

**Universidade de Lisboa  
Faculdade de Farmácia**



**Terapias dirigidas contra o cancro:  
inibidores de cinases no melanoma maligno  
e no cancro colorretal metastáticos**

**Raquel Sofia Direitinho Pedras**

Monografia orientada pela Professora Doutora Ana Paula Francisco,  
Professora Auxiliar.

**Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas**

**2022**

**Universidade de Lisboa  
Faculdade de Farmácia**



**Terapias dirigidas contra o cancro:  
inibidores de cinases no melanoma maligno  
e no cancro colorretal metastáticos**

**Raquel Sofia Direitinho Pedras**

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

Monografia orientada pela Professora Doutora Ana Paula Francisco,  
Professora Auxiliar.

**2022**

# Resumo

A terapia dirigida compreende o uso de fármacos ou outras substâncias que têm como alvo biomoléculas específicas com funções essenciais no crescimento e proliferação das células cancerígenas de forma a bloquear este crescimento e disseminação.

Dos agentes utilizados na terapia dirigida fazem parte os inibidores de baixo peso molecular, cujo alvo são maioritariamente as cinases que fazem parte de vias de transdução de sinais e estão, por isso, envolvidas na regulação e progressão do ciclo celular, na morte celular, na metastização e na angiogénese.

Um exemplo de vias de transdução de sinais que se encontram desreguladas devido a mutações numa ou mais das suas cinases é a via MAPK/ERK. A descoberta destas mutações na via MAPK/ERK e o seu envolvimento no melanoma fez com que esta via fosse extensivamente estudada, resultando na aprovação de inibidores das cinases BRAF e MEK.

Por sua vez, a iniciação, a progressão e a metastização do cancro colorretal também depende de várias vias de transdução de sinais, sendo a via do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) uma das mais relevantes, visto que este e respetivos recetores (VEGFR) desempenham um papel central na angiogénese do tumor. Desta forma, dada a importância da angiogénese no cancro colorretal metastático, diferentes estratégias terapêuticas têm sido usadas e estudadas para a inibir, incluindo inibidores de cinases.

Apesar de se ter verificado uma resposta e uma regressão do tumor com a utilização dos inibidores de cinases já aprovados, ao fim de algum tempo surge o aparecimento de resistências. Portanto, ainda existe a necessidade de esclarecer os mecanismos moleculares e compreender completamente o efeito destes inibidores e de continuar a desenvolver novos inibidores.

Nesta monografia é feita uma revisão sobre os inibidores de cinases atualmente aprovados no tratamento do melanoma e do cancro colorretal metastático, focando-se sobretudo nas interações com os alvos terapêuticos e nas relações estrutura-atividade.

**Palavras-chave:** Terapia dirigida; Inibidor de cinases; Melanoma; Cancro colorretal.

# Abstract

Targeted therapy consists of the use of drugs or other substances that target specific biomolecules with essential functions in the growth and proliferation of cancer cells to block this growth and progression.

The agents used in targeted therapy include small molecule inhibitors, whose target are mostly kinases that are part of signal transduction pathways and are therefore involved in the regulation and progression of the cell cycle, cell death, metastasis, and angiogenesis.

An example of signal transduction pathways that are dysregulated due to mutations in at least one of the kinases is the MAPK/ERK pathway. The discovery of these mutations in the MAPK/ERK pathway and their involvement in melanoma made this pathway extensively studied, resulting in the approval of BRAF and MEK inhibitors.

Moreover, the initiation, progression and metastasis of colorectal cancer also depend on several signal transduction pathways, being one of the most relevant the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway since this and its receptors (VEGFR) play a central role in tumor angiogenesis. Therefore, given the importance of angiogenesis in metastatic colorectal cancer, different therapeutic strategies have been used and studied to inhibit it, including kinase inhibitors.

Although there has been a response and tumor regression with the use of already approved kinase inhibitors, after some time resistance appears. Therefore, it is still necessary to clarify the molecular mechanisms and fully understand the effect of these inhibitors, and to continue to develop new inhibitors.

This monograph reviews the kinase inhibitors currently approved for the treatment of melanoma and metastatic colorectal cancer, focusing mainly on the interactions with the therapeutic targets and the structure-activity relationship.

**Keywords:** Targeted therapy; Kinase inhibitors; Melanoma, Colorectal cancer.

# **Agradecimentos**

A elaboração desta monografia não teria sido possível sem o contributo de algumas pessoas. Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Professora Doutora Ana Paula Francisco pela disponibilidade, apoio e conhecimentos transmitidos que me ajudaram ao longo destes últimos meses.

Quero também deixar o meu agradecimento aos meus amigos, que são uma parte fundamental da minha vida, por estarem sempre presentes para me apoiarem e motivarem.

Por fim, obrigada aos meus pais, ao meu irmão e aos meus avós pelo apoio incondicional e por todo o carinho que me deram. Não seria a pessoa que sou hoje sem vocês.

# Abreviaturas

ATP – Trifosfato de Adenosina

CCR – Cancro Colorretal

CDK – *Cyclin-dependent Kinase*

CSF1R – *Receptor of the Colony-stimulating Factor-1*

DCI –Dacarbazina

EGFR – *Epidermal Growth Factor Receptor*

EMA – *European Medicines Agency* (Agência Europeia do Medicamento)

ERBB3 – *Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 3*

ERK – *Extracellular Signal-regulated Kinase*

FAK – *Focal Adhesion Kinase*

FGFR – *Fibroblast Growth Factor Receptor*

FDA– *Food and Drug Administration*

G-CSF – *Granulocyte Colony-stimulating Factor*

IC<sub>50</sub> – Concentração inibitória média

IGF1 – *Insulin-like Growth Factor 1*

IGFR1 – *Insulin-like Growth Factor 1 Receptor*

MAPK – *Mitogen-activated Protein Kinase*

MEK – *Mitogen-activated Protein Kinase Kinase*

MET – *Mesenchymal-epithelial Transition Factor*

MTD – *Maximum Tolerated Dose*

mTOR – *Mammalian Target of Rapamycin*

PDGFR – *Platelet-derived Growth Factor Receptor*

PI3K –*Phosphoinositide 3-kinases*

RAF – *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*

RAS – *Rat sarcoma virus*

RB – *Retinoblastoma Protein*

RTK – *Receptor Tyrosine kinase*

RTKI – *Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor*

SDF-1 – *Stromal Cell-derived Factor 1*

SG – Sobrevivência Global

VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor*

VEGFR – *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*

UV –Ultravioleta

# Índice

	pág.
1 Cinasas e os seus inibidores .....	1
2 Inibidores de cinases no melanoma .....	3
2.1 Inibidores de BRAF .....	6
2.1.1 Vemurafenib .....	6
2.1.2 Dabrafenib .....	9
2.1.3 Resistência aos inibidores de BRAF .....	11
2.2 Inibidores de MEK .....	12
2.2.1 Trametinib .....	13
2.2.2 Cobimetinib .....	15
2.2.3 Resistência aos inibidores de MEK .....	17
2.3 Encorafenib e Binimetinib .....	17
2.4 Inibidores de CDK4/6 .....	18
3 Inibidores de cinases no cancro colorretal .....	24
3.1 Inibidores de VEGFR-2 .....	25
3.1.1 Regorafenib .....	28
3.1.2 Fruquintinib .....	30
3.1.3 Resistência aos inibidores de VEGFR .....	32
4 Conclusões .....	34
Referências Bibliográficas .....	35

# Índice de figuras

pág.

Figura 1 – Via de sinalização de MAPK/ERK. Adaptado de (5).....	5
Figura 2 – Vemurafenib ligado ao dímero de BRAF V600E. Adaptado de (4).....	7
Figura 3 – Estrutura química do Vemurafenib e a sua ligação aos resíduos de aminoácidos. Adaptado de (8).....	8
Figura 4 – Estrutura do Vemurafenib (a verde) ligado à bolsa do ATP (as linhas vermelhas a tracejado indicam as ligações de hidrogénio). Adaptado de (4).....	8
Figura 5 – Dabrafenib (a azul) ligado à bolsa do ATP em BRAF V600E (as linhas vermelhas a tracejado indicam as ligações de hidrogénio). Adaptado de (4).....	10
Figura 6 – Sobreposição da proteína BRAF V600E ligada ao Vemurafenib (a laranja) e ao Dabrafenib (a cinzento). Adaptado de (4).....	10
Figura 7 – Sobreposição do Dabrafenib (a azul) e do Vemurafenib (a laranja) na bolsa de ligação do ATP em BRAF V600E. Adaptado de (4).....	10
Figura 8 – Representação espacial das interações entre MEK e os seus inibidores. Adaptado de (16).....	13
Figura 9 – Ligação do Trametinib (a amarelo) a MEK1. Adaptado de (15).....	14
Figura 10 – Ligações de hidrogénio entre Trametinib e MEK1. Adaptado de (17).....	15
Figura 11 – Cobimetinib e grupos químicos essenciais. Adaptado de (16).....	16
Figura 12 – Interações do Cobimetinib com MEK (as linhas vermelhas a tracejado indicam ligações de hidrogénio). Adaptado de (4).....	16
Figura 13 – Via de sinalização de CDK4/6. Adaptado de (19).....	19
Figura 14 – Via MAPK/ERK e CDK4/6 alteradas no melanoma. Adaptado de (20)....	20
Figura 15 – Características em comum entre os inibidores. Adaptado de (22).....	21
Figura 16 – Interações essenciais entre os grupos químicos de Palbociclib (esquerda), Abemaciclib (centro) e Ribociclib (direita) e a cinase. Adaptado de (23).....	22
Figura 17 – Interações essenciais entre os inibidores e os resíduos de aminoácidos de CDK6. Adaptado de (23).....	22
Figura 18 – Via de sinalização de VEGF envolvida na angiogénese. Adaptado de (29).....	25
Figura 19 – Diferença entre as formas de ligação dos inibidores de tipo I (Sunitinib) e tipo II (Sorafenib). Adaptado de (32).....	26
Figura 20 – Estrutura química do Regorafenib e grupos químicos fundamentais. Adaptado de (32).....	29
Figura 21 – Ligação do Regorafenib a VEGFR-2. Adaptado de (32).....	30
Figura 22 – Estrutura química do Fruquintinib e os seus grupos químicos essenciais. Adaptado de (32).....	31
Figura 23 - Ligação do Fruquintinib a VEGFR-2. Adaptado de (32).....	32

# 1 Cinases e os seus inibidores

A terapia dirigida consiste no uso de fármacos ou outras substâncias que têm como alvo biomoléculas específicas com funções cruciais no crescimento e proliferação das células cancerígenas e que atuando sobre estas biomoléculas bloqueiam este crescimento e disseminação destas células. Desta forma, a identificação de alvos ideais é essencial para o sucesso do desenvolvimento de terapêuticas dirigidas no cancro. Estas biomoléculas incluem antigénios de superfície celular, fatores de crescimento, recetores ou vias de transdução de sinais e estão envolvidas na regulação e progressão do ciclo celular, na morte celular, na metastização e na angiogénese.

Os agentes utilizados na terapia dirigida são divididos em inibidores de baixo peso molecular, anticorpos monoclonais, vacinas imunoterapêuticas e terapia genética.

Os inibidores de baixo peso molecular (< 900 Da) têm a capacidade de entrar dentro das células e atingir proteínas específicas. Muitos destes inibidores atuam na inativação de cinases e na interrupção das vias de sinalização que se encontram desreguladas durante a carcinogénese. Por outro lado, estes inibidores podem também ter como alvo os proteassomas, cinases dependentes de ciclinas (CDKs), entre outros. As cinases, o alvo da terapia dirigida em que se irá focar esta monografia, desempenham um papel significativo na regulação das vias de sinalização que modulam muitas funções fisiológicas, como o crescimento, a proliferação, a migração das células e a angiogénese. A desregulação destas cinases pode, por isso, provocar respostas celulares inadequadas levando à progressão de diversas doenças como, por exemplo, o cancro (1).

Quanto à sua estrutura, as cinases apresentam regiões conservadas, com destaque para a presença de um domínio cinase característico desta família de proteínas e que é responsável pela atividade catalítica de transferência do grupo fosfato do ATP para o substrato. Este domínio cinase é, por sua vez, caracterizado por apresentar dois lóbulos, o lóbulo N-terminal e C-terminal, que se ligam através de uma região denominada de *hinge* (que traduzido para o português é “dobradiça”, uma vez que é uma região altamente flexível). Para além disso, há uma tríade de aminoácidos conservada em todas as proteínas cinases conhecida como DFG e que é constituída pela sequência de aminoácidos de aspartato (D), fenilalanina (F) e glicina (G).

