. 675).

Existem outros domínios responsáveis por conectar proteínas e peptídeos que atuam nas vias de sinalização. O domínio PTB (do inglês phospho-Tyr binding), assim como SH2, é responsável pela ligação de peptídeos a resíduos de tirosinas fosforiladas. O domínio SH3 atua na conexão entre peptídeos e resíduos ricos em prolina, portanto, pode estar presente nas mesmas moléculas que contêm o domínio SH2 ou PTB. O domínio PH, homólogo à pleckstrina (proteína que serve de substrato a PKC, uma serina-treonina quinase), é responsável pela ligação de proteínas ao grupo inositol de fosfoinosítídeos (VOET *et al.*, 2013, p. 707-708).

Proteínas estruturais participam do processo de sinalização celular para direcionar a atuação de proteínas quinases. A proteína estrutural Ste5p interage com as quinases da via MAPK em leveduras e estudos apontam que na sua ausência a via de sinalização é inativa. Outras proteínas funcionam como âncoras ao promover a integração das vias de sinalização. A proteína ancoradora de quinase A, por exemplo, é responsável por ancorar as subunidades regulatórias da PKA (uma serina-treonina quinase), direcionar sua atuação para alvos específicos e colaborar com a adesão de outras proteínas que atuam nessas vias (VOET, 2013, p. 713-714).

2.2 Vias de sinalização

Os receptores acoplados a enzimas tirosina quinases (TKR e NRTK) ativam três vias clássicas: Ras/MAPK (conhecida como ERK); PI3K/PKB (conhecida como Akt)/mTOR; e PLC/IP3/DAG/PKC. A via de receptores associados a tirosina quinases (NRTK) ativam também uma via clássica conhecida como JAK/STAT (Figura 1).

As proteínas PI3K, PLC e STAT apresentam um domínio SH2 que se liga a um resíduo de fosfotirosina na cauda citosólica de seus respectivos receptores. A proteína Ras não apresenta esse domínio, porém, ela pode dar início a uma cascata de sinalização graças ao auxílio de outras proteínas em que ao menos uma delas possui um domínio SH2, como a proteína adaptadora Grb2.

O domínio SH2 de cada proteína conserva uma sequência de aminoácidos, os quais permitem a ligação aos resíduos de fosfotirosinas de diferentes receptores. Desta forma, diferentes ligantes como insulina, fator de crescimento epidermal humano, eritropoietina conseguem ativar essas mesmas vias ainda que atuem em diferentes receptores TK. O diferencial é a resposta induzida pelo ligante, que

depende do padrão genético expresso na célula em que está localizado.

Outro fato interessante é a possibilidade de que substratos de uma via de sinalização sejam capazes de ativar substratos de outras vias. É de conhecimento da comunidade científica que receptores acoplados a proteínas G podem ativar substratos que ativam vias relacionadas a TK. Assim, vias de sinalização se inter-relacionam e esse fato precisa ser mais explorado para o desenvolvimento de fármacos mais seletivos.

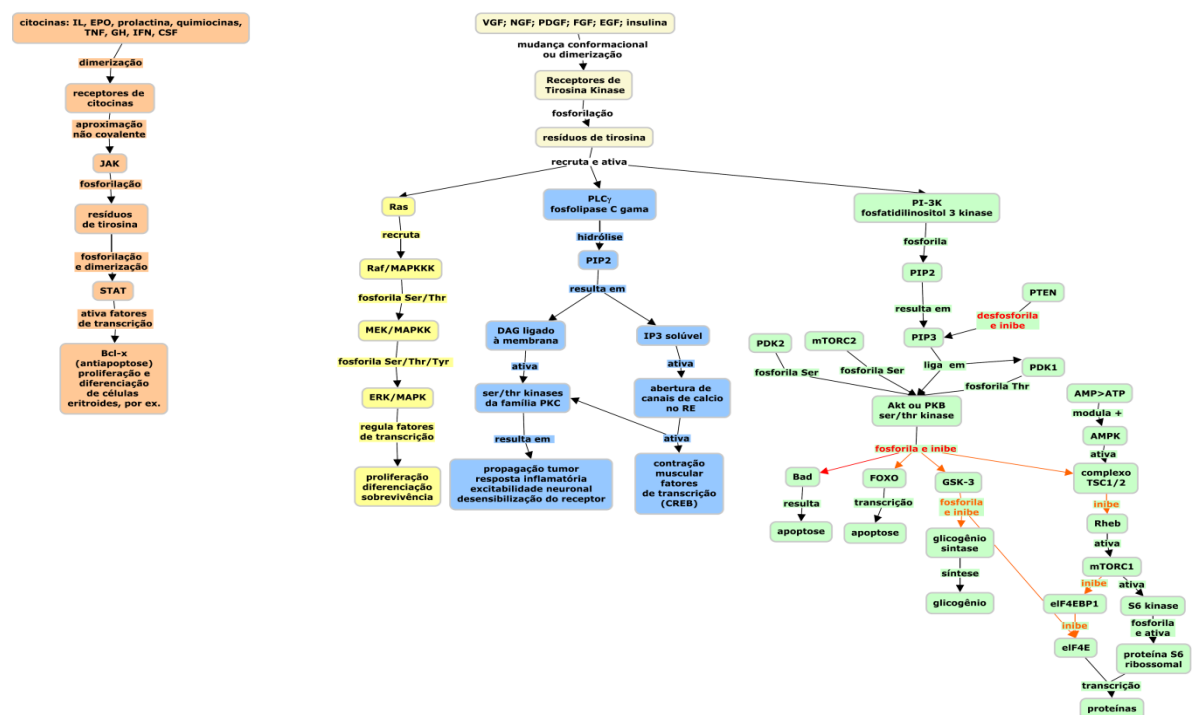


Figura 1. Mapa conceitual (cmaptools) das principais vias de sinalização envolvendo receptores e enzimas quinases. IL interleucina; EPO eritropoietina; TNF fator de necrose tumoral; GH hormônio do crescimento; IFN interferon; CSF fator de estimulação de colônia; JAK Janus kinase; STAT signal transducers and activators of transcription; VGF fator de crescimento vascular; NGF fator de crescimento neuronal; PDGF fator de crescimento derivado de plaquetas; FGF fator de crescimento de fibroblastos; EGF fator de crescimento epidermal humano; Ras rat sarcoma vírus; MAP kinases mitogen-activated protein kinases; PLCγ fosfolipase C gama; DAG 1,2 diacilglicerol; IP3 inositol 1,4,5 trifosfato; RE retículo endoplasmático; CREB proteína de ligação a CRE; CRE elemento de resposta a AMPc; PI-3K fosfatidilinositol 3 kinase; PIP2 fosfatidilinositol 4,5 bifosfato; PIP3 fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato; mTORC complexo mTOR; PKB proteína kinase B; AMPK AMP-activated kinase; ATP trifosfato de adenosina; AMP monofosfato de adenosina; eIF4EBP1 proteína de ligação a eIF4E; GSK-3 glicogênio sintase kinase.

2.2.1 Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK)

Grb2, uma proteína adaptadora, contém um domínio SH2, que se liga à fosfotirosina na cauda citosólica de receptores TK da via MAPK. Também contém 2 domínios SH3, responsáveis pela ligação a resíduos específicos de prolina na proteína Sos. Esta proteína é um GEF (fator trocador de nucleotídeo guanina) que altera a conformação estrutural do complexo inativo Ras.GDP, favorecendo a ligação de GTP, o qual está em maior concentração no meio intracelular.

O complexo ativo Ras.GTP é capaz de recrutar e ativar Raf, uma serina-treonina quinase conhecida como MAPKKK. Uma proteína ativadora de GTPase (GAP) se liga ao complexo e catalisa a reação de hidrólise de GTP a GDP.

Raf é liberada do complexo Ras.GDP e fosforila MEK, uma proteína quinase conhecida como MAPKK, capaz de fosforilar resíduos de serina, treonina e tirosina. MEK ativada fosforila um resíduo de tirosina e um de treonina em ERK, uma proteína serina-treonina quinase conhecida como MAPK (do inglês mitogen-activated protein kinases). Uma mudança conformacional expõe o sítio de ligação ao ATP. ERK ativada é capaz de fosforilar e ativar fatores de transcrição. Como exemplo, um dos fatores promove a transcrição do gene c-fos, envolvido na proliferação celular (LODISH *et al.*, 2014, p. 740-744).

2.2.2 PI3K/PKB (Akt)/mTOR

PI3K (fosfatidilinositol 3 quinase) apresenta um domínio SH2 que se liga a fosfotirosina em receptores acoplados a enzimas tirosina quinases. Seu domínio catalítico fosforila o carbono 3 do anel de fosfoinositídeos presentes na membrana. É interessante notar que fosfatidilinositol 4-fosfato (PIP) e fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) são substratos de PI3K, formando fosfatidilinositol 3,4-bifosfato e PI 3,4,5-trifosfato, respectivamente.

PKB (proteína quinase B), uma serina-treonina quinase conhecida como Akt, apresenta um domínio PH (homólogo à Plecstrina) que se liga ao fosfato do carbono 3 de ambos os fosfoinositídeos ancorados na membrana. A ativação máxima do domínio PH depende das quinases PDK1 e PDK2. PDK1 apresenta domínio PH e também se liga ao fosfato do carbono 3 de um fosfoinositídeo. PDK1 se aproxima e fosforila uma treonina na alça de ativação de PKB. PDK2, livre no citoplasma, é

capaz de fosforilar uma serina no domínio C-terminal de PKB.

