

Ana Isabel Alves Baptista

# Inibidores de Receptores Dependentes de Ciclina como Terapêutica Anti Tumoral

Monografia realizada no âmbito da unidade curricular de Acompanhamento Farmacêutico do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Jorge António Ribeiro Salvador e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

# Índice

ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	2
2. DESENVOLVIMENTO	3
2.1) CINASES DEPENDENTES DE CICLINA (CDK) E A PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR	3
2.2) MECANISMO GERAL DE REGULAÇÃO DAS CDKS E SEUS INIBIDORES	4
2.3) INIBIDORES DE CDK	6
A) Proteínas inibidoras de CDKs (CKIs)	7
B) Moléculas pequenas como inibidores de CDKs	8
2.4) PRINCIPAIS FAMÍLIAS QUÍMICAS DAS PEQUENAS MOLÉCULAS INIBIDORAS DAS CDKS E DOS SEUS DERIVADOS (ALGUNS EXEMPLOS APENAS).	13
a) Estaurosporina e Análogos	13
b) Derivados de Flavonóide	14
c) Derivados da Purina	15
d) Derivados do Indol	16
e) Derivados de piridina	16
g) Himenialdisina e Análogos	18
h) Derivados da Pirimidina	18
i) Derivados do Pirazol	19
j) Derivados do Tiazol	19
k) Outros compostos	20
3. ESTADO ACTUAL	22
4. CONCLUSÃO	24
BIBLIOGRAFIA	25

## **Abstract**

Cyclin-dependent kinases (CDKs) are the catalytic subunits of a family of mammalian heterodimeric serine/threonine kinases that have been implicated in the control of cell-cycle progression, transcription and neuronal function.

The activating partners of the cell-cycle CDKs are molecules that are synthesized and degraded during each cell cycle and thus have been designated 'cyclins'. Although this property has been used to define this kinase family, not all activating partners of CDKs are synthesized and destroyed in a cyclical fashion [1, 2, 3].

The deregulation of the cell cycle control due to the abnormal activity of CDKs is a common feature in most types of cancer.

Intensive research on small molecules that target cell cycle regulatory proteins has led to the identification of many candidate inhibitors that are able to arrest proliferation and induce apoptosis in neoplastic cells as a promising strategy to treat cancer.

This monography will provide an overview of the main classes of CDK inhibitors with a focus on their mechanism of action and discuss clinical and pharmacological implications of CDK inhibitors as possible therapeutic approaches for the treatment of cancer [2, 3].

### **I. Introdução**

As Cinases Dependentes de Ciclina (CDKs) são as subunidades catalíticas de uma família de cinases serina/treonina heterodiméricas dos mamíferos que estão implicadas no controlo da progressão do ciclo celular, na transcrição e função neuronal.

Os "parceiros" activadores das CDKs do ciclo celular são moléculas que são sintetizadas e degradadas durante cada ciclo celular e, por isso, foram designadas de ciclinas [1, 2, 3].

A desregulação do controlo do ciclo celular, devido à actividade anormal das CDKs é uma característica comum na maioria dos tipos de cancro.

A pesquisa intensiva de pequenas moléculas, que tem como alvo as proteínas reguladoras do ciclo celular, conduziram à identificação de muitos candidatos a inibidores que são capazes de restringir a proliferação e induzir apoptose em células neoplásicas como uma estratégia promissora para tratar o cancro.

Este trabalho irá fornecer uma visão geral das principais classes de inibidores de CDK com foco no seu mecanismo de acção e discutir as implicações clínicas e farmacológicas de inibidores de CDK como possíveis abordagens terapêuticas para o tratamento de cancro [2, 3].



presumivelmente activa, todas as CDKs do ciclo celular. A CAK é um complexo proteico formado por CDK7, Ciclina H e Mat1, e é um substrato para CDK8-Ciclina C (setas laranja). As CDK10 e CDK11 podem estar envolvidas na mitose, mas a sua importância funcional, não é bem compreendida. Finalmente, a Ciclina F pode ser necessária para a entrada em G1 e a Ciclina G está implicada na resposta a danos no ADN durante a transição G2-M. As funções das CDK3, CDK10, CDK11, Ciclina F e a Ciclina G são representados por setas roxas para indicar que os dados que as implicam no ciclo celular são ainda preliminares [1, 2, 3].

