

PROTEÍNAS QUINASES: CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E INIBIDORES QUÍMICOS

Bárbara V. Silva*, Bruno A. C. Horta, Ricardo Bicca de Alencastro e Angelo C. Pinto

Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, CT, Bloco A, 21941-909 Rio de Janeiro - RJ, Brasil

Recebido em 30/4/08; aceito em 29/8/08; publicado na web em 5/2/09

KINASE PROTEIN: STRUCTURAL FEATURES AND CHEMICAL INHIBITORS. Protein kinases are one of the largest protein families and they are responsible for regulation of a great number of signal transduction pathways in cells, through the phosphorylation of serine, threonine, or tyrosine residues. Deregulation of these enzymes is associated with several diseases including cancer, diabetes and inflammation. For this reason, specific inhibition of tyrosine or serine/threonine kinases may represent an interesting therapeutic approach. The most important types of protein kinases, their structural features and chemical inhibitors are discussed in this paper. Emphasis is given to the small-molecule drugs that target the ATP-binding sites of these enzymes.

Keywords: kinase; chemical inhibitors; cell signaling.

INTRODUÇÃO

As proteínas quinases são enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas através da transferência de um grupo fosforila de ATP e, em casos excepcionais, de GTP, para treonina, serina (quinase específica para Ser/Thr) ou resíduos de tirosina (quinase específica para Tyr) (Figura 1). A fosforilação destes resíduos é responsável por estímulos extracelulares e intracelulares, que fornecem um mecanismo altamente eficiente para o controle da atividade de proteínas.

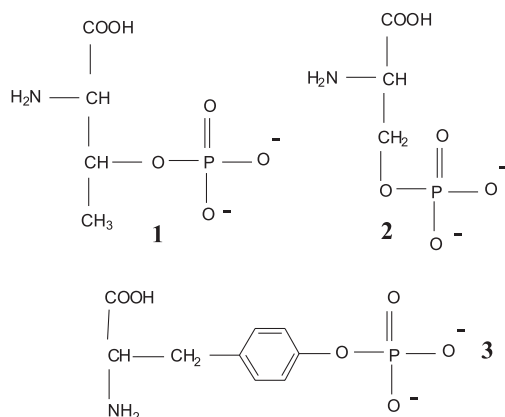


Figura 1. Fosfotreonina (1), fosfoserina (2), fosfotirosina (3)

A reação entre ATP, que contém grupos β- e γ-fosfatos, e uma hidroxila de álcool ou fenol produz quantidades muito pequenas de éster fosfato em água, porque este solvente compete como nucleófilo. Entretanto, a atividade catalítica das proteínas quinases pode favorecer cineticamente a reação. A hidrólise espontânea de monoéster fosfato, de maneira semelhante, tem cinética lenta nas condições fisiológicas normais, tornando necessária a ação de fosfatases para que a reação seja acelerada.¹ Assim, a fosforilação de proteínas é reversível e controlada por enzimas em ambas as direções.

As proteínas quinases são a maior família de proteínas em eucariotos² e são a chave central da comunicação no controle intracelular, regulação e transdução de sinais. O mecanismo regulador inclui

vários fenômenos que vão desde alterações químicas e estruturais da proteína até o controle transcricional. Por isto, um detalhado entendimento do mecanismo de controle das proteínas quinases é foco de interesse de muitas pesquisas, principalmente para a descoberta de novos fármacos.³

Muitas quinases foram descobertas no início dos anos 80 e a continuação das pesquisas mostrou que elas eram apenas a “ponta do iceberg”. Estima-se que o genoma humano apresente por volta de 2000 quinases.¹ A primeira estrutura completamente determinada de uma proteína quinase ativa foi a da proteína quinase A (PKA),⁴ também chamada de proteína quinase dependente do AMP cíclico (PKAc), cuja estrutura catalítica é muito conservada. Atualmente, cerca de 50 estruturas cristalinas do sítio catalítico dessas proteínas foram publicadas no PDB (*Protein Data Bank*) [acessado em Dezembro 2007].⁵

O objetivo do presente artigo é descrever os aspectos estruturais relevantes dos principais tipos de quinases e as patologias ligadas a sua desregulação, bem como revisar seus inibidores químicos conhecidos, com foco em moléculas de baixa massa molecular.

PROTEÍNA QUINASE A (PKA)

A proteína quinase A (EC 2.7.11.11) altera as atividades de proteínas-alvo, fosforilando grupos específicos de serina e treonina. É ativada por concentrações de AMP cíclico (AMPC) da ordem de 10 nM e, por isso, é também conhecida como proteína quinase dependente do AMP cíclico (PKAc). Esta enzima é formada por duas subunidades: uma reguladora (R), com alta afinidade pelo AMPC, e uma catalítica (C). Na ausência de AMPC, a subunidade C torna-se inativa pela formação de um complexo tetramérico R₂C₂. A ligação do AMPC à subunidade R induz mudanças conformacionais que resultam na dissociação da haloenzima inibida.⁶

A estrutura de PKA foi determinada por difração de raios-X. Na Figura 2 está o diagrama da PKA co-cristalizada com ATP e um peptídeo inibidor. A subunidade C possui dois domínios: um pequeno, que corresponde ao sítio de ligação do ATP, composto principalmente de fitas-beta, e um domínio maior composto de hélices-alfa, onde se liga o substrato. Os dois domínios são ligados por uma alça, gerando um bolso de ligação para o ATP e o substrato. Enquanto o ATP preenche a fenda catalítica profunda entre os domínios, os resíduos do peptídeo inibidor ligam-se à periferia deste bolso.^{7,8}

*e-mail: barbara.iq@gmail.com

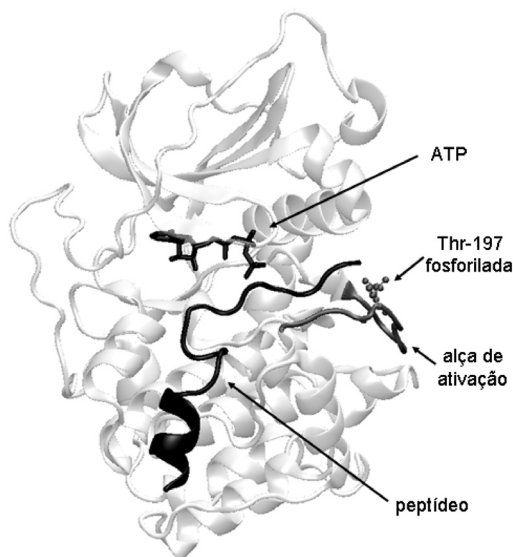


Figura 2. Diagrama da PKA co-cristalizada com ATP e um peptídeo inibidor. A alça (loop) de ativação e o resíduo fosforilado, fosfo Thr-197, estão em cinza claro. O ATP e uma porção do peptídeo inibidor no sítio ativo aparecem em preto (código PDB: 1atp, resolução 2,20 Å)⁸

PROTEÍNA QUINASE C (PKC)

A família de proteínas quinases C (PKC) [EC 2.7.11.13] de mamíferos compreende 10 isoenzimas agrupadas em 3 classes: convencional (α , γ e, alternativamente, β I e β II), recente (δ , ϵ , η /L, θ) e atípica (ζ , ι / λ). Além disso, PKC μ e ν são consideradas, por alguns, constituintes de uma quarta classe e, por outros, como uma família distinta denominada proteínas quinases D. Todas estas enzimas têm em comum uma região C-terminal conservada, típica de quinases, e uma região N-terminal que contém módulos regulatórios: pseudo substrato (exceto μ /D); domínios de ligação à fosfatidilserina e ésteres diacilglicerol/forbol; domínios de ligação a lipídeos aniônicos (apenas as convencionais e recentes) e Ca^{+2} (apenas as convencionais); e domínios de ligação a fosfoinosítídeos (apenas μ /D).⁹

A determinação da estrutura cristalográfica do domínio de ligação à fosfatidilserina e ésteres diacilglicerol/forbol mostrou um domínio globular, com duas folhas-beta estendidas e separadas, formando um bolso para o ligante. Dois átomos de Zn^{2+} coordenam-se com resíduos His e Cys em extremidades opostas da seqüência primária, auxiliando a estabilização deste domínio.^{9,10}

O domínio de ligação a lipídeos aniônicos e Ca^{+2} foi estudado por Sutton e colaboradores.¹¹ Este domínio é rico em folhas-beta e possui um bolso formado por alças que contêm os resíduos que se ligam ao Ca^{+2} .