A mudança conformacional permite a dissociação de PKB da membrana para fosforilar e inibir proteínas (como Bad) e fatores de transcrição (como FOXO) responsáveis pela apoptose. PKB também fosforila e inibe GSK-3, responsável por fosforilar e inibir GS (glicogênio sintase) e fatores de transcrição de proteínas. A fosfatase PTEN é capaz de remover o grupo fosfato do carbono 3 de fosfoinosítídeos como o PIP3, modulando negativamente a via de sinalização (LODISH *et al.*, 2008, p. 694-696). Portanto, a ativação permanente desta via conduz à proliferação celular e favorece a oncogênese.

O complexo mTORC2 possui uma quinase (mTor) capaz de fosforilar e ativar PKB auxiliando a atividade de PDK1. PKB fosforilada é capaz de fosforilar e inibir o complexo TSC1/TSC2, responsável por inibir Rheb. Portanto, a inibição deste complexo permite que Rheb ative o complexo mTORC1, que também apresenta a quinase mTor. Por outro lado, quando há baixo estoque de energia celular, AMP ativa a quinase AMPK, responsável por fosforilar e ativar o complexo TSC1/TSC2 e, portanto, inibir Rheb e mTor. Quando ativo, mTor fosforila e ativa fatores de transcrição. Sua inibição promove a degradação de proteínas (COOPER *et al.*, 2016, 631-635).

É interessante notar que, PKB ativada inibe GSK-3 e modula positivamente mTor, contribuindo para reforçar duplamente a transcrição de proteínas, além de promover reserva de energia para as células.

2.2.3 PLC/IP3/DAG/PKC

A isoforma γ da fosfolipase C (PLC- γ) é ativada pelos receptores acoplados a enzimas tirosina quinases. Seu domínio SH2 se liga à fosfotirosina no domínio citosólico de um receptor ativado, que fosforila resíduos de tirosina e contribui para sua atividade catalítica. PLC- γ ativada hidrolisa PIP2 (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato) a DAG (1,2-diacilglicerol) e IP3 (inositol 1,4,5-trifosfato).

A isoforma β da fosfolipase C (PLC- β) é ativada pelos receptores acoplados à proteína G heterotrimérica (GPCR) e atua como segundo mensageiro.

DAG permanece ligado à membrana e é capaz de ativar PKC, uma proteína serina-treonina quinase. A atividade de PKC é aumentada na presença de cálcio. PKC controla o crescimento e a diferenciação celular.

IP3, uma molécula solúvel, liga-se a canais de cálcio localizados no retículo endoplasmático e promove a abertura dos canais e a saída de cálcio do RE para o citoplasma celular. O aumento da concentração de cálcio favorece a atividade de proteínas quinases e fosfatases.

A associação entre cálcio e calmodulina contribui para a atividade de uma quinase responsável pela fosforilação da cadeia leve de miosina, resultando em contração muscular. Cálcio-calmodulina permite a fosforilação de fatores de transcrição, como CREB, o qual também pode ser fosforilado no mesmo sítio por PKA proveniente da ativação de GPCR (COOPER, 2016, p. 635-637).

A fosforilação de CREB permite que ele recrute um coativador e se ligue a uma sequência regulatória conhecida como CRE (elemento de resposta ao AMPc), resultando na transcrição de genes envolvidos na proliferação e diferenciação celular (COOPER, 2016, p. 617).

2.2.4 JAK/STAT

A proteína STAT apresenta um domínio SH2 que se liga a uma fosfotirosina na cauda citosólica de receptores associados a JAK. Essa tirosina quinase fosforila um resíduo específico de tirosina no domínio C-terminal de STAT, ativando-a. A proteína STAT se dissocia da fosfotirosina do receptor e se associa a uma fosfotirosina no domínio C-terminal de outra STAT através do domínio SH2, de modo que duas proteínas STAT se dimerizam e cada uma apresenta seus domínios SH2 ligado entre si, através de seus resíduos de fosfotirosina.

O dímero formado se desloca para o núcleo e se liga a uma sequência regulatória do DNA através de seu domínio de ligação ao DNA. Uma das proteínas transcritas é a Bcl-x, responsável por inibir a apoptose celular. A fosfatase SHP1 é responsável por remover fosfato da alça de ativação de JAK ao mesmo tempo que bloqueia a ligação de um domínio SH2 a uma fosfotirosina. A proteína SOCS se liga às fosfotirosinas da alça de ativação de JAK e promove sua ubiquitinação por proteossomos (LODISH *et al.*, 2008, p. 674-678).

3 INIBIDORES DE QUINASES

As quinases apresentam em comum uma região de acomodação para uma molécula de ATP, região do cofator, e outra região para ligação do substrato a ser fosforilado, ambas localizadas no seu sítio ativo. A fosforilação do substrato é fundamental para ativar a cascata de sinalização. A maioria dos inibidores de quinases usados na terapêutica tem a propriedade de se ligar à região do cofator e, por esta razão, apresentam características estruturais que mimetizam ATP.

O domínio de ligação ao ATP apresenta uma região conhecida como *hinge* ou dobradiça, porque os resíduos de aminoácidos das extremidades *N*- e *C*-terminal da unidade catalítica interagem por ligações de hidrogênio com a molécula de ATP. A amina do anel de purina do ATP (azul) interage como doador de ligação de hidrogênio com a extremidade *C*-terminal do aminoácido glutamina (Gln-767) e o nitrogênio 1 da mesma base nitrogenada interage como aceceptor de ligação de hidrogênio com a extremidade *N*-terminal do aminoácido metionina (Met-769).

Esse domínio também apresenta um bolsão de ligação à ribose (vermelho), um bolsão hidrofóbico (I), cujo acesso é regulado por um resíduo de aminoácido conhecido como *gatekeeper*, e uma região conhecida como *cleft*, mais exposta ao solvente, para acomodar a função trifosfato do ATP (preto) (LEMKE *et al.*, 2013, p. 1250, PATRICK, 2017, p. 578-580). Adicionalmente, o bolsão hidrofóbico I não é ocupado pelo cofator e pode apresentar sequências de aminoácidos diferentes entre as várias quinases, fato que permite o planejamento de inibidores seletivos. (Figura 2)

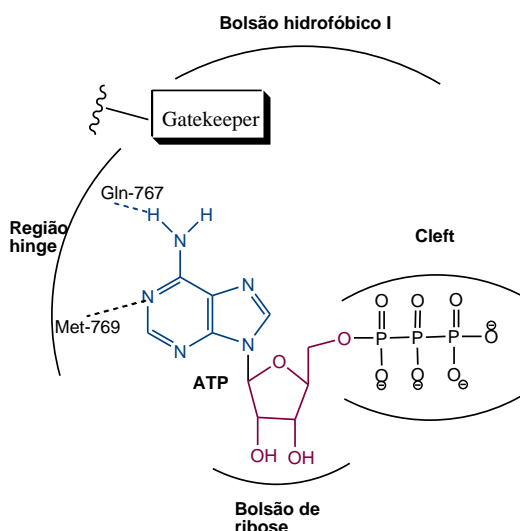


Figura 2. Interação do cofator de ATP (trifosfato de adenosina) no sítio ativo de

quinases.

A seletividade dos inibidores de quinases depende do seu volume e dos resíduos de aminoácidos presentes no bolsão hidrofóbico I, livres para interação com moléculas complementares. O resíduo de *gatekeeper*, representado por um aminoácido de treonina, pode promover um bloqueio conformacional para a acomodação da molécula ou, contrariamente, interagir e servir como ponto de ancoragem, permitindo uma mudança conformacional favorável à interação de inibidores com resíduos de aminoácidos no bolsão (PATRICK, 2017, p. 578).

As serina-treonina e tirosina quinases apresentam 30 resíduos em posições espaciais conservadas. A ilustração a seguir (Figura 3) apresenta a numeração da PKA, uma serina-treonina quinase envolvida na via de sinalização de receptores acoplados à proteína G, e exemplifica a fosforilação do grupo hidroxila (em laranja) de um substrato (linha preta em negrito) pela transferência de um grupo fosfato (γ fosfato) do ATP.

A molécula de ATP se acomoda na fenda existente entre o lóbulo N menor e o lóbulo C maior. Uma hélice α C (em amarelo) apresenta um resíduo de glutamato (Glu91) que interage com um resíduo de lisina (Lys72) localizado na fita β 3 do lóbulo N. Este resíduo interage com o grupo α e β fosfato do ATP. Uma alça presente entre as fitas β 2 e β 3 no lóbulo N é rica em resíduos de glicina e sua extremidade faz contato com os grupos β e γ fosfato do ATP, posicionando o γ fosfato para a transferência.

O segmento de ativação (linha azul) é formado pela tríade DFG, dois resíduos seguintes (juntos formam a alça de ligação ao magnésio) seguidos por uma fita β 9 e pela alça de ativação. A fita β 9 é posicionada antiparalela a uma fita β 6, a qual é seguida pela tríade HDR posicionada na alça catalítica (fita vermelha). A arginina (Arg165) da tríade HDR é responsável por moldar a configuração da alça de ativação a ser fosforilada, de tal modo que este resíduo cria um elo de ligação entre a alça catalítica, a alça de ligação ao magnésio e o local a ser fosforilado.

O aspartato (Asp184) da tríade Asp-Phe-Gly (DFG) interage com todos os grupos fosfatos do ATP através de ligação covalente ou coordenação com átomos de magnésio. A fenilalanina faz ligação hidrofóbica com o resíduo de Glu91, favorecendo a interação Lys-Glu; e com o resíduo de tirosina (Tyr164) da tríade His-Asp-Arg (HDR), facilitando a interação do resíduo de aspartato (Asp166) com a

hidroxila do substrato. Apesar de conservado nos eucariotos, o papel do resíduo de glicina é desconhecido. Um resíduo de lisina (Lys168) na alça catalítica faz interação com o grupo γ fosfato do ATP, favorecido pela interação do Asp166 da tríade HDR (KORNEV *et al.*, 2006).