Os inibidores das cinases podem ser classificados em tipo I, II, III, IV e irreversíveis. Em primeiro lugar, os inibidores tipo I são competitivos do ATP, uma vez que interagem no sítio de ligação do ATP na cinase e na sua conformação ativa (conformação DFG-in). O sítio de reconhecimento molecular destes inibidores é a região *hinge*, porém podem também explorar as bolsas hidrofóbicas adjacentes com o objetivo de aumentar a potência da inibição e uma maior seletividade.

Por sua vez, os inibidores tipo II inibem a cinase na sua conformação inativa (conformação DFG-out). O sítio do reconhecimento molecular destes inibidores é a região *hinge*, podendo explorar as bolsas hidrofóbicas acessíveis, incluindo a bolsa hidrofóbica adjacente ao DFG que só se encontra acessível quando a cinase está na sua conformação DFG-out.

No caso dos inibidores do tipo III, o reconhecimento molecular ocorre exclusivamente num sítio alostérico adjacente à região *hinge*, sem nenhuma interação com o sítio de ligação do ATP e, por isso, são considerados não competitivos de ATP.

Quanto aos inibidores tipo IV, estes são referentes aos inibidores alostéricos cujo reconhecimento molecular ocorre num sítio distante da região *hinge* e, assim, não apresentam nenhum contato espacial com o sítio de ligação do ATP.

Por fim, além dos inibidores reversíveis mencionados anteriormente, existem os inibidores irreversíveis que são capazes de interagir com a proteína alvo através da formação de ligações covalentes (2).

## 2 Inibidores de cinases no melanoma

Os cancros da pele ocorrem com frequência e podem ser divididos em duas categorias: não-melanoma e melanoma. Os cancros da pele não-melanoma incluem os carcinomas basocelular e espinocelular, juntamente com outros tipos raros de cancro da pele. Em conjunto, são a forma de cancro mais comum em muitos países, porém raramente levam à morte. Por sua vez, os cancros da pele melanoma representam menos casos (menos de 1% de todos os casos de cancro de pele), são, no entanto, responsáveis por 80% das mortes. A incidência do melanoma tem aumentado nas últimas décadas, principalmente em países desenvolvidos e com população maioritariamente de pele clara, sendo o sétimo cancro com maior incidência na Europa e o quinto na América do Norte.

Segundo os dados de GLOBOCAN 2020, estima-se que ocorreram em 2020 a nível global 325.000 novos casos de melanoma, sendo a taxa de incidência padronizada de 3,8 por 100.000 nos homens e de 3 por 100.000 nas mulheres, com riscos cumulativos ao longo da vida de 0,42% e 0,33%, respetivamente. Quanto ao número de mortes, estima-se que 57.000 pessoas morreram de melanoma em 2020, resultando numa mortalidade de 0,7 por 100.000 indivíduos nos homens e 0,4 por 100.000 nas mulheres mundialmente (3,4).

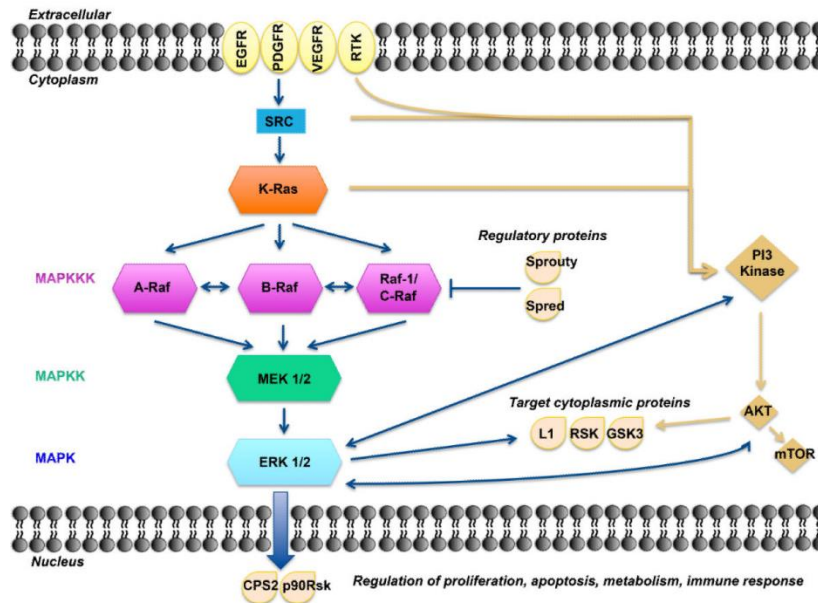
O melanoma é classificado em quatro subtipos clínicos, de acordo com a localização e aparência do tumor: melanoma nodular, melanoma lentigo, melanoma acral lentiginoso e, o mais frequente, o melanoma de extensão superficial, responsável por 50-70% dos casos. Geralmente, os melanomas nodulares e acral lentiginosos apresentam um mau prognóstico devido à sua rápida disseminação e progressão. Nos estádios iniciais do melanoma (estadio I e II), o tumor está localizado e pode ser tratado por cirurgia e terapêutica adjuvante. Nestes casos, o prognóstico é frequentemente positivo e, quando a espessura do tumor é inferior a 2 mm, a taxa de sobrevivência a 20 anos chega a 75% (90% quando a espessura do tumor é inferior a 1 mm). Pelo contrário, quando o tumor já se encontra na sua forma metastática (estadio III, isto é, metástases locais, e estadio IV, isto é, metástases distantes), o tratamento torna-se difícil e a taxa de sobrevivência diminui drasticamente. A taxa de sobrevivência a 5 anos associada à forma metastática do melanoma varia de 5 a 19%, havendo diferenças notáveis conforme a localização da

metástase. Por exemplo, quando cutânea, a taxa de sobrevivência em 5 anos chega a 19%, no entanto cai para 7-10% quando localizada no pulmão ou outros órgãos.

Este tipo de cancro surge quando os melanócitos (células localizadas principalmente na pele, folículos pilosos e olhos, onde é produzida a melanina, o pigmento responsável pela coloração da pele e do cabelo) se tornam malignos devido ao surgimento de mutações. Na pele, os melanócitos estão localizados na camada basal da epiderme, na interface com a derme. Os melanócitos são fundamentais na defesa do nosso organismo contra as radiações do sol. Em condições normais, após a exposição aos raios UV, estes produzem melanina através da cascata de sinalização mediada por queratinócitos, ativando assim a resposta de bronzeamento, que permite que a pele evite danos causados pelos raios UV e efeitos mutagênicos. No entanto, em condições para o surgimento de cancro, várias mutações nos genes reguladores do crescimento resultam na proliferação e disseminação de melanócitos, cujo crescimento já não é mais dependente da cascata de sinalização mediada por queratinócitos.

A compreensão das cascatas de sinalização que estão envolvidas na desregulação do crescimento celular no melanoma é por este motivo essencial para o desenvolvimento de terapêuticas eficientes.

A via MAPK/ERK (Figura 1) desempenha um papel fundamental na origem e proliferação do melanoma. Em circunstâncias normais, a via *wild-type* MAPK/ERK é ativada por estímulos extracelulares, como fatores de crescimento ou citocinas. A ligação destes mediadores aos recetores de tirosina cinase (RTKs), como EGFR, IGF1 ou PDF, induz a dimerização e auto-fosforilação na região C-terminal destes recetores. Em seguida, estes recrutam diversas proteínas que impulsionam a ativação de RAS e, conseqüentemente, esta recruta as isoformas da cinase RAF (A, B e C) para a membrana plasmática, onde sofrem dimerização e são ativadas por fosforilação. Na sua forma ativa, as isoformas de RAF ativam as cinases MEK1 e MEK2, que catalisam assim a ativação de ERK1 e ERK2. Posteriormente, a ERK1 ou ERK2 fosforila uma grande variedade de substratos no citoplasma ou no núcleo, que estão envolvidos na proliferação, diferenciação e sobrevivência das células. A ocorrência de mutações ao longo desta via podem afetar as cinases RAS, RAF ou MEK, resultando na ativação contínua desta via e, por isso, na ocorrência e progressão do melanoma.



**Figura 1 – Via de sinalização de MAPK/ERK. Adaptado de (5).**

Identificou-se a presença da forma mutada da proteína RAS em aproximadamente 20% dos casos de melanoma e, por isso, esta poderia ser um alvo terapêutico. No entanto, a terapêutica dirigida a esta proteína ainda é um desafio e existem outros alvos terapêuticos de maior importância. Como consequência, nenhum inibidor de RAS se encontra disponível para o tratamento de melanoma metastático.

Por sua vez, a proteína RAF, como já foi referido, tem três isoformas, ARAF, BRAF e CRAF, onde a segunda apresenta a maior atividade de cinase basal e é considerado o ativador mais potente de MEK1 e MEK2. Para além disso, verificou-se a presença de mutações na isoforma BRAF em cerca de 60% dos casos de melanoma. Quanto à estrutura desta isoforma, esta consiste em dois lóbulos separados por uma fenda catalítica. Na sua conformação inativa, também designada de *DFG-out*, os lóbulos estão próximos um do outro e estabilizados por interações hidrofóbicas, dificultando o acesso à fenda catalítica. Para mudar para a sua forma ativa, a BRAF tem de ser fosforilada por RAS em dois resíduos chave (Thr599 e Ser602), que se encontram no segmento de ativação de BRAF.

Esta fosforilação resulta na desestabilização das interações hidrofóbicas entre os dois lóbulos e, como consequência, a proteína muda para a sua conformação ativa e a fenda catalítica torna-se acessível. É de referir que o *wild-type* da RAF é capaz de ativar MEK1 e MEK2 sozinho, porém fá-lo principalmente através da formação de

homodímeros e heterodímeros (por exemplo, BRAF/BRAF, CRAF/CRAF, BRAF/CRAF e assim por diante). As mutações da isoforma BRAF são frequentes e resultam na sua ativação contínua. Estas mutações ocorrem normalmente em resíduos chave envolvidos nas interações hidrofóbicas entre os dois lóbulos da proteína. Até à data, aproximadamente 70 formas mutadas de BRAF foram caracterizadas e o mutante BRAF V600E é bastante predominante no melanoma, sendo encontrado em 70-90% de todas as mutações BRAF V600. Nesta mutação, o resíduo de valina na posição 600 é substituído por ácido glutâmico. A estrutura do ácido glutâmico carregada negativamente imita o grupo fosfato da proteína RAS quando esta ativa a BRAF. Por conseguinte, a proteína BRAF fica bloqueada na sua conformação ativa, exibindo uma atividade de cinase aumentada. Assim, a BRAF mutada é 500 vezes mais ativa que a BRAF *wild-type* e é capaz de ativar a MEK1 ou MEK2, incluindo na sua forma monomérica.

Por último, a proteína MEK também se pode encontrar mutada no melanoma, porém em menor grau (cerca de 6-7% dos casos). Como referido anteriormente, existem dois isómeros, MEK1 e MEK2, que compartilham 86% de resíduos idênticos no seu domínio catalítico e são igualmente capazes de fosforilar ERK1/2. Estes fosforilam os resíduos Thr202 e Tyr204, que se encontram dentro da alça de ativação de ERK1/2. Para além disso, como MEK está posicionado a jusante de RAF, é também um alvo importante para o tratamento de formas mutadas de MAPK/ERK no melanoma, sejam mutantes de RAS ou RAF.