PROTEÍNA QUINASE DEPENDENTE DE CÁLCIO Ca^{+2} /CALMODULINA (CaM)

Cálcio é um importante sinalizador celular e, por isso, sua concentração intracelular livre é estritamente regulada. Nos mamíferos, as células contêm um grande número de proteínas que se complexam ao cálcio com diferentes afinidades e especificidades. Algumas dessas proteínas possuem baixa afinidade e atuam principalmente como “tampões” que limitam a difusão de Ca^{2+} . Outras proteínas ligam-se ao cálcio com alta afinidade e especificidade e são responsáveis por vários eventos bioquímicos. A proteína quinase C liga-se diretamente ao cálcio, ao passo que outras quinases são reguladas indiretamente através de um sinal de transdução. É o caso da calmodulina (CaM).¹²

CaM possui dois domínios globulares que contêm, cada um, dois sítios de ligação ao Ca^{2+} , ligados por uma hélice-alfa flexível. A ligação com o Ca^{2+} induz uma mudança conformacional na CaM, expondo resíduos hidrofóbicos que promovem a interação do complexo Ca^{2+} /CaM com diversas proteínas, incluindo a família de Ser/Thr quinases.¹³

Os membros da família de CaMK (EC 2.7.11.17) são CaMKK (CaM-quinase-quinase); CaMKI-CaMKIV; MLCK (quinase da família miosina de cadeia leve), que podem ser do tipo SkMLCK, S-SmMLCK e L-SmMLCK. Todas essas quinases possuem um domínio catalítico, autoinibitório e um domínio de ligação Ca^{2+} /CaM. S-SmMLCK e L-SmMLCK possuem um módulo Ig (imunoglobulina), um módulo fibronectina, uma região de ligação à actina e um domínio PEVK (rico nos aminoácidos prolina, glutamato, valina, e lisina).¹¹ A estrutura cristalográfica de CaMKII pode ser encontrada no PDB com o código 1hxx, resolução 2,65Å).¹⁴

MAPK (PROTEÍNAS QUINASES ATIVADAS POR MITÓGENOS)

As MAPK (EC 2.7.12.2) abrangem grande número de proteínas, tais como ERK1-ERK3 (quinase regulada por sinal extracelular), JNK1-JNK3 (quinase c-Jun N-terminal), p38 α , p38 β , p38 γ , p38a, ERK5, ERK7. A estrutura tridimensional de ERK2 (código PDB: 1gol, resolução 2,80Å) mostrou dois domínios. O domínio N-terminal é composto principalmente por fitas-beta e duas hélices, a hélice-alfa C e a hélice-alfa L16. O domínio C-terminal consiste principalmente de hélices-alfa, além de quatro fitas-beta curtas que contêm muitos dos resíduos envolvidos na catálise.^{15,16}

MAPK requerem fosforilação de resíduo de tirosina e treonina, ambas catalisadas por MEK (quinase ativadora da MAP quinase), para se tornarem ativas.¹⁷ Como consequência, essas quinases são inativadas pelos três maiores grupos de fosfatases: todas as que removem fosfato de serina/treonina ou de tirosina e as fosfatases dual-específicas, que removem fosfato de serina, treonina e tirosina.¹⁸

Na Figura 3, é mostrada a cascata de fosforilação das MAPK na célula. Após a ativação do receptor do fator de crescimento (proteína transmembrana), este ativa a proteína RAS através da molécula adaptadora GRB2 e um fator de troca do nucleotídeo guanina (SOS), induzindo RAS a trocar seu GDP por um GTP. Este evento é seguido

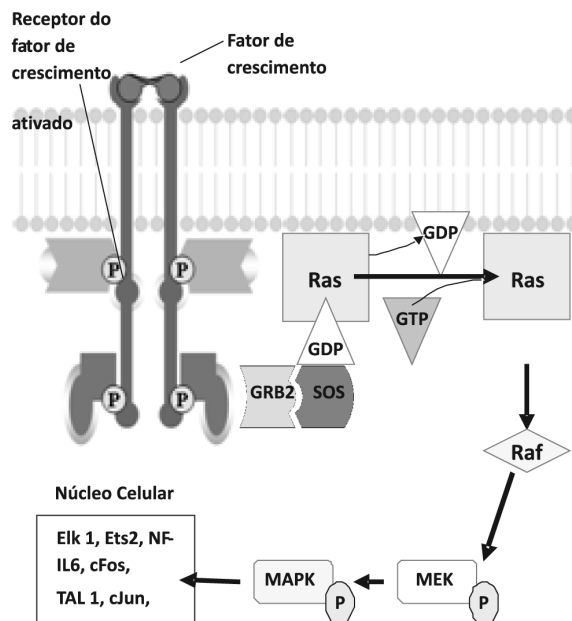


Figura 3. Cascata das MAP quinases na célula

por uma estimulação seqüencial de diversas proteínas quinases citoplasmáticas, como a Raf (quinase específica para Ser/Thr), a MEK e as MAPK. As MAPK, por sua vez, migram para o núcleo celular, onde fosforilam um conjunto de moléculas responsáveis pela transcrição, iniciando, assim, a proliferação celular.¹⁹

PROTEÍNA QUINASE DEPENDENTE DE CICLINA (CDK)

O caráter versátil da regulação de proteínas quinases foi mais estudado para o grupo de quinases dependentes de ciclina (CDK, *cyclin-dependent protein kinase*) [EC 2.7.11.22]. A ativação das CDK requer dois eventos. O primeiro evento é a ligação com uma molécula reguladora positiva, a ciclina;^{20, 21} e o segundo, a fosforilação de um resíduo de treonina (Thr160 em CDK2) localizado na alça conhecida como segmento de ativação.^{22, 23}

O ciclo celular é dividido nas seguintes fases: **G₁** (intervalo, *gap* 1), fase em que a célula se prepara para síntese do DNA; **S** (síntese), estágio no qual o DNA é replicado; **G₂** (*gap* 2), fase na qual a célula se prepara para a mitose; **M** (mitótica), fase onde a célula passa por diversas transformações que resultam na divisão do núcleo (mitose) e divisão do citoplasma, ou seja, a formação de duas células filhas (citocinese).²⁴

CDK específicas operam em fases distintas do ciclo celular: CDK4/ciclina (CycD) e CDK6/CycD são responsáveis pela progressão na fase G₁; CDK2/CycE é necessária para a progressão da fase G₁ a S; CDK2/CycA para a transição de S; enquanto CDK1/CycB para a transição G₂/M.²⁰ Os complexos CDK/cyc são regulados por pequenas moléculas endógenas. A família de inibidores de quinase dependentes de ciclina 4, (INK4, *inhibitor of cyclin-dependent kinase* 4), que inclui p16INK4A, p15INK4B, p18INK4C e p19INK4D, inibe especificamente CDK4/CycD; enquanto membros da família INK2, tais como p21WAF1, p27KIP1 e p57KIP2, se ligam e inibem a atividade de CDK2/CycE, CDK2/CycA, CDK1/CycB, e menos efetivamente, CDK4/CycD.^{20, 25}

Estudos cristalográficos da proteína CDK2 permitiram o entendimento detalhado do mecanismo de ativação pela ligação de ciclina A e fosforilação.²⁶⁻²⁸ O núcleo catalítico da CDK2 é composto de múltiplos subdomínios conservados encontrados em todas as proteínas quinases.²⁹ Possui uma hélice C, um grande domínio C-terminal (~ 210 resíduos), composto predominantemente por hélices-alfa, um domínio N-terminal (~ 80 resíduos) formado principalmente por folhas-beta (Figura 3). O sítio de ligação do ATP situa-se na interface domínio-domínio. Na estrutura inativa, CDK2 monomérica, mostrada na Figura 4, os resíduos do sítio de ligação do ATP estão dispostos de forma incapaz de promover o alinhamento correto do grupo trifosfato para a catálise, apesar do monômero inativo poder ligar-se ao ATP.²⁶

TIROSINA QUINASES

As proteínas tirosina quinases (PTKs) apresentam as seguintes subdivisões: tirosina quinases não receptoras (EC 2.7.10.1) citoplasmáticas (como Src), semelhantes à seqüência de um domínio de proteína conhecida como Src, que podem ser reguladas por diferentes mecanismos; tirosina quinases receptoras (RTKs) [EC 2.7.10.2], proteínas transmembrânicas, ativadas por um ligante extracelular.

As quinases Src têm cinco componentes ou domínios: N-terminal, homólogo Src SH3, SH2, quinase (bilobada), além de um domínio não catalítico C-terminal.³⁰

O domínio quinase é conservado em toda a classe e é responsável pela atividade catalítica. Este domínio possui um pequeno lobo N-terminal, associado à ATP, e um grande lobo C-terminal, associado a um peptídeo ou uma proteína. Possui também os domínios SH3 e SH2,

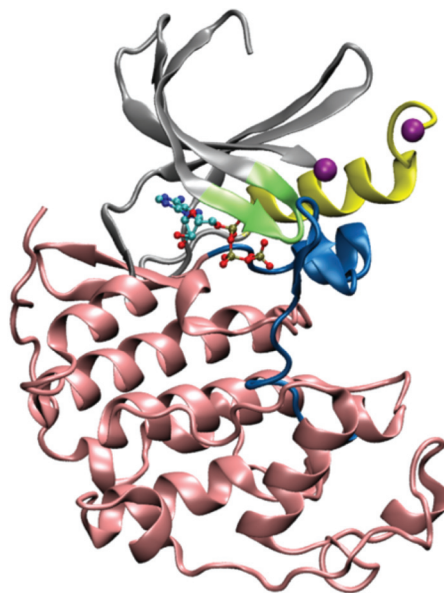


Figura 4. Estrutura monomérica de CDK2. O domínio N-terminal está representado em cinza, com exceção da alça rica em glicina (em verde) e a hélice C, de seqüência PSTAIRE (em amarelo). A molécula de ATP está mostrada na representação de hastas e esferas na interface entre os domínios N- e C-terminal. O domínio C-terminal está na cor rosa, com o segmento de ativação (resíduos 145-172) em azul (código PDB: 1hck, resolução 1,90 Å)²⁶

que fazem interação proteína-proteína e têm funções reguladoras e adaptadoras. O domínio SH3 (códigos PDB: 1bu1, resolução: 2,60 Å; 1csk, resolução: 2,50 Å)^{31, 32} tem aproximadamente 60 aminoácidos e contém regiões ricas em prolina. O domínio SH2 (código PDB: 1hct)³³ tem aproximadamente 100 aminoácidos e é responsável pelo reconhecimento e ligação à tirosina fosforilada.³⁴ Abelson tirosina quinase (ABL) é um exemplo de membro da família tirosina quinases não receptoras.

