

**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Farmácia**



**Cinases... duas décadas passaram após a  
descoberta do imatinib: progresso e  
direções futuras**

**Fátima Mónica Spínola Carvalho**

Monografia orientada pela Professora Doutora Rita Alexandra do  
Nascimento Cardoso Guedes, Professora Associada

**Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas**

**2022**



**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Farmácia**



**Cinases... duas décadas passaram após a  
descoberta do imatinib: progresso e  
direções futuras**

**Fátima Mónica Spínola Carvalho**

**Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas  
apresentado à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

Monografia orientada pela Professora Doutora Rita Alexandra do  
Nascimento Cardoso Guedes, Professora Associada

**2022**



# Resumo

Dados da Organização Mundial de Saúde mostram que o cancro é ainda uma das principais causas de morte em todo o mundo. O constante avanço na medicina possibilitou a identificação de alvos moleculares responsáveis pela fisiopatologia de doenças, nomeadamente o cancro. A tumorigénese resulta da desregulação de mecanismos fundamentais para o controlo da sobrevivência, crescimento e proliferação celulares. As proteínas cinase representam uma das mais importantes famílias de proteínas no genoma humano e são responsáveis pela regulação de um grande número de vias de transdução de sinal nas células. Estas são um grupo amplo de enzimas que incluem diferentes famílias. A sobreexpressão ou mutação de algumas proteínas cinase faz com que sejam enviados à célula sinais que, por sua vez, provocam comportamentos anormais, como a proliferação celular desordenada e a inibição da apoptose.

O interesse da indústria farmacêutica pela investigação de tratamentos de precisão que envolvam a inibição específica de cinases aumentou consideravelmente nos últimos anos, devido ao grande sucesso comercial do imatinib, aprovado pela FDA, em 2001. A terapia dirigida contra cinases é baseada no uso de pequenas moléculas inibidoras de cinases ou de anticorpos monoclonais. O conhecimento da estrutura da proteína cinase é a chave para o sucesso do desenvolvimento de novos fármacos, identificando-se as características necessárias para a ligação dos inibidores ao sítio catalítico e aos domínios alostéricos.

Desde 2001, já foram aprovados mais de 100 fármacos inibidores de cinases, em todo o mundo. Este número está em crescimento exponencial. O seu impacto clínico é visível, principalmente, no tratamento de diversos cancros, incluindo leucemia mieloide crónica, carcinoma do pulmão de não pequenas células, cancro da mama e melanoma. No entanto, poucos foram aprovados até agora para o tratamento de outras doenças.

Um dos maiores obstáculos ao tratamento oncológico é a resistência, sendo por isso necessário o desenvolvimento de novas gerações de fármacos que demonstrem uma maior seletividade e eficácia.

Desta forma, este trabalho consiste numa revisão de algumas famílias de cinases e do progresso a nível da investigação dos inibidores de cinases durante as últimas duas décadas, expondo perspetivas futuras.

**Palavras-chave:** Cinase; Cancro; Domínio catalítico; Inibidores de cinases; Anticorpos monoclonais; Resistência

# Abstract

Data from the World Health Organization show that cancer is still one of the leading causes of death worldwide. The progress in medicine made possible the identification of molecular targets responsible for the pathology of diseases, such as cancer. Cancer is driven by mechanisms of deregulation that control cellular survival and growth. Kinases are at the core of many signal transduction pathways. Protein kinases represent one of the most important families of proteins in the human genome and are responsible for numerous impairments in signal transduction. These are a broad group of enzymes that include different families. The overexpression or alteration of some kinases results in cellular signal transduction which promotes cellular proliferation and inhibits apoptosis.

The significant interest in precision therapy involving inhibition of kinases across the pharmaceutical industry has grown to be one of the most important drug targets over the past years. Starting with the approval of imatinib in 2001. The two main approaches are small-molecule kinase inhibitors and monoclonal antibodies. From knowledge of the structure of the protein kinase, we can identify the characteristics necessary for successful binding inhibitors to the catalytic and allosteric domains.

Since 2001, more than 100 kinase target drugs have been approved worldwide. This number is growing exponentially. The clinical impact is mainly visible in the treatment of various cancers, including chronic myeloid leukemia, non-small cell lung cancer, breast cancer, and melanoma. However, few have been approved so far to treat diseases other than cancer.

Drug resistance in kinases remains an obstacle to be addressed, a promising approach relies on developing the next generation of drugs with enhanced selectivity and efficiency.

Here, a review of some kinase families and the progress made over the past two decades in kinase target drug development, as well as of future perspectives is carried out.

**Keywords:** Kinase; Cancer; Catalytic domain; Kinase inhibitors; Monoclonal antibodies; Resistance

# Agradecimentos

Ao fim destes cinco anos, chega ao momento de agradecer a todos aqueles que fizeram parte do meu percurso académico.

À Professora Doutora Rita Guedes pela sua orientação e partilha de conhecimento na realização desta monografia.

À Dra. Joana agradeço a maneira como me integrou, a paciência e a cooperação no desenvolvimento de competências durante o estágio.

Aos meu pais e irmão pela força e motivação que me deram ao longo destes anos, sem eles não era possível.

Agradeço a todos os meus amigos que pela sua presença tornaram esta caminhada mais suportável e venturosa.

# Abreviaturas

ABL – *Abelson leukemia*

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AGC – Proteínas cinases das famílias PKA, PKG e PKC

AIM – Autorização de introdução no mercado

AKT ou PKB – Cinase AKT ou Proteína cinase B

ALK – Cinase do linfoma anaplásico

aPK – *atypical Protein kinase*

ARAF – *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog A*

ATP – Adenosina trifosfato

BCR-ABL – *Breakpoint cluster region-Abelson leukemia*

BHC – Barreira hematoencefálica

BRAF – *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*

CAMK – Cinases dependentes de cálcio/calmodulina

CCR – Carcinoma de células renais

CDK – Cinase dependente de ciclina

CK1 – Caseína cinase 1

CK2 – Caseína cinase 2

CMGC – Proteínas cinases das famílias CDK, MAPK, GSK e CK2

CPNPC – Carcinoma do pulmão de não pequenas células

CRAF – *Normal cellular homologs of v-Raf*

EGF – Fator de crescimento epitelial

EMA – *European Medicines Agency*

ePK – *eukaryotic Protein kinase*

ERK – Proteína cinase regulada por sinal extracelular

FDA – *Food and Drug Administration*

GIST – Tumores do estroma gastrointestinal

GSK – Cinase glicogénio-sintase

HER/ErbB – Recetores do fator de crescimento epitelial humano

HES – Síndrome hipereosinofílica

HRAS – Proteína cinase da família do sarcoma de rato Harvey



JAK – Janus cinase

KIT – Recetor do fator de crescimento de células estaminais

KLIFS – *Kinase-Ligand Interaction Fingerprint and Structure*

KRAS – Proteína cinase da família do sarcoma de rato Kirsten

LLA – Leucemia linfoblástica aguda

LMC – Leucemia mieloide crónica

mAb – Anticorpo monoclonal

MAPK– Proteína cinase ativada por mitogénio

MEK ou MAP2K – Proteína cinase que fosforiliza a MAPK/ERK

MET – *Mesenchymal-epithelial transition factor*

mTOR – Proteína alvo da rapamicina nos mamíferos

NCCN – *National Comprehensive Cancer Network*

NGS – *Next Generation Sequencing*

NRAS – Proteína cinase da família do sarcoma de rato identificada em células de neuroblastoma

NRTK – Proteína não recetora de tirosina cinase

OH – Hidroxilo

PDB – *Protein Data Bank*

PDGFR – Recetor do fator de crescimento derivado de plaquetas

PH – Cromossoma filadélfia

PI3K – *Phosphoinositide 3-kinase*

PKA ou PKAc – Proteína cinase A ou Proteína cinase dependente do AMP cíclico

PKC – Proteína cinase C

PKG – Proteína cinase G

PIKK – *Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase*

RAF – Proteínas cinase da família do fibrossarcoma acelerado

RAS – Proteínas cinase da família do sarcoma de rato

RET – Recetor do fator neurotrófico derivado de células gliais

RGC – Recetor de guanilil-ciclase

ROCK – Proteína cinase dependente da RhoA/Rho

ROS – *Reactive oxygen species*

RTK – Recetor de tirosina cinase  
SRC – Proteína cinase da família do sarcoma de Rous  
STAT – *Signal transducer and activator of transcription*  
STE – Cinases da cascata de ativação MAPK  
STK – Serina/treonina cinase  
STKI – Inibidor de serina/treonina cinases  
TGF- $\alpha$  – Fator de transformação de crescimento alfa  
TK – Tirosina cinase  
TKI – Inibidor de tirosina cinases  
TKL – Tirosina cinase-*like*  
VEGFR – Recetor do fator de crescimento endotelial vascular

## Índice:

1	Introdução .....	14
2	Famílias de cinases.....	18
2.1	Recetores de tirosina cinase .....	19
2.1.1	Recetores do fator de crescimento epitelial humano .....	20
2.2	Proteínas não recetoras de tirosina cinase .....	23
2.2.1	Cinase <i>Abelson leukemia</i> .....	23
2.2.2	Janus Cinases .....	25
3	Modulação das cinases .....	28
3.1	Estrutura do domínio catalítico .....	29
3.2	Estratégias de inibição das cinases.....	30
4	Fármacos aprovados.....	37
5	Impacto Clínico.....	41
6	Resistência aos inibidores de cinases .....	44
6.1	Mutações secundárias na cinase.....	44
6.2	Ativação de vias secundárias alternativas .....	46
7	Conclusões e direções futuras .....	48
	Referências Bibliográficas .....	51
	Anexos .....	57
A1.	Fármacos Aprovados.....	57

## Índice de Figuras:

Figura 1	Fosforilação de uma Proteína Cinase .....	14
Figura 2	Estrutura cristalográfica do domínio cinase de PKA (PDB ID:2CPK).....	15
Figura 3	Estrutura química do Imatinib .....	16
Figura 4	Mecanismo de inibição do Imatinib .....	16
Figura 5	Processo de ativação dos RTKs .....	19
Figura 6	Vias de sinalização MAPK e PI3K.....	20
Figura 7	Domínios funcionais das proteínas da família ErbB .....	21
Figura 8	Estrutura cristalográfica do dímero EGF/EGFR (PDB ID:1IVO).....	22
Figura 9	Estrutura cristalográfica do domínio cinase do EGFR (PDB ID:3VJO).....	22
Figura 10	Estrutura cristalográfica do domínio cinase do HER2 (PDB ID:3PP0) .....	23

Figura 11 Domínios funcionais da proteína BCR-ABL.....	24
Figura 12 Estrutura cristalográfica dos domínios SH1, SH2 e SH3 da ABL (PDB ID:2FO0).....	25
Figura 13 Domínios funcionais da família de proteínas JAK.....	26
Figura 14 Estrutura cristalográfica do domínio cinase da JAK1 (PDB ID:3EYG) .....	26
Figura 15 Sinalização de citocinas através da via JAK/STAT .....	27
Figura 16 Visão geral do sítio de ligação do ATP da cinase PKA (PDB ID:1ATP)...	30
Figura 17 Estrutura química do Sorafenib .....	31
Figura 18 Estrutura química do Sunitinib .....	31
Figura 19 Estrutura cristalográfica do VEGFR2 ligado ao Sorafenib (PDB ID:4ASD) .....	31
Figura 20 Estrutura cristalográfica do VEGFR2 ligado ao Sunitinib (PDB ID:4AGD) .....	31
Figura 21 Estrutura química do Gefitinib .....	33
Figura 22 Estrutura cristalográfica do EGFR ligado ao Gefitinib (PDB ID:2ITY) <b>Erro! Marcador não definido.</b>	
Figura 23 Estrutura cristalográfica da ABL ligada ao Imatinib (PDB ID:1IEP).....	33
Figura 24 Estrutura química do Dabrafenib.....	34
Figura 25 Estrutura cristalográfica do BRAF-V600E ligado ao Dabrafenib (PDB ID:4XV2) .....	34
Figura 26 Estrutura química do Cobimetinib.....	35
Figura 27 Estrutura cristalográfica da MEK1 ligado ao Cobimetinib (PDB ID:4AN2) .....	35
Figura 28 Estrutura química do Asciminib .....	35
Figura 29 Estrutura cristalográfica de ABL ligado ao Nilotinib e ao Asciminib (PDB ID:5MO4).....	35
Figura 30 Estrutura química do Osimertinib.....	36
Figura 31 Estrutura cristalográfica do EGFR ligado ao Osimertinib (PDB ID:4ZAU) .....	36
Figura 32 Linha do tempo com aprovações de inibidores de cinases relevantes, adaptado de (2,13).....	40
Figura 33 Estrutura cristalográfica de BCR-ABL ligado ao Ponatinib (PDB ID:3OXZ) .....	45
Figura 34 Estrutura cristalográfica de BCR-ABL T315I ligado ao Ponatinib (PDB ID:3IK3).....	45

Figura 35 Estrutura química do Ponatinib .....	45
--	----

**Índice de Tabelas:**

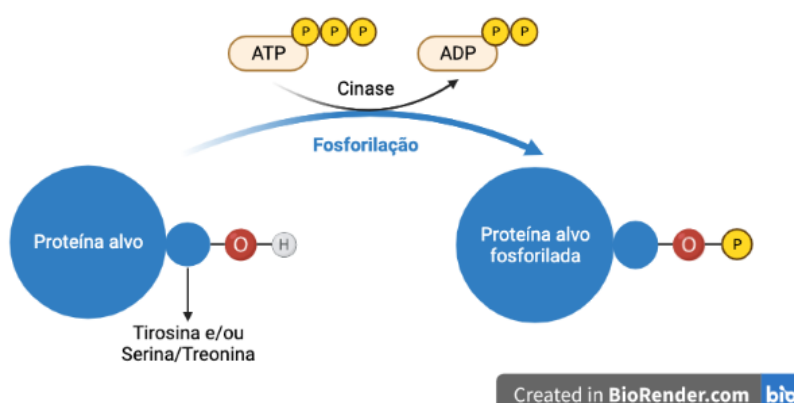
Tabela 1 Classificação das Famílias de Cinases .....	18
--	----

Tabela 2 Classificação dos Inibidores de Cinases, adaptado de (10,47,48).....	32
---	----

# 1 Introdução

Nas últimas décadas a melhor compreensão dos mecanismos moleculares ajudou à identificação de enzimas que podem ter responsabilidade na fisiopatologia do cancro e de outras doenças. O crescente conhecimento na área da biologia molecular originou a identificação de mutações com potencial de modificar a atividade de cinases responsáveis pela fisiopatologia de várias doenças, identificando a família das cinases como importantes alvos terapêuticos. Esta evolução serviu de impulso para um maior investimento da indústria farmacêutica na descoberta de novos fármacos inibidores de cinases.

As proteínas cinases são responsáveis pela regulação de um grande número de vias de transdução de sinal nas células, através da fosforilação de resíduos de serina, treonina ou tirosina. Estas enzimas catalisam a transferência reversível de um grupo  $\gamma$ -fosfato de uma molécula de adenosina trifosfato (ATP) para proteínas ou pequenas moléculas, por exemplo lípidos, o que inicia uma alteração da sua atividade (figura 1). A fosforilação acontece devido à ligação específica do fosfato ao grupo aceitador dos aminoácidos tirosina e/ou serina/treonina, o grupo hidroxilo (OH). A transferência do grupo fosfato pela cinase necessita de um ião metálico divalente ( $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ ) (1).



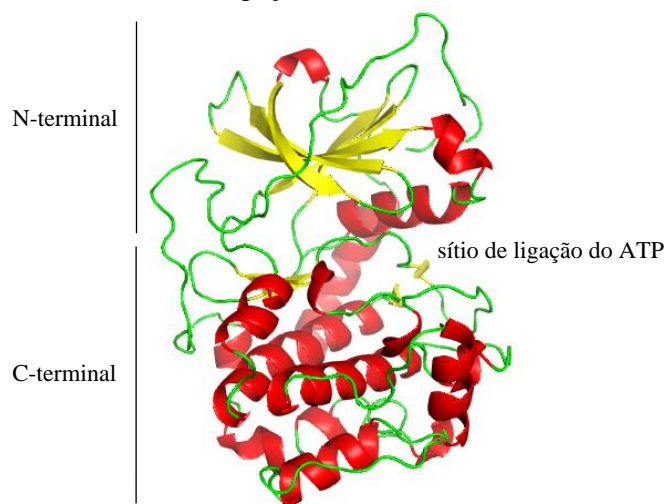
**Figura 1 Fosforilação de uma Proteína Cinase**

As cinases são moléculas sinalizadoras, funcionam como um comando das células, quando há fosforilação a célula “liga” e produz uma resposta. As cinases têm um papel fundamental em diferentes funções celulares como sinalização, proliferação e sobrevivência celular, angiogénese (processo de formação de novos vasos sanguíneos), apoptose (morte programada), regulação de reações metabólicas e transporte membranar, ou seja, na maioria dos processos celulares. De acordo com os últimos dados, o “Kinoma” humano tem ~538 genes de proteínas, que estão subdivididos em famílias típicas e famílias atípicas de cinases (2–5).

As mutações genéticas específicas (mutações *driver*) e a alteração na atividade das cinases provocam, por vezes, comportamentos anormais nas células como a alteração

do seu crescimento, divisão, reparação e interação com outras células, levando à proliferação celular desordenada e deixando de responder à apoptose. A sua desregulação relaciona-se com a progressão de doenças como cancro, doenças imunológicas, principalmente doenças autoimunes e inflamatórias, neurológicas, alérgicas e hematológicas (2).

No início dos anos 80, muitas cinases foram descobertas, porém o passar dos anos revelou que estas eram apenas a "ponta do iceberg". A primeira estrutura completamente resolvida de uma proteína cinase ativa foi a da proteína cinase A (PKA), também chamada de proteína cinase dependente do AMP cíclico (PKAc), cuja estrutura catalítica é muito conservada. A estrutura da PKA (figura 2) descrita por Knighton *et al.* (6) revelou um arranjo bilobado, incluindo um lóbulo N-terminal menor, contendo cinco folhas  $\beta$  (amarelas), uma  $\alpha$ -hélice reguladora conservada, bem como um lóbulo C-terminal constituído principalmente por  $\alpha$ -hélices (vermelhas). A estrutura encontrada evidenciou o sítio de ligação do ATP localizado entre os dois lóbulos (7).