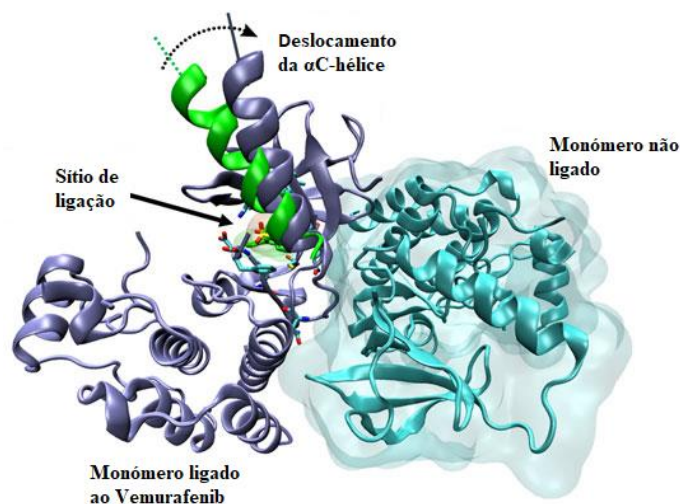
A descoberta das referidas mutações na via MAPK/ERK e o seu envolvimento no melanoma fez com que esta via fosse extensivamente estudada e resultou na aprovação em 2011 do primeiro inibidor de BRAF para o tratamento do melanoma metastático, o Vemurafenib. Nos anos seguintes outros inibidores de BRAF e de MEK foram também aprovados (4).

## **2.1 Inibidores de BRAF**

### **2.2 Vemurafenib**

O Vemurafenib foi aprovado, pela FDA e EMA em 2011 e 2012 respetivamente, em monoterapia para o tratamento de doentes adultos com melanoma irresssecável ou metastático, positivo para a mutação BRAF V600. Este, sendo um inibidor tipo I, liga-se ao sítio de ligação do ATP de apenas um dos monómeros e na sua conformação *DFG-in*,

resultando num deslocamento da  $\alpha$ C-hélice para fora. Assim, o resíduo Lys483 não se encontra orientado adequadamente para coordenar a ligação do ATP e a ponte salina entre Lys483 e Glu501 na  $\alpha$ C-hélice é quebrada, o que afeta a dimerização de BRAF e, conseqüentemente, há a interrupção da via de sinalização de RAF em células mutadas (Figura 2) (6,7).

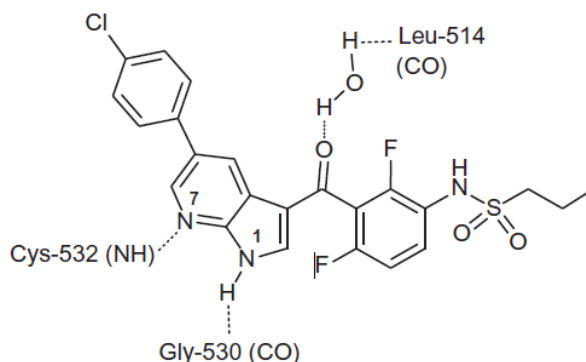


**Figura 2 – Vemurafenib ligado ao dímero de BRAF V600E. Adaptado de (4).**

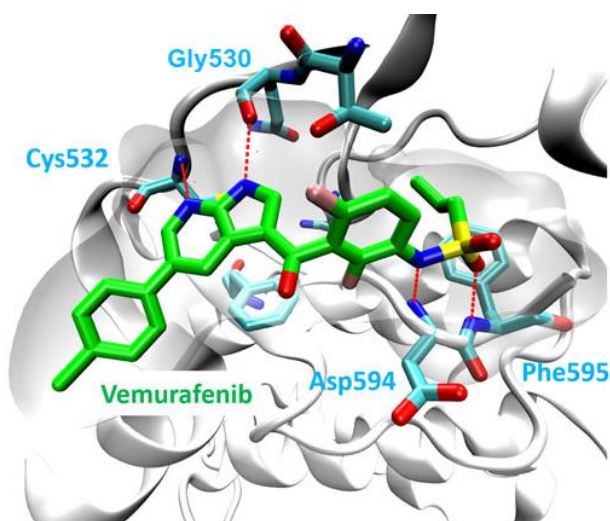
Por sua vez, observam-se as seguintes interações do Vemurafenib com a cinase (Figuras 3 e 4):

1. O grupo 5-fenil-7-azaindol ocupa a bolsa de ligação do ATP e encontra-se rodeado por Trp531 na região *hinge* e Phe583 no lóbulo C-terminal. Está fortemente confinado na região de ligação da adenina da bolsa de ligação do ATP e rodeado por vários resíduos, como Cys532, Trp531, Thr529, Leu514 e Ala481); para além disso, o N7 serve como aceitador da ligação de hidrogénio da amida principal do resíduo Cys532, enquanto N1 serve como dador da ligação de hidrogénio para o carbonilo principal de Gly530;
2. A cetona aumenta a potência da molécula e o seu carbonilo serve como aceitador de uma ligação de hidrogénio mediada por uma molécula de água e ativada pelo Leu514;
3. O grupo difluorofenilo assenta numa bolsa hidrofóbica que contém oito resíduos de aminoácidos (Ala481, Val482, Lys483, Val471, Ile527, Thr529, Leu514 e Phe583);

4. O grupo arilsulfonamida interage com a amida principal dos resíduos Asp594 e Phe595;
5. O grupo propilo imerge numa pequena bolsa hidrofóbica única da família RAF, o que dá a seletividade pretendida para BRAF V600E entre as outras cinases, incluindo BRAF *wild-type* (4,7,8).



**Figura 3 – Estrutura química do Vemurafenib e a sua ligação aos resíduos de aminoácidos. Adaptado de (8).**



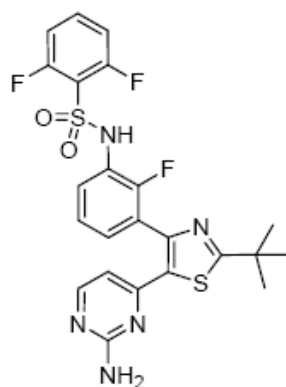
**Figura 4 – Estrutura do Vemurafenib (a verde) ligado à bolsa do ATP (as linhas vermelhas a tracejado indicam as ligações de hidrogénio). Adaptado de (4).**

Foi demonstrado em ensaios enzimáticos *in vitro* que Vemurafenib inibe BRAF V600E com uma  $IC_{50}$  de 31 nM. Em comparação este fármaco precisa até 100 nM para atingir uma  $IC_{50}$  contra BRAF *wild type*. Para além disso, este inibidor também apresentou valores bons de  $GI_{50}$  em mutações alternativas de BRAF V600E (como V600R, V600D, K601E).

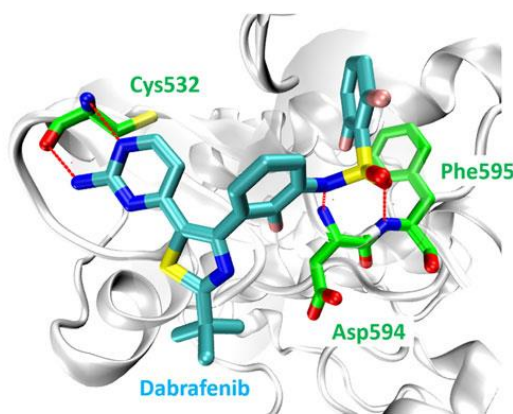
Apesar do Vemurafenib ter apresentado um pior perfil de segurança relativamente ao medicamento comparador (DCI – dacarbazina) e observar-se como efeitos adversos mais comuns a artralgia, erupção cutânea, náusea, fadiga, fotossensibilidade e, paradoxalmente, o desenvolvimento de pequenos tumores de pele (carcinomas de células escamosas, ceratoacantomas), foram demonstrados benefícios claros na fase III do ensaio clínico. No grupo do Vemurafenib, a taxa de resposta foi de 48% (5% com DCI) e a sobrevivência global (SG) em 6 meses foi de 84% (64% com DCI). Para além disso, a SG mediana com Vemurafenib foi de até 13,3 meses e até 10 meses com DCI (4,9).

### 2.2.1 Dabrafenib

Com a aprovação de Vemurafenib, o interesse por fármacos direcionados para o melanoma e, por isso, o Dabrafenib, outro inibidor de BRAF, foi aprovado pela FDA e EMA em 2013. Este é um inibidor de BRAF V600E reversível e competitivo de ATP, e a sua forma de atuar é semelhante ao Vemurafenib. Desta forma, o Dabrafenib interage com a região *hinge* de BRAF através da ligação do nitrogénio de pirimidina com o resíduo Cys532, e o grupo sulfonamida interage com os resíduos Asp594 e Phe595 na bolsa de ligação do ATP (Figura 5) (4,10).

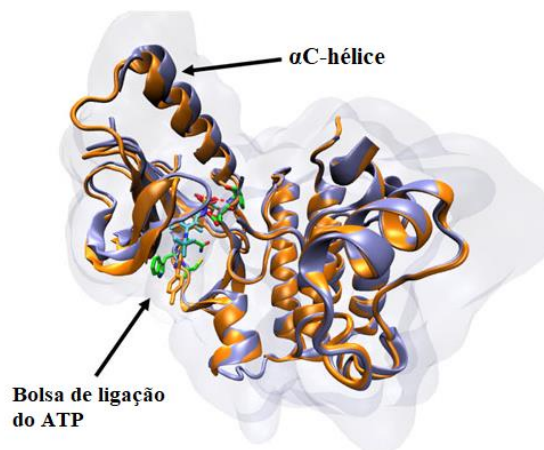


Dabrafenib

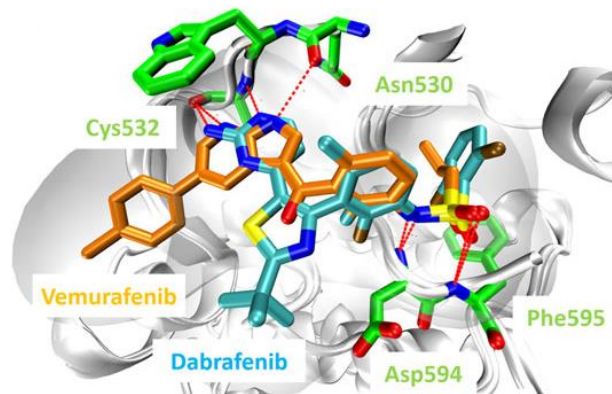


**Figura 5 – Dabrafenib (a azul) ligado à bolsa do ATP em BRAF V600E (as linhas vermelhas a tracejado indicam as ligações de hidrogénio). Adaptado de (4).**

Para além disso, uma sobreposição das estruturas do Dabrafenib e do Vemurafenib ligados à BRAF permite verificar uma conformação proteica semelhante e um deslocamento da  $\alpha$ -hélice comparável (Figura 6). Ainda comparando estes dois inibidores, também se observam interações semelhantes com os resíduos Asp594, Phe595 e Cys532, e o grupo difluorofenilo do Dabrafenib liga-se à mesma bolsa hidrofóbica que o grupo propilo do Vemurafenib (Figura 7) (4).



**Figura 6 – Sobreposição da proteína BRAF V600E ligada ao Vemurafenib (a laranja) e ao Dabrafenib (a cinzento). Adaptado de (4).**



**Figura 7 – Sobreposição do Dabrafenib (a azul) e do Vemurafenib (a laranja) na bolsa de ligação do ATP em BRAF V600E. Adaptado de (4).**

Nos ensaios enzimáticos *in vitro* foi demonstrado que Dabrafenib apresenta uma  $IC_{50}$  para BRAF V600E e BRAF *wild-type* no mesmo intervalo (0,7nM e 5,2nM respetivamente). No entanto, a nível celular inibe seletivamente o crescimento de linhas celulares com mutações em BRAF, nomeadamente as mutações V600E, V600D e

V600K. A sua atividade diminui drasticamente quando BRAF se encontra na sua forma *wild-type*, demonstrando assim alta seletividade de Dabrafenib para as formas mutadas.

Num ensaio clínico de fase III com DCI (dacarbazina) como medicamento comparador, os doentes tratados com Dabrafenib apresentaram uma taxa de resposta de 50% (6% com DCI) e uma Sobrevivência Livre de Progressão mediana de 5,1 meses (2,7 meses com DCI). Para além disso, verificou-se uma melhoria na SG mediana de 18 meses com Dabrafenib e de 15 meses para DCI.

Por outro lado, o Dabrafenib e o Vemurafenib apresentaram uma eficácia semelhante nos ensaios clínicos, porém existem diferenças significativas em termos de toxicidade. Embora estes fármacos não tenham sido comparados diretamente num ensaio clínico, a toxicidade cutânea aparece com menos frequência com o Dabrafenib do que com o Vemurafenib, e outros efeitos adversos tendem a ser menos frequentes em doentes submetidos à terapêutica com o Dabrafenib (4).