TIROSINA QUINASES RECEPTORAS (RTKS)

A primeira estrutura cristalográfica de receptores de tirosina quinases a ser determinada foi a da quinase receptora de insulina (IRK),³⁵ uma glicoproteína transmembrânica. Ao contrário de outros receptores tirosina quinases, o receptor de insulina é um dímero na forma inativa. O receptor consiste de duas subunidades β transmembrânicas e duas subunidades α extracelulares (Figura 5).

A insulina liga-se às subunidades α. A porção intracelular da

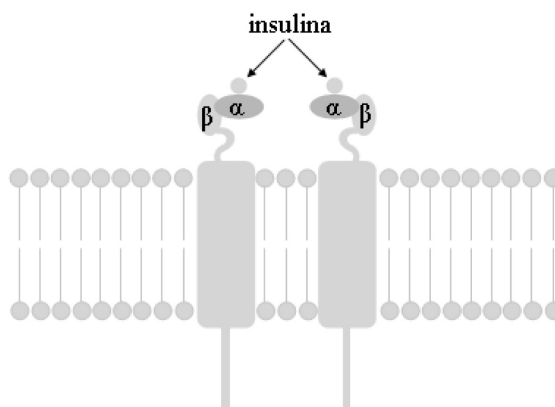


Figura 5. Esquema da quinase receptora de insulina (IRK)

subunidade β transmembrânica contém o domínio com atividade de tirosina quinase, e tem estrutura semelhante à PKAc. A ligação da insulina a uma ou duas subunidades α induz uma mudança conformacional no domínio intracelular do receptor. O receptor sofre autofosforilação, aumentando sua atividade. Uma vez ativado, o receptor fosforila outras proteínas.³⁶

Na Figura 6 está representada a ligação de um fator de crescimento (hormônio protéico) que resulta na dimerização de seus receptores de superfície. Neste caso, o dímero é a forma ativa. Os domínios intracelulares da tirosina quinase sofrem autofosforilação, o que os liga às proteínas celulares que ativam a cascata quinase.

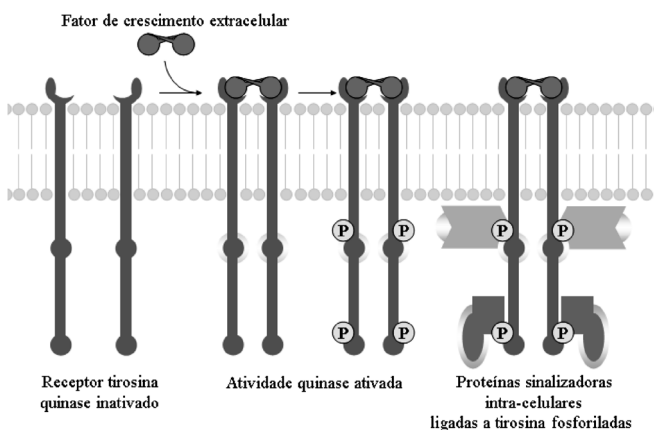


Figura 6. Ativação do receptor tirosina quinase após ligação de fator de crescimento extracelular

Existem diversos tipos de fatores de crescimento, que são denominados de acordo com o tipo de tecido em que seus receptores são expressos. Esses fatores de crescimento atuam mediante a ativação de seus receptores (usualmente tirosina quinases). Os membros da família do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) atuam mediante ativação de receptores do tipo tirosina quinase. Os receptores de VEGF (VEGFR, *vascular endothelial growth factor receptor*) são predominantemente expressos em células endoteliais vasculares. São três os receptores de VEGF e a ativação seletiva de cada um deles resulta em diferentes respostas biológicas. A ativação do receptor Flt-1 (ou VEGFR-1) induz os efeitos organizacionais na estrutura vascular; a ativação do receptor KDR (ou VEGFR-2) induz a mitose das células endoteliais vasculares; e a ativação do receptor Flt-4 (ou VEGFR-3, predominantemente expresso em vasos linfáticos) induz linfangiogênese. Sob o ponto de vista estrutural, VEGF é uma glicoproteína homodimérica que compreende duas subunidades idênticas de 23kD.³⁷ A estrutura do VEGF foi determinada por difração de raios-X.³⁸

Uma subfamília de RTK é a dos receptores de fator de crescimento derivados de plaqueta (PDGFR, *platelet-derived growth factor receptor*), que tem semelhança estrutural com a família dos VEGFR e incluem PDGFR α , PDGFR β , cKIT, CSF1R e Flt-3.³⁹ Estes receptores possuem 5 domínios imunoglobulinas em sua região extracelular e um domínio quinase hidrofílico na região citoplasmática.⁴⁰

O receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) é uma glicoproteína da membrana plasmática composta de um domínio de ligação extracelular, de um segmento transmembrânico lipofílico e de um domínio intracelular de tirosina quinase. O EGFR é um membro da família de receptores do fator de crescimento epidermal humano (HER, *humam epidermal growth factor receptor*), que inclui HER-1, HER-2, HER-3 e HER-4, importantes mediadores do crescimento celular, diferenciação e sobrevivência. O EGFR é ativado pela homodimerização com outro EGFR ou heterodimerização com outro membro da família HER, por exemplo, HER-2.⁴¹

A família de fatores de crescimento do fibroblasto (FGF) é formada por 22 proteínas estruturalmente relacionadas. As respostas biológicas de FGF são mediadas por quatro receptores tirosina quinase, FGFR1-4 (*fibroblast growth factor receptor*). Cada FGFR é formado por uma região de ligação extracelular (Figura 6), que contém três domínios imunoglobulinas; uma hélice transmembrânica e um segmento citoplasmático com atividade tirosina quinase.⁴²

INTERVENÇÃO TERAPÊUTICA

Em função de seu papel essencial no processo de apoptose, proliferação celular, metabolismo do glicogênio, neurotransmissão e oncogênese, a desregulação ou superexpressão de proteínas quinases está associada a doenças como asma, câncer, desordens cardiovasculares, diabetes, doenças do sistema nervoso central, entre outras.⁴³

O envolvimento de proteínas quinases no desenvolvimento e manutenção de tumores malignos humanos pode ocorrer por: rearranjo genômico, incluindo translocação cromossomal que gera a fusão de proteínas contendo o domínio catalítico e uma proteína não relacionada que usualmente fornece a função ativação (dimerização), tal como a fusão dos genes *Bcr-Abl* em leucemia mielóide crônica;⁴⁴ mutações que conduzem à atividade quinase;⁴⁵ desregulação da atividade quinase por ativação de oncogenes ou perda da função de supressores tumorais. Isto ocorre, por exemplo, com o oncogene *Ras* (ativado em aproximadamente 30-50% dos cânceres humanos), desregulação da atividade da quinase Raf e quinases dependentes de ciclinas;⁴⁶ desregulação da atividade quinase por superexpressão dos receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR).⁴⁷

INIBIDORES QUÍMICOS DAS PROTEÍNAS QUINASES

Como descrito anteriormente, todas as proteínas quinases têm um domínio catalítico que contém uma fenda onde se liga uma molécula de ATP. A inibição alostérica, que altera a conformação espacial destas enzimas e, conseqüentemente, bloqueia os sítios de ligação do ATP, é bastante promissora no planejamento de fármacos, principalmente moléculas de baixa massa molecular.