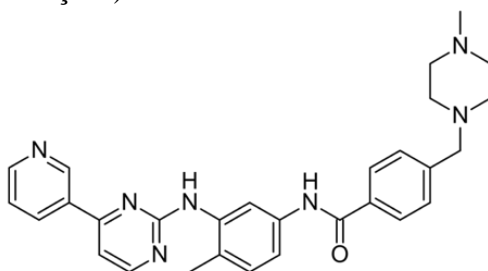


**Figura 2 Estrutura cristalográfica do domínio cinase de PKA (PDB ID:2CPK)**

Atualmente, existem cerca de 6017 estruturas cristalográficas correspondentes a 314 diferentes cinases, publicadas no PDB (*Protein Data Bank*) e KLIFS (*Kinase-Ligand Interaction Fingerprint and Structure*) (8,9). A base de dados KLIFS divulga interações entre cinases e ligandos, oferecendo informação valiosa sobre os resíduos responsáveis pela ligação de inibidores de cinases. Esta informação proporciona o melhor reconhecimento de interações fármaco-enzima.

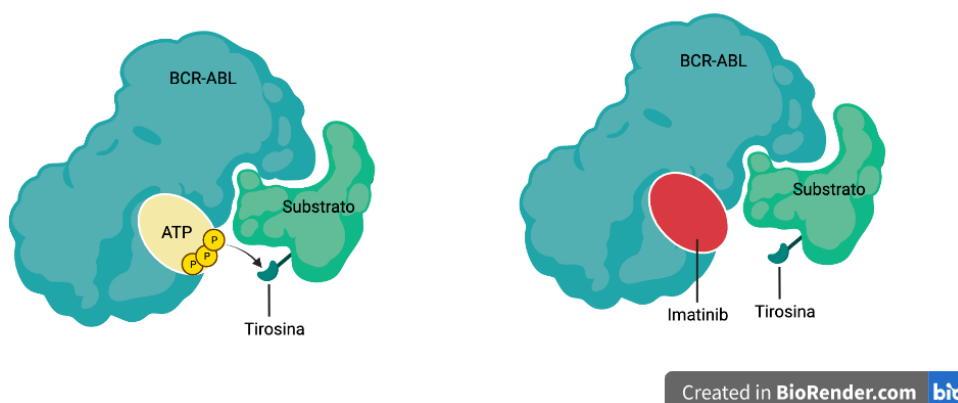
A regulação das cinases já provou ser um alvo importante no desenvolvimento de novas formas de tratamento. Em 2001, a aprovação do fármaco imatinib (Gleevec ou Glivec®, da Novartis) (figura 3) pela *Food and Drug Administration* (FDA), o primeiro inibidor desenvolvido racionalmente para inibir uma tirosina cinase (*Abelson leukemia*, ABL) e com grande sucesso comercial, demonstrou o potencial da terapia direcionada tendo como alvo as cinases. Quando entrou no mercado, este fármaco obteve excelentes resultados, como o aumento da taxa de sobrevivência dos doentes com leucemia

mieloide crônica (LMC), tumores gastrointestinais e noutras doenças malignas (envolvendo sobretudo mutações).



**Figura 3 Estrutura química do Imatinib**

O sucesso do imatinib deve-se sobretudo à sua “falta de seletividade”. A polifarmacologia do imatinib permitiu a sua utilização noutras indicações além da LMC, incluindo tumores do estroma gastrointestinal (GIST), síndrome hipereosinofílica (HES), entre outras. O imatinib exerce a sua atividade inibitória bloqueando a ligação do ATP ao sítio catalítico da proteína alterada BCR-ABL (*breakpoint cluster region-abelson leukemia*) que desregula o funcionamento da célula, tornando-a cancerígena. O mecanismo de inibição do imatinib está representado na figura 4.



**Figura 4 Mecanismo de inibição do Imatinib**

A toxicidade, a resistência e a elevada probabilidade de recidiva aos tratamentos mais comuns, como a quimioterapia e imunoterapia, aumentou o interesse numa nova forma de tratamento com alvos específicos. A terapia direcionada às cinases tem o objetivo de bloquear o crescimento e a propagação de células malignas sem causar a destruição das células saudáveis (10). Esta forma de abordar o tratamento é revolucionária na terapia contra o cancro. A afinidade dos fármacos para as células tumorais aumenta a sua eficácia e diminui os seus efeitos adversos, o que possivelmente aumenta a sua segurança.

O papel das cinases na regulação das funções celulares não está ainda completamente compreendido, e espera-se que nos próximos anos cada vez mais cinases irão surgir como alvos terapêuticos, com potencial para o desenvolvimento de novos inibidores. Um dos problemas dos inibidores de cinases é a resistência adquirida aos fármacos das



primeiras gerações, sendo, portanto, o desenvolvimento de novas gerações crítico. A cura ainda está longe, mas esta forma de tratamento poderá estar um passo à frente do cancro e mudar a perspetiva de doença terminal para doença crónica, aumentando a esperança média de vida dos doentes, assim como, a sua qualidade de vida.

## 2 Famílias de cinases

As proteínas cinases humanas são um grupo amplo de enzimas que incluem 518 diferentes famílias, ou 538 quando as cinases atípicas são consideradas (11,12). As famílias de cinases podem ser subdivididas em eucariotas convencionais (*eukaryotic Protein kinase* ou ePK) ou atípicas (*atypical Protein kinase* ou aPK). As proteínas cinase eucariotas são um grupo de enzimas em que a natureza do grupo OH fosforilado pode ter origem numa cadeia lateral fenólica ou alcoólica, sendo divididas nas classes tirosina cinases (TKs) e serina/treonina cinases (STKs), respetivamente. As TKs são divididas em dois tipos de proteínas: as recetoras (RTK) e as não recetoras (NRTK). As STKs são um grupo mais heterogéneo. As proteínas cinases de dupla especificidade chamam-se híbridas pois catalisam a fosforilação de ambas as classes, por exemplo, a família MEK que fosforiliza resíduos de tirosina e treonina (1,2,13).

As famílias de cinases podem ser classificadas (tabela 1) pela comparação da sequência de aminoácidos e estrutura conservada do domínio catalítico, incluindo: AGC (proteína cinase A ou PKA, proteína cinase G ou PKG, e proteína cinase C ou PKC), CAMK (cinases dependentes de cálcio/calmodulina), CK1 (caseína cinase 1), CMGC (cinase dependente de ciclina ou CDK, proteína cinase ativada por mitogénio ou MAPK, cinase glicogénio-sintase ou GSK e caseína cinase 2 ou CK2), STE (cinases da cascata de ativação MAPK), TK (tirosina cinases), TKL (tirosina cinase-like) e RGC (recetor de guanilil-ciclase) (14). Existe ainda um outro grupo que inclui todas as cinases que não se conseguem integrar na classificação dos grupos anteriores.

**Tabela 1 Classificação das Famílias de Cinases**

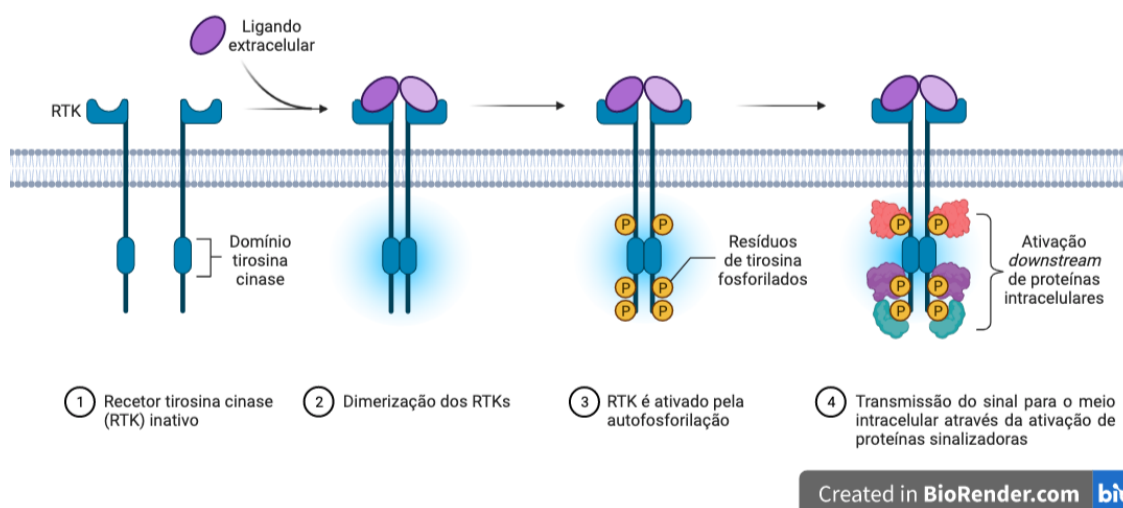
Superfamília	Grupo	Famílias
Proteínas cinases eucariotas	AGC	PDK, AKT/PKB, SGK, PKA, PKC, PKG, DMPK, GRK
	CAMK	CAMK1, CAMK2, CAMK3, CAMK4, CAMK5
	CK1	TTBK, CK1, VRK
	CMGC	CDK, MAPK, CDKL, CLK, RCK, GSK
	STE	STE7/MEK/MAP2K, STE11/MAP3K, STE20/MAP4K
	TK	ALK/LTK, CSF-1R, EGFR/HER, FGFR, FLT3, PDGFR, RET, TRK, VEGFR, HGFR, NGFR, MET, KIT, IGF1R, DDR, EPH, INSR, ABL, ACK, AXL, CSK, FES, FAK, JAK, SYK, MET, ROR, SRC, SYK, TEC, TIE, TRK
	TKL	RAF, MLK
	RGC	
	Outras	AUR, MOS
Proteínas cinases atípicas	PIKK	mTOR

As proteínas cinases atípicas não partilham sequências com clara semelhança às ePKs, no entanto, apresentam atividade catalítica equivalente às cinases (15). Dentro deste grupo, a família mais estudada é a proteína alvo da rapamicina nos mamíferos (mTOR), pertencente ao grupo *phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase* (PIKK) (16).

As famílias de cinases são um grupo de proteínas muito vasto, há imensos exemplos de cinases estudadas como alvos terapêuticos, sendo as TKs mais documentadas e exploradas, de modo que surgiram inúmeros inibidores, exemplificativamente, dos seguintes alvos: recetores da família HER/ErbB (Recetores do fator de crescimento epitelial humano) e proteínas não recetoras ABL e JAK (Janus cinase). A escolha destas famílias teve em conta o número extenso de fármacos aprovados que inibem toda a família HER, para doentes com tumores sólidos, como o cancro do pulmão e da mama, e a família ABL, para o tratamento de doenças hematológicas. A inibição da família JAK tem sido outra estratégia popular para indicações não oncológicas.

## 2.1 Recetores de tirosina cinase

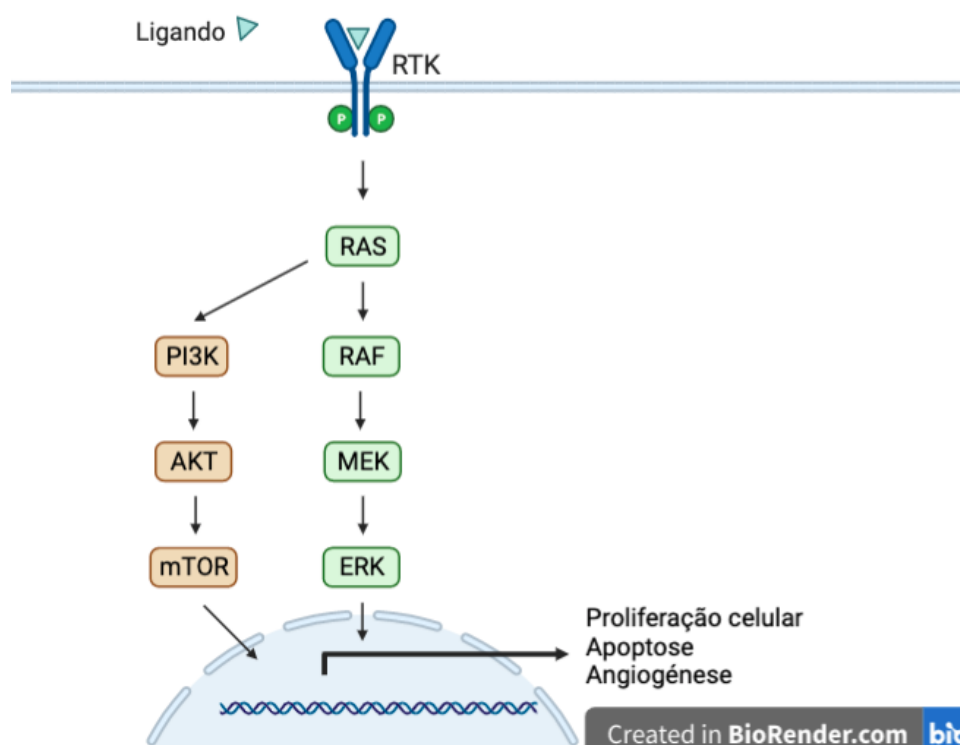
Os recetores de tirosina cinase (RTKs) apresentam uma estrutura com um domínio extracelular que contém uma região de ligação ao ligando, uma região transmembranar e uma região intracelular que contém o domínio tirosina cinase. Os membros da família dos RTKs são maioritariamente glicoproteínas monoméricas na sua forma inativa. Os RTKs traduzem o sinal de ativação de proteínas para o citoplasma pela ligação extracelular de ligandos como a insulina e fatores de crescimento, o que induz a interação recetor-recetor de estruturas idênticas (homodimerização ou heterodimerização) e a autofosforilação dos resíduos de tirosina. É importante referir que os processos chave são a ligação do ligando ao recetor, a dimerização do RTK e a fosforilação dos resíduos de tirosina (figura 5). Os resíduos de tirosina fosforilados geram uma ativação *downstream* das cascatas RAS/RAF/MEK/ERK ou MAPK e PI3K/AKT/mTOR ou PI3K (17–19).



**Figura 5** Processo de ativação dos RTKs

A dimerização dos RTKs levam à ativação das proteínas intracelulares da família do sarcoma de rato (RAS) como NRAS, KRAS e HRAS, esta ativa as proteínas STKs da família do fibrossarcoma acelerado (RAF) como ARAF, BRAF e CRAF, iniciando-se, assim uma cascata de fosforilação das proteínas MAPK (MEK e ERK). A ERK é

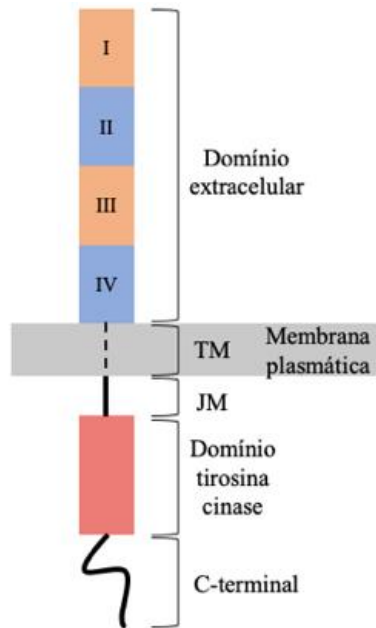
responsável pela transdução de sinal, contribuindo para a expressão de genes relacionados com a vascularização, invasão e metastização do tumor. Uma das vias de sinalização também muito frequente é a sinalização da via PI3K pela proteína RAS responsável pela homeostasia celular (20). Estes funcionam como segundos mensageiros ativados por um processo de fosforilação em cadeia, percursores da transmissão do sinal do meio extracelular para o meio intracelular até ao núcleo (figura 6).



**Figura 6 Vias de sinalização MAPK e PI3K**

### 2.1.1 Recetores do fator de crescimento epitelial humano

A família HER/ErbB consiste em quatro recetores de tirosina cinase, incluindo HER1 (EGFR, ErbB1), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) e HER4 (ErbB4). Todos os membros da família partilham uma estrutura genérica de uma glicoproteína membranar. A sua estrutura (figura 7) consiste numa região extracelular onde ocorre a ligação do fator de crescimento, uma  $\alpha$ -hélice transmembranar (TM) que une as regiões extra e intracelulares do recetor e uma região intracelular (19,21,22). A região extracelular está dividida em quatro subdomínios, os domínios I (L1) e III (L2) ricos em leucina e responsáveis pela ligação do ligando, e os domínios II (CR1) e IV (CR2) ricos em cisteína, o domínio II é responsável pela interação recetor-recetor. A região TM é móvel e influencia a estabilidade de algumas conformações. A região intracelular contém um domínio justamembrana (JM), um domínio tirosina cinase e uma cauda terminal carboxílica (C-terminal). O domínio JM é flexível e tem responsabilidade na dimerização e ativação das cinases.

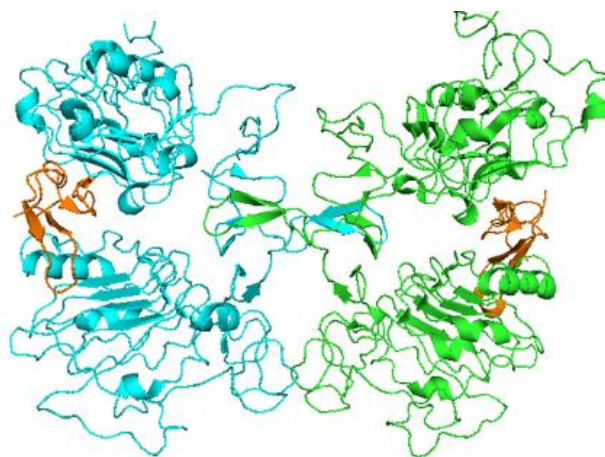


**Figura 7 Domínios funcionais das proteínas da família ErbB**

A forma ativa das cinases da família ErbB é um homodímero ou heterodímero formado com um recetor diferente da família, preferencialmente o HER2, proporcionando amplificação e diversificação de vias de sinalização (23). As cinases desta família desempenham um papel fundamental na regulação do crescimento, diferenciação e sobrevivência de células epiteliais, mesenquimais, neuronais e dos seus precursores indiferenciados (24). As cinases EGFR e HER2 são as mais conhecidas, devido ao seu papel no desenvolvimento de alguns tipos de cancro, o EGFR no carcinoma do pulmão de não pequenas células (CPNPC) e o HER2 no cancro da mama.

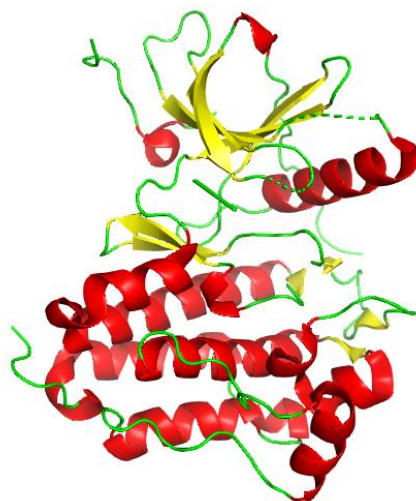
O gene EGFR localizado no cromossoma 7p13 contém 28 exões, codifica uma glicoproteína da membrana plasmática com 1210 aminoácidos, com aproximadamente 134 kDa (19). A dimerização do EGFR é estimulada por ligandos extracelulares como o fator de crescimento epitelial (EGF) e o fator de transformação de crescimento alfa (TGF- $\alpha$ ) no domínio extracelular, que levam à ativação da atividade catalítica da cinase, incluindo a ativação *downstream* de proteínas intracelulares.