### **2.2.2 Resistência aos inibidores de BRAF**

A descoberta do Vemurafenib e Dabrafenib foi um marco importante no tratamento do melanoma metastático, uma vez que permitiu prolongar o tempo de vida de doentes diagnosticados com este cancro. No entanto, a monoterapia com estes fármacos apresentou importantes limitações. Apesar de se verificar uma resposta rápida e uma regressão do tumor, a maioria dos doentes tratados com Dabrafenib ou Vemurafenib manifestou reincidência num ano, com cerca de 70% dos doentes a apresentar resistência adquirida a estes fármacos. (4)

A resistência é normalmente mediada pela reativação da via MAPK/ERK e pode ocorrer através de vários mecanismos: mutações ativadoras *upstream* (por exemplo, mutações em NRAS ou KRAS) ou alterações *downstream* da via MAPK (mutações em MEK1/2 ou em ERK), ativação de vias de sinalização paralelas (por exemplo, a via PI3K), aumento da expressão de recetores da tirosina cinase (por exemplo, EGFR, PDGFR $\beta$ , MET, ERBB3, IGFR1), e a amplificação ou *splicing* alternativo do gene BRAF.

Para além disso, a monoterapia com inibidores de BRAF também leva ao aparecimento de episódios cutâneos hiperproliferativos, incluindo o carcinoma espinocelular e queratoacantoma. Eventualmente percebeu-se que estas toxicidades

cutâneas estão associadas à ativação paradoxal da via MAPK em células que expressam BRAF *wild-type*. Nestas células, o tratamento com inibidores de BRAF leva à dimerização de RAF (com a formação de homodímeros de CRAF ou heterodímeros de CRAF-BRAF) e à transativação do membro do dímero que não se encontra ligado ao inibidor. Isto, por sua vez, leva à ativação exacerbada da via MAPK, induzindo os episódios cutâneos hiperproliferativos referidos anteriormente.

Posto isto, a inibição completa da via MAPK pode ser necessária para induzir a apoptose no melanoma com mutação em BRAF V600. Assim, a combinação de um inibidor de BRAF com a inibição *downstream* de MEK1 e MEK2 foi proposta de forma a maximizar a inibição da via MAPK e prevenir o aparecimento de resistências (11).

### **2.3 Inibidores de MEK**

Paralelamente ao desenvolvimento dos inibidores de BRAF, diversos estudos focaram-se na descoberta de inibidores de MEK, sendo este o segundo alvo molecular no tratamento do melanoma. Como referido anteriormente, existem duas formas de MEK nos humanos, MEK1 e MEK2, que partilham uma sequência de aminoácidos 79% idêntica e, por isso, não foi possível obter seletividade entre estas duas formas durante o desenvolvimento dos inibidores (4,12).

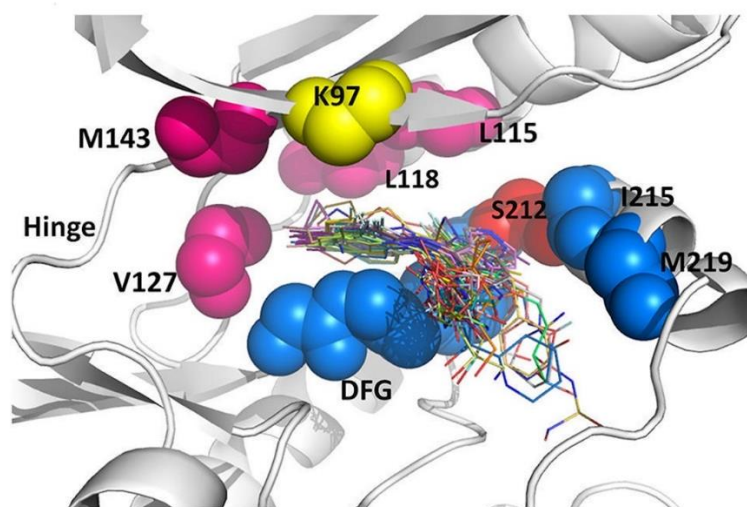
MEK possui uma bolsa alostérica adjacente à bolsa de ligação do ATP, à qual se ligam os inibidores de MEK, sendo por isso inibidores tipo III. Três inibidores deste tipo foram aprovados em monoterapia ou em combinação com inibidores de BRAF para o tratamento de melanomas com a mutação BRAF V600: Vemurafenib e Cobimetinib, Dabrafenib e Trametinib, e Encorafenib e Binimetinib (13,14).

Quanto às interações entre MEK e os inibidores, estas podem ser divididas em três regiões espaciais. A primeira região é uma sub-bolsa hidrofóbica que consiste em Leu115, Leu118, Val127 e Met143 (representado a roxo na Figura 8), sendo as interações apolares. Desta forma, os inibidores têm grupos hidrofóbicos na sua estrutura que se ligam nesta sub-bolsa.

Quanto à segunda região, esta consiste em Lys97, um importante resíduo de aminoácido catalítico, localizado no topo da bolsa de ligação (representado a amarelo na Figura 8) que interage com o átomo de oxigénio dos inibidores.

Por fim, na terceira região (representado a azul e vermelho na Figura 8) a interação mais importante é com o resíduo de aminoácido Ser212, uma vez que é essencial para a inibição de MEK. Assim sendo, os inibidores têm um grupo polar ou um grupo aceitador da ligação de hidrogénio para interagir com a amida da cadeia principal do resíduo de Ser212.

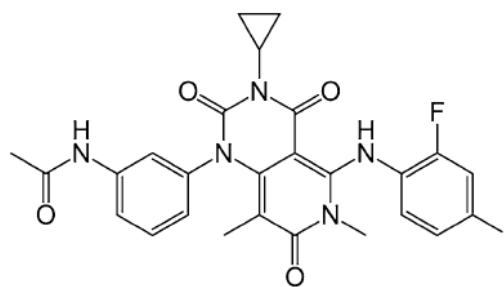
Para além disso, os diferentes inibidores estão sujeitos a interações específicas que envolvem outros aminoácidos de modo a conseguir a seletividade. Especificamente, a parte do inibidor exposta ao solvente pode ser substituída por diferentes átomos ou grupos químicos (15,16).



**Figura 8 – Representação espacial das interações entre MEK e os seus inibidores. Adaptado de (16).**

### 2.3.1 Trametinib

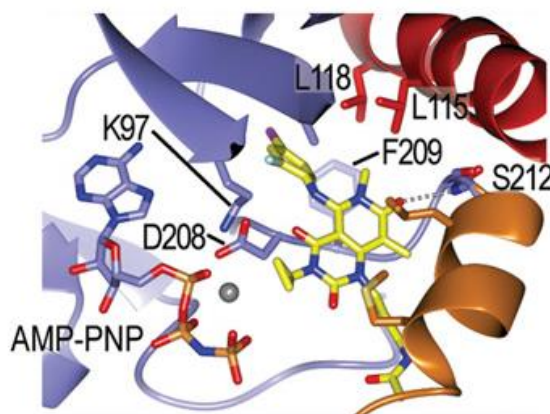
O Trametinib foi o primeiro inibidor de MEK1 e MEK2 a poder ser administrado por via oral aprovado pela FDA e EMA em 2013 e 2014, respetivamente, em monoterapia para o tratamento de doentes adultos com melanoma metastático ou irressecável com uma mutação BRAF V600. A ligação deste inibidor causa alterações conformacionais em MEK, bloqueando especificamente a acessibilidade das cinases RAF ao resíduo Ser217 na estrutura de MEK (4,17).



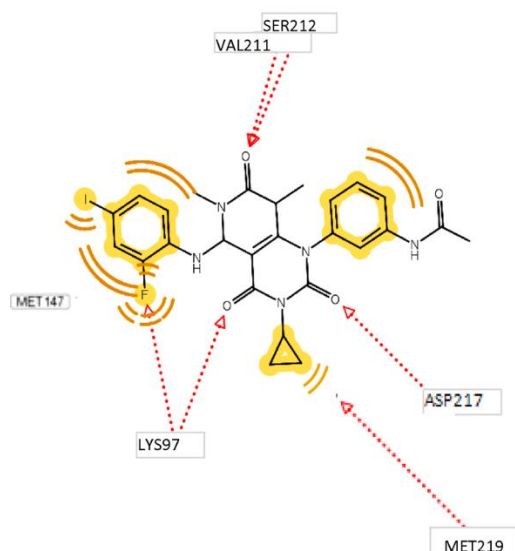
**Trametinib**

Observou-se as seguintes interações entre MEK1 e o Trametinib (Figura 9 e 10):

1. O grupo aromático 4-iodo-2-fluorofenilo ocupa a sub-bolsa hidrofóbica que se encontra por trás da bolsa de ligação do inibidor;
2. Formação de uma ligação de hidrogénio entre um átomo de oxigénio e o resíduo de aminoácido Ser212;
3. O resíduo de aminoácido Lys97 para além de formar uma ligação de hidrogénio com o átomo de oxigénio, também o faz com o átomo de flúor do inibidor.
4. Formação de outras ligações de hidrogénio entre os resíduos de aminoácidos e o inibidor, para além de interações hidrofóbicas adicionais (15,17).



**Figura 9 – Ligação do Trametinib (a amarelo) a MEK1. Adaptado de (15).**



**Figura 10 – Ligações de hidrogénio entre Trametinib e MEK1. Adaptado de (17).**

Foi demonstrado que o Trametinib é um inibidor bastante potente de MEK1 e MEK2, com uma  $IC_{50}$  igual a 0,7 e 0,9 nM, respetivamente, inibindo de forma eficaz o crescimento de células do melanoma com mutações BRAF V600. No entanto, é completamente ineficaz quando as células apresentam BRAF e RAS na sua forma *wild-type*.

Num ensaio clínico de fase III, cujo medicamento comparador foi a dacarbazina (DCI), os doentes tratados com Trametinib apresentaram uma taxa de resposta de 22% (8% com DCI), uma Sobrevivência Livre de Progressão mediana de 4,8 meses (1,5 meses com DCI) e uma SG mediana de 15,6 meses (11,3 meses com DCI). Os efeitos adversos mais comuns associados ao uso do Trametinib foram erupção cutânea, diarreia, edema periférico, fadiga e dermatite acneiforme (4).

No entanto, o principal uso do Trametinib é em associação com Dabrafenib, tendo esta combinação sido aprovada mais tarde também para o tratamento de doentes adultos com melanoma metastático ou irressecável com uma mutação BRAF V600. Como referido anteriormente, o uso desta combinação permitiu uma melhoria significativa das respostas clínicas e uma diminuição da toxicidade relacionada com a ativação paradoxal da via MAPK induzida pelo Dabrafenib (14).

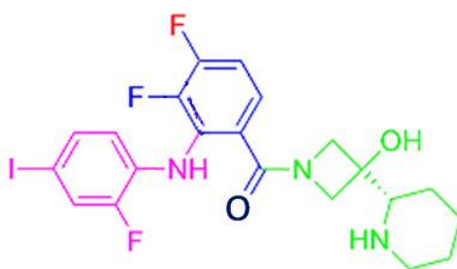
### 2.3.2 Cobimetinib

Em 2015, o Cobimetinib tornou-se o segundo inibidor de MEK a ser aprovado pela FDA e EMA. Ao contrário do Trametinib, o Cobimetinib apenas foi aprovado em

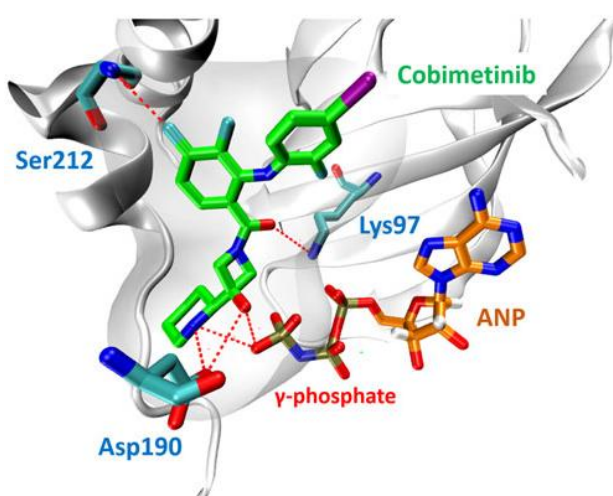
combinação com um inibidor de BRAF, o Vemurafenib, para o tratamento de doentes adultos com melanoma irrecorrível ou metastático com uma mutação BRAF V600 (4).