Além de ligações de hidrogênio tipo doador e receptor, existem interações de natureza lipofílica da quinase com o ATP (Figura 7). Apesar de os sítios de ligação do ATP serem muito conservados entre as proteínas quinases, a arquitetura de regiões próximas a esses sítios pode variar. Para fins de propostas de novos fármacos, os sítios de ligação nas proteínas quinases podem ser divididos nas seguintes regiões:⁴⁸ região da adenina - região em que se posiciona o núcleo

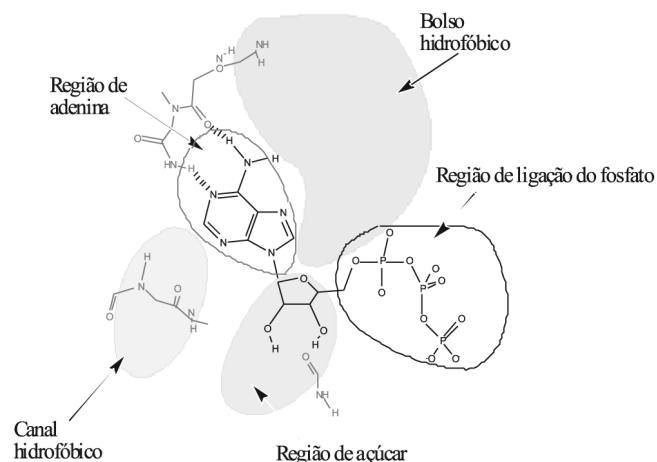


Figura 7. Representação geral de uma molécula de ATP em seu sítio de ligação de uma proteína quinase. Adaptada da ref. 48

purínico (ou o resíduo de purina, ou adenina), que faz duas ligações de hidrogênio com o receptor; região do açúcar - na maioria das proteínas quinases é uma região hidrofílica; bolso hidrofóbico - este bolso não é usado pelo ATP, mas é explorado pela maior parte dos inibidores; canal hidrofóbico - é uma fenda aberta para a água. Como não é usada pelo ATP, pode ser explorada para o aumento da afinidade entre o fármaco e o receptor; região de ligação do fosfato - é a menos importante em termos de afinidade devido à forte exposição à água. Porém, pode ser útil para melhorar a seletividade ou provocar ganho adicional de afinidade na otimização de um novo inibidor.

Além dos inibidores alostéricos que competem pelos sítios de ligação do ATP, existem inibidores alostéricos de quinase que se ligam aos sítios de substratos protéicos, mostrando uma inibição cinética não competitiva. Estes últimos inibidores foram destacados em recente revisão.⁴⁹

INIBIDORES DE PKC

Em 1986, a estaurosporina (**4**) (Figura 8) foi identificada como um potente inibidor de PKC, o que aumentou o interesse em inibidores dessas quinases.⁵⁰ A briostatina 1 (**5**) (Figura 8), uma macrolactona isolada do organismo marinho *Bugula neritina*, é outro conhecido inibidor de PKC.¹

A maior parte das células expressa a mistura de muitas isoformas de PKC e há grande variedade de tecido para tecido. É muito raro encontrar tecidos que expressem somente uma das isoformas ou em que somente uma delas seja mais ativada em estado de doença. Por isto, a inibição seletiva de PKC não é trivial.

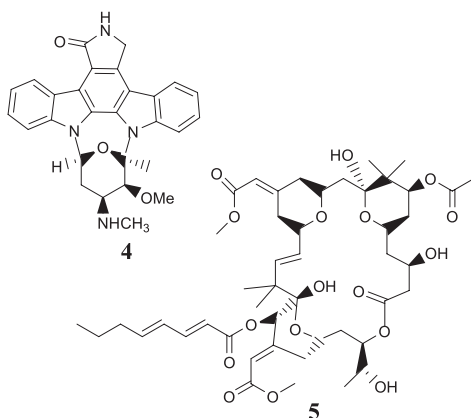


Figura 8. Estaurosporina (**4**), Briostatina 1 (**5**)

INIBIDORES DE QUINASES DEPENDENTES DE CICLINAS

A freqüente desregulação das CDK em casos de tumores humanos encorajou vários pesquisadores a procurar inibidores destas quinases. Várias moléculas seletivas de baixa massa molecular que competem com os sítios de ligação do ATP em CDK1, CDK2 e CDK4 foram obtidas. Verificou-se, no caso destes inibidores, que em células normais a inibição é reversível nas fases G₁ ou na transição G₂/M da divisão celular. Isto não acontece em células transformadas, onde o controle da divisão celular está ausente ou defeituoso e as células sofrem apoptose. Além disso, muitos desses inibidores têm moderada eficácia *in vivo*, o que torna necessária a pesquisa de novos antagonistas de proteínas do ciclo celular para o tratamento do câncer.⁴⁸

CGP 60474 (**6**) e a olomoucina (**7**) (Figura 9a e b) interagem com a região de dobradiça (*hinge*) de CDK2 através de ligação hidrogênio com N1 e N2. A olomoucina apresenta razoável seletividade para CDK1 faltando, porém, a potência necessária para torná-lo um

fármaco inibidor.⁵⁰ Por isso, Imbach e colaboradores⁵¹ otimizaram derivados da olomoucina obtendo moléculas promissoras para inibição de CDK1, conforme pode ser observado na Figura 9.

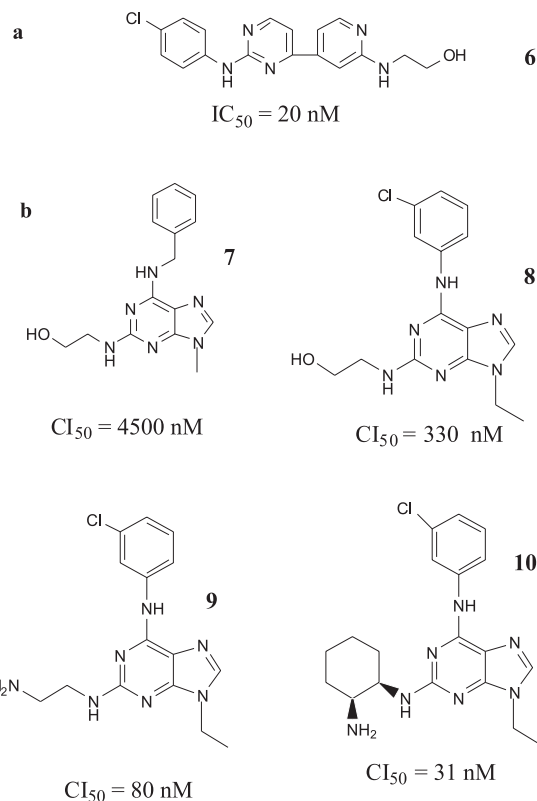


Figura 9. a) CGP 60474 (**6**), b) olomoucina (**7**) e seus derivados (**8**, **9** e **10**) com valores de CI_{50} para CDK1 e CDK2

O CGP 82996 (**11**), moléculas da classe triaminopirimidina (TAP), o produto natural fascaplisina (**12**) e flavopiridol (**13**) (Figura 10) são inibidores seletivos *in vitro* de várias quinases dependentes de ciclinas. O principal alvo desses compostos é a CDK4/CycD1 com CI_{50} 1500 nM, 350 nM e 230 nM para CGP 82996, fascaplisina e flavopiridol, respectivamente.⁵²

Compostos da classe dos oxindóis (**14**) (Figura 11), sintetizados por Bramson e colaboradores,²⁴ interrompem o ciclo celular através da inibição da atividade de CDK2 com valores de CI_{50} na ordem de nanomolar. Além disso, esses compostos previnem a alopecia que normalmente acontece durante a quimioterapia.⁵³

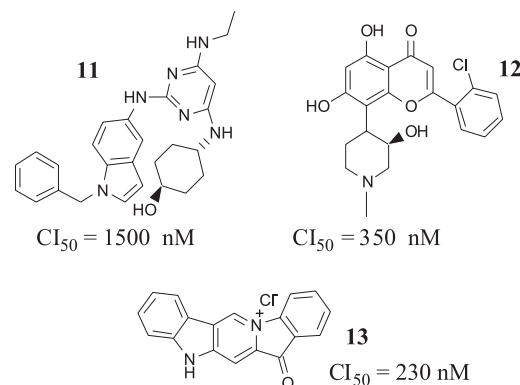


Figura 10. CGP 82996 (**11**); Flavopiridol (**12**); Fascaplisina (**13**) com valores de CI_{50} para CDK4/CycD1

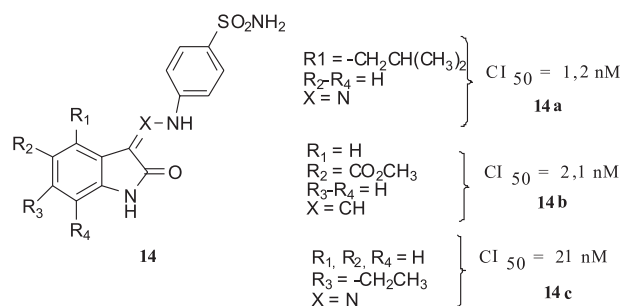


Figura 11. Compostos da classe dos oxindóis inibidores de CDK2 com valores de Cl_{50}

INIBIDORES DO RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL

O receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR ou ErbB-1) foi identificado como um protooncogene tirosina quinase. Diversos estudos sugerem que estes receptores e seus ligantes estão associados a uma grande porcentagem de todos os tumores sólidos.¹

Produtos naturais pertencentes à classe das ansamicinas, como a geldanamicina e a herbimicina (estrutura geral **15**) (Figura 12) são potentes inibidores de EGFR, impedindo a proliferação celular. Contudo, observou-se também que estes compostos impedem a proliferação celular de muitos outros mitógenos e não inibem EGFR em ensaios com enzimas isoladas.⁵⁴