Na figura 8 está ilustrado o complexo ligando-recetor (EGF/EGFR), os domínios I, II e III da região extracelular estão organizados na forma de um C e o EGF (laranja) liga-se entre os domínios I e III. Dois EGFR (verde e azul) interagem entre os domínios II de cada recetor para formar a estrutura dimerizada (25,26). Este modelo de ativação da cinase pela ligação de um ligando é essencial para a compreensão do mecanismo de ação de anticorpos monoclonais dirigidos ao domínio extracelular destes recetores.



**Figura 8 Estrutura cristalográfica do dímero EGF/EGFR (PDB ID:1IVO)**

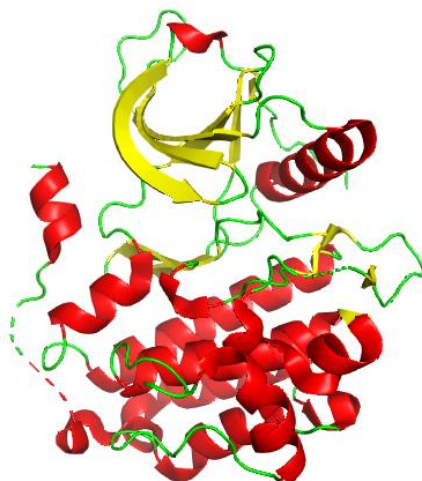
O domínio catalítico do EGFR (figura 9) é constituído por dois lóbulos, o N-terminal e o C-terminal (27). O lóbulo N-terminal consiste em cinco cadeias  $\beta$  (amarelas) e uma  $\alpha$ -hélice, o C-terminal consiste, maioritariamente em  $\alpha$ -hélices (vermelhas). O sítio de ligação do ATP está localizado entre os dois lóbulos.



**Figura 9 Estrutura cristalográfica do domínio cinase do EGFR (PDB ID:3VJO)**

Nos casos de CPNPC é comum encontrar mutações no EGFR. As mutações mais frequentes no domínio da tirosina cinase são a deleção dos aminoácidos leucina (L747), arginina (R748), ácido glutâmico (E749) e alanina (A750) no exão 19 (LREA) e a substituição no exão 21 (L858R), presentes em cerca de 45% e 40% dos doentes mutados, respetivamente (28). As mutações LREA e L858R são responsáveis pelo aumento da atividade da cinase e pela sua dimerização espontânea. Estas mutações desestabilizam a conformação do EGFR levando à autofosforilação da sua forma dimerizada, conseqüentemente, à ativação de cascatas de sinalização que inibem a apoptose, o que resulta num aumento da sobrevivência das células cancerígenas e na proliferação descontrolada das mesmas (19). A cascata de ativação MAPK é responsável pela ativação do ciclo celular no CPNPC. A cascata PI3K/AKT/mTOR é indiretamente ativada, causando a inibição da apoptose.

O HER2 é uma glicoproteína membrana com 1255 aminoácidos, com aproximadamente 138 kDa, com um domínio cinase estruturalmente idêntico ao EGFR (figura 10). O gene que codifica esta proteína localiza-se no cromossoma 17. O HER2 não é capaz de se ligar aos fatores de crescimento, uma vez que não é autônomo, necessita de outro membro da família HER/ErbB de modo a formar heterodímeros. Apesar de não se verificar especificidade de nenhum ligando para o recetor HER2, este é o parceiro preferencial de dimerização dos outros membros da família.



**Figura 10 Estrutura cristalográfica do domínio cinase do HER2 (PDB ID:3PP0)**

A amplificação do HER2 é observada em 20-30% dos câncros da mama agressivos, mas também, em vários outros tipos de cancro, como do estômago, dos ovários e da próstata. O número de cópias do gene aumenta e a sobreexpressão do HER2 resulta no desequilíbrio de muitos mecanismos celulares porque o número de recetores HER2 na célula cancerígena disponível para formar heterodímeros aumenta, podendo ativar a proliferação e sobrevivência celular e evitar a morte celular (29).

## **2.2 Proteínas não recetoras de tirosina cinase**

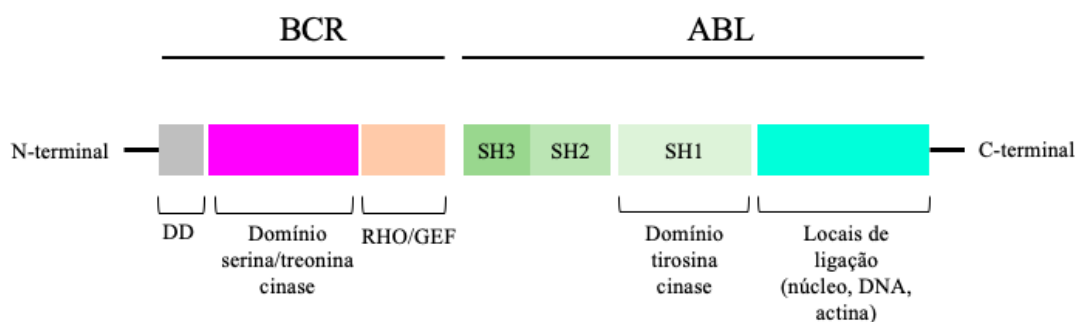
As proteínas não recetoras de tirosina cinase (NRTKs) fazem parte de cascatas de ativação desencadeadas por recetores de proteínas cinases ou outros recetores celulares. As NRTKs estão localizadas normalmente no citoplasma, possuem um domínio tirosina cinase e domínios onde se ligam proteínas, lípidos e o ácido desoxirribonucleico (ADN). As suas estruturas são muito diversas. As famílias mais comuns deste grupo de proteínas incluem: cinase ABL, proteína cinase da família do sarcoma de Rous (SRC), janus cinase (JAK), RAS e RAF.

### **2.2.1 Cinase *Abelson leukemia***

O gene BCR-ABL (*Breakpoint Cluster Region-Abelson Leukemia*) tem origem na translocação recíproca entre os cromossomas 9 e 22. A fusão dos genes BCR e ABL

formam o cromossoma Filadélfia (PH). Este gene mutante é responsável pela produção da proteína de fusão BCR-ABL, com atividade tirosina cinase, que contém o domínio N-terminal de BCR e o domínio C-terminal de ABL. As duas principais isoformas da proteína BCR-ABL são p210<sup>BCR-ABL</sup> e p190<sup>BCR-ABL</sup>, com peso molecular de 210kDa e 190 kDa, respetivamente, e função variável. A isoforma expressa pelo gene mutado depende do ponto de rutura do gene BCR, portanto diferem no tamanho deste, mas todas contêm os exões 2-11 do gene ABL. A isoforma mais frequente nos casos de LMC é a p210<sup>BCR-ABL</sup>, ocorre quando a região de quebra se localiza entre os exões 12 e 16 do gene BCR. A isoforma p190<sup>BCR-ABL</sup> está presente maioritariamente nos casos de leucemia linfoblástica aguda (LLA) e ocorre quando a região de quebra ocorre no exão 1 do gene BCR (30).

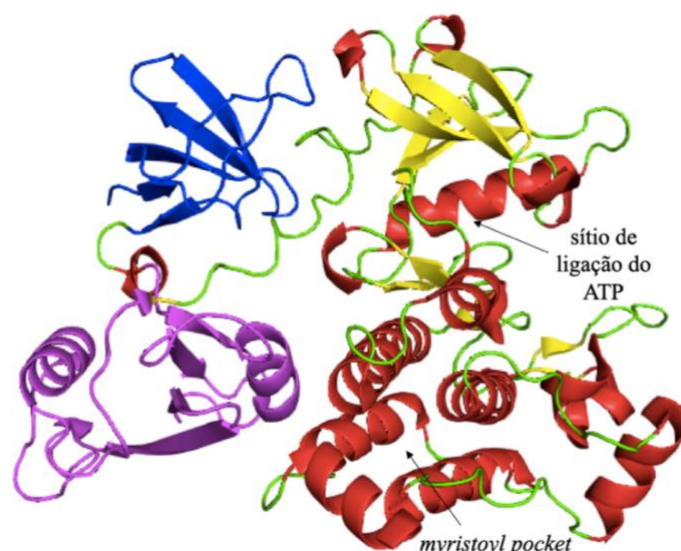
No N-terminal de BCR encontra-se o domínio de dimerização (DD), o domínio catalítico serina/treonina e o domínio de homologia do fator de troca de nucleótidos de guanina (RHO/GEF), com papel na ativação das proteínas da família RAS que é responsável pela ativação de fatores de transcrição. No C-terminal de ABL situam-se os domínios com homologia SRC (SH1-SH3), o domínio SH1 corresponde à tirosina cinase e os domínios SH2 e SH3 são reguladores e responsáveis pela interação com outras proteínas (figura 11). A estrutura da família ABL e SRC mostraram semelhança geral das estruturas reguladoras, mostrando a conservação dos domínios reguladores entre famílias. A maioria do lóbulo N-terminal da proteína ABL é removido pela fusão das proteínas BCR-ABL, incluindo o domínio *myristoyl*, como consequência a proteína perde a autorregulação negativa da atividade catalítica da cinase. Normalmente a fosforilação é controlada pela sequência reguladora do N-terminal de ABL que é substituída pela sequência de BCR na formação da proteína BCR-ABL, pelo que o domínio tirosina cinase é ativado, constitutivamente, por esta (31).



**Figura 11 Domínios funcionais da proteína BCR-ABL**

A estrutura da ABL (figura 12), da proteína de fusão BCR-ABL, revela os domínios SH2 (roxo) e SH3 (azul) responsáveis pela autorregulação da função catalítica, o domínio tirosina cinase. Na figura estão destacados o sítio de ligação do ATP entre os lóbulos N-terminal e C-terminal, e o *myristoyl pocket* no C-terminal (32,33).



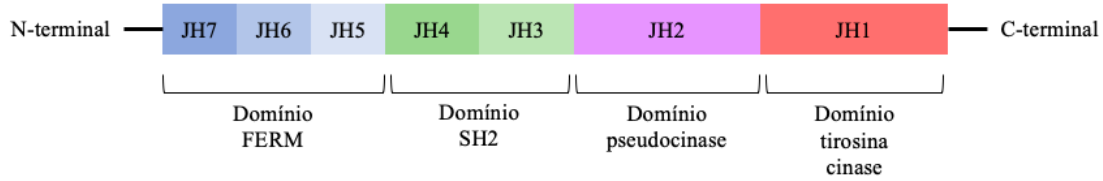


**Figura 12 Estrutura cristalográfica dos domínios SH1, SH2 e SH3 da ABL (PDB ID:2FO0)**

O cromossoma PH foi reconhecido na fisiopatologia da LMC e está presente em 15% dos doentes adultos diagnosticados com leucemia (34). A proteína BCR-ABL exibe uma atividade de tirosina cinase desregulada, sendo responsável pela inibição da apoptose e, conseqüentemente do aumento da proliferação e sobrevivência das células malignas. A proteína ABL é expressa nas células-tronco hematopoiéticas, no caso da LMC as células-tronco sofrem uma transformação maligna, causando sobreexpressão de granulócitos alterados, com vantagem proliferativa (35). Com base na importância do cromossoma PH e do gene BCR-ABL para a carcinogénese da LMC, o objetivo da investigação de novos fármacos é a terapia direcionada a células que contenham o transcrito BCR-ABL.

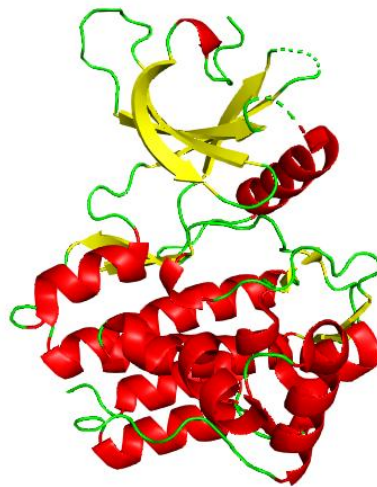
### 2.2.2 Janus Cinases

A família JAK inclui 4 membros JAK1, JAK2, JAK3 e TYK2. Esta possui ~1100 aminoácidos e a sua estrutura, única dentro da família de NRTKs, consiste em 7 domínios homólogos (JH1, JH2, JH3, JH4, JH5, JH6, JH7) (36). O centro ativo localiza-se no domínio cinase (JH1) do C-terminal. O domínio pseudocinase (JH2) regula a atividade da cinase através da sua interação com JH1, apesar de não ter atividade catalítica (37,38). No N-terminal encontra-se o domínio FERM, assim denominado devido à sua homologia com a família de proteínas ERM (ezrina, radixina e moesina), é responsável pela ligação ao domínio intracelular de proteínas recetoras de citocinas. Entre o domínio FERM e o domínio pseudocinase está o domínio com homologia SRC (SH2), também responsável pela ligação aos recetores de citocinas (Figura 13).



**Figura 13 Domínios funcionais da família de proteínas JAK**

A estrutura do domínio tirosina cinase da JAK (figura 14) contém um lóbulo N-terminal e um lóbulo C-terminal, tal como as outras cinases. Resumindo, contém um lóbulo N-terminal pequeno constituído por cinco folhas  $\beta$  (amarelas) e uma  $\alpha$ -hélice, e um lóbulo C-terminal maior constituído principalmente por  $\alpha$ -hélices (vermelhas). Entre os dois lóbulos encontra-se o sítio de ligação do ATP, um *pocket* hidrofóbico capaz de ligar-se à base da adenina (39).

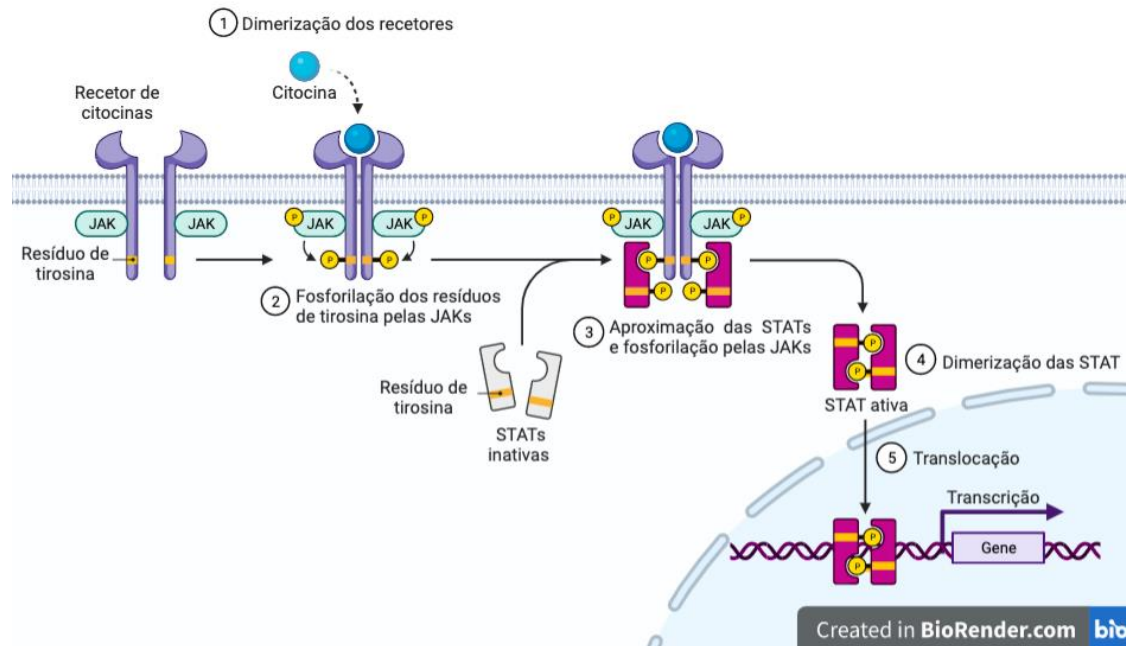


**Figura 14 Estrutura cristalográfica do domínio cinase da JAK1 (PDB ID:3EYG)**

Quando os recetores de citocinas são ativados pelos ligandos extracelulares sofrem dimerização, conseqüentemente, aproximam as JAK permitindo a fosforilação do domínio tirosina cinase das JAK e do próprio recetor. As JAK ligam-se à região intracelular dos recetores da membrana celular. Os resíduos de tirosina fosforilados da JAK possibilitam a ligação de um substrato, a proteína *signal transducer and activator of transcription* (STAT), permitindo a transferência do grupo fosfato para esta, sendo responsável pela sua dimerização. A proteína STAT dimerizada liga-se ao ADN no núcleo da célula, ativando, deste modo, a transcrição de genes que desempenham um papel fundamental na proliferação, diferenciação e apoptose (37).

A via JAK/STAT (Figura 15) está envolvida no crescimento, neurodesenvolvimento, hematopoiese e nas respostas inflamatórias e imunes. A existência de uma anomalia na proteína JAK poderá causar inflamação ou imunossupressão, na medida em que os principais processos estimulados por esta via são a sinalização e produção de citocinas pró-inflamatórias e de células do sistema imunitário. Sendo a família JAK uma família de proteínas intracelulares com responsabilidade na transdução do sinal de citocinas, uma estratégia promissora de tratamento tendo como alvo estas cinases pode ser

benéfico em doenças inflamatórias e autoimunes, incluindo artrite reumatoide, artrite psoriática, mielofibrose e colite ulcerosa.



**Figura 15 Sinalização de citocinas através da via JAK/STAT**

### 3 Modulação das cinases

As principais abordagens terapêuticas envolvidas na modulação das cinases são baseadas no uso de pequenas moléculas inibidoras de cinases (*small-molecule kinase inhibitors*), e anticorpos monoclonais (*monoclonal antibodies* ou mAbs). O baixo peso molecular das pequenas moléculas permite que atravessem a membrana plasmática. Em oposição, os mAbs só conseguem atuar no domínio extracelular de recetores membranares devido ao seu elevado peso molecular. Para além disso, as pequenas moléculas têm maior vantagem custo-eficácia e são de administração oral diária, enquanto que os mAbs têm uma semi-vida maior e são administrados principalmente por via intravenosa (40). A maioria dos inibidores de cinases são pequenas moléculas que inibem a atividade catalítica no domínio cinase através de moléculas ATP-miméticas ou alostéricas (10).