Tal como o Trametinib, o Cobimetinib liga-se à bolsa alostérica que se encontra próxima ao sítio de ligação do ATP e verificam-se as seguintes interações essenciais (Figura 11 e 12):

1. O grupo 4-iodo-2-fluorofenilo ocupa a sub-bolsa hidrofóbica, havendo, por isso, interações hidrofóbicas (representado a roxo na Figura 11);
2. Formação de uma ligação e hidrogénio entre o átomo de oxigénio do inibidor (representado a azul-escuro na Figura 11) e o grupo  $\epsilon$ -amino de Lys97, substituindo a ponte salina entre a mesma amina de Lys97 e Glu114 da C-hélice da cinase que é essencial para o estado ativo da enzima;
3. Ligação entre o átomo de nitrogénio da cadeia principal de Ser212 e o átomo de flúor do inibidor (representado a vermelho na Figura 11) (16).



**Figura 11 – Cobimetinib e grupos químicos essenciais. Adaptado de (16).**



**Figura 12 – Interações do Cobimetinib com MEK (as linhas vermelhas a tracejado indicam ligações de hidrogénio). Adaptado de (4).**

Num ensaio clínico de fase III, estudou-se a eficácia da combinação de Cobimetinib e Vemurafenib em comparação com o Vemurafenib em monoterapia. Os resultados demonstraram para a terapêutica de combinação uma taxa de resposta de 68% (45% com o Vemurafenib) e uma SG em 9 meses de 81% (73% com o Vemurafenib). Além disso, a combinação apresentou efeitos adversos semelhantes ao Vemurafenib em monoterapia. No entanto, estes efeitos foram considerados como gerenciáveis considerando a eficácia da terapêutica (4).

### **2.3.3 Resistência aos inibidores de MEK**

O desenvolvimento de inibidores de MEK reforçou o arsenal terapêutico para o tratamento do melanoma metastático e, de facto, a utilização de combinações de inibidores de BRAF e MEK aumentou substancialmente a duração da resposta a estes fármacos. Ainda assim, o desenvolvimento de inibidores de MEK como o Trametinib e o Cobimetinib não conseguiu impedir o aparecimento de resistências, apenas o adiou.

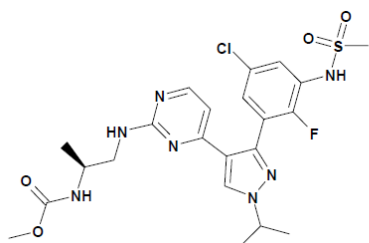
Estas resistências ocorrem principalmente devido à reativação da via MAPK/ERK originada por mutações em MEK1 e MEK2. Por sua vez, as mutações desenvolvem-se em consequência da exposição prolongada aos inibidores de MEK e podem ocorrer no sítio de ligação do inibidor, impedindo a sua ligação, ou tornam MEK ativa sem a necessidade de ocorrer a sua fosforilação. A amplificação dos oncogenes de BRAF V600E e de RAS também pode ser a causa da resistência, uma vez que aumenta o número de MEK fosforiladas. Por fim, em menor grau, a resistência aos inibidores de MEK pode também ser devida a uma maior ativação de vias alternativas (como, por exemplo, PI3K-Akt) ou pela perda do *feedback* negativo por parte de ERK1 e ERK2 (4).

## **2.4 Encorafenib e Binimetinib**

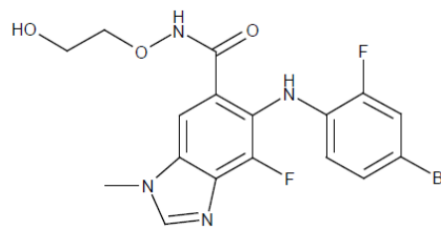
A associação de Encorafenib e Binimetinib foi a terceira combinação de um inibidor de BRAF e um inibidor de MEK aprovada (em 2018 pela FDA e EMA) para o tratamento de melanoma com a mutação BRAF V600. Verificou-se que houve uma melhoria da Sobrevida Livre de Progressão com a combinação de Encorafenib mais Binimetinib em comparação com as outras combinações de inibidores de BRAF e MEK.

Desta forma, esta melhoria na eficácia pode estar relacionada com a farmacocinética distinta do Encorafenib que, com a sua ligação prolongada à molécula alvo (apresenta uma semi-vida de dissociação significativamente maior de 30 horas, em

comparação com a semi-vida de 2 e 0,5 horas de Dabrafenib e Vemurafenib, respectivamente), proporciona uma maior inibição de BRAF e um aumento da potência em comparação com os outros fármacos da mesma classe. Além disso, o Encorafenib é também um inibidor altamente específico de BRAF, o que resulta numa menor toxicidade deste inibidor, uma vez que há menos efeitos *off-target* (18).



**Encorafenib**



**Binimetinib**

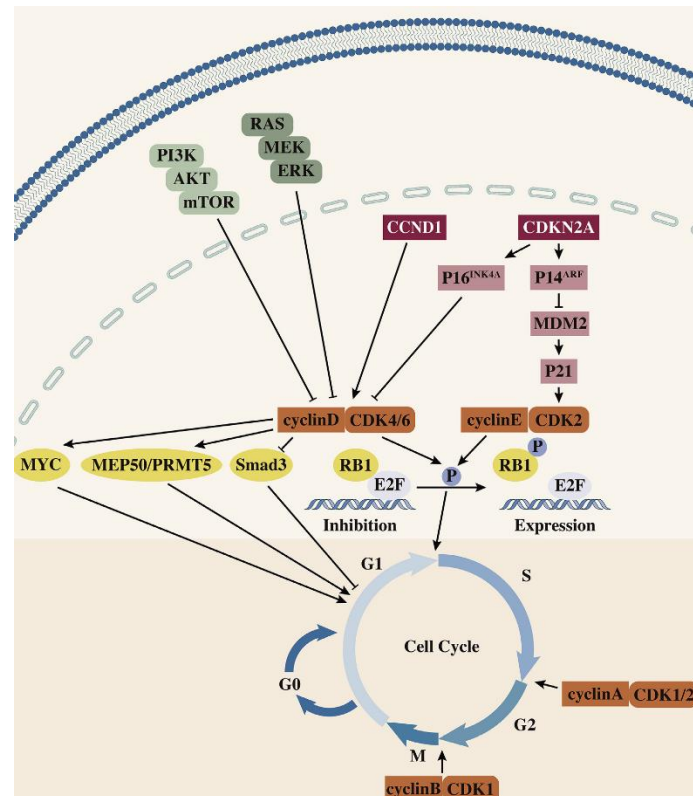
Apesar de a inibição conjunta de BRAF e MEK ter se tornado o tratamento padrão para doentes com melanoma avançado e positivo para a mutação BRAF, a resistência e a toxicidade continuam a ser um problema para muitos doentes. Por isso, é necessário que outras opções de tratamento sejam investigadas. Uma possibilidade que tem vindo a ser estudada é a combinação tripla com um terceiro agente, como um inibidor de CDK4/6, visto que poderá a melhorar a atividade antitumoral (18).

## 2.5 Inibidores de CDK4/6

As cinases dependentes de ciclina 4 e 6 (CDK4/6) controlam o primeiro intervalo entre fases (G1 e S) do ciclo celular, demonstrando o seu potencial como alvo antitumoral. Estas cinases, que são reguladas por ciclinas tipo D, fosforilam e inibem a proteína supressora de tumor do retinoblastoma (RB). RB é um regulador central da transição do ciclo celular G1-S. Na sua forma não fosforilada, RB liga-se e inibe os fatores de transcrição da família E2 (E2F), impedindo a transcrição de genes associados à progressão do ciclo celular e consequente entrada na fase S.

As CDK4/6 desempenham, portanto, um papel fundamental na regulação do ciclo celular em G1, uma vez que interferem no estado de fosforilação e na subsequente função de RB. A atividade anormal de CDK4/6 leva a uma fosforilação exacerbada de RB, uma progressão mediada por E2F através de G1 e, por isso, a uma proliferação celular descontrolada, uma característica do cancro. Esta hiperatividade de CDK4/6 é geralmente devido a uma mutação ou deleção que inativa o gene CDKN2A, que codifica o inibidor

de CDK4/6, p16<sup>INK4a</sup> (Figura 13). A via p16<sup>INK4a</sup>/CiclinaD-CDK4/6/RB encontra-se desregulada em vários câncros, incluindo em 90% dos melanomas. Em muitos câncros, isto deve-se à perda da função da própria RB, no entanto, no melanoma a RB encontra-se muitas vezes funcional e a atividade anormal desta via é principalmente impulsionada pela perda de p16<sup>INK4a</sup> e, conseqüentemente, à atividade aumentada de CDK4/6 (Figura 14). Desta forma, CDK4/6 é um alvo terapêutico relevante para o tratamento de diversas neoplasias, incluindo o melanoma.

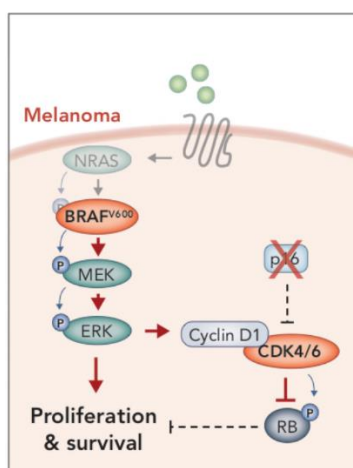


**Figura 13 – Via de sinalização de CDK4/6. Adaptado de (19).**

Para além disso, a combinação de inibidores de CDK4/6 e inibidores da via RAS/RAF/MEK/ERK é uma estratégia promissora para ultrapassar resistências e para aumentar a atividade antitumoral. Como referido anteriormente, na maioria dos casos a resistência aos inibidores BRAF e MEK deve-se à reativação da via MAPK/ERK e esta via e a via de CDK4/6 convergem no complexo ciclina D1-CDK4/6.

Estudos anteriores demonstraram que a atividade anormal de CDK4/6 aumentou a resistência aos inibidores de BRAF e, por isso, a combinação de inibidores de CDK4/6 com inibidores de MAPK/ERK pode ser benéfica para atenuar ou ultrapassar a resistência aos inibidores de BRAF. O momento em que se adiciona o inibidor de CDK4/6 ao

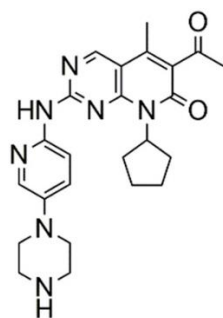
tratamento com o inibidor de BRAF e MEK deve ser tido em consideração, uma vez que afetará o seu mecanismo de ação e consequente eficácia. Num estudo, foi demonstrado que o tratamento inicial com o inibidor de CDK4/6 Palbociclib e os inibidores de BRAF e MEK pode prevenir o desenvolvimento de resistências aos fármacos e induzir uma regressão tumoral robusta e sustentada, tendo o efeito sido superior ao observado pelo inibidor da BRAF sozinho ao da inibição dupla de BRAF e MEK. No entanto, a resposta sinérgica é perdida quando o Palbociclib é adicionado após as células do melanoma terem adquirido resistência à inibição de BRAF (19,20).



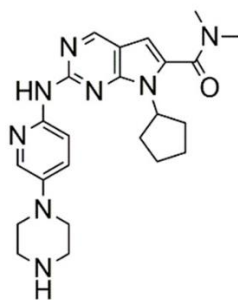
**Figura 14 – Via MAPK/ERK e CDK4/6 alteradas no melanoma. Adaptado de (20).**

Ao longo dos anos vários inibidores de CDK foram desenvolvidos e testados em diferentes tipos de cancro. A primeira geração de inibidores, devido à sua ação em diversas cinases, apresentaram um desequilíbrio entre a eficácia e a toxicidade. Por sua vez, os inibidores de segunda geração foram desenvolvidos com o objetivo de aumentar a seletividade e a potência da inibição, porém nos ensaios clínicos apresentaram uma eficácia limitada e uma toxicidade significativa, tendo esta sido associada à sua ação em isoformas fundamentais para a proliferação (CDK1) e sobrevivência (CDK9) de células normais.