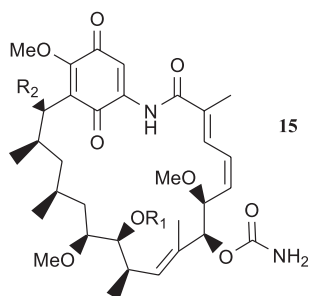


Figura 12. Produtos naturais pertencentes à classe das ansamicinas: $R_1 = R_2 = H$ - Geldanamicina; $R_1 = CH_3$, $R_2 = OCH_3$ - Herbimicina

Muitas quinases (e outras proteínas) ligam-se à proteína acompanhante (*chaperone*) HSP-90, proteína transportadora, no retículo endoplasmático. Este processo requer ATP. A geldanamicina é um inibidor competitivo dos sítios de ATP de HSP 90, com o carbamato mimetizando uma adenina e a quinona ocupando o sítio de ligação do trifosfato.⁵⁵ Isso faz com que os EGFR não se liguem apropriadamente ao transportador, e sejam desviados para os lisossomos, onde são degradados. Dessa forma, após um período de muitas horas, as ansamicinas conduzem à completa inibição da atividade quinase EGFR pela destruição da proteína. Muitos outros RTK, incluindo a insulina, são também destruídos pelas ansamicinas por essa mesma via.⁵⁶

Gefitinib (Iressa®), ZD1839 (**16**) (Figura 13) é um derivado de quinazolina que inibe EFGR de maneira reversível. Estudos pré-clínicos mostraram que este fármaco é capaz de se ligar fortemente ao receptor, inibindo o crescimento do tumor.⁵⁷ O *Gefitinib* foi lançado, em 2003, para o tratamento de câncer de pulmão de células não-pequenas (NSCLC) localmente avançado ou em metástase.⁵⁸

Erlotinib (Tarceva®), OSI-774 (**17**) (Figura 13) é outro exemplo de inibidor de EFGR. Este fármaco é administrado por via oral e foi aprovado pelo FDA para o tratamento de pacientes com NSCLC e câncer pancreático.^{58,59}

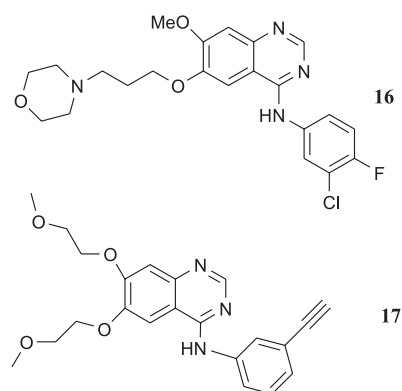


Figura 13. *Gefitinib* (Iressa®) (**16**), *Erlotinib* (Tarceva®) (**17**)

INIBIDORES DO RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO DO FIBROBLASTO

Em 1997, Mohammadi e colaboradores⁶⁰ identificaram uma nova classe de inibidores de receptores de tirosina quinases com diferentes substituintes químicos para a estrutura do oxindol (Figura 14). Estes compostos foram testados para a inibição da atividade quinase receptora de FGFR1, receptor do fator de crescimento do fibroblasto 1, (*Fibroblast Growth Factor Receptor 1*) em células NIH3T3.

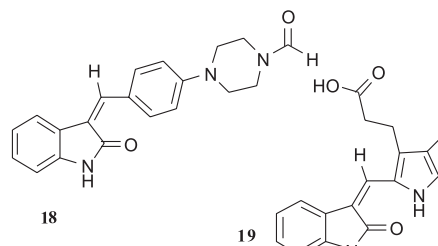


Figura 14. Estruturas de SU4984 (**18**) e SU5402 (**19**)

Um ensaio *in vitro* de autofosforilação foi realizado com FGFR1 na presença de várias concentrações de SU4984 (**18**) ou SU5402 (**19**). Ambos os compostos inibiram a atividade quinase de FGFR1K com concentração inibitória média (Cl_{50}) de 10 a 20 nM na presença de 1 mmol de adenosina trifosfato (ATP).

INIBIDORES MULTIQUINASES

Houve um tempo em que se pensava que inibidores de receptores múltiplos de quinases eram um risco. Contudo, novas evidências mostram que não somente o organismo tolera o ataque multipropagado, mas que a estratégia mais apropriada é justamente atacar a complexa via da comunicação celular.⁶¹ Nos itens seguintes, estão descritos alguns inibidores que possuem como alvo dois ou mais tipos de quinase.

Quinazolininas

O fator de crescimento HER2 é fortemente expressado em 25% dos casos de cânceres de mama. Herceptin®, um anticorpo monoclonal, foi aprovado primeiramente em 1998, nos Estados Unidos, para o tratamento de casos avançados de HER2-positivo. Embora este anticorpo seja considerado um grande passo no tratamento de câncer de mama há muito ainda para ser investigado, visto que existem pacientes HER2-positivos que desenvolvem resistência a Herceptin®. Além disso, esse fármaco não é capaz de curar cânceres

em fase de metástase.⁶¹

A companhia GlaxoSmithKline (GSK) revelou que o uso de moléculas de baixa massa molecular no tratamento do câncer, como o derivado quinazolina dual-quinase *Lapatinib* (Tykerb®), GW 572016 (**20**) (Figura 15), impediu a progressão da doença em pacientes já em estágio avançado. Várias companhias, incluindo GSK, Wyeth, Array BioPharma e Exelixis acreditam que o desenvolvimento de inibidores multiquinases seja uma grande oportunidade lucrativa.

Inibidores multiquinases em desenvolvimento para o câncer de mama são planejados visando impedir a sinalização celular, bloqueando dois ou mais membros da família HER. No caso de *Lapatinib*, são bloqueados HER2 e HER1.⁶¹

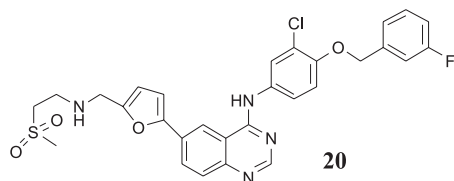


Figura 15. *Lapatinib* (Tykerb®) (**20**)

Pirrolotriazinas

Mastalerz e colaboradores⁶² sintetizaram uma nova classe de pirrolotriazinas que inibem EGFR e HER2. Dentre os compostos obtidos por esse grupo, o derivado que deu melhores resultados foi o **21** (Figura 16). A CI_{50} foi 27 e 33 nM para HER2 e EGFR, respectivamente.

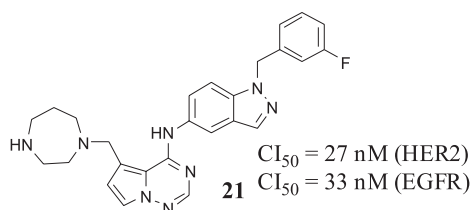


Figura 16. Pirrolotriazina (**21**) inibidora de EGFR e HER2 com valores de CI_{50}

Uréias N, N'-dissubstituídas e oxindóis

Os receptores do fator de crescimento vascular endotelial (VEGFR) desempenham papel importante no desenvolvimento da angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos). A superativação da família VEGFR e, em particular, de KDR (receptor do domínio quinase) estão aliados à progressão de uma variedade de cânceres humanos. Além disso, a ativação de Flt-3 e cKIT, por mutação, está diretamente associada com a progressão da leucemia mieloide aguda (AML) e do tumor estromal gastrointestinal (GIST).³⁹

Recentemente, o FDA (*Food and Drugs Administration*) aprovou dois inibidores multiquinases como novos agentes no tratamento do câncer: SU11248, *Sunitinib* (**22**) (classe: oxindol) e BAY 43-9006, *Sorafenib* (**23**) (classe: uréiacarbamoilpiridinila) (Figura 17). Enquanto os alvos de SU11248 são VEGFR e PDGFR, BAY 43-9006 também inibe a quinase Raf.^{39,49}

Na pesquisa de novos inibidores de RTKs, Dai e colaboradores³⁹ identificaram uma série de aminoindazol N,N'-diariluréias como potentes inibidores de KDR (VEGFR-2), Flt-3 e cKIT.

O derivado aminoindazol que apresentou os melhores resultados *in vitro* e *in vivo* é chamado de ABT-869 (**24**) (Figura 17). Testes pré-clínicos mostraram que este composto tem eficácia na redução

de tumores, como o carcinoma do colo do útero e o carcinoma de mama com dose diária 12,5 mg/kg.⁶³

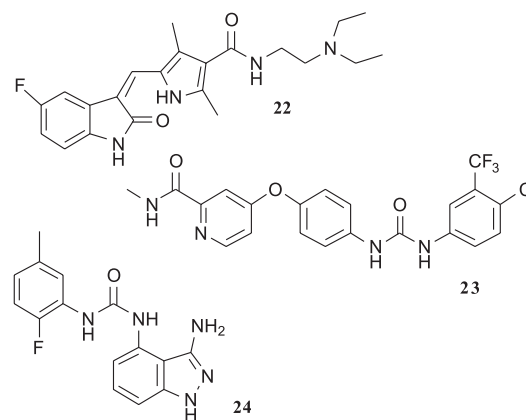


Figura 17. *Sunitinib*, SU11248 (**22**), *Sorafenib*, BAY 43-9006 (**23**), ABT-869 (**24**)

Diidroindenopirazóis

Akritopoulou-Zanze e colaboradores⁶⁴ sintetizaram uma série de compostos da classe dos diidroindenopirazóis, que inibiram um grande painel de tirosina quinases, apresentando, porém, maior seletividade para a inibição das subfamílias PDGFR/VEGFR. A Figura 18 mostra os compostos (**25** e **26**) que resultaram em menor CI_{50} para KDR.