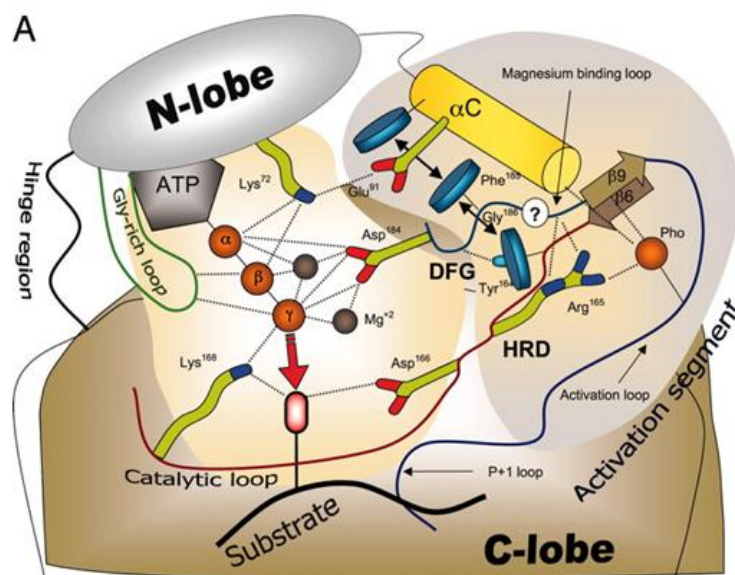


Figura 3. Representação esquemática da cavidade catalítica de proteína serina treonina quinase (“é usada a numeração PKA”), onde o substrato a ser fosforilado e o cofator que irá transferir o grupo fosfato interagem adequadamente. Copyright (2006) National Academy of Sciences, U.S.A. (KORNEV *et al.*, 2006)

A conformação inativa apresenta uma alteração conformacional que expõe um segundo bolsão hidrofóbico II localizado próximo ao bolsão hidrofóbico I. A molécula de ATP não faz ligação com esse bolsão e esse fato é explorado para o desenvolvimento de moléculas que competem pela região de ligação ao ATP ao mesmo tempo em que interagem com o bolsão hidrofóbico II, tais inibidores são tipo II. Já os inibidores do tipo I competem com o ATP no sítio catalítico, mas não tem ligação no bolsão hidrofóbico II, não exposto na forma ativa da quinase (PATRICK, 2017, p. 578).

Outros inibidores atuam em sítios alostéricos e, portanto, modulam negativamente a atividade de quinases. Inibidores do tipo III são alostéricos e se ligam apenas aos bolsões hidrofóbicos na conformação inativa da enzima. Inibidores do tipo IV atuam em regiões distantes do sítio de ligação ao ATP. Inibidores do tipo V atuam nos bolsões hidrofóbicos na conformação ativa da enzima (PATRICK, 2017,

p. 578-579).

3.1 Inibidores de EGFR (HER1)

Existem quatro receptores tirosina quinase de membrana para o EGF em humanos, denominados HER1, 2, 3 e 4. Os ligantes de HER1 são: EGF, HB-EGF (heparina ligadora de EGF) e o fator de crescimento α derivado de tumores (TGF- α). A ligação de um desses ligantes ao domínio de ligação extracelular de HER1 leva a sua homodimerização (LODISH *et al.*, 2014, p. 728).

EGFR ou HER1 é expresso em tumores sólidos de mama, pulmão, bexiga, esôfago, cavidade oral e quase todos os cânceres derivados do epitélio (LEMKE *et al.*, 2013, p. 1253).

3.1.1 Gefitinibe (Iressa®, AstraZeneca)

Gefitinibe foi o primeiro inibidor de tirosina quinase intrínseca ao receptor do fator de crescimento epidermal humano (EGFR ou HER1), lançado no mercado para tratamento de tumores sólidos, em especial para câncer de pulmão de células não pequenas localmente avançado ou metastático.

Gefitinibe possui um anel de quinazolina, o qual mimetiza o anel de purina do ATP, uma amina secundária ligada ao carbono 4 e um anel aromático substituído com um átomo de cloro na posição *meta* e flúor em *para*. Os átomos de nitrogênio fazem importantes ligações de hidrogênio com resíduos de aminoácidos presentes na região *hinge* do domínio de ligação ao ATP no sítio ativo da quinase.

Assim, o nitrogênio 1 do anel heterocíclico é um aceptor de hidrogênio do resíduo de metionina (Met-793) e o nitrogênio 3 interage com uma molécula de água que atua como aceptor de hidrogênio do resíduo de treonina (Thr-790). A amina do anel de anilina em C-4 não atua como doador de hidrogênio, mas auxilia o posicionamento do anel aromático no bolsão hidrofóbico I, o qual apresenta um resíduo de Thr como *gatekeeper* (LEMKE *et al.*, 2013, p. 1253, PATRICK, 2017, p. 580) (Figura 4).

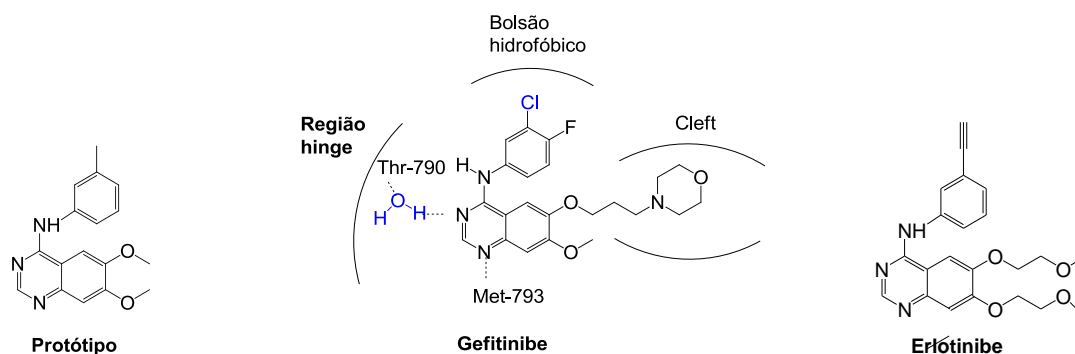


Figure 4. Imagem mostra protótipo, gefitinibe e erlotinibe.

O protótipo usado no desenvolvimento de gefitinibe também apresentava um anel de anilina, mas substituído por apenas um grupo metílico em *meta*. Tanto o grupo metila como o hidrogênio ligado ao carbono 4 do anel de anilina são passíveis de metabolização pelas enzimas do citocromo P450 (CYP450) para formação de hidroxila alcoólica e fenólica, respectivamente. A estratégia para evitar a oxidação foi a substituição da metila por átomo de cloro e a substituição do hidrogênio ligado ao carbono 4 por átomo de flúor (PATRICK, 2017, p. 580).

Adicionalmente, este protótipo possuía dois grupos metoxílicos ligados ao anel de quinazolina em C-6 e C-7. No entanto, em gefitinibe o grupo metóxi em C-6 sofreu uma modificação com a introdução de um anel de morfolina com espaçamento de 3 carbonos. Isso permitiu uma melhor acomodação da molécula na região *cleft* no domínio de ligação ao ATP e aumentou a solubilidade do fármaco em água (PATRICK, 2017, p. 580).

3.1.2 Erlotinibe (Tarceva®, Roche)

Erlotinibe é um inibidor análogo ao gefitinibe, usado para o tratamento de câncer de pulmão de células não pequenas. Apresenta um anel de quinazolina ligado através de seu carbono 4 a um anel de anilina. Um grupo acetileno substitui a metila do protótipo no anel aromático para impedir a metabolização pela CYP450, favorecendo a interação da molécula com o bolsão hidrofóbico I.

Ambos os grupos metoxílicos presentes nos carbonos 6 e 7 de quinazolina sofrem idêntica modificação com a substituição por metoxietila, auxiliando a acomodação da molécula na região *cleft* (LEMKE *et al.*, 2013, p. 1253, PATRICK,

2017, p. 580) (Figura 4).

3.2 Inibidores de EGFR (HER1) e HER2

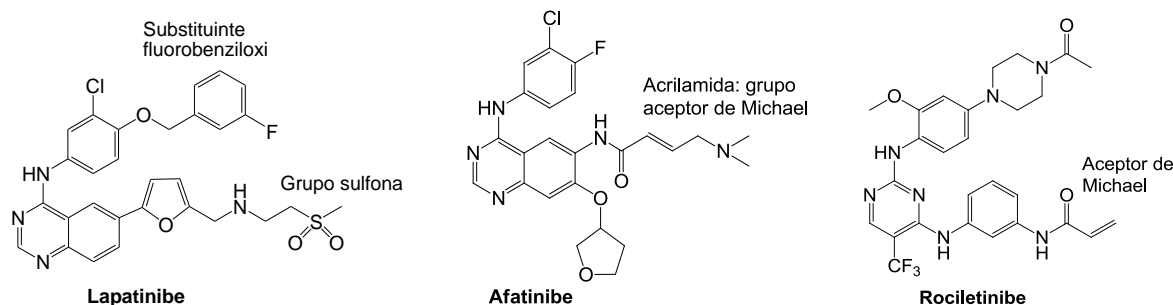
O receptor de membrana HER2 se apresenta em conformação pré ativa com uma alça saliente para fora e não se liga diretamente a um ligante, mas forma heterodímeros com HER3 e 4, os quais possuem em comum dois ligantes: neuregulinas 1 e 2 (NRG1 e 2). HB-EGF também se liga a HER4. Um aumento da expressão de HER2 na célula, sensibiliza a célula para diversos membros da família EGF (LODISH *et al.*, 2014, p. 728-729).

HER2 é superexpresso em câncer de mama, ovário, pulmão e intestino resistentes (LEMKE *et al.*, 2013, p. 1253).