O desenvolvimento de inibidores de cinases é um grande desafio uma vez que um fármaco pode ter várias cinases como alvo, devido à conservação dos domínios cinase. Quando não se verifica especificidade a esperança do tratamento ser eficaz é normalmente menor. A melhor estratégia será encontrar inibidores de cinases que sejam específicos de um único alvo, de uma doença em particular.

A introdução de grandes bases de dados sobre as especificidades dos inibidores das proteínas cinase levou à descoberta de que muitas moléculas desenhadas para inibir apenas uma cinase em particular, também inibiam outras. A promiscuidade de algumas moléculas é uma vantagem, na medida que podem ser utilizadas em tipos diferentes de cancro, mesmo que originalmente a investigação se tenha focado num alvo específico. Por exemplo, a atividade do imatinib em várias cinases possibilitou a sua aplicação em diferentes indicações como LMC com translocação BCR-ABL, GIST com alteração do recetor do fator de crescimento de células estaminais (KIT) e HES com o recetor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) desregulado.

A polifarmacologia de um inibidor de cinase normalmente está associada à inibição de cinases que são estruturalmente muito semelhantes ou da mesma família, o que pode aumentar a eficácia do fármaco, mas também os efeitos adversos, em determinados casos. O fármaco afatinib inibe o EGFR e o HER2 no cancro do pulmão, este mecanismo de ação mais alargado poderia demonstrar maior eficácia, mas não existem dados que o comprovem (41). Porém, o tratamento com afatinib teve uma maior frequência de diarreia e erupção cutânea, quando comparado com o gefitinib. No entanto, estes efeitos adversos podem ser minimizados com uma redução da dose do afatinib, caso necessário (42).

Para além da especificidade, estas moléculas devem ter afinidade para se conseguirem ligar à cinase pelo maior período de tempo possível. Todas as cinases necessitam de ATP, sabendo que a ligação do ATP é imprescindível para o funcionamento das

proteínas, quando o sítio de ligação do ATP é bloqueado é promovida a forma inativa da enzima inviabilizando a fosforilação. O problema está na enorme quantidade de moléculas de ATP que competem com uma única molécula pelo sítio de ligação na cinase, para ultrapassar este desafio o fármaco deverá ter uma interação/ligação mais forte ao domínio cinase do que ao ATP.

### 3.1 Estrutura do domínio catalítico

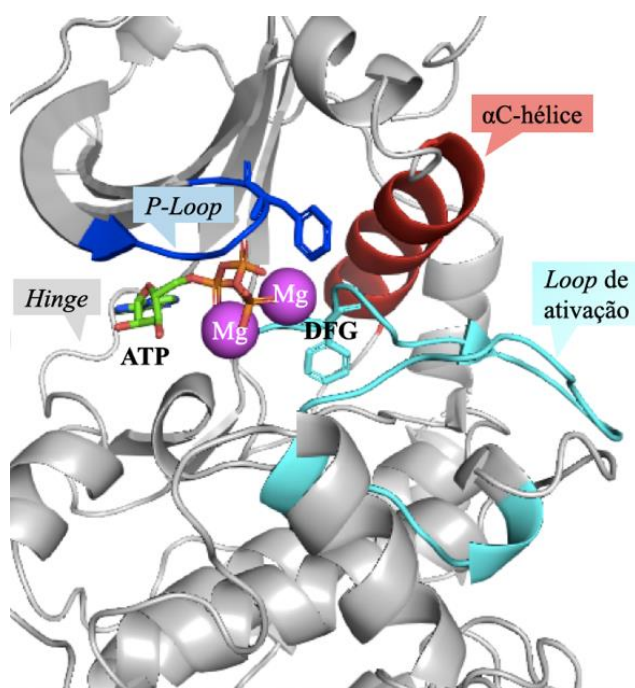
O conhecimento da estrutura das cinases é a chave para o sucesso, assim é importante identificar as características necessárias para a ligação dos inibidores. A estrutura de todas as proteínas cinase partilham um domínio cinase muito semelhante. As três funções principais deste domínio são: 1) ligação da molécula doadora do grupo fosfato (ATP), em complexo com o íon metálico necessário à fosforilação ( $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ ); 2) ligação do substrato alvo (proteína ou lípido) e 3) transferência do  $\gamma$ -fosfato do ATP para o grupo OH aceitador, do resíduo de tirosina ou serina/treonina do substrato (43).

O domínio cinase (ou domínio catalítico) é uma estrutura conservada com ~250-300 aminoácidos muito importante para a comunicação celular (43). O domínio cinase é uma estrutura bilobada, sendo formado pelos lóbulos N-terminal e C-terminal, ligados por uma região flexível o *hinge* (44,45). O sítio de ligação do ATP (figura 16) está localizado entre os dois lóbulos. O anel duplo de adenina do ATP forma ligações hidrofóbicas com o *hinge*.

O N-terminal é o lóbulo mais pequeno e consiste em cinco cadeias  $\beta$  ( $\beta 1$ - $\beta 5$ ) e uma  $\alpha$ -hélice ( $\alpha C$ -hélice; vermelha). O *loop* de ligação do ATP (*P-loop*; azul) é uma alça flexível rica em glicina (GxGx $\Phi$ GV) que liga as cadeias  $\beta 1$  e  $\beta 2$  do N-terminal (o aminoácido  $\Phi$  refere-se a um resíduo hidrofóbico). O aminoácido valina (V) do *P-loop* é responsável por uma interação hidrofóbica com o ATP e com muitos inibidores de cinases. As mutações no *P-loop* modificam a sua flexibilidade e perturbam a conformação necessária para a ligação de alguns fármacos. O aminoácido lisina (K) que pertence à sequência conservada AxK, da cadeia  $\beta 3$ , é conservado. A  $\alpha C$ -hélice também tem um aminoácido conservado, o glutamato (E). A orientação da  $\alpha C$ -hélice difere entre a conformação inativa e a conformação ativa, necessária para a atividade catalítica. No estado ativo, designado  $\alpha C$ -hélice-in, a  $\alpha C$ -hélice está orientada para o sítio de ligação do ATP, o grupo  $\alpha$ -fosfato liga-se ao aminoácido  $\beta 3$ -lisina, que por sua vez forma uma ligação iónica com o aminoácido  $\alpha C$ -glutamato, estabilizadora da conformação ativa (44,45).

O C-terminal é o lóbulo maior e consiste em seis  $\alpha$ -hélices ( $\alpha D$ - $\alpha I$ ,  $\alpha EF1$  e  $\alpha EF2$ ) e quatro pequenas cadeias  $\beta$  ( $\beta 6$ - $\beta 9$ ), um *loop* de ativação e um *loop* catalítico. O *loop* de ativação (turquesa) pode adotar uma conformação fechada ou aberta. A funcionalidade da cinase depende da conformação aberta ativa. O *loop* de ativação varia no tamanho e sequência de aminoácidos entre as famílias de cinases. No entanto, começa sempre com

uma tríade de aminoácidos conservada denominada DFG (aspartato, fenilalanina e glicina). A proteína cinase encontra-se ativa quando os elementos do domínio cinase criam um ambiente propício para a transferência do fosfato, dependendo da posição e orientação do aspartato (D) da região DFG. Na conformação inativa, designada DFG-out, o aspartato bloqueia o sítio de ligação do ATP. Enquanto na conformação ativa, designada DFG-in, o aspartato ocupa um *pocket* posterior hidrofóbico adjacente ao sítio de ligação do ATP. Uma mutação no *loop* de ativação pode desestabilizar o balanço energético necessário para manter a conformação fechada e assim favorecer a conformação aberta. O cofator do ATP ( $Mg^{2+}$ ; roxo) está representado como esferas na figura 16. O grupo  $\gamma$ -fosfato liga-se ao primeiro  $Mg^{2+}$  que orienta o aspartato (D) da tríade DFG, enquanto o segundo  $Mg^{2+}$  liga-se à asparagina (N), aminoácido localizado no fim do *loop* catalítico ( $\beta 6/\beta 7$ ). O aminoácido aspartado (D) da sequência conservada HRD do *loop* catalítico funciona como uma base de Brønsted-Lowry, aceitadora do próton do grupo OH do substrato tirosina e/ou serina/treonina promovendo o ataque nucleofílico ao  $\gamma$ -fosfato (44,45).



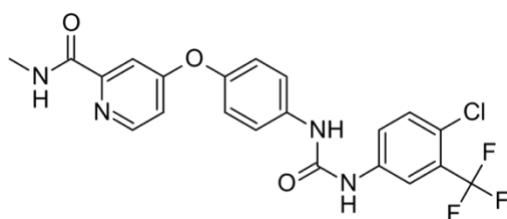
**Figura 16** Visão geral do sítio de ligação do ATP da cinase PKA (PDB ID:1ATP)

### 3.2 Estratégias de inibição das cinases

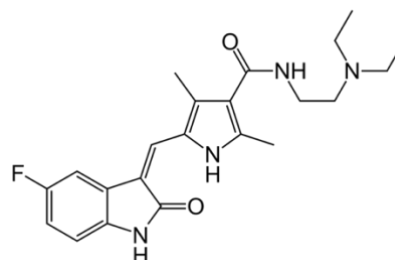
Os inibidores de cinases podem ser classificados segundo o seu mecanismo de ação, especificamente através da conformação da cinase necessária para ocorrer a ligação do inibidor no caso das pequenas moléculas. Podem classificar-se em inibidores ATP-miméticos, quando competem com o ATP, ou alostéricos.



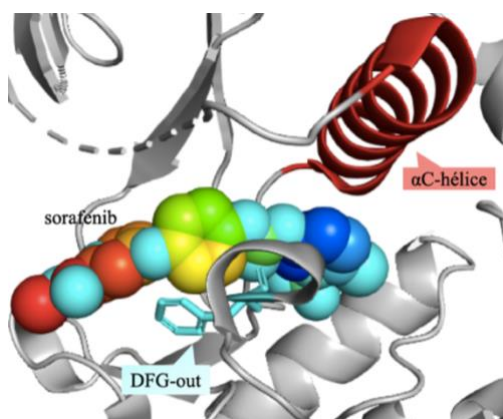
A tabela 2 resume a classificação dos inibidores segundo Roskoski (45). Os inibidores de cinases são divididos nos grupos de inibidores reversíveis (*Tipo I, I½, II, III, IV e V*) e irreversíveis (*VI*). Os *Tipo I½ e II* são ainda divididos nos subtipos A e B. Os fármacos do subtipo A são os inibidores que se estendem para o *pocket* posterior do sítio de ligação do ATP (em direção à  $\alpha$ C-hélice), o que significa maior tempo de vida do complexo fármaco-alvo e maior atividade farmacológica, sendo que esta só persiste quando o fármaco está ligado. Por exemplo, os inibidores do recetor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), sorafenib (figura 17) e sunitinib (figura 18), aprovados pela FDA e pela *European Medicines Agency* (EMA), com indicação para o tratamento do carcinoma de células renais (CCR) diferem na duração do contacto com a cinase. O sorafenib é um inibidor *Tipo IIA* (figura 19) que permanece em contacto com a cinase durante 64 minutos, enquanto que o sunitinib (figura 20) é um inibidor *Tipo IIB* que permanece menos de 2,9 minutos em contacto (45,46).



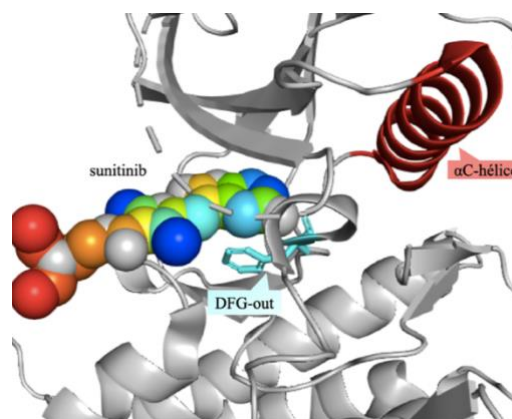
**Figura 17 Estrutura química do Sorafenib**



**Figura 18 Estrutura química do Sunitinib**



**Figura 19 Estrutura cristalográfica do VEGFR2 ligado ao Sorafenib (PDB ID:4ASD)**



**Figura 20 Estrutura cristalográfica do VEGFR2 ligado ao Sunitinib (PDB ID:4AGD)**

A região entre os lóbulos N-terminal e C-terminal forma um *pocket* frontal e um *pocket* posterior (*gate area* e *back cleft*). A modelação do perfil de seletividade e de potência no desenvolvimento de novos fármacos pode ser afetada pelo aminoácido que controla a entrada no *pocket* posterior hidrofóbico, o *gatekeeper*. O tamanho e formato do *pocket* posterior do sítio de ligação do ATP depende da natureza do *gatekeeper*. Quando o aminoácido é volumoso ocupa esse espaço ficando a *pocket* posterior mais pequeno. Se

o *gatekeeper* for pequeno concede acesso a este *pocket*. O *pocket* posterior poderá ser um excelente alvo para aumentar a seletividade do fármaco e levar à diminuição dos efeitos adversos. O desenho de fármacos que se podem ligar aos vários *pockets* é uma estratégia para aumentar a sua afinidade (45).

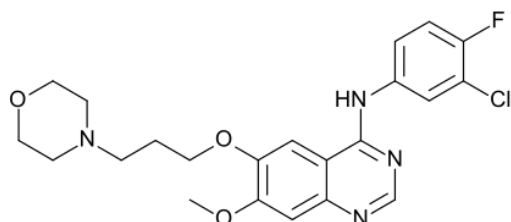
**Tabela 2 Classificação dos Inibidores de Cinases**, adaptado de (10,47,48)

<b>Classificação</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Exemplos</b>
<i>Tipo I</i>	Ligação à forma ativa da cinase DFG-in, $\alpha$ C-hélice-in, no sítio de ligação do ATP	Dasatinib, Erlotinib, Gefitinib, Palbociclib, Pralsetinib, Fostamatnib, Selpercatinib, Vandetanib
<i>Tipo I½A</i>	Ligação à forma inativa da cinase DFG-in, no sítio de ligação do ATP, que se estende para o <i>pocket</i> posterior	Dabrafenib, Erdafitinib, Infigratinib, Lapatinib, Lenvatinib, Vemurafenib
<i>Tipo I½B</i>	Ligação à forma inativa da cinase DFG-in, no sítio de ligação do ATP	Abemeciclib, Alectinib, Brigatinib, Ceritinib, Crizotinib, Entrectinib, Erlotinib, Lorlatinib, Palbociclib, Ribociclib, Tepotinib, Tofacitinib
<i>Tipo IIA</i>	Ligação à forma inativa da cinase DFG-out, no sítio de ligação do ATP, que se estende para o <i>pocket</i> posterior	Imatinib, Nilotinib, Pexidartinib, Ponatinib, Ripretinib, Sorafenib, Tivozantinib
<i>Tipo IIB</i>	Ligação à forma inativa da cinase DFG-out, no sítio de ligação do ATP	Bosutinib, Gilteritinib, Nintedanib, Sunitinib
<i>Tipo III</i>	Ligação alostérica à cinase $\alpha$ C-hélice-out, no <i>pocket</i> adjacente ao sítio de ligação do ATP	Trametinib, Selumetinib, Cobimetinib, Binimetinib
<i>Tipo IV</i>	Ligação alostérica num <i>pocket</i> fora do sítio de ligação do ATP	Asciminib
<i>Tipo V</i>	Ligação bivalente em dois locais de ligação diferentes	
<i>Tipo VI</i>	Ligação covalente com aminoácidos nucleofílicos	Acalabrutinib, Almonertinib, Afatinib, Dacomitinib, Ibrutinib, Tirabrutinib, Olmutinib, Neratinib, Mobocertinib, Osimertinib, Zanubrutinib

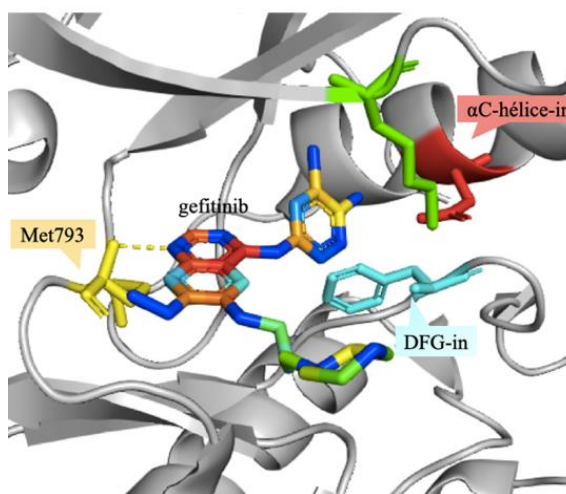
No passado, a estratégia inicial foi o desenho de compostos que poderiam mimetizar a ligação do ATP à cinase. Os inibidores *Tipo I* ligam-se ao sítio de ligação do ATP na forma ativa da cinase, tanto a tríade DFG como a  $\alpha$ C-hélice estão na sua conformação “in”. Estes inibidores são ATP-miméticos, a porção central da estrutura química (purina) imita as ligações de hidrogénio formadas entre o *hinge* e o anel adenina do ATP, normalmente ligam-se no *pocket* frontal. Estes inibidores possuem ação bloqueadora por meio da inibição competitiva com o ATP. A seletividade destes fármacos é baixa devido à conservação da forma ativa da cinase. O gefitinib, erlotinib e icotinib, derivados de quinazolina, são exemplos de inibidores reversíveis do EGFR de primeira geração, que demonstraram eficácia contra a deleção no exão 19 e a



substituição no exão 21 (L858R) do EGFR. O gefitinib (figura 21) liga-se ao sítio de ligação do ATP na forma ativa do EGFR, formando uma ligação de hidrogénio com o aminoácido M793 do *hinge* (figura 22) (49).

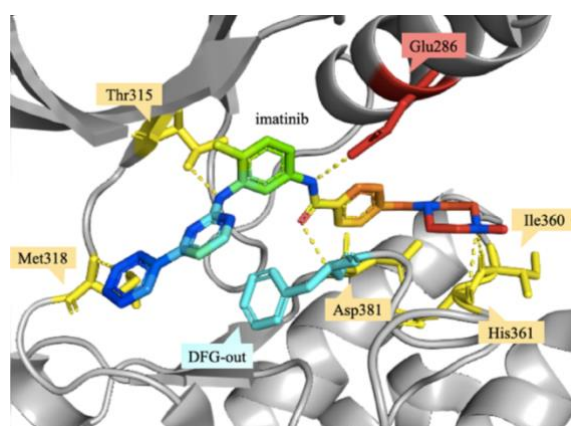


**Figura 21** Estrutura química do Gefitinib



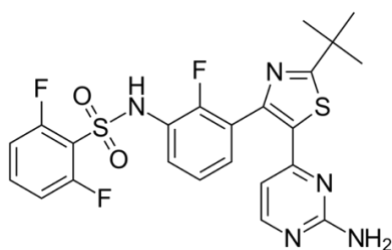
**Figura 22** Estrutura cristalográfica do EGFR ligado ao Gefitinib (PDB ID:2ITY)

Os inibidores *Tipo II* inibem a cinase na sua conformação inativa DFG-out, no sítio de ligação do ATP. Esta conformação abre um *pocket* hidrofóbico adicional que fica acessível a um ligando hidrofílico do fármaco. Esta solução ganhou popularidade através da aprovação do imatinib, que inibe as cinases devido à sua estabilização na conformação inativa. O imatinib (inibidor *Tipo IIA*, figura 3) é um inibidor de tirosina cinase (TKI) de primeira geração, é um derivado de 2-fenilaminopirimidina que inibe as cinases PDGFR, BCR-ABL e KIT. O imatinib liga-se através de ligações de hidrogénio ao *hinge* no resíduo M318, ao resíduo *gatekeeper* T315, à  $\alpha$ C-hélice no resíduo E286, à região DFG no resíduo D381 e através de uma ligação bidentada aos resíduos H361 e I360 (figura 23) (50).