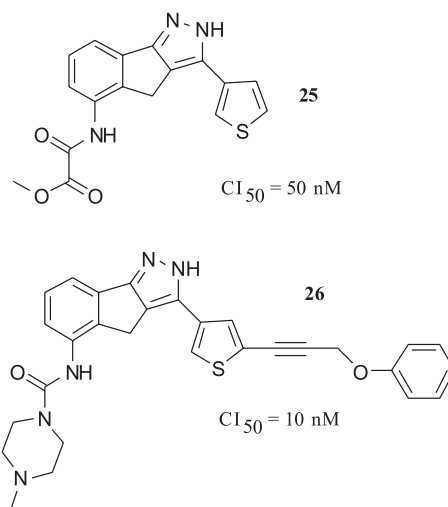


Figura 18. Estruturas de diidroindenopirazóis com valores de CI_{50} para KDR

Derivados de pirimidinas

A leucemia mieloide crônica (LMC) é um tipo de câncer gerado pela fusão dos genes bcr e abl. A proteína ABL localiza-se principalmente no núcleo, onde atua como um regulador negativo do crescimento celular e se associa a genes supressores tumorais. O gene bcr (*breakpoint cluster region*) localiza-se no ponto de quebra do cromossomo 22.⁶⁵

A oncoproteína BCR-ABL, codificada pelo gene fundido, é uma enzima citoplasmática tetramérica com intrínseca atividade tirosina quinase.⁶⁶

O grupo Novartis sintetizou o CPG 57148B (**27**) (agora denomi-

nado STI571, Glivec®) da classe uréiapirimidina (Figura 19). Este composto foi desenvolvido para ser inibidor de um receptor de fator de crescimento (PDGFR), mas apresentou CI_{50} de 25 nM contra BCR-ABL e ABL, e 50 nM contra PDGFR.⁶⁷ Ele também inibe a autofosforilação de cKIT com CI_{50} de 100 nM, além de apresentar atividade significativa contra a maior parte das quinases conhecidas e testadas.⁶⁸

Em 2000, Schindler e colaboradores⁶⁹ obtiveram a estrutura cristalográfica da quinase humana ABL complexada com STI571 (código PDB: 1fpv, resolução: 2,40 Å). Esse composto induz a troca da orientação da parte N-terminal do segmento da alça (*loop*) de ativação, o que resulta em uma conformação incapaz de se ligar ao ATP.

Desatinib/BMS-354825 (**28**) (Figura 19), aprovada em 2006, é uma piperazinopirimidina também utilizada no tratamento de CLM. É um inibidor múltiplo de quinases receptoras, incluindo BCR-ABL, família Src, c-KIT, PDGFR- β .⁵⁸

PP1 (**29**) (classe pirazolpirimidina) e CGP 76030 (**30**) (classe pirrolpirimidina) (Figura 19) são dois exemplos de inibidores de Src. PP1 também inibe cKIT e BCR-ABL. Estes compostos bloqueiam o crescimento celular e a sobrevivência de células que expressam vários mutantes resistentes aos inibidores de Abl.⁷⁰

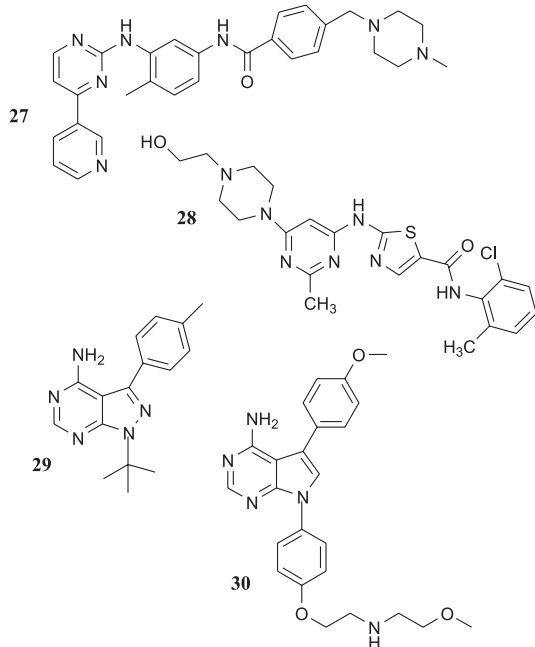


Figura 19. Glivec, STI571 (27), Desatinib (28), PP1 (29), CGP 76030 (30)

Balanol

Balanol (**31**) (Figura 20) é um produto natural mimético do ATP, isolado do fungo *Verticillium balanoides*. É um potente inibidor de PKC e PKA, ambos com CI_{50} de 4 nM.⁴³

A desregulação do AMPc implica em doenças como o câncer, desordens cardiovasculares e inflamação. BD2 (**32**), um análogo da série do produto natural balanol (Figura 20) inibe a proteína quinase A (CI_{50} = 0,3 nM) através da ocupação do sítio catalítico do AMPc.⁷¹

INIBIDORES QUE SE LIGAM A DOIS SÍTIOS DA PROTEÍNA QUINASE

Compostos que se ligam a dois sítios de uma proteína podem aumentar a potência e especificidade de inibidores para muitas enzimas.⁷² Inibidores desse tipo podem, por exemplo, ligar-se ao sítio

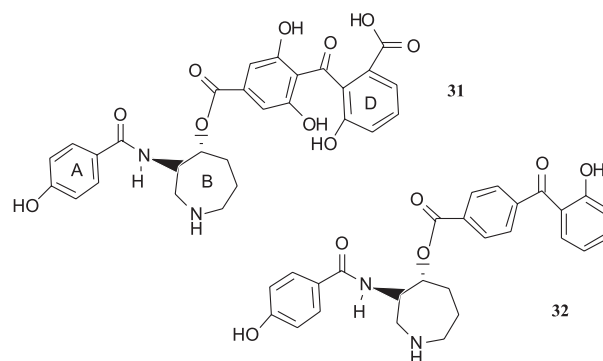


Figura 20. Balanol (31) e seu análogo BD2 (32). A=fragmento 4-hidroxibenzoilamida, B=fragmento hexa-hidroazepina, C=fragmento ácido 3,5-di-hidróxi-4-cetobenzóico, D=fragmento ácido 3-hidróxi-2-cetobenzóico

ativo e ao domínio SH2 de uma Src quinase ao mesmo tempo.

Os principais inibidores que se ligam a duas regiões de uma quinase estão incluídos em quatro categorias: derivados de sulfonilbenzoil (**33**), de ácidos carboxílicos (**34**), de dipeptídeos (**35**) e de fosfodiésteres (**36**) (Figura 21).

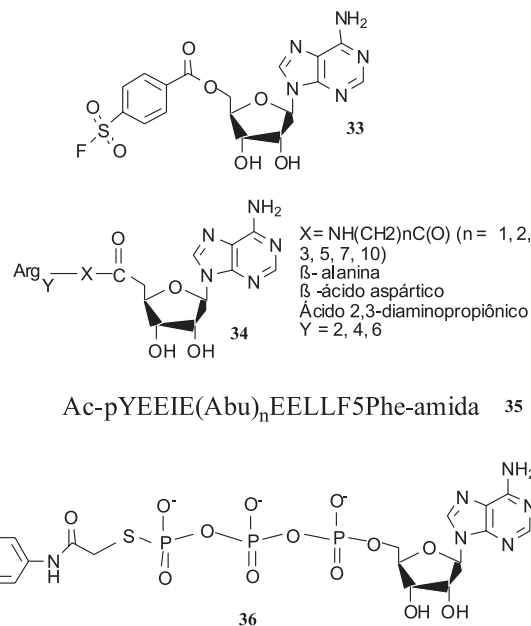


Figura 21. Sulfonilbenzoil, inibidor de PKC e PKA (33);⁷³ série de derivados de ácidos carboxílicos, inibidores de PKC e PKA (34);⁷⁴ derivado de peptídeo, inibidor de quinases Src (35);⁷⁵ derivado fosfodiéster, inibidor de PKA (36)⁷⁶

Recentemente, derivados do grupo diarilimidazóis (**37**) (Figura 22) foram apontados como inibidores da Raf quinase, atuando também em dois sítios dessa proteína: o sítio do ATP e de uma região alostérica adjacente.⁷⁷

Para mais informações sobre as doenças associadas à desregulação de proteínas quinases, ver a página virtual *Protein Kinase Resource Page* em <http://www.sdsc.edu/kinases> (acessada em Abril 2008).⁷⁸

CONCLUSÕES

Em função do seu envolvimento com a diferenciação e proliferação celular, e transdução de sinais as proteínas quinases são