3.2.1 Lapatinibe (Tykerb®, Glaxosmithkline)

Lapatinibe conserva a estrutura 4-aminoquinazolina de Gefitinibe. O anel aromático ligado à amina secundária, apesar de preservar o átomo de cloro, apresenta um substituinte fluorobenziloxi ao invés de um átomo de flúor. Esse aumenta a seletividade da molécula, uma vez que é capaz de acessar somente o bolsão hidrofóbico II de HER1 e HER2 na conformação inativa da enzima (LEMKE *et al.*, 2013, p. 1253).

Adicionalmente, o grupo metoxi do carbono 6 é substituído por um furano ligado a uma amina secundária com espaçamento de um carbono. Essa amina contém um grupo etilênico ligado na extremidade à função metil sulfona. Esta cadeia interage na região *cleft* do ATP e confere maior polaridade para a molécula de lapatinibe e, em função disso, aumenta a solubilidade do fármaco em água (LEMKE *et al.*, 2013, p. 1253; PATRICK *et al.*, 2017, p. 580) (Figura 5).



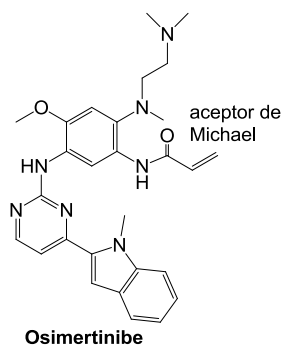


Figura 5. Lapatinibe e seus análogos, afatinibe, rociletinibe e osimertinibe

3.2.2 Afatinibe (Giotrif®, Boehringer Ingelheim)

Afatinibe é um inibidor irreversível de HER1 e HER2, que conserva a estrutura 4-anilino quinazolina dissubstituída de Gefitinibe, mas possui grupos funcionais que promovem uma ligação irreversível no receptor da quinase. O grupo metoxila da posição 7 da quinazolina é substituído por anel tetrahidrofurano, ligado em sua posição 3.

A principal modificação estrutural ocorre com a substituição do grupo metoxila na posição 6 da quinazolina por uma função carbonílica α,β -insaturada de acrilamida, como um aceptor de Michael, contendo na sua extremidade grupo metileno dimetilamino. Esse aceptor é capaz de interagir com um resíduo de metionina (nucleófilo) presente na região *gatekeeper*, mesmo após várias mutações no resíduo *gatekeeper* Thr 790 (PATRICK, 2017, p. 581). Afatinibe foi mais eficaz do que o erlotinibe como tratamento de segunda linha de pacientes com carcinoma espinocelular avançado (YANG *et al.*, 2017).

3.2.3 Rociletinibe (não aprovado)

Rociletinibe é um inibidor irreversível e seletivo de quinases que sofreram mutação do resíduo do *gatekeeper* treonina por metionina (T790M). Apresenta um anel de pirimidina ligado a uma função anilina, a qual é dissubstituída por um grupo metoxila na posição *orto* e acetilpiperazina em *para*. Ainda, o anel de pirimidina possui grupo trifluorometila em C-5 e uma amina ligada a C-4. Essa amina ligada ao anel aromático também caracteriza um grupo anilina, a qual se conecta a uma função aceptor de Michael (PATRICK, 2017, p. 582).

3.2.4 Osimertinibe (Tagrisso®, AZMED)

Osimertinibe é utilizado para tratamento de câncer de pulmão de células não pequenas. Também é um inibidor irreversível e seletivo para mutações T790M que ocorrem no *gatekeeper* de EGFR. Conserva o anel de pirimidina ligado a anilina presente no Rociletinibe (PATRICK, 2017, p. 582). No entanto, apesar de conter o grupo anilina clássica em C-2 do anel pirimidina, este anel é trissubstituído e contém grupo metoxílico em *orto*, etileno diamina na posição *para* e grupo prop-2-enamida (acceptor de Michael) na posição *meta* (C-5). O anel heterocíclico metil-indol é também observado na posição C-4 do anel de pirimidina.

3.3 Inibidor de HER1/2, VEGFR e RET

VEGF2 está envolvido na formação de novos vasos e o seu bloqueio é responsável pela inibição da angiogênese e, assim, diminuição da oxigenação e do suporte de nutrientes para a célula tumoral (LEMKE *et al.*, 2013, p. 1253).

RET é uma tirosina quinase de membrana e sua superexpressão é responsável por câncer de tireoide e de alguns casos de câncer de pulmão de células não pequenas, os quais envolvem a fusão dos genes KIF5B e RET (PATRICK, 2017, p. 590).

3.3.1 Vandetanibe (ZD6474) (Caprelsa®, AstraZeneca)

O Vandetanibe também conserva a estrutura 4-aminoquinazolina de gefitinibe. Vandetanibe é um inibidor de múltiplas quinases, como HER1, HER2, VEGFR e RET (PATRICK, 2017, p. 580). É indicado para o tratamento de carcinoma medular de tireoide localmente avançado.

Os átomos de flúor na posição *orto* e bromo na posição *para* do anel de anilina têm a função de bloquear a metabolização destas posições pela citocromo P450. O grupo metoxila na posição 6 da quinazolina é conservado e na posição 7 há adição de um grupo oximetil-*N*-metilpiperidínico (Figura 6).

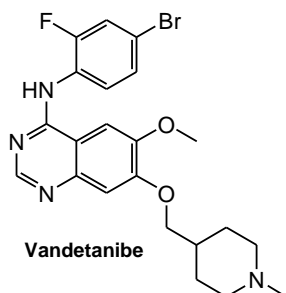


Figura 6. Vandetanibe

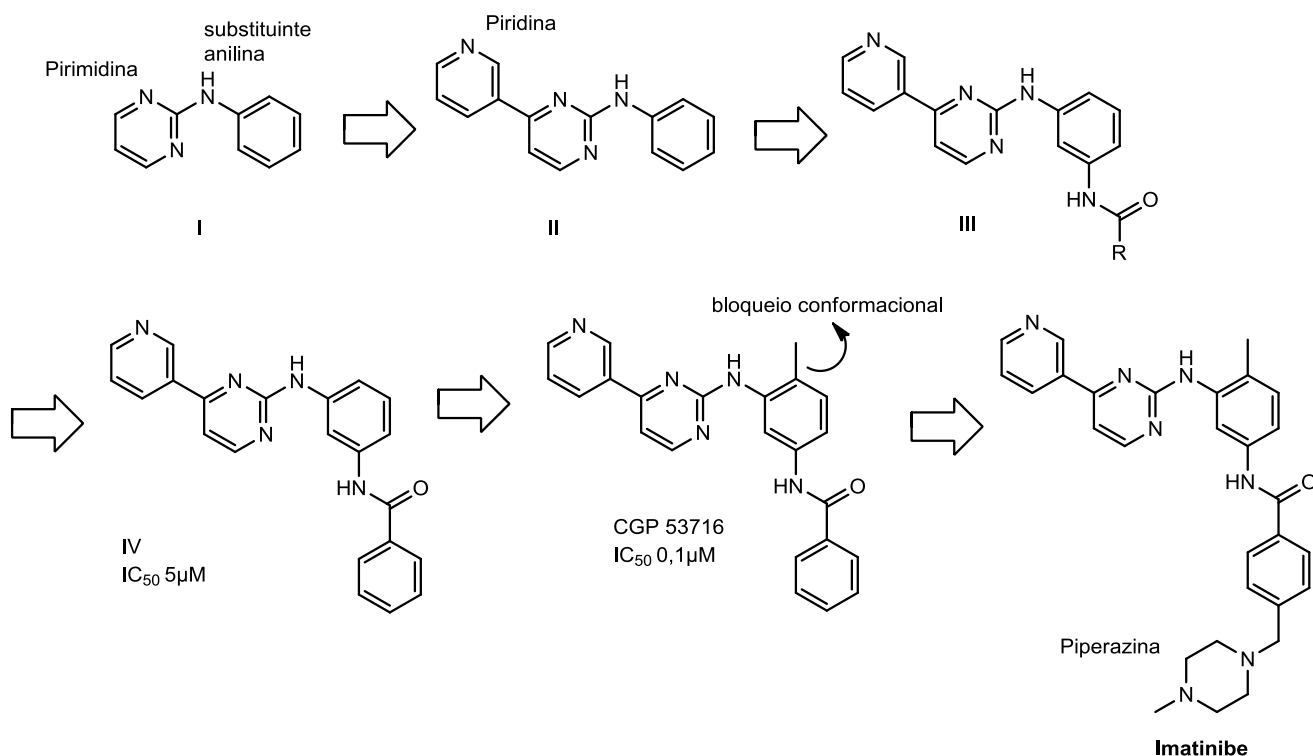
3.4 Inibidores de Abl-Bcr, Kit e PDGFR

Os receptores de tirosina quinase PDGFR (Platelet-derived growth factor receptors) e Kit estão envolvidos com tumor do estroma gastrointestinal (LEMKE *et al.*, 2013, p. 1254). Abl-Bcr é uma proteína quinase citoplasmática expressa pelo cromossomo Filadélfia, que é formado pela fusão dos genes Abl e Bcr, localizados nos cromossomos 9 e 22, respectivamente. Esse cromossomo está relacionado com mais de 90% dos casos de LMC (leucemia mielocítica crônica) em adultos (LEMKE *et al.*, 2013, p. 1252).

3.4.1 Imatinibe (Gleevec®, Novartis)

Imatinibe foi o primeiro fármaco antitumoral inibidor de tirosina quinase aprovado para uso terapêutico. O protótipo fenilaminopirimidina é um inibidor de serina-treonina quinase, como a PKC, e o grupo amina interage como doador de hidrogênio com o resíduo *gatekeeper* treonina (Thr-315). A adição de um anel piridina ao carbono 4 da pirimidina aumenta a interação do inibidor no bolsão hidrofóbico presente na região de ligação de ATP, no sítio ativo da quinase (PATRICK, 2017, p. 582) (Esquema 1).