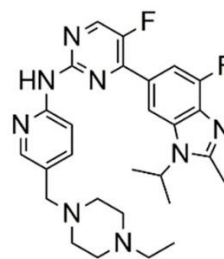
Contudo, nos últimos anos desenvolveram-se os inibidores de terceira geração que inibem seletivamente CDK4/6 com uma forte eficácia e uma toxicidade reduzida. Exemplos destes inibidores aprovados pela FDA e EMA são Palbociclib (em 2015 e 2016, respetivamente), Ribociclib (em 2017) e Abemaciclib (em 2017 e 2018, respetivamente) (21).



**Palbociclib**



**Ribociclib**

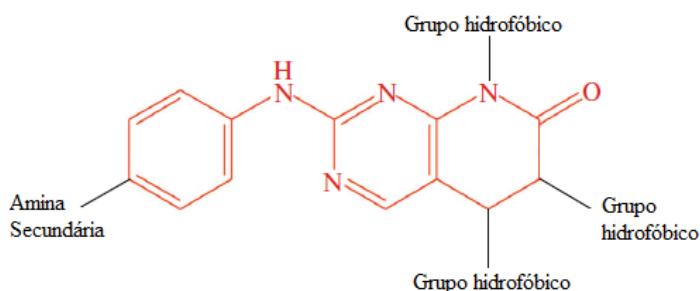


**Abemaciclib**

As características que o Palbociclib e o Ribociclib têm em comum são as seguintes (Figura 15):

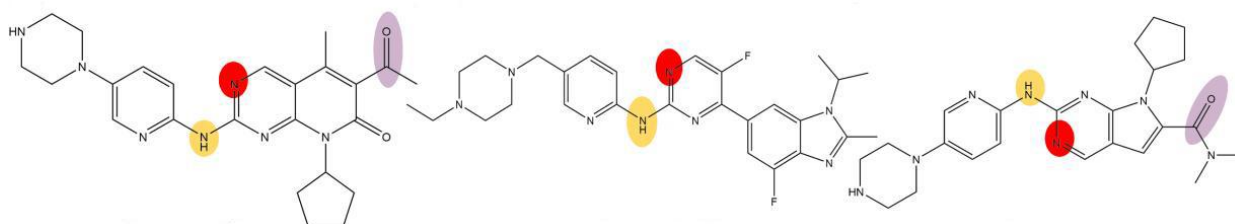
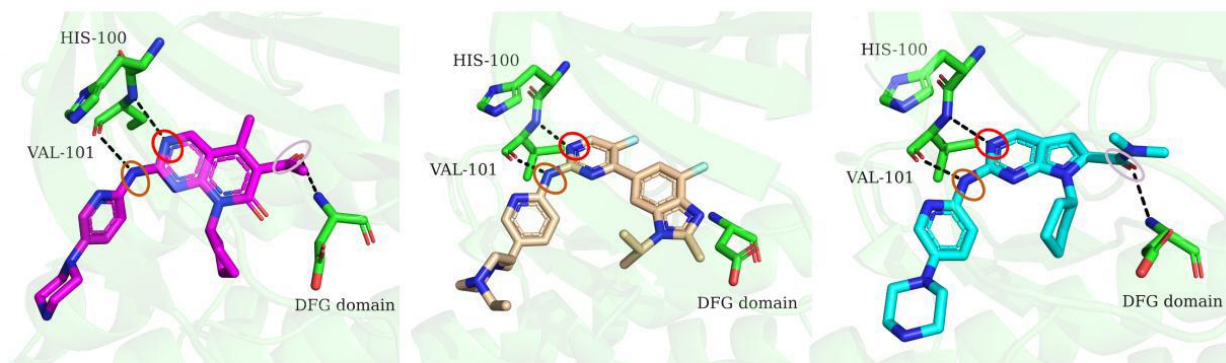
1. A pirimidina que se encontra ligada a um heterociclo, que por sua vez é substituído por uma cetona;
2. O grupo NH como espaçador entre a pirimidina e o grupo fenilo;
3. O grupo fenilo que na posição *para* é substituído por uma amina secundária;
4. Grupos hidrofóbicos adicionais em diferentes posições ligados ao heterociclo anexado à pirimidina.

Por sua vez, o Abemaciclib apresenta as mesmas características à exceção do heterociclo anexado à pirimidina e os grupos aí substituídos (22).



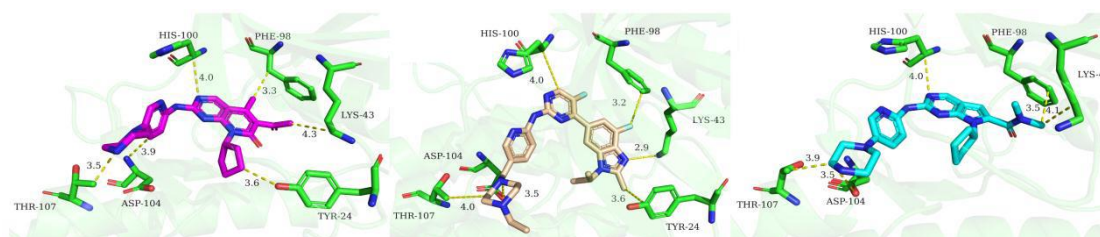
**Figura 15 – Características em comum entre os inibidores. Adaptado de (22).**

Dos grupos químicos referidos, para o Palbociclib e o Ribociclib, os mais importantes são 3N-pirimidina, NH como espaçador e o carbonilo. Quanto ao Abemaciclib há dois grupos químicos importantes: NH como espaçador e 3N-pirimidina (Figura 16) (23).



**Figura 16 – Interações essenciais entre os grupos químicos de Palbociclib (esquerda), Abemaciclib (centro) e Ribociclib (direita) e a cinase. Adaptado de (23).**

Estes são inibidores competitivos de ATP, formando ligações de hidrogénio no sítio de ligação do ATP com resíduos de aminoácidos da região *hinge* da cinase e interações hidrofóbicas na região normalmente ocupada pelo anel de adenina do ATP. Assim, o Palbociclib e o Abemaciclib ligam-se aos seguintes resíduos cruciais para inibir, neste caso, a função de CDK6: Tyr24, Lys43, Phe98, His100, Asp104 e Thr107. Por sua vez, o Ribociclib liga-se aos resíduos Lys43, Phe98, His100, Asp104 e Thr107 em CDK6 (Figura 17) (23).



**Figura 17 – Interações essenciais entre os inibidores e os resíduos de aminoácidos de CDK6. Adaptado de (23).**

Apesar de uma melhoria notável no tratamento do melanoma, existe ainda uma necessidade urgente de fármacos novos e eficazes. Os inibidores de CDK4/6 já inovaram a forma como se aborda o tratamento de outros cancros, nomeadamente o cancro da mama. Embora a sua utilidade clínica no melanoma seja provável, são necessários mais

estudos para confirmar a relevância dos inibidores de CDK4/6 de forma a se poder incluir estes fármacos na prática clínica. Com base nas evidências atualmente disponíveis, a monoterapia com os inibidores de CDK4/6 pode oferecer um benefício moderado na melhor das hipóteses. Por outro lado, a adição de inibidores de CDK4/6 a inibidores de BRAF e MEK pode oferecer um benefício substancial. Será, por isso, de particular relevância a avaliação das toxicidades destes regimes terapêuticos em combinação e a descoberta de biomarcadores preditivos que sejam confiáveis para aferir a eficácia dos inibidores de CDK4/6 (24).

### **3 Inibidores de cinases no cancro colorretal**

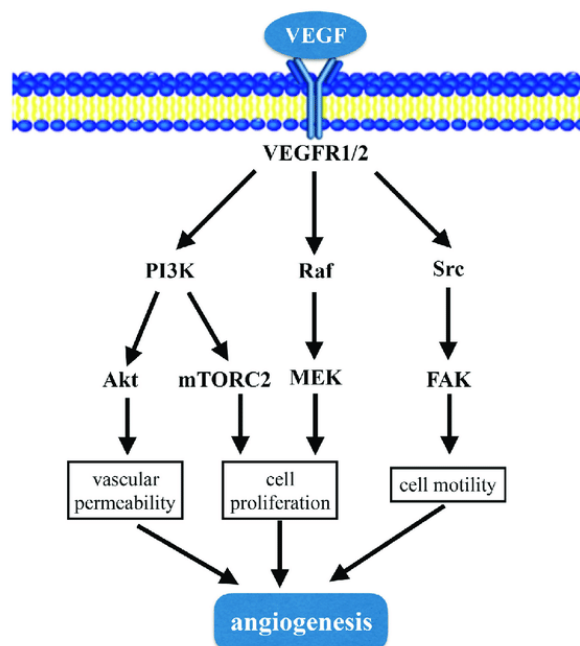
O cancro do intestino, cancro do cólon e o cancro retal têm muitas características em comum e são frequentemente agrupados como cancro colorretal (CCR), sendo, a nível global, o terceiro cancro com maior incidência (10% em 2020) e o segundo em termos de mortalidade (9,4% em 2020). Segundo os dados de GLOBOCAN 2020, estima-se que mais de 1,9 milhão de novos casos de cancro colorretal e 935.000 mortes ocorreram em 2020, representando cerca de um em cada 10 casos de cancro e mortes (25,26).

A maioria dos casos de CCR começa com pequenos pólipos adenomatosos que, com o tempo, podem tornar-se malignos. Desta forma, a reação imediata aos primeiros sintomas e o diagnóstico precoce contribui para o sucesso do tratamento e a sobrevivência dos doentes em mais de 90% dos casos. No entanto, nos estádios iniciais os sintomas no CCR podem ser mínimos ou inexistentes (25).

Em doentes com CCR, a metastização é a principal causa de mortalidade. Aproximadamente 25% dos doentes apresentam metástases à distância no momento do diagnóstico e, no decurso da doença, 40% irão desenvolver metástases, principalmente no fígado, pulmão e peritoneu, justificando as altas taxas de mortalidade. Para além disso, a taxa de sobrevivência aos 5 anos é de 60%, enquanto para os doentes que apresentam metástases à distância é de apenas 10-20%. Desta forma, é necessário continuar a pesquisar novas estratégias de tratamento do CCR (27,28).

A iniciação, a progressão e a metastização do CCR depende de várias vias de transdução de sinais, sendo as vias do recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) as mais relevantes. Relativamente à família das proteínas VEGF e aos seus recetores (VEGFRs), estes desempenham um papel central na angiogénese do tumor, uma vez que ativam múltiplas redes de sinalização, resultando no crescimento de células endoteliais, formação de vasos, aumento da permeabilidade vascular, sobrevivência do tumor, e proliferação e disseminação de metástases. Esta atividade angiogénica das proteínas VEGF é mediada pela sua ligação a recetores de tirosina cinase (TKRs) na superfície da célula, provocando, assim, a homodimerização ou heterodimerização do recetor e a posterior fosforilação dos

resíduos de tirosina do domínio intracelular, que leva à ativação de diversas vias de sinalização, como RAS-RAF-MAPK-FAK-SRC ou AKT-mTOR (Figura 18).



**Figura 18 – Via de sinalização de VEGF envolvida na angiogénese. Adaptado de (29).**

Por conseguinte, dada a importância da angiogénese no CCR metastático, diferentes estratégias terapêuticas têm sido usadas e estudadas para a inibir, incluindo inibidores orais que têm como alvo os recetores de tirosina cinase (27).