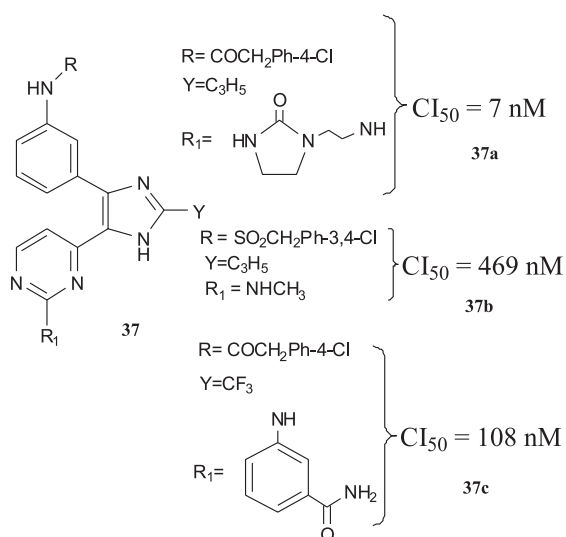


Figura 22. Diarilimidazóis (37) inibidores da RAF quinase

importantes alvos terapêuticos. A maior parte dos cânceres está associada com a desregulação dessas proteínas, geralmente através de mutação gênica, que conduz a uma superexpressão ou danificação de inibidores endógenos. Além do câncer, outras doenças sérias, como as cardiovasculares, também envolvem proteínas quinases.

A cristalografia de raios-X de diversas quinases, em conformações ativas e inativas, contribuiu para elucidar o mecanismo molecular de ação de muitos fármacos e nortear a descoberta de novas moléculas com capacidade inibitória.

O grupo farmacofórico dos inibidores químicos (oxindóis, aminoadazóis, pirazóis, pirimidinas, etc) mimetizam a adenina (um dos componentes do ATP), enquanto grupos aromáticos, oxigenados ou nitrogenados penetram na fenda catalítica da proteína quinase, realizando interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio.

O entendimento completo da ação dessas proteínas na comunicação celular ainda é um desafio, devido à grande variedade de quinases que podem ser expressas pelo genoma humano. Além disso, o desenvolvimento de resistência aos fármacos no tratamento quimioterápico do câncer e a busca por melhores propriedades farmacocinéticas das moléculas preparadas tornam esta área bastante atraente para muitos grupos de pesquisa.

LISTA DE ACRÔNIMOS

ABL- Abelson tirosina quinase; AML – leucemia mielóide aguda; AMPc - adenosina monofosfato cíclico; ATP - adenosina trifosfato; BCR – região do ponto de quebra (*breakpoint cluster region*); CaM – calmodulina; CaMK – quinase dependente de cálcio Ca^{2+} /calmodulina (CaMK); CaMKK - CaM-quinase-quinase; CDK – quinase dependente de ciclina; CML – leucemia mielóide crônica; CSF1R – receptor do fator 1 de colônia estimulante; EFR – fator de crescimento do fibroblasto; FGFR – receptor do fator de crescimento do fibroblasto; EGF - fator de crescimento epitelial; EGFR – receptor do fator de crescimento epitelial; ERK – quinase regulada por sinal extracelular; FGFR – receptor do fator de crescimento do fibroblasto; FLT – *fms-like* tirosina quinase; GTP – guanosina trifosfato; HER – receptor do fator de crescimento epidermal humano; INK – inibidor de quinase dependente de ciclina; IRK – quinase receptora de insulina; IRS – substrato receptor de insulina; JNK – quinase c-Jun n-terminal; KDR – receptor do domínio quinase; MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno; MEK – quinase ativadora da MAP quinase; MLCK – quinase da família miosina de cadeia leve; PDGF

– fator do crescimento derivado de plaqueta; PDGFR – receptor do fator de crescimento derivado de plaqueta; PKAc – proteína quinase dependente de AMPc; PKC – proteína quinase C; PTK – proteína tirosina quinase; RTK – tirosina quinase receptora; RAF – família de genes que encodam as proteínas serina/treonina quinases, responsáveis pela estimulação da cascata das MAP quinases; TAP – triaminopirimidina; TCF – fator complexo ternário; VEGF – fator de crescimento endotelial vascular; VEGFR – receptor de fator de crescimento endotelial vascular.

REFERÊNCIAS

- Bridges, A. J.; *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2541.
- Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam S.; *Science* **2002**, *298*, 1912
- Engh, R. A.; Bossemeyer D.; *Advan. Enzyme Regul.* **2001**, *41*, 121.
- Knighton, D. R.; Zheng, J. H.; Ten Eyck, L. F.; Ashford, V. A.; Xuong, N. H.; Taylor, S. S.; Sowadski, J. M.; *Science* **1991**, *253*, 407.
- Liao, J. J.-L.; *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 409.
- Yu, S.; Mei, F. C. J.; Lee C.; Cheng, X.; *Biochemistry* **2004**, *43*, 1908.
- Adams, J. A.; *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2271.
- Zheng, J.; Trafny, E. A.; Knighton, D. R.; Xuong, N. -H.; Taylor, S. S.; Teneyck, L. F.; Sowadski, J. M.; *Acta Crystallogr., Sect D* **1993**, *49*, 362.
- Newton, A. C.; *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2353.
- Mott, H. R.; Carpenter, J. W.; Zhong, S.; Ghosh, S.; Bell, R. M.; Campbell, S. L.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 8312.
- Sutton, R. B.; Davletov, B. A.; Berghuis, A. M.; Sudhof, T. C.; Sprang, S. R.; *Cell* **1995**, *80*, 929.
- Soderling, T. R.; Stull, J. T.; *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2341.
- Soderling, T. R.; *Trends Biochem.* **1999**, *24*, 232.
- Hoelz, A.; Nairn, A. C.; Kuriyan, J.; *Mol. Cell.* **2003**, *11*, 1241.
- Zhang, F.; Strand, A.; Robbins, D.; Cobb, M. H.; Goldsmith, E. J.; *Nature* **1994**, *367*, 704.
- Robinson, M. J.; Harkins, P. C.; Zhang, J.; Baer, R.; Haycock, J. W.; Cobb, M. H.; Goldsmith, E. J.; *Biochemistry* **1996**, *35*, 5641.
- Payne, D. M.; Rossomando, A. J.; Martino, P.; Erickson, A. K.; Her, J.-H.; Shanawowitz, J.; Hunt, D. F.; Weber, M. J.; Sturgill, T. W.; *EMBO J.* **1991**, *10*, 885.
- Cobb, M. H.; *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1999**, *71*, 479.
- Seger, R.; Krebs, E. G.; *FASEB J.* **1995**, *9*, 726; Chen, Z.; Gibson, T. B.; Robinson, F.; Silvestro, L.; Pearson, G.; Xu, B.; Wright, A.; Vanderbilt, C.; Cobb, M. H.; *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2449.
- Sherr, C. J.; *Science* **1996**, *274*, 1672.
- Mott, H. R.; Carpenter, J. W.; Zhong, S.; Ghosh, S.; Bell, R. M.; Campbell, S. L.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 8312.
- Draetta, G. F.; *Curr. Biol.* **1997**, *7*, 50.
- Morgan, D. O.; *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **1997**, *13*, 261.
- Bramson, H. N.; Corona, J.; Davis, S. T.; Dickerson, S. H.; Edelstein, M.; Frye, S. V.; Gampe, R. T., Jr.; Harris, P. A.; Hassell, A.; Holmes, W. D.; Hunter, R. N.; Lackey, K. E.; Lovejoy, B.; Luzzio, M. J.; Montana, V.; Rocque, W. J.; Rusnak, D.; Shewchuk, L.; Veal, J. M.; Walker, D. H.; Kuyper, L. F.; *J. Med. Chem.* **2007**, *44*, 4339.
- Sherr, C. J.; Roberts, J. M.; *Genes Dev.* **1995**, *9*, 1149.
- De Bondt, H. L.; Rosenblatt, J.; Jancarik, J.; Jones, H. D.; Morgan, D. O.; Kim, S.-H.; *Nature* **1993**, *363*, 595; Schulze-Gahmen, U.; De Bondt, H. L.; Kim, S.-H.; *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4540.
- Jeffrey, P. D.; Russo, A. A.; Polyak, K.; Gibbs, E.; Hurwitz, J.; Mas-sague, J.; Pavletich, N. P.; *Nature* **1995**, *376*, 313.
- Russo, A. A.; Jeffrey P. D.; Pavletich, N. P.; *Nat Struct Biol.* **1996**, *3*, 696.
- Hanks, S. K.; Hunter, T.; *FASEB J.* **1995**, *9*, 576.
- Parang, K.; Cole, P. A.; *Pharmacol. Ther.* **2002**, *93*, 145.