Foi observado que o nitrogênio do anel de piridina atua como acceptor de hidrogênio de um resíduo de metionina (Met-318) na região *hinge* do sítio de ligação ao ATP da tirosina quinase presente na proteína citoplasmática Abl, ao mesmo tempo que seu anel interage com um bolsão hidrofóbico (LEMKE *et al.*, 2013, p. 1252).



Esquema 1. Desenvolvimento de imatinibe a partir do protótipo fenilaminopirimidina com atividade em PKC, uma serina-treonina quinase.

Ao introduzir um grupo amida na posição *meta* em relação ao grupo anilina e um anel aromático ligado à carbonila do grupo amida, identificou-se fraca inibição de tirosina quinases, IC₅₀ 5 μM (PATRICK, 2017, p. 582). O nitrogênio do grupo amida é doador de ligação de hidrogênio a um resíduo de ácido glutâmico (Glu-286) e o oxigênio aceita um hidrogênio de um resíduo de ácido aspártico (Asp-381). O grupo benzamida pode inibir a tirosina quinase intrínseca ao PDGFR (LEMKE *et al.*, 2013, p. 1252, PATRICK, 2017, p. 584).

A metilação na posição *orto* do grupo anilina provoca um impedimento estéreo que torna inacessível o bolsão hidrofóbico presente no sítio de ligação ao ATP em serina treonina quinases, mas facilita o acesso ao bolsão hidrofóbico na conformação inativa da região de ligação ao ATP no sítio ativo de tirosina quinase presente na proteína Abl (LEMKE *et al.*, 2013, p. 1252, PATRICK, 2017, p. 583).

Outra modificação importante foi a introdução de um anel de *N*-metilpiperazina espaçado por um carbono ligado na posição *para* em relação à benzamida. O nitrogênio metilado pode ser protonado facilmente aumentando a solubilidade do imatinibe. Além disso, ele faz ligação iônica com um resíduo de

glutamato presente em um bolsão hidrofóbico exposto na conformação inativa de tirosina quinases de Abl, Kit e PDGFR (PATRICK, 2017, p. 583) (Figura 7).

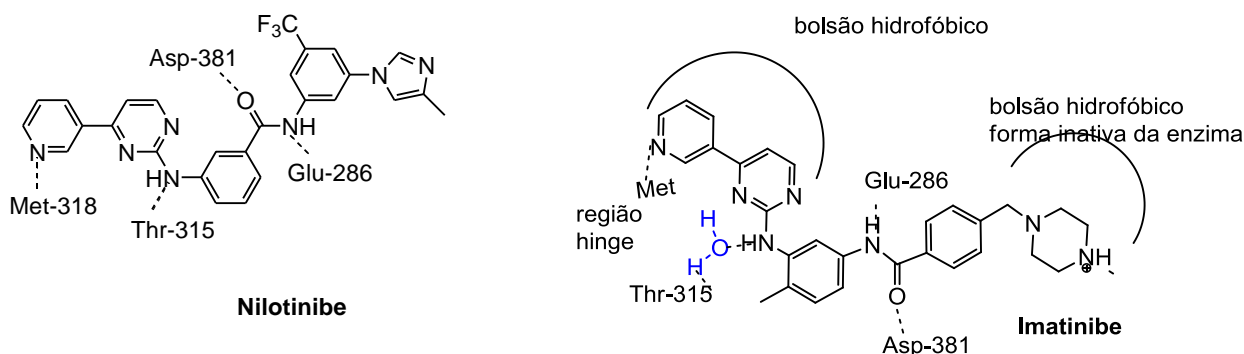


Figura 7. Nilotinibe e imatinibe

3.4.2 Nilotinibe (Tasigna®, Novartis)

Nilotinibe difere de imatinibe nos grupos ligados à função amida, onde a carbonila é ligada ao grupo anilina e o nitrogênio ao anel aromático. Apesar disso, conservam as interações com os mesmos resíduos de aminoácidos.

Um grupo metil-imidazol substitui *N*-metilpiperazina e amplia a afinidade de nilotinibe pelo bolsão hidrofóbico por interações hidrofóbicas com os aminoácidos leucina (Leu-285), valina (Val-289) e ácido glutâmico (Glu-286) da região de ligação ao ATP presente na proteína Abl e mantém a inibição de Kit e PDGFR (LEMKE *et al.*, 2013, p. 1252; PATRICK, 2017, p. 585).

Um grupo trifluorometila adicionado no anel benzênico na posição *meta* em relação ao grupo de imidazol faz interações hidrofóbicas com os resíduos de aminoácidos leucina (Leu-298), valina (Val-299) e fenilalanina (Phe-359) expostos no bolsão hidrofóbico na conformação inativa da quinase Abl (LEMKE *et al.*, 2013, p. 1252).

3.5 Inibidores de Abl-Bcr e Src

3.5.1 Dasatinibe (BMS-354825) (Sprycel®, Bristol)

Dasatinibe não se liga à região de ligação ao ATP, mas a outra região no sítio ativo de tirosina quinase Abl no estado ativo ou inativo, denominada como um sítio alostérico. Adicionalmente, também exerce inibição de Src, uma tirosina quinase

citoplasmática envolvida na proliferação celular (PATRICK, 2017, p. 585).

Uma amina secundária une um anel de tiazol e um anel de pirimidina, a qual interage com resíduo de metionina (Met-318) como doador de hidrogênio, diferentemente da amina de imatinibe que interage com o *gatekeeper* treonina (Thr-315).

O nitrogênio tiazólico também interage com o mesmo resíduo de metionina como de aceitor de hidrogênio, favorecendo a interação do grupo aminotiazol na região *hinge*. Uma amida ligada ao anel tiazolídico faz importante ligação de hidrogênio entre o nitrogênio e o resíduo de Thr-315 e a afinidade é maior quando a quinase se encontra na conformação ativa (LEMKE *et al.*, 2013, p. 1252).

A adição de um anel benzênico à amida, metilado e clorado nas posições *orto*, é responsável pela interação com os aminoácidos treonina (Thr-315), metionina (Met-290), valina (Val-299), isoleucina (Ile-313) e alanina (Ala-380) em um bolsão hidrofóbico profundo no sítio ativo da tirosina quinase em uma região não relacionada à ligação de ATP, independentemente da conformação ativa ou inativa (LEMKE *et al.*, 2013, p. 1252).

A introdução de uma hidroxietil-piperazina em C-4 do anel de aminopirimidina confere maior solubilidade à molécula e, ainda, auxilia seu posicionamento na região *hinge* (LEMKE *et al.*, 2013, p. 1253) (Figura 8).

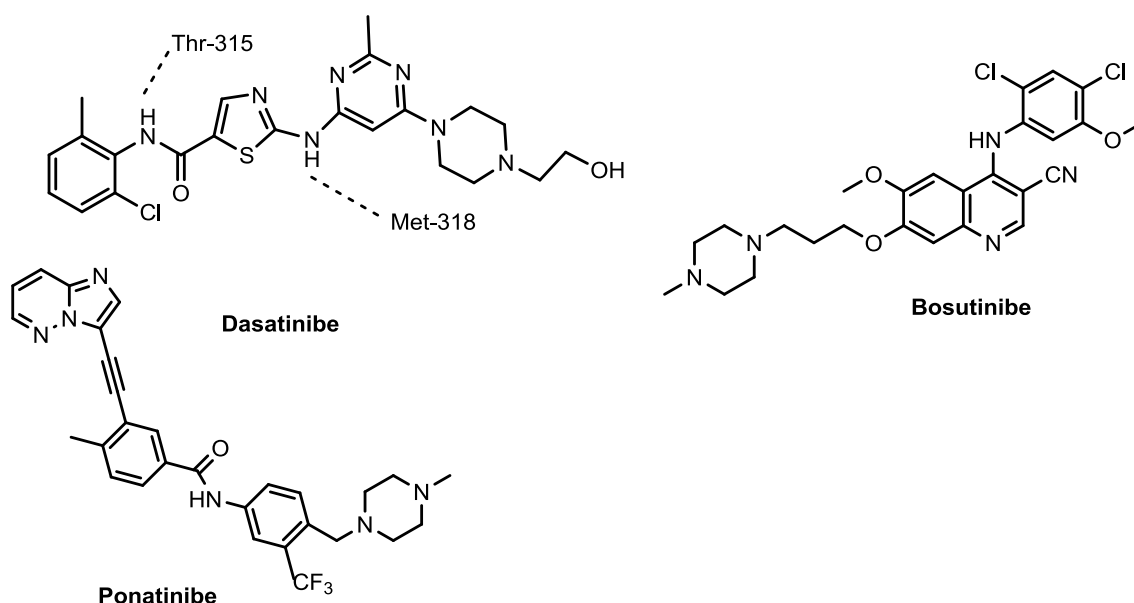


Figura 8. Dasatinibe, bosutinibe e ponatinibe

3.5.2 Bosutinibe (Bosulif®, Wyeth Pharmaceuticals)

Bosutinibe apresenta estrutura 4-anilinoquinolina-3-carbonitrila semelhante aos medicamentos erlotinibe e gefitinibe, mas com a substituição de um anel de quinazolina por quinolina. É um inibidor duplo Abl/Src de segunda geração e eficaz no tratamento de leucemia mielocítica crônica. Assim como dasatinibe e nilotinibe, bosutinibe também não é eficaz contra a forma T315I, embora seja eficaz contra várias mutações resistentes ao imatinibe. A interação entre bosutinibe e seus ligantes é desconhecida (LEVINSON; BOXER, 2012).