### 3.1 Inibidores de VEGFR-2

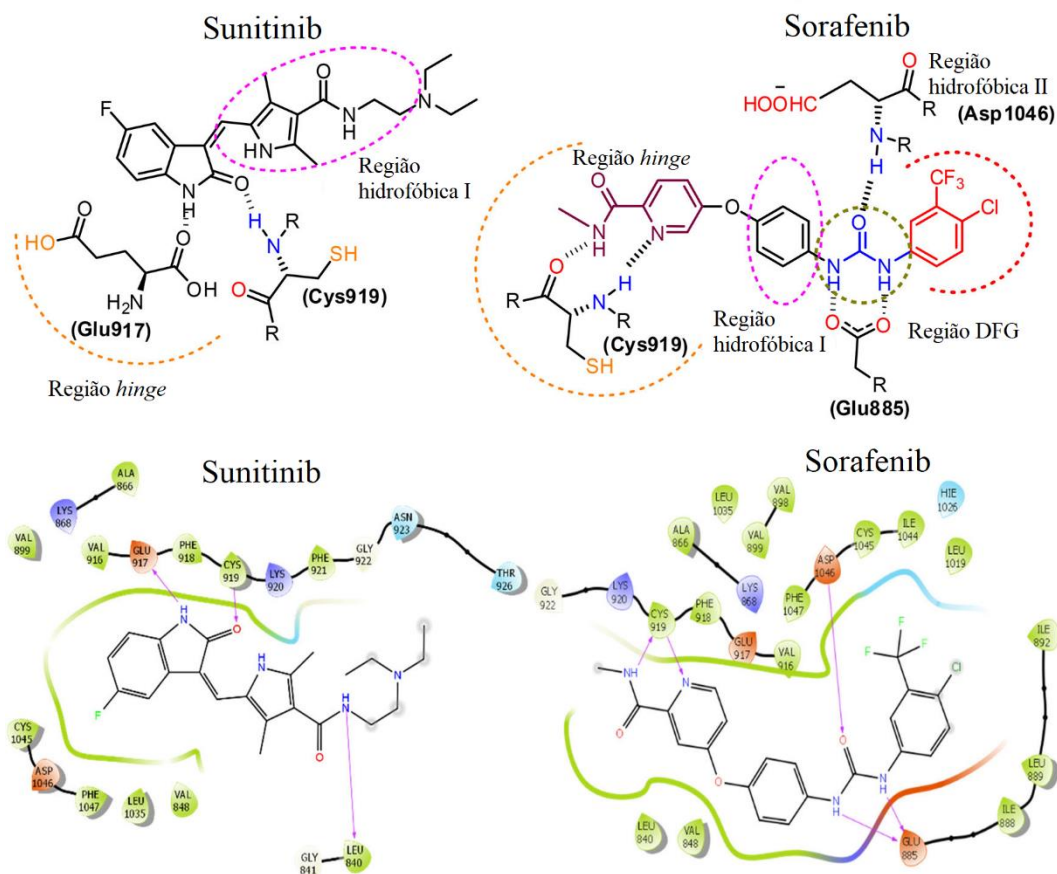
Diversos tipos de tumor apresentam a sobre-expressão de VEGFS e dos seus recetores, incluindo o cancro colorretal. A família de proteínas VEGF inclui cinco fatores, designadamente VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e fator de crescimento da placenta (PLGF). Relativamente aos recetores de VEGF, estes são categorizados em três tipos: VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3. De entre os três VEGFRs, o VEGFR-2 é o que apresenta um maior impacto na progressão da angiogénese e, por isso, a sua inibição é uma abordagem eficaz. Para além disso, ainda existe a vantagem dos tecidos e células saudáveis apresentarem uma fraca expressão de VEGFR-2 (30,31).

Os inibidores de VEGFR-2 dividem-se principalmente em três tipos: tipo I, II e III. Os inibidores do tipo I são inibidores competitivos de ATP, ou seja, ligam-se no sítio de ligação do ATP, mais especificamente a onde se liga o anel de adenina do ATP. A

ligação destes inibidores ocorre na conformação ativa da cinase (*DFG-in*). Um exemplo deste tipo de inibidores é o Sunitinib.

Por outro lado, os inibidores tipo II interagem especificamente com a conformação inativa da cinase (*DFG-out*). São incapazes de se ligarem ao sítio de ligação do ATP, porém ligam-se à bolsa hidrofóbica adjacente do recetor, como é o caso do inibidor Sorafenib. As diferenças entre as formas de ligação dos inibidores tipo I (Sunitinib) e II (Sorafenib) estão representados na Figura 18.

Os inibidores do tipo III são os inibidores covalentes. Estes interagem covalentemente com o sítio ativo do recetor na região *hinge*, de forma a prevenir a ligação do ATP ao domínio catalítico, sendo o Vatalanib um exemplo destes inibidores (32).



**Figura 19 – Diferença entre as formas de ligação dos inibidores de tipo I (Sunitinib) e tipo II (Sorafenib). Adaptado de (32).**

O sítio ativo de VEGFR-2 encontra-se dividido em três regiões: duas regiões hidrofóbicas (I e II) e uma região de ligação. A região hidrofóbica I é delimitada pelos resíduos de aminoácidos Leu840, Phe918 e Gly922, enquanto a região hidrofóbica II é delimitada pelos resíduos de aminoácidos Leu889, Ile892, Val898 e Ile1044. Por sua vez,

a região de ligação é delimitada pelos resíduos de aminoácidos Ala866, Val914, Leu1035 e Cys1045.

Os inibidores tipo I ligam-se à região hidrofóbica I ao formar uma a três ligações de hidrogénio na região *hinge* com os aminoácidos Glu917 e Cys919. Para além disso, existem aminoácidos presentes na região de ligação, Asp1046 e Glu885, que podem interagir através ligações de hidrogénio com estes inibidores.

Por sua vez, os inibidores tipo II ocupam a região hidrofóbica II, que é referida como um sítio alostérico. No VEGFR-2, como em todas as proteínas cinases, está presente a tríade de resíduos de aminoácidos (DFG) constituída por Asp1046, Phe1047 e Gly1048. O resíduo de aminoácido Phe1047 insere-se no sítio alostérico durante a conformação DFG-*in*. Entretanto, na conformação DFG-*out*, o resíduo de aminoácido Phe1047 dirige-se para a região à qual o fosfato do ATP se posiciona, resultado num sítio alostérico vazio, permitindo a ligação dos inibidores tipo II. Devido ao seu baixo peso molecular e à sua conformação, os inibidores tipo I não conseguem interagir com esta região.

Quanto às outras regiões, os inibidores tipo II também ocupam a região hidrofóbica I através de anéis que são capazes de fazer uma a três ligações com os resíduos de aminoácidos da região *hinge* (Glu917, Cys919). Para além disso, um par de dador e aceitador de ligações de hidrogénio está presente nestes inibidores para formar ligações com os resíduos de aminoácidos Asp1046 e Glu885 (31,32).

Existem alguns inibidores de VEGFR-2 aprovados pela FDA e pela EMA, como Sorafenib, Regorafenib, Sunitinib e Pazopanib. Contudo, o Regorafenib, um inibidor do tipo II, é o único indicado para o tratamento de doentes adultos com cancro colorretal metastático e que foram tratados previamente com quimioterapia à base de fluoropirimidinas, uma terapêutica anti-VEGF e uma terapêutica anti-EGFR (30,31).

No entanto, em 2020, a FDA concedeu uma designação de *fast track* ao Fruquintinib, um inibidor tipo II de VEGFR, em tratamento de doentes com CCR metastático previamente tratados com quimioterapia à base de fluoropirimidinas, oxaliplatina e irinotecano, uma terapêutica anti-VEGF e uma terapêutica anti-EGFR (33).

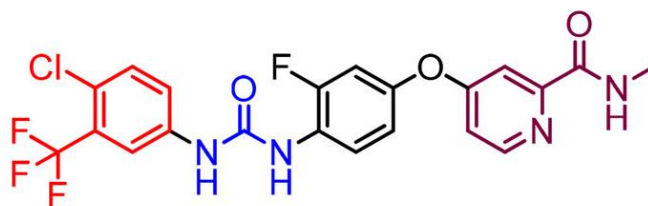
### 3.1.1 Regorafenib

O Regorafenib é um potente inibidor que tem atividade contra diversas proteínas cinases envolvidas nas várias fases de desenvolvimento do cancro colorretal, tendo efeitos na angiogénese (ao inibir VEGFR-1/2/3, TIE2, PDGFR- $\alpha/\beta$  e FGFR-1/2), na proliferação (ao inibir KIT, RAF1, BRAF e RET), na metastização (ao inibir VEGFR-2/3, e PDGFR) e na atividade imunossupressora do microambiente tumoral (ao inibir CSF1R). Este inibidor foi descoberto num estudo, que tinha como objetivo otimizar a potência e outras propriedades farmacológicas de compostos conhecidos da classe da ureia, como o Sorafenib. Para além disso, a nível pré-clínico, o Regorafenib demonstrou uma atividade anti-tumoral mais robusta que outros inibidores angiogénicos, devido à sua capacidade referida anteriormente de inibição de diversas cinases (27,34).

Sendo um inibidor de VEGFR tipo II, o Regorafenib ocupa principalmente quatro regiões no seu alvo: a região hidrofóbica I e II, a região DFG (que é rica em ligações de hidrogénio) e a região *hinge*.

Desta forma, o Regorafenib e os outros inibidores tipo II de VEGFR-2 são constituídos por quatro partes fundamentais, como se encontra representado na Figura 20:

1. um ou mais anéis aromático ou heterocíclico, contendo como heteroátomo o nitrogénio (cor roxa da estrutura);
2. um ou mais anéis aromático ou heterocíclico no centro da molécula, possuindo o comprimento adequado de forma a encaixar na área entre o domínio de ligação do ATP e o domínio alostérico, ou seja, a região de ligação (cor preta da estrutura);
3. um par dador e aceitador de ligações de hidrogénio, que consiste num grupo funcional de ureia (que é o caso do Regorafenib), amida, dicarboxamida ou tioureia (cor azul da estrutura);
4. um grupo terminal hidrofóbico, em que na maior parte dos inibidores consiste num ou mais anéis (aromático ou heterocíclico), substituído ou não por um ou mais átomos de halogéneo (cor vermelha da estrutura) (32).



**Figura 20 – Estrutura química do Regorafenib e grupos químicos fundamentais. Adaptado de (32).**

No Regorafenib, como é possível verificar na Figura 21, o anel heterocíclico interage com a região *hinge* do VEGFR-2, formando duas ligações de hidrogénio com Cys919, que é uma interação essencial para a sua atividade inibitória. O anel aromático central da molécula ocupa a região hidrofóbica I, enquanto a região DFG é envolvida por um dador e aceitador de ligações de hidrogénio. Nesta região, o grupo de ureia liga-se aos resíduos de aminoácidos Asp1046 e Glu885 através de ligações de hidrogénio. Posteriormente, há interações hidrofóbicas entre o anel aromático substituído por um átomo de cloro e a região hidrofóbica II.

É em consequência desta interação entre o grupo hidrofóbico terminal do inibidor e a região alostérica da conformação inativa do recetor, que os inibidores tipo II apresentam uma maior seletividade ao VEGFR-2 em comparação com os inibidores tipo I. Isto ocorre devido aos resíduos de aminoácidos que constituem o sítio alostérico serem menos conservados que os resíduos presentes na bolsa à qual se liga a adenina (30,32).

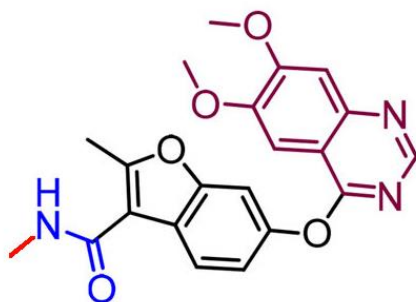


ser a solução para minimizar a toxicidade *off-target* e proporcionar altas exposições ao fármaco na MTD, levando à inibição sustentada de VEGFR.

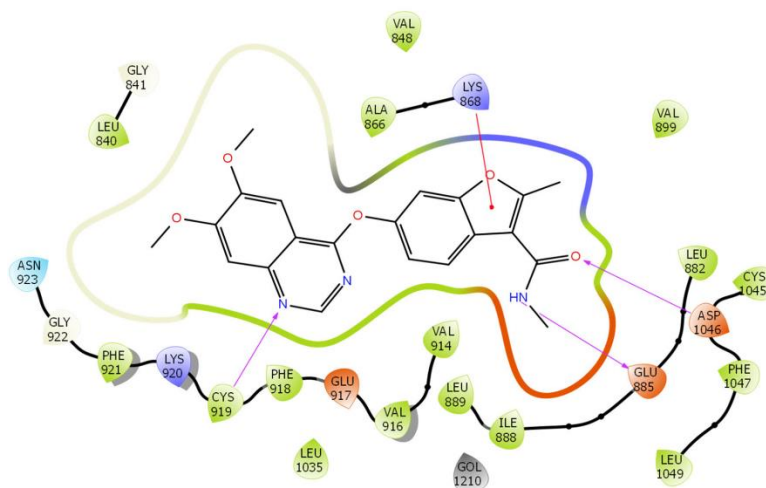
O Fruquintinib representa uma nova geração de inibidores de VEGFR com uma forte potência e alta seletividade. Esta última foi demonstrada num painel de 253 cinases, ao verificar-se que este inibidor inibe de forma robusta VEGFR-1,2 e 3 e com pouco ou nenhum efeito inibitório nas outras cinases (35).