## 2.2) Mecanismo Geral de Regulação das CDKs e seus inibidores

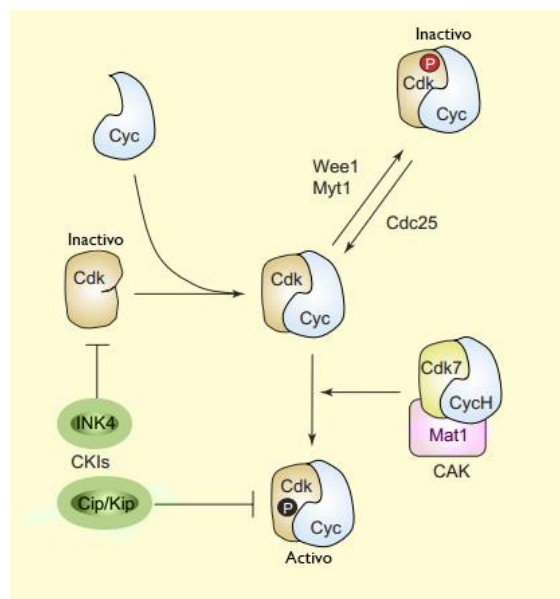


Figura 2 – Mecanismos Regulatórios Básicos das CDKs do Ciclo Celular [Figura Adaptada de Malumbres M, Barbacid M. *Mammalian cyclin-dependent kinases*. Trends Biochem Sci **2005**; 30:630-41]

Como as CDKs requerem ligação com os seus “parceiros”, as ciclinas, para a activação da sua actividade de cinase, descobriu-se que algumas CDKs (CDK4 e CDK6) são inibidas por ligação directa de compostos pertencentes à família de proteínas INK4. Em contraste, os inibidores proteicos da família Cip/Kip bloqueiam a actividade de cinase ao formarem complexos triméricos inactivos (complexos de CDK2-Ciclina A, CDK1-Ciclina A, CDK1-Ciclina B, e possivelmente CDK4- Ciclina D e CDK6-Ciclina D). Os complexos CDK-Ciclina podem ser activados por fosforilação pela CAK. No entanto, os complexos de CDK-Ciclina podem ser regulados negativamente pela fosforilação em resíduos de treonina ou tirosina adjacentes pelas cinases Wee1 e Myt1. Estas fosforilações inibidoras podem ser revertidas pela dupla especificidade das fosfatases Cdc25 que atuam como reguladores positivos da actividade CDK-Ciclina [1, 2, 3].

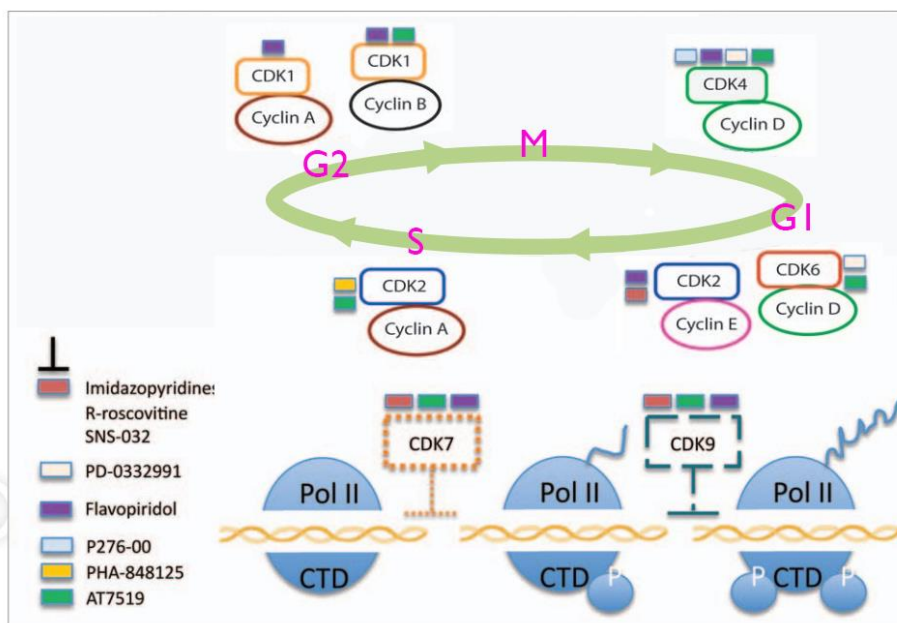


Figura 3 – Possibilidades Terapêuticas dos Inibidores das CDKs como anticancerígenos [Figura Adaptada de Canavese M, Santo L, Raju N. *Cyclin dependent kinases in cancer*. Landes Bioscience: Cancer Biology & Therapy 13:7, 451-457; May 2012]

O genoma dos mamíferos tem 12 loci que codificam as CDKs, embora apenas cinco deles - CDK1, CDK2, CDK3, CDK4 e CDK6 - estão directamente envolvidas na condução do ciclo celular.

Esta monografia reporta vários inibidores de CDK, especialmente pequenas moléculas, relatando conjuntamente as suas actividades inibitórias sobre os vários tipos de CDKs. Ir-se-á realçar, portanto, o potencial para o desenvolvimento de novas moléculas anticancerígenas [4].

A epidemia mundial do cancro tem estimulado a procurar novos conceitos e alvos para o tratamento desta doença. Terapias mais tradicionais [5] visam explorar a maquinaria proliferativa, por exemplo, a replicação do ADN ou segregação cromossómica. Como tal, estas terapias demonstram apenas selectividade parcial para células tumorais comparando com os tecidos de proliferação normal, tais como o intestino e medula óssea. Apesar dos esforços para aperfeiçoar e de forma melhorar as existentes classes de agentes anti tumorais continuarem a existir, a última mudança de ênfase tem surgido no sentido de encontrar novos alvos mecanísticos que têm surgido como uma consequência directa do intenso estudo das subjacentes alterações genéticas associadas ao estado canceroso.