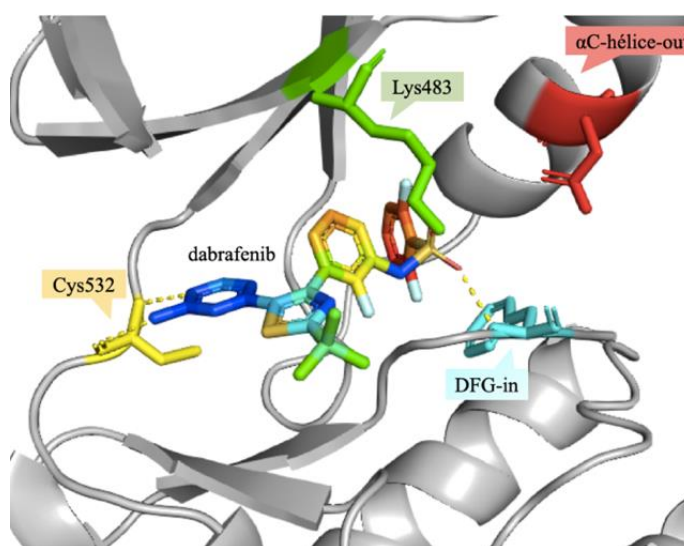


**Figura 23** Estrutura cristalográfica da ABL ligada ao Imatinib (PDB ID:1IEP)

A cinase apresenta muitas conformações possíveis, e um grande número de conformações intermédias foram descritas. Alguns autores introduziram uma categoria intermédia para classificar os fármacos que inibem estas conformações, no entanto não há uma definição clara. Estes inibidores do *Tipo I/2* inibem uma conformação inativa, normalmente excluem as conformações DFG-out. O dabrafenib (inibidor *Tipo I/2A*, figura 24) inibe a proteína cinase BRAF numa conformação DFG-in. No entanto, a  $\alpha$ C-hélice está orientada para fora ( $\alpha$ C-hélice-out), quebrando a ligação dos resíduos  $\beta$ 3-lisina e  $\alpha$ C-glutamato, gerando uma cinase inativa (figura 25). O dabrafenib liga-se ao BRAF-V600E através de ligações de hidrogénio com o aminoácido C532 do *hinge*, K483 da cadeia  $\beta$ 3 e F595 da tríade DFG (51). Esta estratégia oferece maior seletividade para inibidores que induzem mudanças estruturais, para lá do DFG-in ou DFG-out.

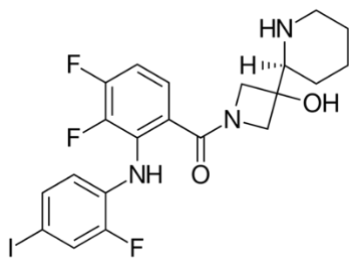


**Figura 24 Estrutura química do Dabrafenib**

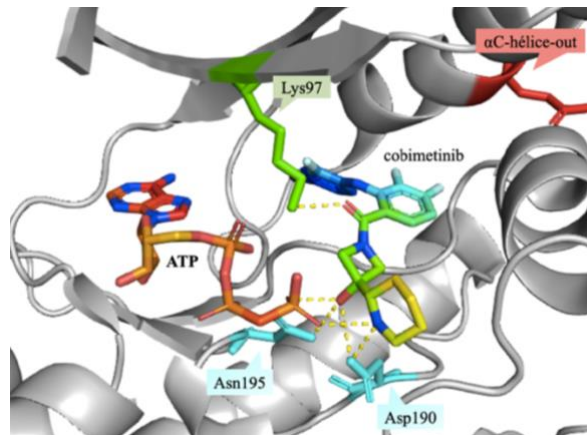


**Figura 25 Estrutura cristalográfica do BRAF-V600E ligado ao Dabrafenib (PDB ID:4XV2)**

Os inibidores *Tipo III* ligam-se num *pocket* alostérico adjacente ao sítio de ligação do ATP. Essa inibição é chamada de não competitiva, pois o ATP e o inibidor podem ambos estar ligados à cinase simultaneamente. Como estes inibidores exploram sítios de ligação exclusivos de uma cinase em particular possuem maior seletividade. O cobimetinib (inibidor *Tipo III*, figura 26) demonstrou eficácia, potência e seletividade para o tratamento do melanoma com as mutações BRAF-V600E e V600K, em combinação com o vemurafenib. Este inibidor seletivo das cinases MEK1/2 liga-se à  $\beta$ 2-lisina (K97) através de uma ligação de hidrogénio (figura 27). O impedimento estérico dos ciclos aproxima a amida do *loop* catalítico, os aminoácido D190 e N195 ligam-se ao fármaco e ao ATP (52). O cobimetinib estabiliza a forma inativa da MEK1/2, resultando na obstrução do sítio de ligação do substrato.

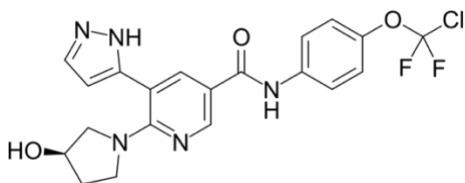


**Figura 26** Estrutura química do Cobimetinib

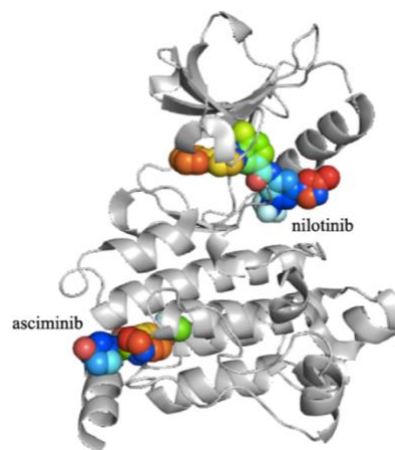


**Figura 27** Estrutura cristalográfica da MEK1 ligado ao Cobimetinib (PDB ID:4AN2)

Os inibidores *Tipo IV*, tal como os do *Tipo III*, são inibidores alostéricos. Estes podem ligar-se num *pocket* alostérico fora do sítio de ligação do ATP, no domínio catalítico. O asciminib (figura 28), aprovado pela FDA, em 2021, foi desenhado para ultrapassar a mutação T315I, resistente aos inibidores de BCR-ABL de primeira e segunda geração. Este fármaco interage com o *myristoyl pocket*, que está envolvido na autorregulação da atividade catalítica da cinase. Este *pocket* abre porque o domínio *myristoyl*, que estabiliza a cinase na forma inativa, é perdido na fusão de BCR-ABL. O asciminib, que se liga ao *pocket myristoyl*, imita o domínio *myristoyl* e restabelece a forma inativa da cinase. A inibição alostérica é provavelmente a solução para as limitações de seletividade dos inibidores competitivos com o ATP, dos efeitos adversos devido à inibição não específica de outras cinases e de resistência a mutações adquiridas ao nível do domínio catalítico. A combinação do asciminib com um inibidor competitivo com o ATP poderá suprimir a resistência no *pocket myristoyl* (figura 29) (53,54).

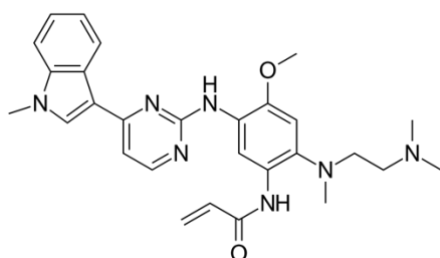


**Figura 28** Estrutura química do Asciminib

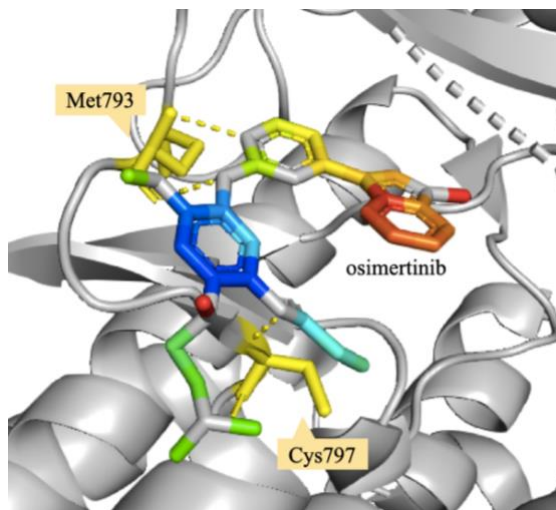


**Figura 29** Estrutura cristalográfica de ABL ligado ao Nilotinib e ao Asciminib (PDB ID:5MO4)

Os inibidores *Tipo VI* formam ligações covalentes com a cinase alvo. A segunda geração de inibidores do EGFR, afatinib e dacomitinib, liga-se covalentemente ao sítio de ligação do ATP e demonstraram atividade farmacológica superior ao gefitinib. No entanto, ligam-se ao EGFR *wild-type* que pode ser a causa de diarreia e erupção cutânea, limitando as doses clínicas utilizadas. O osimertinib (figura 30) é o tratamento preferencial de primeira linha do CPNPC para doentes com a mutação T790M. Este composto é um inibidor covalente do EGFR de terceira geração. O osimertinib forma uma ligação de hidrogénio com o aminoácido M793 e uma ligação covalente com C797 do *hinge*, do sítio de ligação do ATP do EGFR (figura 31) (55).



**Figura 30** Estrutura química do Osimertinib



**Figura 31** Estrutura cristalográfica do EGFR ligado ao Osimertinib (PDB ID:4ZAU)

## 4 Fármacos aprovados

Nos anos 90, foram aprovados fármacos inibidores de cinases sem o conhecimento das suas proteínas alvo. O fasudil (Eril®, da Asahi Kasei Pharma) tem indicação para uso no vasoespasma cerebral e foi aprovado no Japão, em 1995, e mais tarde na China. No entanto, não tem aprovação nos EUA ou na Europa. É um inibidor da proteína cinase dependente da RhoA/Rho (ROCK), mas também de outras cinases da família AGC. A sua capacidade de inibição da ROCK foi descrita só em 1997 (56).

A aprovação do teste de diagnóstico HercepTest® e do trastuzumab (Herceptin®, da Roche) pela FDA, em 1998, revolucionou o tratamento do cancro da mama. O HercepTest® foi desenvolvido para a deteção do biomarcador HER2. O Trastuzumab foi o primeiro mAb concebido para reconhecer o HER2, bem como o primeiro codesenvolvido com um teste de diagnóstico (57). Este anticorpo interage com os recetores HER2 bloqueando a sinalização celular desregulada. Em 2020, a FDA aprovou o margetuximab (Margenza®, da MacroGenics), um mAb com indicação em associação com quimioterapia tal como o trastuzumab.

O lapatinib (Tyverb®, da GSK) foi aprovado pela FDA, em 2007, para o cancro da mama devido à sua capacidade de dupla inibição do HER2 e do EGFR. O neratinib (Nerlynx®, da Puma Biotechnology) e o tucatinib (Tukysa®, da Seattle Genetics) são inibidores do HER2 de segunda geração com maior potência e especificidade, tendo sido aprovados pela FDA para o cancro da mama, em 2017 e 2020, respetivamente.

O sirolimus (Rapamicina ou Rapamune®, da Pfizer) é um composto natural obtido a partir da bactéria *Streptomyces hygroscopicus*. Foi descoberto em 1972, inicialmente como agente antifúngico (44). Muitos anos depois, descobriu-se que possuía atividade imunossupressora, e, em 1999, foi aprovado pela FDA com indicação para doentes transplantados na manutenção para prevenção de rejeição (58). O seu mecanismo de ação assenta na formação intracelular do complexo sirolimus-FKBP12 que inibe a mTOR, envolvida na proliferação da população linfocitária (células responsáveis por atacar o órgão transplantado).

A descoberta do imatinib (Gleevec ou Glivec®, da Novartis) nos laboratórios Ciba Geigy, nos anos 90, conduziu ao primeiro ensaio clínico, em 1998, e à sua aprovação pela FDA para o tratamento de LMC causada pela translocação BCR-ABL, em 2001, e posteriormente para outras indicações devido a sua seletividade para as famílias PDGFR e KIT (59). O imatinib foi o primeiro fármaco desenhado racionalmente para inibir uma cinase específica para tratar uma doença, e, portanto, é entendido como pioneiro na descoberta de inibidores de cinases. Na sequência do imatinib, foram aprovados o nilotinib (Tasigna®, da Novartis), o dasatinib (Spraycel®, da Bristol Myers Squibb), o bosutinib (Bosulif®, da Pfizer), o ponatinib (Iclusig®, da

Incyte/Takeda) e o asciminib (Scemblix®, da Novartis) com alvo a proteína BCR-ABL, este último aprovado pela FDA, em 2021.

Muitos fármacos estão aprovados para o tratamento do CPNPC, causado pela variabilidade de mutações nos genes EGFR, ALK, ROS, BRAF, NTRK e MET. Esta diversidade revela a importância da caracterização molecular dos tumores. As mutações do EGFR são as mais comuns. Em 2003, foi aprovado pela FDA o gefitinib (Iressa®, da AstraZeneca) para o tratamento do CPNPC, sendo o primeiro inibidor do EGFR a receber autorização de introdução no mercado (AIM). Em 2005, a FDA restringiu o uso do gefitinib por não ter demonstrado aumento da sobrevivência média global no estudo ISEL (60). Em 2004, o erlotinib (Tarceva®, da Roche) recebia aprovação pela FDA. Devido ao aparecimento de resistências a estes inibidores, foram aprovadas novas gerações de fármacos. Os inibidores covalentes de segunda geração, o afatinib (Giotrif®, da Boehringer Ingelheim) e o dacomitinib (Vizimpro®, da Pfizer) e de terceira geração o osimertinib (Tagrisso®, da AstraZeneca) com seletividade para a mutação resistente T790M. Em 2021, a FDA aprovou o mobocertinib (Exkivity®, da Takeda) desenhado para inibir o EGFR com mutações no exão 20.

O crizotinib (Xalkori®, da Pfizer) foi o primeiro inibidor da cinase do linfoma anaplásico (ALK) aprovado pela FDA para o CPNPC, em 2011, também tem atividade contra as cinases TK das famílias: *reactive oxygen species* (ROS) e *mesenchymal-epithelial transition factor* (MET). Os doentes tratados com crizotinib desenvolvem resistência, que muitas vezes conduz a recidiva no sistema nervoso central. A segunda geração de inibidores ALK, desenvolvidos para dar resposta a estas mutações, incluem o ceritinib (Zykadia®, da Novartis), o alectinib (Alecensa®, da Roche) e o brigatinib (Akinbrig®, da Takeda) aprovados pela FDA, em 2014, 2015 e 2017, respetivamente. Os inibidores ALK foram desenvolvidos até à terceira geração, o lorlatinib (Lorviqua®, da Pfizer) é o mais recente, aprovado em 2018. O alectinib, brigatinib e lorlatinib são considerados na *guideline National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) como tratamento preferencial de primeira linha de tratamento. Em primeira linha também se podem usar o ceritinib e o crizotinib (28). Um dos problemas que se coloca é a definição da melhor sequência terapêutica para poder maximizar os resultados em cada doente.

Recentemente, foram aprovados para o tratamento do CPNPC outras moléculas inibidoras de cinases com alvo a mutação MET, o capmatinib (Tabrecta®, da Novartis) e o tepotinib (Tepmetko®, da Merck) aprovados pela FDA, em 2020 e 2021, respetivamente; e os inibidores do recetor do fator neurotrófico derivado de células gliais (RET), o seliperatinib (Retevmo®, da Lilly) e o pralsetinib (Gavreto®, da Roche) aprovados pela FDA, em 2020.

Os inibidores que atuam na angiogénese são uma estratégia de tratamento muito importante e são aplicáveis a vários tipos de tumores proporcionando a destruição da vascularização do tumor, havendo assim um controlo metastático. A evidência mais concludente da eficácia das terapias antiangiogénicas, mais especificamente anti-



VEGFR, vem do sucesso do anticorpo bevacizumab (Avastin®, da Roche), aprovado pela FDA para tratar diferentes tumores sólidos, em 2004. A via da angiogénese pode ser inibida através das cinases VEGFR, PDGFR, KIT, FGFR e MET (2). Os primeiros exemplos são o sorafenib (Nexavar®, da Bayer) e o sunitinib (Sutent®, da Pfizer), inibidores de várias cinases incluindo o PDGFR, aprovados pela FDA para o CCR, em 2005 e 2006, respetivamente. Seguidos dos inibidores de segunda geração pazopanib (Votrient®, da Novartis), axitinib (Inlyta®, da Pfizer) e cabozapanib (Cabometyx®, da Ipsen).