Tal como os outros inibidores tipo II, o Fruquintinib é constituído por quatro partes essenciais e interage principalmente com quatro regiões no seu alvo (Figuras 22 e 23):

1. um sistema de anéis, onde um deles é um heterocíclico, cujo heteroátomo é o nitrogénio (cor roxa da estrutura), que interage com a região *hinge* do recetor através de uma ligação de hidrogénio com o resíduo de aminoácido Cys919;
2. um sistema de anéis no centro da molécula (cor preta da estrutura), que ocupa a região hidrofóbica I;
3. um grupo funcional de amida (cor azul na estrutura) que funcionará como dador e aceitador de ligações de hidrogénio, ligando-se aos resíduos de aminoácidos Asp1046 e Glu885, formando-se duas ligações de hidrogénio;
4. um grupo metilo (cor vermelha na estrutura) que funcionará como grupo hidrofóbico terminal, havendo interações hidrofóbicas entre este e a região hidrofóbica II (32).



**Figura 22 – Estrutura química do Fruquintinib e os seus grupos químicos essenciais. Adaptado de (32).**



**Figura 23 - Ligação do Fruquintinib a VEGFR-2. Adaptado de (32).**

### 3.1.3 Resistência aos inibidores de VEGFR

Devido ao aparecimento de resistências, a aplicação clínica dos inibidores de VEGFR continua a ser um desafio. A ocorrência destas deve-se sobretudo à sobre-expressão dos recetores, ao desenvolvimento e, posterior, seleção de células tumorais resistentes à hipoxia, a mutações nas células endoteliais e ao aumento de fatores pró-angiogénicos não tumorais em circulação. Na última situação, a inibição das vias de sinalização normais com a administração dos RTKIs resulta no aumento sistémico de fatores pró-angiogénicos não tumorais, como VEGF, G-CSF, SDF-1, osteopontina, fatores de células estaminais e semelhantes. A sobre-expressão destes fatores pode, assim, alimentar as vias alternativas de sinalização da angiogénese (31,32).

Para além disso, há evidências de que vários agentes anti-angiogénicos, que têm como alvo VEGF e VEGFR, não atuam apenas nas células tumorais, mas também células endoteliais vasculares, uma vez que estas também expressam VEGFR. Quando esses agentes atuam nas células tumorais a vascularização tumoral é significativamente inibida, havendo regressão tumoral. Por sua vez, quando atuam nas células endoteliais, a agressividade destas células é aumentada. Os inibidores de VEGFR estimulam a expressão de genes que estão associados à invasão local e ao desenvolvimento de metástases à distância, como Snail, Slug, Fak e Axl. Por outro lado, a inibição de FGFR e PDGFR expressos em várias células cancerígenas, suprime estes fenótipos evasivos.

É importante ressaltar que todos os RTKIs aprovados têm alguma atividade inibitória para VEGFR, sugerindo que possivelmente todos ativam a agressividade das

células normais. Assim, é necessário esclarecer os mecanismos moleculares e compreender completamente os efeitos diretos dos RTKIs anti-angiogénicos nas células tumorais (36).

## 4 Conclusão

O principal desafio dos inibidores das cinases de baixo peso molecular é o aparecimento de resistências ao fim de algum tempo do seu uso clínico. Atualmente, com o objetivo de lidar com este desafio, diversas estratégias terapêuticas têm sido estudadas e aplicadas, como o uso de novas gerações de fármacos, inibidores com múltiplos alvos e a combinação de terapêuticas.

Apesar do surgimento das resistências, os inibidores de baixo peso molecular continuarão a ser uma das principais opções de tratamento para o cancro devido às suas vantagens, principalmente em casos com elevada carga tumoral e um rápido ritmo de progressão, onde é necessário um controlo rápido da doença. É, portanto, crucial continuar-se a desenvolver novos inibidores e compreender completamente o mecanismo molecular deste tipo de patologia-

Com a evolução da biologia molecular moderna e a aplicação de tecnologias avançadas, os inibidores de baixo peso molecular encontram-se neste momento num rápido estado de desenvolvimento. Por isso, é provável que no futuro será possível desenvolver-se muitas novas moléculas para o tratamento do cancro com melhores resultados em termos de eficácia em comparação com os inibidores atuais. Para além disso, a combinação da imunoterapia e dos inibidores de baixo peso molecular também tem sido proposto, uma vez que apresenta potencial para aumentar as taxas de resposta e contribuir para uma sustentabilidade das mesmas.

## Referências Bibliográficas

1. Lee YT, Tan YJ, Oon CE. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *Eur J Pharmacol.* 2018;834(July):188–96.
2. Pauli FP, Barreiro EJ, Barbosa ML de C. Structural characteristics of protein kinases and their inhibitors in clinical use. *Rev Virtual Quim.* 2018;10(5):1280–303.
3. Bolick NL, Geller AC. Epidemiology of Melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2021;35(1):57–72.
4. Millet A, Martin AR, Ronco C, Rocchi S, Benhida R. Metastatic Melanoma: Insights Into the Evolution of the Treatments and Future Challenges. *Med Res Rev.* 2017;37(1):98–148.
5. Burotto M, Chiou VL, Lee J-M, Kohn EC. The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective. 2014;120(22):3446–56.
6. Waizenegger IC, Baum A, Steurer S, Stadtmüller H, Bader G, Schaaf O, et al. A novel RAF kinase inhibitor with DFG-out-binding mode: High efficacy in BRAF-mutant tumor xenograft models in the absence of normal tissue hyperproliferation. *Mol Cancer Ther.* 2016;15(3):354–65.
7. Wang Q, Zorn JA, Kuriyan J. A structural atlas of kinases inhibited by clinically approved drugs [Internet]. 1st ed. Vol. 548, *Methods in Enzymology.* Elsevier Inc.; 2014. 23–67.
8. Wu YJ. *Heterocycles and Medicine. A Survey of the Heterocyclic Drugs Approved by the U.S. FDA from 2000 to Present.* [Internet]. 1st ed. Vol. 24, *Progress in Heterocyclic Chemistry.* Elsevier Ltd.; 2012. 1–53.
9. Roskoski R. Targeting oncogenic Raf protein-serine/threonine kinases in human cancers. *Pharmacol Res [Internet].* 2018;135(August):239–58.
10. Uehling DE, Harris PA. Recent progress on MAP kinase pathway inhibitors. *Bioorganic Med Chem Lett [Internet].* 2015;25(19):4047–56.
11. Subbiah V, Baik C, Kirkwood JM. Clinical Development of BRAF plus MEK Inhibitor Combinations. *Trends in Cancer [Internet].* 2020;6(9):797–810.

12. Zhu J, Li C, Yang H, Guo X, Huang T, Han W. Computational study on the effect of inactivating/activating mutations on the inhibition of MEK1 by trametinib. *Int J Mol Sci.* 2020;21(6):1–15.
13. Wang B, Wu H, Hu C, Wang H, Liu J, Wang W, et al. An overview of kinase downregulators and recent advances in discovery approaches. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):1–19.
14. Savoia P, Fava P, Casoni F, Cremona O. Targeting the ERK signaling pathway in melanoma. *Int J Mol Sci.* 2019;20(6):1–37.
15. Gonzalez-Del Pino GL, Li K, Park E, Schmoker AM, Ha BH, Eck MJ. Allosteric MEK inhibitors act on BRAF/MEK complexes to block MEK activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118(36):1–8.
16. Zhao Z, Xie L, Bourne PE. Insights into the binding mode of MEK type-III inhibitors. A step towards discovering and designing allosteric kinase inhibitors across the human kinome. *PLoS One.* 2017;12(6):1–14.
17. Hashemzadeh S, Ramezani F, Rafii-Tabar H. Study of Molecular Mechanism of the Interaction Between MEK1/2 and Trametinib with Docking and Molecular Dynamic Simulation. *Interdiscip Sci – Comput Life Sci.* 2019;11(1):115–24.
18. Trojaniello C, Festino L, Vanella V, Ascierto PA. Encorafenib in combination with binimetinib for unresectable or metastatic melanoma with BRAF mutations. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2019;12(3):259–66.
19. Guo L, Qi J, Wang H, Jiang X, Liu Y. Getting under the skin: The role of CDK4/6 in melanomas. *Eur J Med Chem.* 2020;204(17):112531.
20. Lelliott EJ, McArthur GA, Oliaro J, Sheppard KE. Immunomodulatory Effects of BRAF, MEK, and CDK4/6 Inhibitors: Implications for Combining Targeted Therapy and Immune Checkpoint Blockade for the Treatment of Melanoma. *Front Immunol.* 2021;12(May):1–15.
21. Ammazalorso A, Agamennone M, De Filippis B, Fantacuzzi M. Development of CDK4/6 inhibitors: A five years update. *Molecules.* 2021;26(5):1-21.
22. Belal A. 3D-Pharmacophore Modeling, Molecular Docking, and Virtual Screening for Discovery of Novel CDK4/6 Selective Inhibitors. *Russ J Bioorganic Chem.*

- 2021;47(1):317–33.
23. Song L, Ning S, Hou J, Zhao Y. Performance of protein-ligand docking with CDK4/6 inhibitors: A case study. *Math Biosci Eng.* 2020;18(1):456–70.
  24. Garutti M, Targato G, Buriolla S, Palmero L, Minisini AM, Puglisi F. Cdk4/6 inhibitors in melanoma: A comprehensive review. *Cells.* 2021;10(6):1–16.
  25. García-Aranda M, Redondo M. Targeting receptor kinases in colorectal cancer. *Cancers (Basel).* 2019;11(4):1–24.
  26. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49.
  27. Papadimitriou M, Papadimitriou CA. Antiangiogenic tyrosine kinase inhibitors in metastatic colorectal cancer: Focusing on regorafenib. *Anticancer Res.* 2021;41(2):567–82.
  28. Canavese M, Ngo DTM, Maddern GJ, Hardingham JE, Price TJ, Hauben E. Biology and therapeutic implications of VEGF-A splice isoforms and single-nucleotide polymorphisms in colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2017;140(10):2183–91.
  29. Guo D, Murdoch CE, Liu T, Qu J, Jiao S, Wang Y, et al. Therapeutic Angiogenesis of Chinese Herbal Medicines in Ischemic Heart Disease: A Review. *Front Pharmacol.* 2018;9(April):1–10.
  30. Abdallah AE, Mabrouk RR, Al Ward MMS, Eissa SI, Elkaeed EB, Mehany ABM, et al. Synthesis, biological evaluation, and molecular docking of new series of antitumor and apoptosis inducers designed as VEGFR-2 inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2022;37(1):573–91.
  31. Modi SJ, Kulkarni VM. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR-2)/KDR Inhibitors: Medicinal Chemistry Perspective. *Med Drug Discov.* 2019;2:100009.
  32. Modi SJ, Kulkarni VM. Exploration of structural requirements for the inhibition of VEGFR-2 tyrosine kinase: Binding site analysis of type II, ‘DFG-out’ inhibitors.

- J Biomol Struct Dyn. 2021;0(0):1–16.
33. Hutchison China MediTech. Chi-Med Announces Fruquintinib Granted U.S. FDA Fast Track Designation for Metastatic Colorectal Cancer. 2020.
  34. Awad AJ, Walcott BP, Stapleton CJ, Dale D, Cheng-Chia L, Loeffler JS. Molecular insight of regorafenib treatment for colorectal cancer. HHS Public Access. *Physiol Behav.* 2017;176(1):139–48.
  35. Sun Q, Zhou J, Zhang Z, Guo M, Liang J, Zhou F, et al. Discovery of fruquintinib, a potent and highly selective small molecule inhibitor of VEGFR 1, 2, 3 tyrosine kinases for cancer therapy. *Cancer Biol Ther.* 2014;15(12):1635–45.
  36. Tomida C, Nagano H, Yamagishi N, Uchida T, Ohno A, Hirasaka K, et al. Regorafenib induces adaptive resistance of colorectal cancer cells via inhibition of vascular endothelial growth factor receptor. *J Med Investig.* 2017;64(3–4):262–5.