3.5.3 Ponatinibe (Iclusig®, ARIAD Pharmaceuticals)

Ponatinibe é inibidor de tirosina quinase Abl. Ele atua na região de ligação ao ATP presente no sítio ativo na conformação inativa. Ao contrário de outros inibidores de Abl, ponatinibe consegue acessar o bolsão hidrofóbico mesmo que haja mutação do *gatekeeper* treonina (Thr-315) para isoleucina (Ile-315) ou fenilalanina (Phe-382) devido à rigidez da molécula que apresenta uma ligação tripla (PATRICK, 2017, p. 585). A interação da nuvem eletrônica da tripla ligação com o resíduo de Thr-315 é fraca e não mais envolve ligação de hidrogênio.

A ligação tripla conecta um anel aromático metilado que interage no bolsão hidrofóbico e uma estrutura bicíclica que contém um nitrogênio capaz de interagir com a região *hinge* como acceptor de hidrogênio.

O anel aromático metilado apresenta-se ligado a outro anel aromático por uma ponte de amida e este último possui um grupo trifluorometila na posição meta. Este último grupo interage com a região hidrofóbica exposta na conformação inativa. Um anel de piperazina espaçado por um carbono interage com resíduo de ácido aspártico (Asp-400), além de outros resíduos como ácido aspártico (Asp-381), valina (Val-289), isoleucina (Ile-360) e fenilalanina (Phe-359) (PATRICK, 2017, p. 585).

3.6 Inibidores de múltiplas TK

Fármacos inibidores de diversas tirosina quinases não são seletivos e, ao mesmo tempo, não podem inibir quinases que conduzam a efeitos colaterais (PATRICK, 2017, p. 591) (Figura 9).

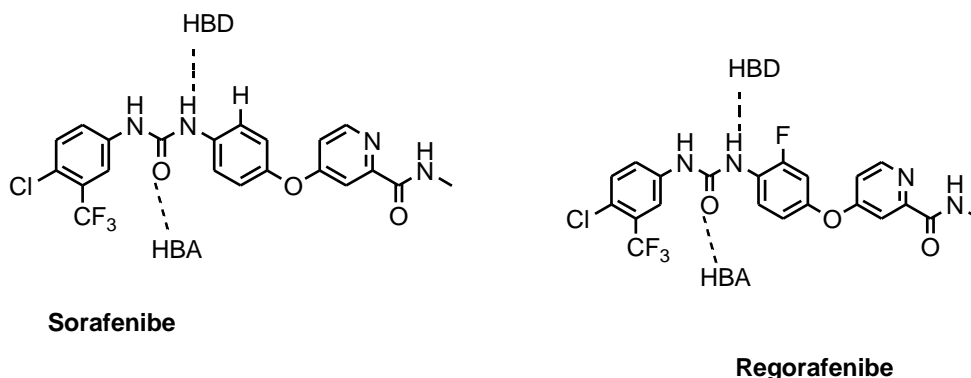


Figura 9. Sorafenibe e regorafenibe

3.6.1 Sorafenibe (Nexavar®, Bayer)

O protótipo de sorafenibe é uma molécula de ureia. A princípio o interesse era encontrar um inibidor de Raf, uma serina-treonina quinase. A adição de um anel benzeno a um dos átomos de nitrogênio e a adição de um anel de tiofeno dissustituído no outro átomo apresentou boa atividade inibitória (PATRICK, 2017, p. 592) (Esquema 2).

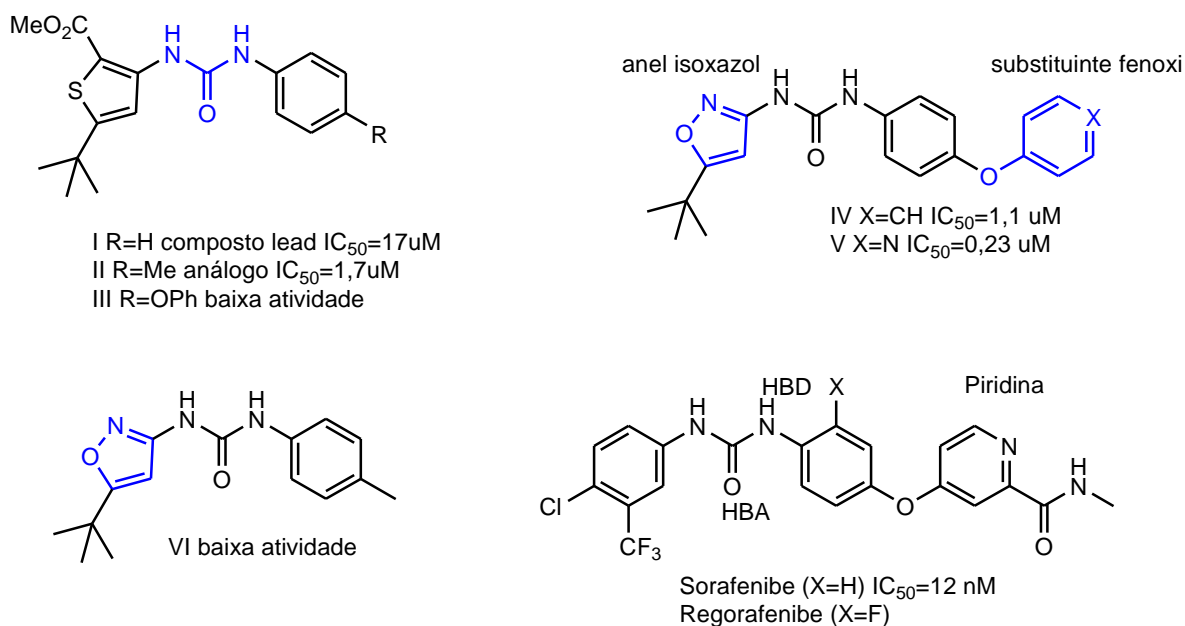
A metilação do carbono 4 do anel de benzeno ampliou sua atividade inibitória. Porém, a substituição dessa metila por um grupo fenoxi reduziu drasticamente a atividade inibitória. Por outro lado, foi observado que a manutenção do grupo metila e a substituição do anel de tiofeno por um anel de isoxazol monossustituído também conduzia a redução da atividade inibitória (PATRICK, 2017, p. 592).

A despeito dessa observação, a combinação do anel de isoxazol e do grupo fenoxi conduziu ao aumento da atividade inibitória. A substituição do grupo fenil por uma piridina aumentou ainda mais sua atividade.

A substituição de um hidrogênio na posição *orto* ao anel de piridina por uma amida metilada, além da substituição do anel de isoxazol por um anel benzênico dissustituído por um cloro na posição *para* e trifluorometila na posição *meta* conduziu ao sorafenibe, que atua na inibição de diversas tirosina quinases em conformação inativa, entre elas destaca-se VEGFR, além de Raf (PATRICK, 2017, p. 592).

O nitrogênio da amida metilada interage com um resíduo de cisteína (Cys-919) na região *hinge* através de uma ligação de hidrogênio. O grupo trifluorometila e o anel aromático parecem interagir no bolsão hidrofóbico exposto na conformação

ativa da região de ligação ao ATP (LEMKE *et al.*, 2013, p. 1254).



Esquema 2. Desenvolvimento de sorafenibe e regorafenibe

3.6.2 Regorafenibe (Stivarga®, Bayer)

Regorafenibe, uma molécula em fase de teste clínico, foi obtida pela introdução de um átomo de flúor ao anel benzênico ligado por ponte etérea ao anel de piridina. O flúor foi adicionado na posição *orto* em relação ao nitrogênio da ureia. Este derivado apresentou atividade inibitória sobre diversas tirosinas quinases (PATRICK, 2017, p. 592).

3.7 Inibidores de Raf

Raf é uma proteína serina treonina quinase envolvida na via de sinalização Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK), a qual promove proliferação e diferenciação de células, além de prevenir a apoptose. Esta via encontra-se constitutivamente ativada em mais de 30% de vários tipos de câncer e mutações em Ras representam cerca de 20% das variações observadas na via MAPK (YAEGER; CORCORAN, 2019). Apesar da importância do desenvolvimento de inibidores de Ras, a sua elevada afinidade pelo substrato GTP e ausência de bolsões de interação, conduziram os estudos para planejamento de inibidores de quinases *downstream*, como Raf, MEK e ERK (LINDSAY; BLACKHALL, 2019). Apenas inibidores seletivos das quinases

Raf e MEK estão disponíveis na terapêutica para serem usados em conjunto com inibidores BRAF com o objetivo de reduzir toxicidade e o desenvolvimento de resistência (KAROULIA *et al.*, 2017). A associação de Raf com Ras.GTP permite que ocorra a fosforilação da quinase *downstream* MEK.

3.7.1 Vemurafenibe (Zelboraf®, Genentech)

Vemurafenibe é um inibidor de Raf e atua na região de ligação ao ATP que apresenta uma mutação de um aminoácido de valina (Val-600) por um resíduo de ácido glutâmico ou lisina. Sua seletividade é garantida pela interação da sulfonamida com resíduos de ácido aspártico (Asp-594) e fenilalanina (Phe-595) expostos na conformação ativa. Essa interação permite o acesso da cadeia propílica a um bolsão hidrofóbico encontrado apenas em Raf. Um anel de pirrol-piridina atua na região *hinge* através de ligações de hidrogênio com um resíduo de cisteína (Cys-532) (PATRICK, 2017, p. 587-588). Vemurafenibe é eficaz no tratamento de melanoma (Figura 10).