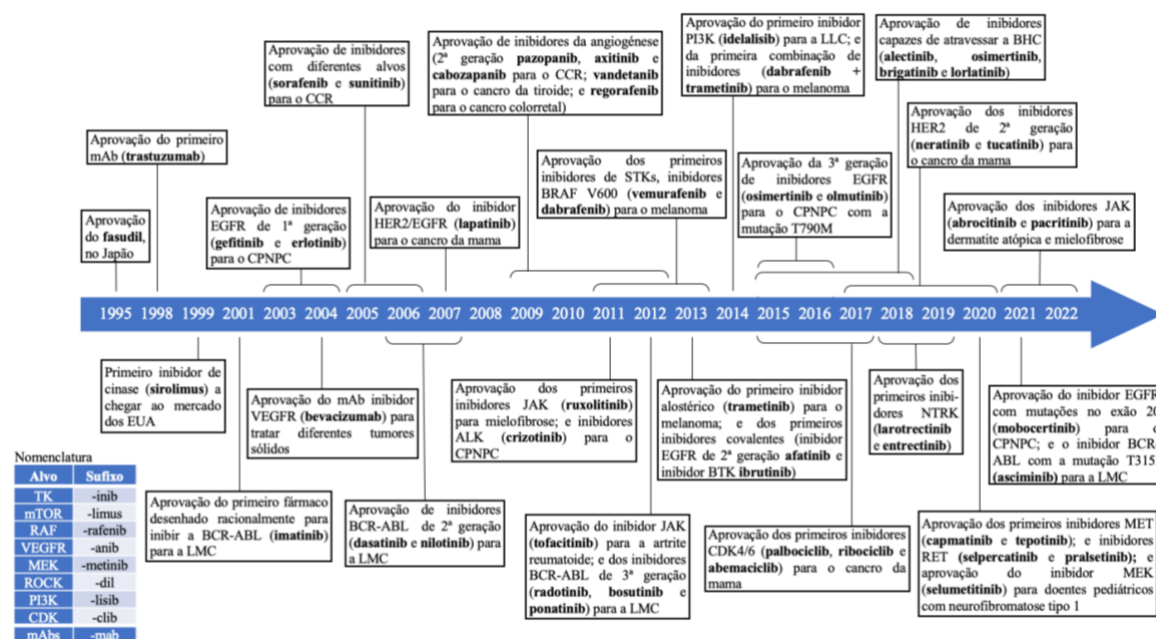
Os primeiros inibidores de serina/treonina cinases (STKIs), especificamente BRAF V600, aprovados pela FDA foram o vemurafenib (Zelboraf®, da Roche), em 2011, e o dabrafenib (Tafinlar®, da Novartis), em 2013, que vieram revolucionar o tratamento do melanoma metastático. O primeiro inibidor alostérico aprovado pela FDA, em 2013, foi o trametinib (Mekinist®, da GSK), inibidor MEK indicado para o melanoma metastático. A primeira combinação de inibidores MEK e BRAF (dabrafenib + trametinib) foi aprovada pela FDA, em 2018.

As pequenas moléculas são na sua maioria de administração oral, exceto o netarsudil (Rhokiinsa®, da Aerie Pharmaceuticals), um colírio; o temsirolimus (Torisel®, da Pfizer) e o trilaciclib (Cosela®, da G1 Therapeutics), injetáveis intravenosos. O ruxolitinib (Jakavi®, da Novartis) é o primeiro inibidor da JAK1/2 de administração oral, aprovado para o tratamento da mielofibrose e da policitemia vera, pela FDA, em 2011. Em 2021, o ruxolitinib (Opzelura®, da Incyt) foi aprovado numa formulação farmacêutica tópica, para o tratamento da dermatite atópica (61).

A artrite reumatoide é a doença autoimune com mais inibidores de cinases aprovados. O tofacitinib (Xeljanz®, da Pfizer) que inicialmente foi descrito como inibidor da JAK3, mais tarde mostrou inibir toda a família JAK (62). Foi aprovado para o tratamento da artrite reumatoide pela FDA, em 2012, e, para colite ulcerosa, em 2018 (63). A EMA aprovou o tofacitinib, em 2017, depois de um parecer negativo, em 2013, devido a preocupações relativas ao risco e ao tipo de infeções graves observadas (64). Na sequência deste, outros inibidores das cinases da família JAK receberam aprovação pela FDA e EMA, tal como o baricitinib (Olumiant®, da Lilly), o upadacitinib (Rinvoq®, da Abbvie), e o filgotinib (Jyseleca®, da Galapagos). Em 2022, a FDA aprovou dois novos inibidores da JAK, o abrocitinib (Cibinqo®, da Pfizer) e o pacritinib (Vonjo®, da CTI BioPharma), para a dermatite atópica e mielofibrose, respetivamente.

O número de fármacos inibidores de cinase aprovados está em crescimento exponencial, foram aprovados mais de 100 fármacos, em todo o mundo. Na Europa, entre 2001 e 2010, foram aprovados pela EMA 16 fármacos (12 pequenas moléculas e 4 anticorpos monoclonais). Na última década, foram mais 62 fármacos aprovados (55 pequenas moléculas e 7 anticorpos monoclonais), perfazendo um total de 78 fármacos (67 pequenas moléculas e 11 anticorpos monoclonais) com AIM Europeu. Só em 2021

foram aprovados 13 fármacos e, mais recentemente, em 2022, o tepotinib também recebeu AIM.



**Figura 32 Linha do tempo com aprovações de inibidores de cinases relevantes, adaptado de (2,13)**

O Anexo A1 apresenta uma tabela com os fármacos organizados por ordem cronológica da sua aprovação pela FDA e EMA, e alguns aprovados no Japão, China e Coreia do Sul, incluindo pequenas moléculas e anticorpos monoclonais (\*). Neste anexo são indicadas as principais cinases alvo dos fármacos, o seu uso clínico e o ano em que receberam a autorização de introdução no mercado pelas diferentes agências reguladoras do medicamento. Os fármacos que foram aprovados para indicações não oncológicas estão destacados a azul.



## 5 Impacto Clínico

Os primeiros TKIs a entrar no mercado têm como alvo as cinases BCR-ABL e EGFR, estes são reconhecidos por marcar o início da mudança do paradigma em direção à medicina de precisão. O seu impacto clínico é visível, principalmente, no tratamento de diversos cânceros, incluindo LMC, CPNPC e melanoma. Além de terem demonstrado eficácia, os inibidores de cinases são preferidos por serem terapias direcionadas e estarem associados a menos efeitos adversos. Esta opção terapêutica tem potencial de aumentar o tempo de vida do subgrupo de doentes com mutações, envolvendo opções de tratamento sequencial e possibilitando a sua sobrevivência com uma doença “crônica”.

A hipótese de tratamento da LMC era muito reduzida, sendo o tratamento com agentes quimioterapêuticos e o transplante alogênico de células tronco os únicos tratamentos disponíveis, agora estas opções estão reservadas para fases mais avançadas ou resistentes aos TKIs. O aparecimento dos TKIs mudou completamente o prognóstico dos doentes com LMC, o imatinib é um dos exemplos com mais sucesso devido ao impacto clínico que obteve. A prevalência da LMC aumentou com a introdução do imatinib, o que se torna contraditório porque um fármaco que é tão eficaz, na verdade teve como consequência o aumento do número de doentes com diagnóstico. O aumento da prevalência ao longo do tempo, pode ser explicado pelo aumento da sobrevivência destes doentes com um tratamento que resulta na eliminação clínica da doença apenas com continuação da terapia a longo prazo (13,65). Atualmente, como primeira linha de tratamento de doentes recém diagnosticados com LMC na fase crônica, segundo a *guideline* da NCCN estão recomendados designadamente o imatinib, o bosutinib, o dasatinib, e o nilotinib. Todos demonstraram ter resposta semelhante a nível da sobrevivência global. A escolha do tratamento deve ter em consideração o risco de progressão da doença, toxicidade, idade, tolerabilidade e comorbilidades. O imatinib é o único fármaco da primeira geração, como é menos tóxico é o tratamento preferencial em doentes mais velhos e com comorbilidades. Os inibidores de segunda geração são preferidos em doentes mais jovens porque a taxa de resposta molecular *major* é maior e mais rápida, o que permite uma interrupção segura do tratamento, por exemplo para fins de fertilidade. O ponatinib e o asciminib são opções de segunda linha e são ativos contra a maioria das mutações, incluindo T315I, estão recomendados no caso de resistência ou intolerância ao tratamento anterior com pelo menos dois TKIs. Os vários fármacos já aprovados possibilitam uma sequência de tratamento, se não houver resposta a um destes TKIs existe a possibilidade de trocar para outro (34).

O cancro do pulmão é a principal causa de morte por doença oncológica no mundo. Em 2018, representou 18,4% do total de mortes por cancro (66). Para além disso, apresenta uma taxa de sobrevivência aos 5 anos de 17,8%. Antes do aparecimento das terapias direcionadas, o tratamento deste tipo de cancro passava por cirurgia e quimioterapia à base de compostos de platina. A identificação de marcadores moleculares é muito

importante para a seleção do tratamento mais eficaz. Nos casos de CPNPC é comum encontrar mutações no EGFR e também ALK, ROS e BRAF, estes devem ser testados na caracterização do tumor. Se todos estes forem negativos poderá fazer-se a testagem do skipping do exão 14 no gene MET, rearranjos do RET e NTRK1/2/3. Todas estas mutações prevêm a sensibilidade aos diferentes inibidores de cinases. Vários estudos clínicos corroboram o aumento da taxa de resposta e a sobrevivência livre de progressão, assim como a diminuição dos efeitos adversos com o uso de terapia direcionada a mutações do EGFR e rearranjos do ALK (28). Um estudo recente também demonstrou benefício na combinação de inibidores do EGFR e quimioterapia (67). A identificação de possíveis benefícios de terapias de combinação, representa uma possível melhoria dos tratamentos existentes baseada na evidência.

O melanoma metastático é associado a mau prognóstico, com uma taxa de sobrevivência global aos 5 anos de 10%, até 2011. As únicas opções de tratamento eram a quimioterapia e a imunoterapia com interleucina-2. A identificação de mutações BRAF e MEK permitiram alterar o prognóstico destes doentes, nomeadamente com o aparecimento da terapêutica dirigida. Vários fármacos foram desenvolvidos com o objetivo de inibir a via MAPK, incluindo inibidores de BRAF (vemurafenib, dabrafenib e encorafenib) e MEK (trametinib, cobimetinib e binimetinib), podendo a sua ação ser combinada, de forma a bloquear diversas vias de uma só vez e permitir uma maior inibição da via MAPK. A combinação destes (dabrafenib + trametinib e vemurafenib + cobimetinib) tornou-se a terapêutica padrão do melanoma metastático com mutação BRAF, devido a diversos estudos que demonstraram taxas de resposta mais alta e um rápido controlo tumoral (20).

Com o avanço da medicina, com os tratamentos sistémicos cada vez mais eficazes e com o aumento da esperança de vida dos doentes com cancro em estadios avançados surge um problema, o aumento da incidência de metástases. Estas são especialmente difíceis de tratar quando localizadas no sistema nervoso central. A maioria dos agentes quimioterapêuticos não atravessam a barreira hematoencefálica (BHC). Para além disso, a radioterapia utilizada no tratamento de tumores cerebrais tem efeitos adversos severos a longo prazo. Os fármacos capazes de atravessar a BHC têm características farmacocinéticas especiais. O desafio é conseguir um equilíbrio entre as propriedades desejadas como a potência e seletividade, ao mesmo tempo que a permeabilidade ideal para atravessar a BHC. Uma das vantagens de alguns inibidores de cinases como o osimertinib, o alectinib, o brigatinib, o lorlatinib, o selpercatinib e o capmatinib é a capacidade de atravessar a BHC. Estes fármacos já demonstraram ter atividade nas metástases cerebrais no CPNPC. Este achado é relevante, uma vez que no cancro do pulmão as metástases cerebrais são muito comuns (13).

A implementação de testes genéticos apropriados para a identificação de biomarcadores preditivos da sensibilidade aos diferentes inibidores de cinases é essencial para definir o tratamento mais eficaz. A título de exemplo, no CPNPC existem sete alterações genómicas diferentes, todas com aprovações próprias de tratamento. A necessidade de

muitos testes de diagnóstico resultada no maior investimento em novas tecnologias que permitam sequenciar o genoma, como *Next Generation Sequencing* (NGS).

## 6 Resistência aos inibidores de cinases

Um dos maiores obstáculos do tratamento eficaz são os casos em que existe resistência a diferentes fármacos. A resistência pode ser classificada como primária/intrínseca quando não existe resposta inicial do doente ao tratamento devido a mecanismos que existem previamente, ou secundária/adquirida quando surge resposta clínica, mas passado algum tempo o tratamento deixa de ser eficaz (68). O desenvolvimento de resistência aos fármacos inibidores de cinases é muito comum, e muitas vezes responsável pelos casos de recidiva do cancro.

A resistência primária aos TKIs pode estar associada a fatores farmacocinéticos como o metabolismo do fármaco, a interações medicamentosas, à expressão aberrante de proteínas na superfície celular responsáveis pelo transporte dos fármacos para o citoplasma (bomba de efluxo) ou à ligação a proteínas plasmáticas. Estas observações podem comprometer a remissão citogénica completa porque os níveis intracelulares de fármaco são subterapêuticos. Outro mecanismo poderá ser a existência de fatores intrínsecos da célula tumoral do doente, por exemplo as mutações alvo, bem como alterações genéticas coexistentes (69).

Na origem da ineficácia destes fármacos podem estar vários mecanismos de resistência adquirida, ou seja, de natureza multifatorial, tornando difícil a capacidade de prevêê-los. Apesar desta diversidade, todos têm o objetivo de encontrar uma via de manutenção da proliferação e sobrevivência celular, mesmo que um inibidor esteja presente. Um dos mecanismos pode ser a mutação de resistência secundária no sítio de ligação do inibidor, que impede a eficácia da inibição da cinase. Um segundo mecanismo pode ser a ativação de uma via secundária/compensatória alternativa que ativa uma cascata *downstream*, desviando a função catalítica do alvo original. Um outro mecanismo está associado à transformação histológica do tumor, por exemplo a alteração do microbioma ou metástases em sítios que o inibidor não tem acesso, como no sistema nervoso central (13).

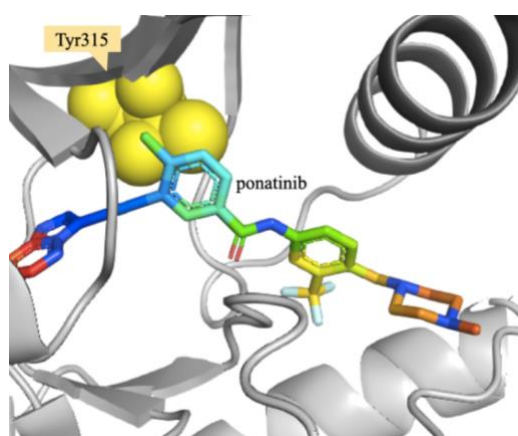
### 6.1 Mutações secundárias na cinase

As mutações mais comuns que conferem resistência adquirida aos TKIs são ao nível do domínio cinase. O principal mecanismo de resistência são mutações nos resíduos de aminoácidos nas sub-regiões do domínio cinase como *P-loop*, sítio de ligação do ATP, *loop* catalítico e *loop* de ativação.

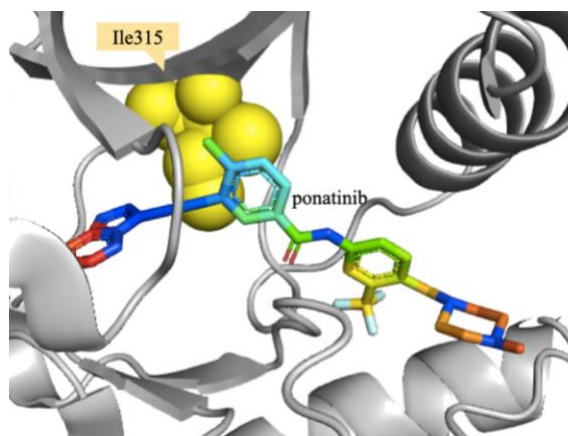
Mais de 100 mutações diferentes foram identificadas no domínio cinase da proteína BCR-ABL. Entre as quais, resistentes ao dasatinib as mutações V299L, T315A e F317L/V/I/C, resistentes ao nilotinib as mutações Y253H, E255K/V e F359V/C/I,

resistentes ao bosutinib as mutações V299L e G250E e resistentes a todos os TKI, exceto ao ponatinib e asciminib, a mutação T315I (34).

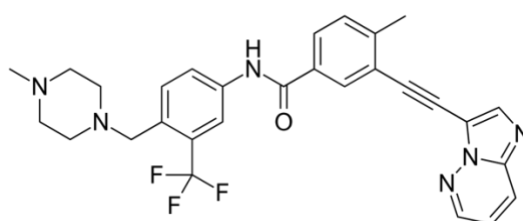
Um dos mecanismos mais comuns de resistência é a mutação do resíduo *gatekeeper*. Normalmente o *gatekeeper* é um resíduo com uma cadeia lateral pequena, muitas vezes o aminoácido treonina. Este cria um *pocket* hidrofóbico, perto do sítio de ligação do ATP, onde muitos inibidores especificamente se ligam. Quando este aminoácido é substituído por outro, com uma cadeia lateral maior, a ligação do inibidor é impedida. Por exemplo, um dos mecanismos de resistência do imatinib é uma substituição do aminoácido treonina (figura 33) por uma isoleucina (figura 34) na posição 315 da proteína BCR-ABL (T315I). O ponatinib (inibidor *Tipo IIA*, figura 35) é um TKI de terceira geração, e o primeiro a ter atividade inibitória contra esta mutação. A introdução do grupo etinil permite que o ponatinib se ligue ao *gatekeeper* mutante (I315), reduzindo o impedimento estérico (70,71).



**Figura 33** Estrutura cristalográfica de BCR-ABL ligado ao Ponatinib (PDB ID:3OXZ)



**Figura 34** Estrutura cristalográfica de BCR-ABL T315I ligado ao Ponatinib (PDB ID:3IK3)



**Figura 35** Estrutura química do Ponatinib

A mutação do *gatekeeper* também confere resistência adquirida aos inibidores do EGFR de primeira e segunda geração, em 60% dos doentes. A mutação T790M no exão 20 do EGFR, uma substituição do aminoácido *gatekeeper* treonina por uma metionina, diminui a afinidade dos inibidores de primeira geração (inibidores reversíveis e competitivos com o ATP) e ainda aumentam a afinidade do ATP. A segunda geração de inibidores foi desenvolvida com o objetivo de aumentar a potência e ultrapassar a resistência adquirida. O afatinib e dacomitinib são inibidores irreversíveis do EGFR

com maior potência, mas também maior toxicidade devido à ligação não específica aos recetores de EGFR *wild-type*, com exacerbação de efeitos adversos como diarreia e erupção cutânea. No entanto, estes efeitos adversos poderiam ser minimizados com uma redução de dose, mas atingir a concentração necessária para inibir eficazmente o EGFR com mutação T790M era impraticável (28).

Os inibidores de terceira geração foram desenvolvidos com o objetivo de ultrapassar a resistência adquirida pela mutação T790M e os problemas de toxicidade, reduzindo a ligação não específica. O osimertinib e o rociletinib, fármacos de terceira geração, ligam-se irreversivelmente ao sítio de ligação do ATP, por meio de uma ligação covalente. O osimertinib é o tratamento preferencial de primeira linha do CPNPC para doentes com as mutações T790M, deleção LREA ou L858R, porque com tratamento inicial com um TKI de primeira ou segunda geração há o risco da progressão da doença e degradação do estado geral do doente até que o doente desenvolva a mutação de resistência adquirida. Apesar da eficácia que o osimertinib demonstrou, as células tumorais ainda assim encontram mecanismos de resistência. O osimertinib interage com o aminoácido C797 através de uma ligação covalente, uma substituição do resíduo de cisteína (C797) para serina afeta os benefícios terapêuticos do osimertinib, levando ao desenvolvimento de resistência (13).