31. Arold, S.; O'Brien, R.; Franken, P.; Strub, M.-P.; Hoh, F.; Dumas, C.; Ladbury, J. E.; *Biochemistry* **1998**, *37*, 14683.
32. Borchert, T. V.; Mathieu, M.; Zeelen, J. P.; Courtneidge, S. A.; Wierenga, R. K.; *FEBS Lett.* **1994**, *341*, 79.
33. Xu, R. X.; Word, J. M.; Davis, D. G.; Rink, M. J.; Willard Jr., D. H.; Gampe Jr., R. T.; *Biochemistry* **1995**, *34*, 2107.
34. Xu, Q.; Zheng, J.; Xu, R.; Barany, G.; Cowburn, D.; *Biochemistry* **1999**, *38*, 3491.
35. Hubbard, S. R.; Wei, L.; Ellis, L.; Hendrickson, W. A.; *Nature* **1994**, *372*, 746.
36. Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt C. H.; *Fundamentos de Bioquímica*, 1ª ed., Artmed: Porto Alegre, 2002.
37. Ho, Q. T.; Kuo, C. J.; *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*, 1349.
38. Muller, Y. A.; Li, B.; Christinger, H. W.; Wells, J. A.; Cunningham, B. C.; De Vos, A. M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 7192.
39. 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.
40. Heldin, C. H.; *Cell* **1995**, *80*, 213.
41. Mendelsohn, J.; *J. Clin. Oncol.* **2002**, *20*, 1s.
42. Ibrahim, O. A.; Zhang, F.; Hrstka, S. C. L.; Mohammadi, M.; Linhardt, R. J.; *Biochemistry* **2004**, *43*, 4724.
43. Narayana, N.; Diller, T. C.; Koide, K.; Bunnage, M. E.; Nicolaou, K. C.; Brunton, L. L.; Xuong, N.; Eyck, T.; Taylor, S. S.; *Biochemistry* **1999**, *38*, 2367; Koide, K.; Bunnage, M. E.; Paloma, L. G.; Kanter, J. R.; Taylor, S. S.; Brunton, L. L.; Nicolaou, K. C.; *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 601.
44. Cortes, J. E.; Talpaz, M.; Kantarijan, H.; *Am. J. Med.* **1996**, *100*, 555.
45. Blume-Jensen, P.; Hunter T.; *Nature* **2001**, *411*, 355.
46. Sherr, C. J.; *Cancer Res.* **2000**, *60*, 3689.
47. Yarden, Y.; Sliwkowski, M. X.; *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 127.
48. Fabbro, D.; Ruetz, S.; Buchdunger, E.; Cowan-Jacob, S. W.; Fendrich, G.; Liebetanz, J.; Mestan, J.; O'Reilly, T.; Traxler, P.; Chaudhuri, B.; Fretz, H.; Zimmermann, J.; Meyer, T.; Caravatti, G.; Furet, P.; Manley, P. W.; *Pharmacol. Ther.* **2002**, *93*, 79.
49. Bogoyevitch, M. A.; Fairlie, D. P.; *Drug Discov. Today* **2007**, *12*, 622.
50. Tamaoki, T.; Nomato, H.; Takahashi, I.; Kato, Y.; Morimoto, M.; Tomita, F.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, *35*, 397.
51. Imbach, P.; Capraro, H.-G.; Furet, P.; Mett, H.; Meyer, T.; Zimmermann, J.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 91.
52. Soni, R.; Fretz, H.; Muller, L.; Schoepfer, J.; Chaudhuri, B.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *272*, 794.
53. Davis, S. T.; Benson, B. G.; Bramson, H. N.; Chapman, D. E.; Dickerson, S. H.; Dold, K. M.; Eberwein, D. J.; Edelstein, M.; Frye, S. V.; Gampe Jr., R. T.; Griffin, R. J.; Harris, P. A.; Hassell, A. M.; Holmes, W. D.; Hunter, R. N.; Knick, V. B.; Lackey, K.; Lovejoy, B.; Luzzio, M. J.; Murray, D.; Parker, P.; Rocque, W. J.; Shewchuk, L.; Veal, J. M.; Walker, D. H.; Kuyper, L. F.; *Science* **2001**, *291*, 134.
54. Uehara, Y.; Murakami, Y.; Mizuno, S.; Kawai, S.; *Virology* **1985**, *164*, 294.
55. Roe, S. M.; Prodromou, C.; O'Brien, R.; Ladbury, J. E.; Piper, P. W.; Pearl, L. H.; *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 260.
56. Murakami, Y.; Mizuno, S.; Uehara, Y.; *Biochem. J.* **1994**, *301*, 63.
57. Baselga, J.; Herbst, R.; LoRusso, P.; Rischin, D.; Ranson, M.; Plummer, R.; Raymond, E.; Maddox, A.-M.; Kaye, S.; Kieback, D.; Harris, A.; Ochs, J.; *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* **19**, **2000** (CA 686).
58. Peifer, C.; Krasowski, A.; Hammerle, N.; Kohlbacher, O.; Dannhardt G.; Totzke, F.; Schachtele, C.; Laufer, S.; *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7549.
59. Bianco, R.; Gelard, T.; Damiano, V.; Ciardiello, F.; Tortora, G.; *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*, 1416.
60. Mohammadi, M.; McMahon, G.; Sun, L.; Tang, C.; Hirth, P.; Yeh, B. K.; Hubbard, S. R.; Schlessinger, J.; *Science* **1997**, *276*, 955.
61. "Battling breast cancer"; *Chem. Eng. News* **2006**, *84* (32), 21.
62. Mastalerz, H.; Chang, M.; Gavai, A.; Johnson, W.; Langley, D.; Lee, F. Y.; Marathe, P.; Mathur, A.; Oppenheimer, S.; Tarrant, J.; Tokarski, J. S.; Vite, G. D.; Vyas, D. M.; Wong, H.; Wong, T. W.; Zhang, H.; Zhang, G.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2828.
63. Daniel, H. A.; Tapang, P.; Magoc, T. J.; Pease, L. J.; Reuter, D. R.; Wei, R.-Q.; Li, J.; Guo, J.; Bousquet, P. F.; Ghoreish-Haack, N. S.; Wang, B.; Bukofzer, G. T.; Wang, Y.-C.; Stavropoulos, J. A.; Hartandi, K.; Niquette, A. L.; Soni, N.; Johnson, E. F.; McCall, J. O.; Bouska, J. J.; Luo, Y.; Donawho, C. K.; Dai, Y.; Marcotte, P. A.; Glaser, K. B.; Michaelides, M. R.; Davidsen, S. K.; *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 995.
64. Akritopoulou-Zanze, I.; Albert, D. A.; Bousquet, G. A. C.; Harris, C. M.; Moskey, M.; Dinges, J.; Stewart, K. D.; Sowin T. J.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3136.
65. Buschbeck, M.; Hofbauer, S.; Di Croce, L.; Keri, G.; Ullrich A.; *EMBO Rep.* **2005**, *6*, 63.
66. Mcwhirter, J. R.; Galasso, D. L.; Wang, J. Y.; *J. Mol. Cell. Biol.* **1993**, *13*, 7587.
67. Zimmermann, J.; Buchdunger, E.; Mett, H.; Meyer, T.; Lydon, N. B.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 187.
68. Druker, B. J.; Sawyers, C. L.; Kantarjian, H.; Resta, D. J.; Reese, S. F.; Ford, J. M.; Capdeville, R.; Talpaz, M.; *N. Engl. J. Med.* **2001**, *344*, 1038; Heinrich, M. C.; Griffith, D. J.; Druker, B. J.; Wait, C. L.; Ott, K. A.; Ziegler, A. J.; *Blood* **2000**, *96*, 925.
69. Schindler, T.; Bornmann, W.; Pellicena, P.; Miller, W. T.; Clarkson, B.; Kuriyan, J.; *Science* **2000**, *289*, 1938.
70. Warmuth, M.; Simon, N.; Mitina, O.; Mathes, R.; Fabbro, D.; Manley, P. W.; *Blood* **2003**, *101*, 664.
71. Jin, H.; Wu, T.; Jiang, Y.; Zhuang, N.; Mao, X.; Yu, Q.; *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* **2007**, *809*, 21.
72. Radzicka, A.; Wolfenden, R.; *Methods Enzymol.* **1995**, *249*, 284.
73. Kruse, C. H.; Holden, K. G.; Pritchard, M. L.; Field, J. A.; Rieman, D. J.; Greig, R. G.; Poste, G.; *J. Med. Chem.* **1998**, *31*, 1762.
74. Loog, M.; Uri, A.; Raidaru, G.; Jär, J.; Ek, P.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1447.
75. Profit, A. A.; Lee, T. R.; Lawrence, D. S.; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 280.
76. Parang, K.; Till, J. H.; Ablooglu, A. J.; Kohanski, R. A.; Hubbard, S. R.; Cole, P. A.; *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 37.
77. Wolin, R. L.; Bembenek, S. D.; Wei, J.; Crawford, S.; Lundeen, K.; Brunmark, A.; Karlsson, L.; Edwards, J. P.; Blevitt, J. M.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2825.
78. Smith, C. M.; Shindyalov, I. N.; Veretnik, S.; Gribskov, M.; Taylor, S. S.; Eyck, L. F.; Bourne, P. E.; *Trends Biochem. Sci.* **1997**, *22*, 444.