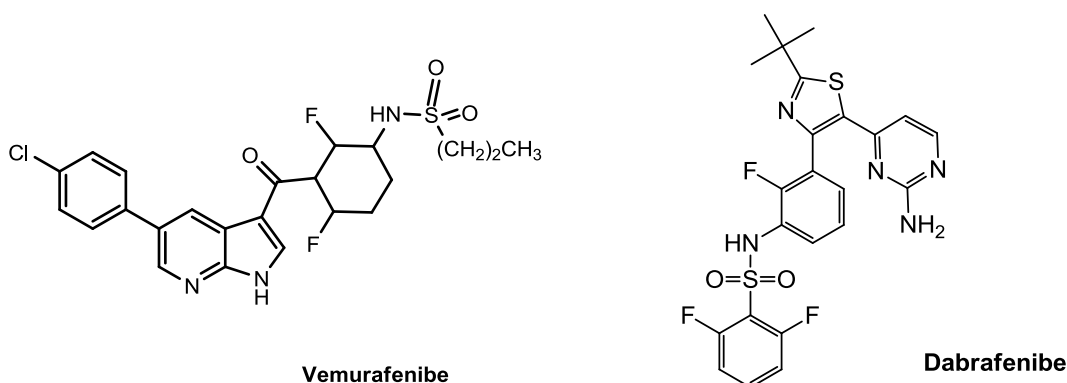


Figura 10. Vemurafenibe e dabrafenibe

3.7.2 Dabrafenibe (Tafinlar & Rafinlar, Novartis)

Dabrafenibe é um inibidor de Raf que apresenta mutações em V600E e está aprovado para o tratamento de melanoma avançado e câncer de pulmão de células não pequenas metastáticas. É utilizado em combinação com inibidores de MEK, como o trametinibe, pois o tratamento com dabrafenibe pode provocar o aparecimento de tumores secundários (SCHEIDER *et al.*, 2021) (Figura 10).

3.8 Inibidores de MEK

MEK é uma proteína quinase envolvida na via de sinalização Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK). Os inibidores de MEK (trametinibe, binimetinibe e cobimetinibe) são aprovados para uso em conjunto com inibidores de Raf para tratamento de melanoma maligno que apresenta mutação V600E em Raf. O inibidor selumetinibe foi aprovado para neurofibromatose na pediatria. Todos os inibidores atuam no complexo Raf/MEK e inibem a fosforilação dupla de MEK. Uma vez não fosforilado, MEK não será capaz de fosforilar ERK (PINO *et al.*, 2021) (Figura 11).

3.8.1 Cobimetinibe (Cotellic®, Genentech)

Cobimetinibe é um inibidor alostérico de MEK, envolvida na fosforilação de um resíduo de tirosina e um de treonina em ERK. Um resíduo de ácido aspártico (Asp-190) interage com os anéis piperidina e azetidina. Um resíduo de valina (Val-127) interage com o átomo de iodo ligado à anilina dissubstituída (PATRICK, 2017, p. 588).

A proliferação celular pode ser impulsionada por processo upstream envolvendo receptores tirosina quinases, Ras ou Raf e cobimetinibe é um inibidor mais potente quando a proliferação celular é impulsionada por Raf (PINO *et al.*, 2021).

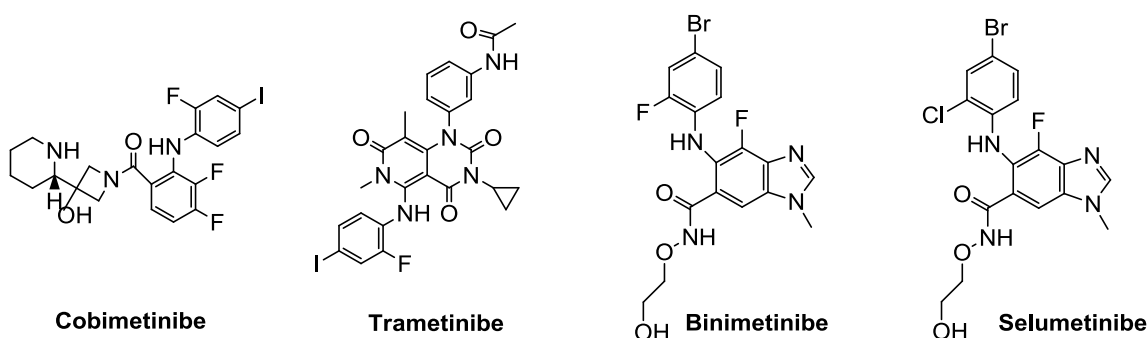


Figura 11. Cobimetinibe, trametinibe, binimetinibe e selumetinibe

3.9 Inibidores de mTOR

mTOR é uma proteína quinase envolvida na via PI3K. O inibidor Rapamicina é um antibiótico natural e everolimus e temsirolimus são inibidores análogos (Figura 12).

3.9.1 Rapamicina (Rapamune®, Wyeth Pharmaceuticals)

Rapamicina ou Sirolimus é um antibiótico da classe dos macrolídeos produzido pela bactéria *Streptomyces hygroscopicus*. Sirolimus se liga a uma proteína chamada FKBP12 ou proteína de ligação-FK506. Em seguida, outra parte do macrolídeo se liga a mTOR, culminando com a sua inibição (PATRICK, 2017, p. 595).

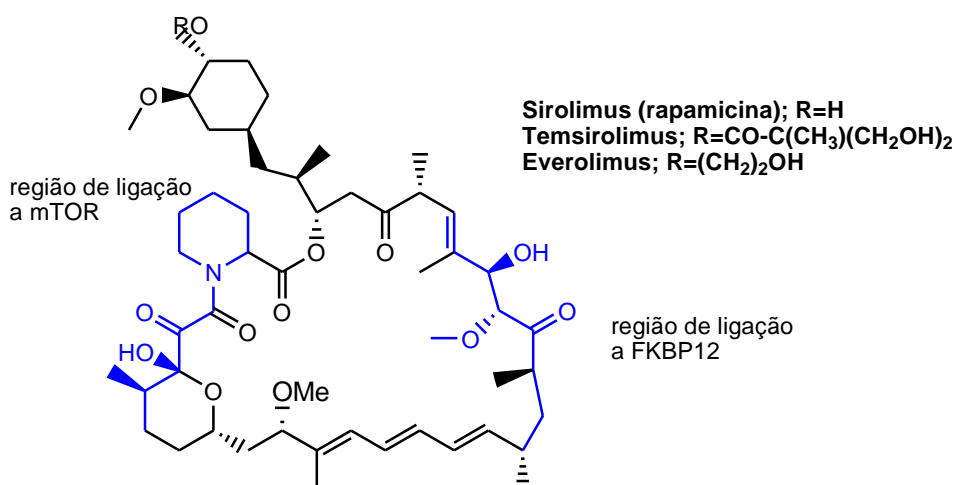


Figura 12. Rapamicina e análogos

3.10 Inibidores de PI3K

Os inibidores da via PI3K estão envolvidos no controle da atividade de PKB (Akt), mTOR e tirosina quinase de Bruton (PATRICK, 2017, p. 589) (Figura13).

3.10.1 Idelalisibe (Zydelig®, Gilead Sciences)

Idelalisibe é inibidor da isoforma P110-δ de fosfoinosítídeo 3-quinase. Esta isoforma é encontrada no baço, timo e leucócitos (PATRICK, 2017, p. 589). Idelalisibe é indicado para o tratamento de pacientes com leucemia linfocítica crônica recidivante, linfoma não Hodgkin de células B foliculares e linfoma linfocítico pequeno recidivado.

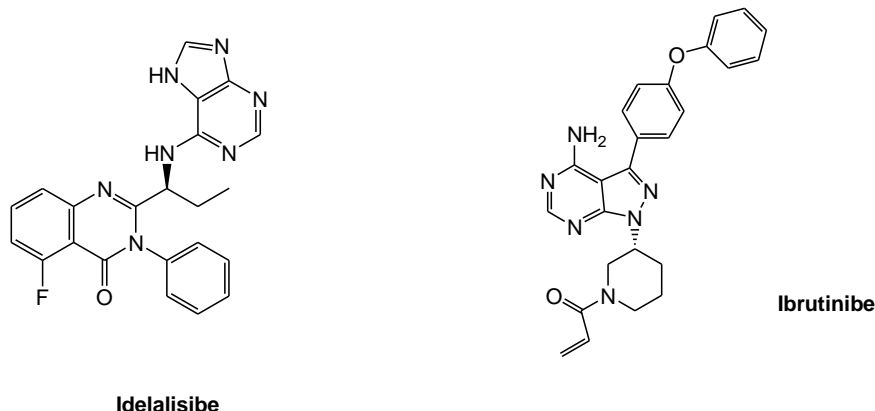


Figura 13. Idelalisibe e Ibrutinibe

3.10.2 Ibrutinibe (Imbruvica®, Pharmacyclics)

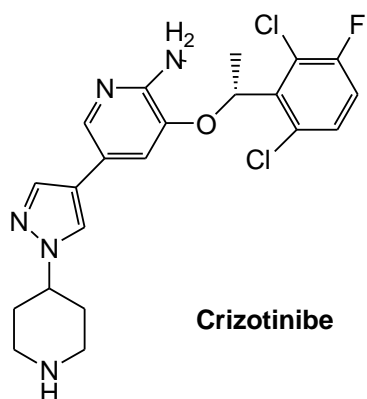
Ibrutinibe é um inibidor irreversível da tirosina quinase de Bruton, uma proteína citoplasmática responsável pela ativação e proliferação de células B. O grupo acrilamida funciona como eletrófilo ao interagir com um grupo tiol de um resíduo de cisteína (Cys-481) da quinase (PATRICK, 2017, p. 589).

3.11 Inibidor de ALK

ALK (quinase de linfoma anaplásico) é um receptor de tirosina quinase cuja superexpressão está relacionada a alguns tipos de câncer de pulmão, além de linfoma anaplásico de grandes células (PATRICK, 2017, p. 589).

3.11.1 Crizotinibe (Xalkori®, Pfizer)

Crizotinibe é um inibidor de ALK, usado no tratamento de tumores sólidos (PATRICK, 2017, p. 589). Possui um sistema pirazol-piridina central contendo grupos substituintes, como piperidina e 2-amino-3-oximetil(metil)-diclorofluorfenila, respectivamente (Figura 14).