## 6.2 Ativação de vias secundárias alternativas

A ativação de uma via alternativa à cinase alvo pode resultar de uma sobreexpressão ou amplificação de outra cinase que mimetiza o mecanismo de ação do alvo original. Por exemplo, no CPNPC com sensibilidade aos inibidores do EGFR, as células tumorais têm a capacidade de compensar a resposta a estes inibidores pela amplificação do gene MET, HER2 ou FGF. Todos estes genes codificam um RTK, que é ativado em alternativa ao EGFR e assume a responsabilidade da ativação das mesmas cascatas *downstream*, normalmente ativadas pelo EGFR mutante como se não estivesse a ser inibido. Em outros tipos de CPNPC com sensibilidade aos inibidores do ALK, também se verifica uma resposta semelhante das células tumorais, com a sobreexpressão de outros RTK como o EGFR ou KIT. Na mesma lógica de raciocínio, no CPNPC com sensibilidade aos inibidores do RET, as células tumorais respondem com a amplificação do gene MET. No cancro da mama também são conhecidos mecanismos de resistência idênticos. Quando há sensibilidade para os inibidores do HER2, as células substituem a ativação destes recetores por outros como HER3 ou IGF1R (72).

Outro mecanismo de ativação de uma via secundária alternativa é a alteração de cinases que pertencem a cascatas *downstream*. Por exemplo, a resposta compensatória das células tumorais sensíveis aos inibidores de RTK pode resultar de mutações adquiridas dos genes KRAS ou BRAF, que causam ativação constitutiva da cascata MAPK. A cascata de ativação PI3K/AKT/mTOR também pode ser ativada constitutivamente como compensação da inibição de um RTK. A perda da função da fosfatase PTEN ou

mutações no gene que codifica a PI3K é responsável pela ativação desta via de sinalização. A terapia de combinação pode ser vantajosa quando é associado um inibidor da mutação original com um inibidor de outra cinase para bloquear a causa predominante de resistência. Atualmente, no tratamento do melanoma é usado a combinação de inibidores BRAF e MEK (13).

## 7 Conclusões e direções futuras

No vasto mundo da oncologia, em que cada doente é um doente, o tratamento de precisão oferece a possibilidade de tratar o doente e o seu tumor em particular, aumentando a esperança média de vida, assim como, a qualidade de vida. Este pressuposto só é possível devido aos estudos intensivos das mutações nos genes que codificam proteínas cinases responsáveis pela proliferação celular desordenada e pela inibição da apoptose.

Nos últimos 20 anos, o reconhecimento de diferentes vias de transdução de sinais responsáveis pela carcinogénese despoletou o desenvolvimento de fármacos inibidores de cinases que atuam em vias moleculares específicas. O imatinib foi o primeiro destes novos fármacos a ser aprovado pela FDA, revolucionando o tratamento da leucemia mieloide crónica. O seu sucesso impulsionou o maior investimento da indústria farmacêutica na pesquisa de moléculas capazes de inibir alvos específicos.

A maioria destes fármacos demonstraram maior eficácia e menos efeitos adversos quando comparados a tratamentos tradicionais devido à sua seletividade para as células tumorais. Além disso, podem ser administrados por via oral e têm maior vantagem económica. No entanto, o acesso universal destas terapias é dificultado devido aos obstáculos criados pelas agências reguladoras e está limitado a uma fração reduzida de doentes, visto ser uma terapêutica que beneficia principalmente doentes mutados.

Atualmente, um dos maiores desafios nesta área está em melhorar a seletividade para a cinase específica da doença, com o objetivo de diminuir a ligação não específica das restantes cinases. As estruturas cristalográficas resolvidas são a base para a compreensão atual da regulação da atividade catalítica da cinase, ainda que a sua maioria represente o domínio cinase isolado em complexo com as pequenas moléculas. O caminho a seguir será resolver toda a estrutura da cinase, incluindo os domínios reguladores da função catalítica do domínio cinase, e descobrir o seu papel na regulação da própria e de outras cinases. Este estudo é particularmente desafiante porque estas estruturas representam imagens congeladas que não refletem todas as conformações fisiologicamente relevantes da proteína. Assim, estas estruturas tornam-se ferramentas do desenho de novos fármacos direcionados a *pockets* alostéricos exclusivos de cada família de cinase para aumentar a sua seletividade.

Apesar das vantagens dos inibidores de cinases, o desenvolvimento de resistência é uma realidade muitas vezes sem solução. Neste sentido, quando se inicia tratamento de primeira linha com esta terapêutica alvo, o doente eventualmente irá ter progressão da doença e é necessário iniciar outra terapêutica. Se houver possibilidade de sequência de tratamento com outro fármaco da terapêutica alvo, desenvolvido para as possíveis mutações adquiridas será o cenário ideal, por isso o desenvolvimento de inibidores de segunda e terceira geração é muito importante. Outra das possibilidades quando há



resistência é voltar aos tratamentos tradicionais. Se não há nenhuma terapêutica subsequente o doente fica sem opções terapêuticas, e entrar em ensaios clínicos pode ser benéfico quando o doente já esgotou todas as linhas terapêuticas.

O total potencial do “Kinoma” humano está ainda por explorar. Apesar de haver pouca diversidade nos alvos dos fármacos em relação à quantidade de genes, como não existem novas mutações identificadas recentemente, prevê-se que não haja um aumento significativo de novas cinases alvo. A inovação deverá ser nas novas gerações de fármacos com maior seletividade, desenhadas para ultrapassar as mutações adquiridas.

Nos últimos anos, os inibidores da família JAK aprovados para doenças inflamatórias, como a artrite reumatoide, tem vindo a crescer. Prevê-se que haja um aumento de aprovação de fármacos para estas doenças. No entanto, espera-se que o uso clínico de inibidores de cinases continue a ser maior na oncologia.

A população alvo da terapia de precisão é sempre muito mais complexa que a dos ensaios clínicos, devido à variedade molecular das doenças, como no caso do cancro do pulmão, que na realidade é um conjunto de patologias, causadas por diversas mutações específicas. Portanto, a informação adquirida de ensaios clínicos é, por vezes, muito limitada. A validação destas terapias implica o desenho de mais ensaios clínicos para testar os fármacos contra cada doença que apresente o mesmo mecanismo molecular, com a dificuldade de encontrar participantes com o biomarcador em estudo. Para enfrentar estes desafios, novas estratégias como o enriquecimento dos ensaios clínicos de forma a testar vários tratamentos dentro da mesma doença conforme o diagnóstico molecular ou de forma a testar um tratamento num dado mecanismo biológico independentemente da doença são particularmente relevantes. Pressupõe-se que os inibidores cujos ensaios clínicos não demonstraram eficácia, devem ser estudados para novas indicações terapêuticas, devido à semelhança entre famílias de cinases.

Os critérios de seleção dos participantes dos ensaios clínicos são a base para identificar os doentes que melhor respondem a uma dada terapia. É necessário pensar que nem todos os doentes vão beneficiar da mesma forma a um mesmo tratamento. A presença de mutações em doentes mais jovens ou mais velhos, ou a presença de comorbilidades podem ser fatores a considerar na escolha do tratamento. Ensaios clínicos com populações bem definidas são necessários para determinar o benefício-risco dos fármacos.

A decisão sobre a primeira linha de tratamento ainda permanece incerta em muitos casos. Serão necessários mais estudos que comparam os fármacos já aprovados para definição de sequências de tratamento informadas, e identificação de possíveis benefícios de terapias de combinação, para se conseguir produzir a melhor proposta de tratamento baseada na evidência. No futuro será de prever que a decisão de utilizar um fármaco em particular tenha em conta diversos fatores como informação genética e biomarcadores tanto pré terapia como no seu decorrer.

São necessários métodos padronizados de avaliação de biomarcadores nas unidades de saúde, capazes de antecipar que doentes vão beneficiar deste tipo de fármacos, na rotina terapêutica. Espera-se, num futuro próximo, diagnósticos mais precisos e terapias dirigidas a cinases otimizadas e mais eficazes, sendo rotina a realização de testes genéticos, culminando, assim, numa melhoria substancial dos resultados clínicos. A medicina do futuro fundamentar-se-á na melhoria da capacidade preditiva e preventiva da doença com uma maior probabilidade de sobrevivência global, de forma a tornar comum o tratamento precoce e personalizado, tendo em conta as especificidades biológicas desta.

## Referências Bibliográficas

1. Fabbro D, Cowan-Jacob SW, Moebitz H. Ten things you should know about protein kinases: IUPHAR Review 14. Vol. 172, British Journal of Pharmacology. John Wiley and Sons Inc.; 2015. p. 2675–700.
2. Attwood MM, Fabbro D, Sokolov A v., Knapp S, Schiöth HB. Trends in kinase drug discovery: targets, indications and inhibitor design. Vol. 20, Nature Reviews Drug Discovery. Nature Research; 2021. p. 839–61.
3. Imran M, Asdaq SMB, Khan SA, Meenakshi DU, Alamri AS, Alsanie WF, et al. Innovations and patent trends in the development of USFDA approved protein Kinase inhibitors in the last two decades. Pharmaceuticals. 2021 Aug 1;14(8).
4. Human Kinome [Internet]. [cited 2022 Jun 21]. Available from: <http://kinase.com/human/kinome/>
5. KinBase [Internet]. [cited 2022 Jun 21]. Available from: <http://kinase.com/kinbase/>
6. Knighton DR, Zheng J, ten Eyck LF, Ashford VA, Xuong NH, Taylor SS, et al. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. Science. 1991;253(5018):407–14.
7. Taylor SS, Wu J, Bruystens JGH, del Rio JC, Lu TW, Kornev AP, et al. From structure to the dynamic regulation of a molecular switch: A journey over 3 decades. The Journal of Biological Chemistry. 2021 Jan 1;296.
8. RCSB PDB: Homepage [Internet]. [cited 2022 Jun 28]. Available from: <https://www.rcsb.org/>
9. KLIFS - the structural kinase database [Internet]. [cited 2022 Jun 28]. Available from: <https://klifs.net/>
10. Bhullar KS, Lagarón NO, McGowan EM, Parmar I, Jha A, Hubbard BP, et al. Kinase-targeted cancer therapies: Progress, challenges and future directions. Vol. 17, Molecular Cancer. BioMed Central Ltd.; 2018.
11. Carles F, Bourg S, Meyer C, Bonnet P. PKIDB: A curated, annotated and updated database of protein kinase inhibitors in clinical trials. Molecules. 2018;23(4).
12. Bournez C, Carles F, Peyrat G, Aci-Sèche S, Bourg S, Meyer C, et al. Comparative assessment of protein kinase inhibitors in public databases and in PKIDB. Molecules. 2020 Jul 1;25(14).
13. Cohen P, Cross D, Jänne PA. Kinase drug discovery 20 years after imatinib: progress and future directions. Vol. 20, Nature Reviews Drug Discovery. 2021.

14. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* (1979). 2002 Dec 6;298(5600):1912–34.
15. Kanev GK, de Graaf C, de Esch IJP, Leurs R, Würdinger T, Westerman BA, et al. The Landscape of Atypical and Eukaryotic Protein Kinases. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2019 Nov 1;40(11):818–32.
16. Duong-Ly KC, Peterson JR. The Human Kinome and Kinase Inhibition as a therapeutic strategy. *Current protocols in pharmacology / editorial board, SJ Enna (editor-in-chief)* . [et al]. 2013;0 2(SUPPL.60):Unit2.9.
17. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor-tyrosine kinases. *Cell*. 2010 Jun 6;141(7):1117.
18. Esteban-Villarrubia J, Soto-Castillo JJ, Pozas J, Román-Gil MS, Orejana-Martín I, Torres-Jiménez J, et al. Tyrosine kinase receptors in oncology. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020 Nov 2;21(22):1–48.
19. Amelia T, Kartasasmita RE, Ohwada T, Tjahjono DH. Structural Insight and Development of EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. Vol. 27, *Molecules*. MDPI; 2022.
20. Rodrigues AS, Brinca A. Treatment of BRAF-Mutated Metastatic Melanoma: Immunotherapy or Target Therapy? *Journal of the Portuguese Society of Dermatology and Venereology*. 2021 Jun 25;79(2):103–11.
21. Sharifi J, Khireghesh MR, Safari F, Akbari B. EGFR and anti-EGFR nanobodies: review and update. Vol. 29, *Journal of Drug Targeting*. Taylor and Francis Ltd.; 2021. p. 387–402.
22. Martin-Fernandez ML, Clarke DT, Roberts SK, Zanetti-Domingues LC, Gervasio FL. Structure and dynamics of the EGF receptor as revealed by experiments and simulations and its relevance to non-small cell lung cancer. Vol. 8, *Cells*. MDPI; 2019.
23. Roskoski R. ErbB/HER protein-tyrosine kinases: Structures and small molecule inhibitors. Vol. 87, *Pharmacological Research*. Academic Press; 2014. p. 42–59.
24. Roskoski R. Small molecule inhibitors targeting the EGFR/ErbB family of protein-tyrosine kinases in human cancers. Vol. 139, *Pharmacological Research*. Academic Press; 2019. p. 395–411.
25. Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, et al. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell*. 2002 Sep 20;110(6):775–87.
26. Sabbah DA, Hajjo R, Sweidan K. Review on Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Structure, Signaling Pathways, Interactions, and Recent Updates of EGFR Inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2020 Mar 3;20(10):815–34.

27. Yoshikawa S, Kukimoto-Niino M, Parker L, Handa N, Terada T, Fujimoto T, et al. Structural basis for the altered drug sensitivities of non-small cell lung cancer-associated mutants of human epidermal growth factor receptor. *Oncogene*. 2013 Jan 3;32(1):27–38.
28. Ettinger DS, Wood DE, Chair V, Aisner DL, Akerley W, Bauman JR, et al. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Non-Small Cell Lung Cancer Version 7.2021 — October 29, 2021. 2021.
29. Biri-Kovács B, Adorján A, Szabó I, Szeder B, Bősze S, Mező G. Structure–activity relationship of HER2 receptor targeting peptide and its derivatives in targeted tumor therapy. *Biomolecules*. 2020 Feb 1;10(2).
30. Reckel S, Hamelin R, Georgeon S, Armand F, Jolliet Q, Chiappe D, et al. Differential signaling networks of Bcr–Abl p210 and p190 kinases in leukemia cells defined by functional proteomics. *Leukemia*. 2017 Jul 1;31(7):1502.
31. al Hamad M. Contribution of BCR-ABL molecular variants and leukemic stem cells in response and resistance to tyrosine kinase inhibitors: a review. *F1000Res*. 2021;10.
32. Nagar B, Hantschel O, Seeliger M, Davies JM, Weis WI, Superti-Furga G, et al. Organization of the SH3-SH2 unit in active and inactive forms of the c-Abl tyrosine kinase. *Mol Cell*. 2006 Mar 17;21(6):787–98.
33. Skora L, Mestan J, Fabbro D, Jahnke W, Grzesiek S. NMR reveals the allosteric opening and closing of Abelson tyrosine kinase by ATP-site and myristoyl pocket inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Nov 19;110(47):E4437–45.
34. Kristina Gregory N, Hema Sundar O, Maness L, Buffett P, Mead M, Metheny L, et al. NCCN Guidelines Version 3.2022 Chronic Myeloid Leukemia. 2022 [cited 2022 May 27]; Available from: <https://www.nccn.org/home/member->
35. Holyoake TL, Vetrie D. The chronic myeloid leukemia stem cell: stemming the tide of persistence. *Blood*. 2017 Mar 23;129(12):1595–606.
36. Roskoski R. Janus kinase (JAK) inhibitors in the treatment of inflammatory and neoplastic diseases. *Pharmacological Research*. 2016 Sep 1;111:784–803.
37. Clark JD, Flanagan ME, Telliez JB. Discovery and development of Janus kinase (JAK) inhibitors for inflammatory diseases. Vol. 57, *Journal of Medicinal Chemistry*. American Chemical Society; 2014. p. 5023–38.
38. Garrido-Trigo A, Salas A. Molecular structure and function of janus kinases: Implications for the development of inhibitors. *Journal of Crohn’s and Colitis*. 2020;14:S713–24.
39. Williams NK, Bamert RS, Patel O, Wang C, Walden PM, Wilks AF, et al. Dissecting Specificity in the Janus Kinases: The Structures of JAK-Specific Inhibitors Complexed to the JAK1 and JAK2 Protein Tyrosine Kinase Domains. *Journal of Molecular Biology*. 2009 Mar 20;387(1):219–32.

40. Gharwan H, Groninger H. Kinase inhibitors and monoclonal antibodies in oncology: clinical implications. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2015 13:4. 2015 Dec 31;13(4):209–27.
41. Nelson V, Ziehr J, Agulnik M, Johnson M. Afatinib: Emerging next-generation tyrosine kinase inhibitor for NSCLC. Vol. 6, *OncoTargets and Therapy*. 2013. p. 135–43.
42. Park K, Tan EH, O’Byrne K, Zhang L, Boyer M, Mok T, et al. Afatinib versus gefitinib as first-line treatment of patients with EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (LUX-Lung 7): A phase 2B, open-label, randomised controlled trial. *The Lancet Oncology*. 2016 May 1;17(5):577–89.
43. Hanks SK, Hunter T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J*. 1995 May;9(8):576–96.
44. Modi V, Dunbrack RL. Defining a new nomenclature for the structures of active and inactive kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Apr 2;116(14):6818–27.
45. Roskoski R. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2022 update. Vol. 175, *Pharmacological Research*. Academic Press; 2022.
46. McTigue M, Murray BW, Chen JH, Deng YL, Solowiej J, Kania RS. Molecular conformations, interactions, and properties associated with drug efficiency and clinical performance among VEGFR TK inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Nov 6;109(45):18281–9.
47. Roskoski R. Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes. *Pharmacological Research*. 2016 Jan 1;103:26–48.
48. Roskoski R. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2022 update. Vol. 175, *Pharmacological Research*. Academic Press; 2022.
49. Yun CH, Boggon TJ, Li Y, Woo MS, Greulich H, Meyerson M, et al. Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity. *Cancer Cell*. 2007 Mar 13;11(3):217–27.
50. Nagar B, Bornmann WG, Pellicena P, Schindler T, Veach DR, Miller WT, et al. Crystal Structures of the Kinase Domain of c-Abl in Complex with the Small Molecule Inhibitors PD173955 and Imatinib (STI-571) 1. Vol. 62, *CANCER RESEARCH*. 2002.
51. Zhang C, Spevak W, Zhang Y, Burton EA, Ma Y, Habets G, et al. RAF inhibitors that evade paradoxical MAPK pathway activation. *Nature*. 2015 Oct 22;526(7574):583–6.