Crizotinibe

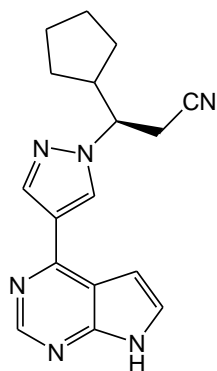
Figura 14. Crizotinibe

3.12 Inibidor de JAK

JAK são proteínas citoplasmáticas da família Janus quinase que estão envolvidas nas vias de sinalização de citocinas (VOET *et al.*, 2013, p.718).

3.12.1 Ruxolitinibe (Jakavi®, Novartis)

Ruxolitinibe é inibidor da tirosina quinase citoplasmática Janus kinase. Apresenta um anel pirrol pirimidina que interage na região *hinge* de ligação do ATP através de ligações de hidrogênio (PATRICK, 2017, p. 590) (Figura 15).



Ruxolitinibe

Figura 15. Ruxolitinibe

4 CONCLUSÃO

Dentre os receptores de tirosina quinase, o EGFR apresenta o maior número de inibidores. Entre as quinases citoplasmáticas, destaca-se Abl em número de inibidores. Alguns inibidores apresentam múltiplos alvos, apesar disso, nenhum fármaco é utilizado como monoterapia. Os inibidores de MEK, por exemplo, são utilizados em associação com inibidores de Raf. A via PI3K/mTOR apresenta apenas um inibidor para PI3K e três antibióticos para mTOR, ao passo que a via JAK/STAT apresenta apenas um fármaco. A maioria das proteínas quinases apresentam mutações e carecem de inibidores eficazes, de modo que há a necessidade de desenvolver novos candidatos a fármacos mais eficazes e menos tóxicos.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, Bruce; JOHNSON, Alexander; LEWIS, Julian; MORGAN, David; RAFF, Martin; ROBERTS, Keith; WALTER, Peter; WILSON, John; HUNT, Tim. Sinalização celular. In: _____. **Biologia molecular da célula**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed LTDA, 2017. p. 832; 850-852; 862; 865-866. ISBN: 9788582714225

COOPER, Geoffrey M.; HAUSMAN, Robert E. Cell signaling. In: _____. **The Cell: a Molecular Approach**. 7th ed. Sunderland: Sinauer, 2016. p. 617; 631-637. ISBN: 9781605352909

HUNTER, Tony; COOPER, Jonathan A. Similarities and Differences between the Effects of Epidermal Growth Factor and Rous Sarcoma Virus. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 91, n. 3, p. 878-883, dec. 1981. DOI [10.1083/jcb.91.3.878](https://doi.org/10.1083/jcb.91.3.878). Disponível em: <https://rupress.org/jcb/article-pdf/91/3/878/1075473/878.pdf>. Acesso em: 02 ago. 2021.

HUNTER, Tony; SEFTON, Bartholomew M. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington DC, v. 77, n. 3, p. 1311-1315, 01 mar. 1980. DOI [10.1073/pnas.77.3.1311](https://doi.org/10.1073/pnas.77.3.1311). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC348484/pdf/pnas00666-0088.pdf>. Acesso em: 01 ago. 2021.

KAROULIA, Zoi; GAVATHIOTIS, Evi; POULIKAKOS, Poulikos I. New perspectives for targeting RAF kinase in human cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, p. 676-691, 06 out. 2017. DOI <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.79>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrc.2017.79#Abs3>. Acesso em: 25 jun. 2022.

KORNEV, Alexandr P.; HASTE, Nina M.; TAYLOR, Susan S.; EYCK, Lynn F. Ten. Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington DC, v. 103, n. 47, p. 17783-17788, 21 nov. 2006. DOI <https://doi.org/10.1073/pnas.0607656103>. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0607656103>. Acesso em: 18 jun 2022.

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul; ASTER, Jon. Neoplasia. In: _____. **Robbins & Cotran, patologia: bases patológicas das doenças**. 9.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. p. 303. ISBN: 978-85-352-8163-7

LEVINSON, Nicholas M.; BOXER, Steven G. Structural and spectroscopic analysis of the kinase inhibitor Bosutinib and an isomer of Bosutinib binding to the Abl tyrosine kinase domain. **PLOS ONE** 7 (4): e29828, 06 april 2012. PDB DOI [10.2210/pdb3ue4/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb3ue4/pdb). Primary publication DOI <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029828>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0029828#pone-0029828-q001>. Acesso em: 04 jun. 2022.

LINDSAY, Colin R.; BLACKHALL, Fiona H. Direct Ras G12C inhibitors: crossing the rubicon. **British Journal of Cancer**, v. 121, p. 197-198, 26 jun. 2019. DOI <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0499-1>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41416-019-0499-1>. Acesso em: 25 jun. 2022.

LODISH, Harvey F.; BERK, Arnold; KAISER, Chris A.; KRIEGER, Monty; SCOTT, Matthew P.; BRETSCHER, Anthony; PLOEGH, Hidde; AMON, Angelika. Vias de sinalização que controlam a expressão gênica. In: _____. **Biologia Celular e Molecular**. 7.ed. Porto Alegre:

Artmed, 2014. p. 726; 728; 740-744. ISBN: 9788582710494

LODISH, Harvey F.; BERK, Arnold; KAISER, Chris A.; KRIEGER, Monty; SCOTT, Matthew P.; BRETSCHER, Anthony; PLOEGH, Hidde; MATSUDAIRA, Paul. Cell signaling I: signal transduction and short-term cellular responses. In: _____. **Molecular Cell Biology**. 6th ed. W. H. Freeman and Company, 2008. p. 635-639; 646-649. ISBN: 9781429203142

LODISH, Harvey F.; BERK, Arnold; KAISER, Chris A.; KRIEGER, Monty; SCOTT, Matthew P.; BRETSCHER, Anthony; PLOEGH, Hidde; MATSUDAIRA, Paul. Cell signaling II: signaling pathways that control gene activity. In: _____. **Molecular Cell Biology**. 6th ed. W. H. Freeman and Company, 2008. p. 668-680. ISBN: 9781429203142

PATRICK, Graham L. Anticancer agents. In: _____. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 5th ed. Oxford University Press, 2013, p. 514-515. ISBN: 978-0-19-969739-7

PATRICK, Graham L. Anticancer agents. In: _____. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 6th ed. Oxford University Press, 2017, p. 575-596. ISBN: 9780198749691

PINO, Gonzalo L. Gonzalez-Del; LI, Kunhua; PARK, Eunyong; ECK, Michael J. Allosteric MEK inhibitors act on BRAF/MEK complexes to block MEK activation. PNAS, v. 118, n. 36, 01 set. 2021. DOI [10.1073/pnas.2107207118](https://doi.org/10.1073/pnas.2107207118). Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.2107207118>. Acesso em: 05 jun. 2022.

SCHEIDER, Melanie; DELFOSSE, Vanessa; GELIN, Muriel; GRIMALDI, Marina; GRANELL, Meritxell; HERIAUD, Laurene; PONS, Jean-Luc; GONSAUD, Martin Cohen; BALAGUER, Patrick; BOURGUET, William; LABESSE, Gilles. Structure-based and knowledge-informed design of B-Raf inhibitors devoid of deleterious PXR binding. **J. Med. Chem.**, v. 65, n. 2, p. 1552-1566, 27 dec. 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01354>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.1c01354>. Acesso em: 04 jun. 2022.

VOET, Donald; VOET, Judith G. Transdução de sinal. In: _____. **Bioquímica**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013, p. 702-703. ISBN: 9788582710043

VOGT, P. K.; STEHELIN, D.; VARMUS, H. E.; BISHOP, J. M. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. **Nature**, Los Angeles, v. 260, p. 170-173, 11 mar. 1976. DOI <https://doi.org/10.1038/260170a0>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/260170a0.pdf>. Acesso em: 01 ago. 2021.

WELLSTEIN, Anton; GIACCONE, Giuseppe; ATKINS, Michael B.; SAUSVILLE, Edward A. Terapias direcionadas para vias como alvos moleculares: anticorpos monoclonais, inibidores de proteína-quinase e várias pequenas moléculas. In: BRUNTON, Laurence L.; HILAL-DANDAN, Randa; KNOLLMANN, Björn C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 13.ed. Porto Alegre: AMGH EDITORA LTDA, 2019. p. 1479-1521. ISBN: 978-85-8055-614-8

WU, Ying; PENG, Yi-Hui; SHIAO, Hui-Yi; TU, Chih-Hsiang;; LIU, Pang-Min; HSU, John Tsu-An; AMANCHA, Prashanth Kumar; WU, Jian-Sung; COUMARS, Mohane Selvaraj; CHEN, Chun-Hwa; WANG, Sing-Yi; LIN, Wen-Hsing; SUN, Hsu-Yi; CHAO, Yu-Sheng; LYU, Ping-Chiang; HSIEH, Hsing-Pang. Protein Kinase Inhibitor Design by Targeting the Asp-Phe-Gly (DFG) Motif: The Role of the DFG Motif in the Design of Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors. **J. Med. Chem.**, USA, v. 56, n. 10, p. 3889-3903, 23 apr. 2013. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm400072p>. Acesso em: 05 mai. 2022.

YAEGER, Rona; CORCORAN, Ryan B. Targeting alterations in the RAF-MEK pathway.

Cancer Discovery, v 9, n. 3, p. 329-341, 01 mar. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-1321>. Acesso em: 25 jun 2022.

YANG, Zuyao; HACKSHAW, Allan; FENG, Qi; FU, Xiaohong; ZHANG, Yuelun; MAO, Chen; TANG, Jinling. Comparison of gefitinib, erlotinib and afatinib in non-small cell lung cancer: A meta-analysis. **Int J Cancer**. v. 140, n. 12, p. 2805-2819, 27 mar. 2017. DOI: [10.1002/ijc.30691](https://doi.org/10.1002/ijc.30691). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28295308/>. Acesso em: 05 jun. 2022.