52. Rice KD, Aay N, Anand NK, Blazey CM, Bowles OJ, Bussenius J, et al. Novel Carboxamide-Based Allosteric MEK Inhibitors: Discovery and Optimization Efforts toward XL518 (GDC-0973). *ACS Med Chem Lett.* 2012 May 10;3(5):416–21.
53. Schoepfer J, Jahnke W, Berellini G, Buonamici S, Cotesta S, Cowan-Jacob SW, et al. Discovery of Asciminib (ABL001), an Allosteric Inhibitor of the Tyrosine Kinase Activity of BCR-ABL1. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2018 Sep 27;61(18):8120–35.
54. Hughes TP, Mauro MJ, Cortes JE, Minami H, Rea D, DeAngelo DJ, et al. Asciminib in Chronic Myeloid Leukemia after ABL Kinase Inhibitor Failure. *New England Journal of Medicine.* 2019 Dec 12;381(24):2315–26.
55. Yosaatmadja Y, Silva S, Dickson JM, Patterson A v., Smaill JB, Flanagan JU, et al. Binding mode of the breakthrough inhibitor AZD9291 to epidermal growth factor receptor revealed. *J Struct Biol.* 2015 Dec 1;192(3):539–44.
56. Nagumo H, Sasaki Y, Ono Y, Okamoto H, Seto M, Takuwa Y. Rho kinase inhibitor HA-1077 prevents Rho-mediated myosin phosphatase inhibition in smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;278(1).
57. Jørgensen JT. Oncology drug-companion diagnostic combinations. *Cancer Treatment and Research Communications.* 2021 Jan 1;29:100492.
58. Seto B. Rapamycin and mTOR: a serendipitous discovery and implications for breast cancer. *Clinical and Translational Medicine.* 2012 Dec;1(1):29.
59. Iqbal N, Iqbal N. Imatinib: A Breakthrough of Targeted Therapy in Cancer. *Chemotherapy Research and Practice.* 2014 May 19;2014:1–9.
60. Thatcher N, Chang A, Parikh P, Pereira R, Ciuleanu T, von Pawel J, et al. Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). Vol. 366, [www.thelancet.com](http://www.thelancet.com). 2005.
61. Fda, Cder. Advancing Health Through Innovation: New Drug Therapy Approvals 2021. 2021 [cited 2022 Jul 3]; Available from: [www.fda.gov](http://www.fda.gov)
62. Thoma G, Drückes P, Zerwes HG. Selective inhibitors of the Janus kinase Jak3—Are they effective? *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2014 Oct 1;24(19):4617–21.
63. FDA approves new treatment for moderately to severely active ulcerative colitis | FDA [Internet]. [cited 2022 Jul 3]. Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-treatment-moderately-severely-active-ulcerative-colitis>
64. CHMP. Xeljanz; INN-tofacitinib. [cited 2022 Jul 3]; Available from: [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)

65. Huang X, Cortes J, Kantarjian H. Estimations of the increasing prevalence and plateau prevalence of chronic myeloid leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy. *Cancer*. 2012 Jun 15;118(12):3123–7.
66. Guerreiro T, Antunes L, Bastos J, Mayer A, Forjaz G, Araujo A, et al. Lung Cancer: A Nationwide Study to Characterize Sex Differences, Incidence, and Spatial Patterns in Portugal. *In Vivo*. 2020 Sep 1;34(5):2711–9.
67. Hosomi Y, Morita S, Sugawara S, Kato T, Fukuhara T, Gemma A, et al. Gefitinib Alone Versus Gefitinib Plus Chemotherapy for Non-Small-Cell Lung Cancer With Mutated Epidermal Growth Factor Receptor: NEJ009 Study. *J Clin Oncol*. 2020;38(2):115–23.
68. Santoni-Rugiu E, Melchior LC, Urbanska EM, Jakobsen JN, de Stricker K, Grauslund M, et al. Intrinsic Resistance to EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitors in EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: Differences and Similarities with Acquired Resistance. *Cancers (Basel)*. 2019 Jul 1;11(7).
69. Lovly CM, Shaw AT. Molecular pathways: resistance to kinase inhibitors and implications for therapeutic strategies. *Clin Cancer Res*. 2014 May 1;20(9):2249–56.
70. Frankfurt O, Licht JD. Ponatinib - A step forward in overcoming resistance in chronic myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research*. 2013 Nov 1;19(21):5828–34.
71. O'Hare T, Shakespeare WC, Zhu X, Eide CA, Rivera VM, Wang F, et al. AP24534, a Pan-BCR-ABL Inhibitor for Chronic Myeloid Leukemia, Potently Inhibits the T315I Mutant and Overcomes Mutation-Based Resistance. *Cancer Cell*. 2009 Nov 11;16(5):401.
72. Husain H, Scur M, Murtuza A, Bui N, Woodward B, Kurzrock R. Strategies to Overcome Bypass Mechanisms Mediating Clinical Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibition in Lung Cancer. *Mol Cancer Ther*. 2017 Feb 1;16(2):265–72.



# Anexos

## A1. Fármacos Aprovados

Nome	Alvos	Uso clínico	Aprovação
Fasudil	ROCK	Vasoespasm cerebral	1995 Japão 2010 China
Trastuzumab*	HER2	Cancro da mama HER2+ Cancro do estômago	1998 FDA 2000 EMA
Sirolimus	FKBP12/mTOR	Profilaxia de rejeição no transplante renal Doença do enxerto versus hospedeiro (GVHD)	1999 FDA 2001 EMA
Imatinib	BCR-ABL KIT PDGFR	Leucemia mieloide crónica Ph+ Leucemia linfoblástica aguda Ph+ Tumores do estroma gastrointestinal Síndrome mielodisplásica/Doenças mieloproliferativas	2001 FDA 2001 EMA
Gefitinib	EGFR	Carcinoma do pulmão de não pequenas células	2003 FDA 2009 EMA
Cetuximab*	EGFR	Cancro colorretal metastático EGFR+ Carcinoma pavimentocelular da cabeça e pescoço	2004 FDA 2004 EMA
Bevacizumab*	VEGFR	Carcinoma metastizado do cólon ou do reto Cancro da mama Cancro do pulmão de não pequenas células Carcinoma de células renais Cancro epitelial do ovário, da trompa de Falópio ou cancro peritoneal primário Carcinoma do colo do útero	2004 FDA 2005 EMA
Erlotinib	EGFR	Carcinoma do pulmão de não pequenas células Cancro do pâncreas	2004 FDA 2005 EMA
Sorafenib	RAF VEGFR	Carcinoma hepatocelular Carcinoma de células renais Carcinoma diferenciado da tiroide	2005 FDA 2006 EMA
Sunitinib	PDGFR VEGFR	Tumores malignos do estroma gastrointestinal Carcinoma de células renais Tumores neuroendócrinos pancreáticos	2006 FDA 2006 EMA
Dasatinib	BCR-ABL	Leucemia mieloide crónica Ph+ Leucemia linfoblástica aguda Ph+	2006 FDA 2006 EMA
Panitumumab*	EGFR	Carcinoma colorretal metastizado	2006 FDA 2007 EMA
Lapatinib	EGFR HER2	Cancro da mama HER2+	2007 FDA 2008 EMA
Nilotinib	BCR-ABL	Leucemia mieloide crónica Ph+	2007 FDA 2007 EMA
Temsirolimus	FKBP12/mTOR	Carcinoma de células renais avançado	2007 FDA 2007 EMA
Nimotuzumab*	EGFR	Carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço	2008 China
Everolimus	FKBP12/mTOR	Cancro da mama HR+ HER2- Tumores neuroendócrinos de origem pancreática Tumores neuroendócrinos de origem gastrointestinal ou pulmonar Carcinoma de células renais Convulsões relacionadas com a esclerose tuberosa	2009 FDA 2009 EMA
Pazopanib	VEGFR PDGFR	Carcinoma de células renais Sarcoma de tecidos moles	2009 FDA 2010 EMA
Ruxolitinib	JAK1/2	Mielofibrose Policitemia vera Doença do enxerto contra o hospedeiro Dermatite atópica	2011 FDA 2012 EMA

Vandetanib	EGFR VEGFR	Cancro medular da tiroide	2011 FDA 2012 EMA
Vemurafenib	BRAF	Melanoma com mutação BRAF V600	2011 FDA 2012 EMA
Crizotinib	ALK MET ROS1	Carcinoma do pulmão de não pequenas células ALK+ ou ROS1+	2011 FDA 2012 EMA
Icotinib	EGFR	Carcinoma do pulmão de não pequenas células	2011 China
Radotinib	BCR-ABL	Leucemia mieloide crónica Ph+	2012 Coreia do Sul
Axitinib	VEGFR PDGFR	Carcinoma de células renais	2012 FDA 2012 EMA
Pertuzumab*	HER2	Cancro da mama HER2+	2012 FDA 2013 EMA
Tofacitinib	JAK1-3 TYK2	Artrite reumatoide Artrite psoriática Espondilite anquilosante Colite ulcerosa Artrite idiopática juvenil	2012 FDA 2017 EMA
Bosutinib	BCR-ABL	Leucemia mieloide crónica resistente ou intolerante	2012 FDA 2013 EMA
Cabozantinib	VEGFR	Carcinoma de células renais Carcinoma hepatocelular	2012 FDA 2013 EMA
Ponatinib	BCR-ABL	Leucemia mieloide crónica Ph+ com a mutação T315I	2012 FDA 2013 EMA
Regorafenib	VEGFR TIE	Cancro colorretal Tumores do estroma gastrointestinal Carcinoma hepatocelular	2012 FDA 2013 EMA
Trastuzumab- emtandine*	HER2	Cancro da mama HER+	2013 FDA 2013 EMA
Dabrafenib	BRAF	Melanoma com mutação BRAF V600 Carcinoma do pulmão de não pequenas células com mutação BRAF V600	2013 FDA 2013 EMA
Trametinib	MEK	Melanoma com mutação BRAF V600 Carcinoma do pulmão de não pequenas células com mutação BRAF V600	2013 FDA 2014 EMA
Afatinib	EGFR	Carcinoma do pulmão de não pequenas células com mutações no EGFR	2013 FDA 2013 EMA
Ibrutinib	BTK	Linfoma de células do manto Leucemia linfocítica crónica Macroglobulinemia de <i>Waldenström</i>	2013 FDA 2014 EMA
Ramucirumab*	VEGFR	Carcinoma gástrico Carcinoma colorretal Carcinoma do pulmão de não pequenas células Carcinoma hepatocelular	2014 FDA 2014 EMA
Nintedanib	FGFR PDGFR VEGFR	Cancro do pulmão de não pequenas células Fibrose pulmonar idiopática	2014 FDA 2014 EMA
Idelalisib	PI3K	Leucemia linfocítica crónica Linfoma folicular	2014 FDA 2014 EMA
Ceritinib	ALK ROS1	Carcinoma do pulmão de não pequenas células ALK+	2014 FDA 2015 EMA
Rivoceranib (Apatinib)	VEGFR	Adenocarcinoma gástrico avançado	2014 China
Ripasudil	ROCK	Glaucoma Hipertensão ocular	2014 Japão
Alectinib	ALK	Carcinoma do pulmão de não pequenas células ALK+	2015 FDA 2017 EMA

Cobimetinib	MEK	Melanoma com mutação BRAF V600	2015 FDA 2015 EMA
Lenvatinib	VEGFR FGFR PDGF KIT RET	Carcinoma Diferenciado da Tireoide Carcinoma Hepatocelular Carcinoma do Endométrio	2015 FDA 2015 EMA
Palbociclib	CDK4/6	Cancro da mama HR+ HER2-	2015 FDA 2016 EMA
Osimertinib	EGFR	Carcinoma do pulmão de não pequenas células T790M+	2015 FDA 2016 EMA
Necitumumab*	EGFR	Carcinoma do pulmão de não pequenas células	2015 FDA 2016 EMA
Olmutinib	EGFR	Carcinoma do pulmão de não pequenas células T790M+	2016 Coreia do Sul
Olaratumab*	PDGFR $\alpha$	Sarcoma dos tecidos moles	2016 FDA 2016 EMA
Neratinib	HER2	Cancro da mama HER2+	2017 FDA 2018 EMA
Ribociclib	CDK4/6	Cancro da mama HR+ HER2-	2017 FDA 2017 EMA
Copanlisib	PI3K	Linfoma folicular	2017 FDA
Abemaciclib	CDK4/6	Cancro da mama HR+ HER2-	2017 FDA 2018 EMA
Acalabrutinib	BTK	Linfoma de células do manto Leucemia linfocítica crónica	2017 FDA 2020 EMA
Midostaurina	FLT3	Leucemia mieloide aguda FLT3+ Mastocitose sistémica agressiva, Mastocitose sistémica com neoplasia hematológica associada ou Leucemia de mastócitos	2017 FDA 2017 EMA
Baricitinib	JAK1/2	Artrite reumatoide	2017 EMA 2018 FDA
Brigatinib	ALK	Carcinoma do pulmão de não pequenas células ALK+	2017 FDA 2018 EMA
Netarsudil	ROCK	Glaucoma Hipertensão ocular	2017 FDA 2019 EMA
Tivozanib	VEGFR	Carcinoma de células renais	2017 EMA 2021 FDA
Simotinib	EGFR	Carcinoma do pulmão de não pequenas células	2018 China
Fostamatinib	SYK	Trombocitopenia imune crónica	2018 FDA 2020 EMA
Encorafenib	BRAF	Melanoma com mutação BRAF V600	2018 FDA 2018 EMA 2019 Japão
Binimetinib	MEK1/2	Melanoma com mutação BRAF V600	2018 FDA 2018 EMA 2019 Japão
Anlotinib (Catequentinib)	VEGFR	Carcinoma do pulmão de não pequenas células	2018 China
Duvelisib	PI3K $\delta/\gamma$	Leucemia linfocítica crónica Linfoma folicular	2018 FDA 2021 EMA
Dacomitinib	EGFR	Carcinoma do pulmão de não pequenas células EGFR+	2018 FDA 2019 Japão 2019 EMA
Lorlatinib	ALK ROS1	Carcinoma do pulmão de não pequenas células ALK+	2018 Japão 2018 FDA 2019 EMA
Larotrectinib	TRK	Tumores sólidos NTRK+	2018 FDA

			2019 EMA 2021 Japão
Gilteritinib	FLT3	Leucemia mieloide aguda FLT3+	2018 Japão 2018 FDA 2019 EMA
Pyrotinib	HER2	Cancro da mama HER2+	2018 China
Fruquintinib	VEGFR	Cancro colorretal metastático	2018 China
Peficitinib	JAK	Artrite reumatoide	2019 Japão
Erdafitinib	FGFR	Carcinoma urotelial	2019 FDA
Alpelisib	PI3K $\alpha$	Cancro da mama HR+ HER2-	2019 FDA 2020 EMA
Pexidartinib	CSF1R KIT	Tumor de células gigantes tenossinovial	2019 FDA
Entrectinib	NTRK ROS1	Tumores sólidos NTRK+ Carcinoma do pulmão de não pequenas células ROS1+	2019 Japão 2019 FDA 2020 EMA
Upadacitinib	JAK1	Artrite reumatoide Artrite psoriática Dermatite atópica	2019 FDA 2019 EMA 2020 Japão
Fedratinib	JAK2	Esplenomegalia Mielofibrose	2019 FDA 2021 EMA
Zanubrutinib	BTK	Linfoma de células do manto Macroglobulinemia de <i>Waldenström</i>	2019 FDA 2021 EMA
Flumatinib	BCR-ABL	Leucemia mieloide crónica Ph+	2019 China
Trastuzumab deruxtecano*	HER2	Cancro da mama HER2+	2019 FDA 2020 Japão 2021 EMA
Delgocitinib	JAK	Dermatite atópica	2020 Japão
Avapritinib	KIT PDGFR	Tumores do estroma gastrointestinal Mastocitose sistémica avançada	2020 FDA 2020 EMA
Almonertinib	EGFR	Carcinoma do pulmão de não pequenas células T790M+	2020 China
Tirabrutinib	BTK	Linfoma primário do sistema nervoso central Macroglobulinemia de <i>Waldenström</i>	2020 Japão
Selumetinib	MEK1/2	Neurofibromas plexiformes	2020 FDA 2021 EMA
Tucatinib	HER2	Cancro da mama HER2+	2020 FDA 2021 EMA
Pemigatinib	FGFR2	Colangiocarcinoma	2020 FDA 2021 Japão 2021 EMA
Capmatinib	MET	Carcinoma do pulmão de não pequenas células com alterações no exão 14 do MET	2020 FDA 2020 Japão
Selpercatinib	RET VEGFR	Carcinoma do pulmão de não pequenas células Cancro da tiróide	2020 FDA 2021 EMA 2021 Japão
Ripretinib	KIT	Tumores do estroma gastrointestinal	2020 FDA 2021 EMA
Pralsetinib	RET	Carcinoma do pulmão de não pequenas células Cancro da tiróide	2020 FDA 2021 EMA
Filgotinib	JAK	Artrite reumatoide	2020 EMA 2020 Japão
Tirbanibulina	SRC	Queratose actínica	2020 FDA 2021 EMA
Margetuximab*	HER2	Cancro da mama HER2+	2020 FDA
Orelabrutinib	BTK	Linfoma de células do manto Leucemia linfocítica crónica Linfoma linfocítico	2020 China

Tepotinib	MET	Carcinoma do pulmão de não pequenas células com alterações no exão 14 do MET	2021 FDA 2022 EMA
Umbralisib	PI3Kδ	Linfoma da zona marginal Linfoma folicular	2021 FDA
Trilaciclib	CDK4/6	Carcinoma do pulmão de pequenas células	2021 FDA
Amivantamab*	EGFR MET	Carcinoma do pulmão de não pequenas células com mutações no exão 20 do EGFR	2021 FDA 2021 EMA
Infigratinib	FGFR	Colangiocarcinoma FGFR+	2021 FDA
Savolitinib	MET	Carcinoma do pulmão de não pequenas células com alterações no exão 14 do MET	2021 China
Belumosudil	ROCK2	Doença do enxerto versus hospedeiro (GVHD)	2021 FDA
Mobocertinib	EGFR	Carcinoma do pulmão de não pequenas células com mutações no exão 20 do EGFR	2021 FDA
Asciminib	BCR-ABL	Leucemia mieloide crónica Ph+ com a mutação T315I	2021 FDA 2022 Japão
Abrocitinib	JAK1	Dermatite atópica	2021 Japão 2021 EMA 2022 FDA
Pacritinib	JAK2	Mielofibrose	2022 FDA