Recentemente, a atenção farmacêutica tem sido focada nas proteínas que conduzem a proliferação celular, a transformação, a diferenciação e a metastização [6].

É hoje reconhecido que em diversos tumores humanos, a hiperactividade e a desregulação da CDKs (mutação, exclusão e sobre expressão) são as principais causas para a

proliferação descontrolada [9]. Isto levou à iniciação de inibidores de CDK de baixo peso molecular ATP-competitivos e sua avaliação como agentes anti tumorais [6-8]. A importância destes potenciais alvos terapêuticos é claramente evidenciada pela elevada incidência de alterações nos genes que codificam estas proteínas em tumores. Fazer das proteínas cinases um alvo anti tumoral é uma actividade relativamente recente para os químicos medicinais. Os princípios de design recolhidos a partir destes esforços surgiram como novas terapêuticas que são mais específicas, mais eficazes e menos tóxicas do que as anteriores e têm como alvo uma vasta gama de proteínas cinases com um amplo potencial terapêutico. Um certo número de derivados de produtos naturais, bem como inibidores das cinases sintéticos têm sido descobertos e caracterizados [10].

Existem muitos desafios no desenvolvimento racional de inibidores específicos para proteínas cinases, devido à semelhança do mecanismo das diferentes proteínas cinases e da estrutura dos seus domínios catalíticos [11]. Para alcançar o sucesso, duas questões principais que devem ser exploradas:

- A selectividade entre as cinases para um controle eficaz e seguro do ciclo celular. A eficácia clínica destes inibidores depende criticamente não apenas da sua potência, que é a sua capacidade para se ligar as CDKs, capacidade mais estável do que a do ATP, mas também na sua selectividade para as CDK específicas em relação a outros membros da família CDK altamente homólogas e também outras proteínas cinases. A inibição não-selectiva acarreta o risco de efeitos colaterais indesejáveis e potencialmente tóxicos [12]. Assim, juntamente com a potência, a selectividade é uma questão fundamental no design de inibidores de CDKs [13, 14].
- Como evidenciado a partir desses compostos com potência nanomolar para as enzimas CDK, duas ligações de hidrogénio entre o substrato e o local de ligação ao ATP das CDK são preferidas. Como não houve compostos que revelaram potência picomolar, permanece a possibilidade de que uma ligação molecular adicional será fundamental para alcançar uma melhor potência e selectividade [15].

### 2.3) Inibidores de CDK

Os inibidores de CDK podem ser vistos como pertencentes às seguintes categorias:

- A) Proteínas inibidoras de CDK ou CKIs;
- B) Pequenas moléculas inibidoras;

## A) Proteínas inibidoras de CDKs (CKIs)

As CKIs são uma subunidade de regulação adicional para os CDKs, uma proteína que se liga ao complexo CDK-Ciclina e inibe a sua actividade. Estas proteínas são designadas por proteínas inibitórias de CDK (CKIs). A família INK4 {p16 (INK4a), p15 (Ink4b), p18 (Ink4c) e p19 (Ink4d)} e a família Cip1/Waf1/Kip1-2 {(p21 (Cip1/Waf1), p27 (Kip1), p57 (Kip2) } são duas famílias de CKIs que têm por alvo a CDK4, a CDK2 e a CDK6, respectivamente [16, 17]. Ambas as famílias são mostradas no contexto dos reguladores de proliferação e como contribuintes para a maquinaria apoptótica [18]. Os CKIs mais conhecidos estão envolvidos na colocação de um “freio” sobre o ciclo celular: alguns desempenhar um papel na resposta a sinais extracelulares, enquanto que outros parecem funcionar nos passos intrínsecas do ciclo celular [19, 20].

### i) Família Cip/Kip

A proteína p21 foi identificada pela sua capacidade para se ligar aos complexos CDK2-Ciclina e funciona como uma CKI ao inibir a sua actividade. A p21 é um inibidor universal de CDKs, uma vez que inibe a actividade de cada membro da família CDK/ciclina [22]. Novas evidências sugerem agora funções adicionais para a p21 em diversos processos celulares, incluindo um papel como modulador de apoptose. Diversos mecanismos são postulados pelo qual a p21 interfere com a maquinaria apoptótica que englobam tanto os eventos CDK-independentes, como a regulação da transcrição e ligação directa a produtos de genes pró-apoptóticos no citoplasma [22].

A estrutura da proteína inibitória CKI p27 ligada ao complexo CDK2-Ciclina A indica que a p27 se associa com ambas as subunidades, CDK e ciclina. A ligação da p27 com o complexo CDK2-Ciclina A parece ser um evento de dois passos, onde a p27 se liga primeiro à ciclina e seguidamente liga-se à CDK [23]. Similarmente estudos bioquímicos de complexos p27 sugerem que os complexos p27/p21-Ciclina se formam mais prontamente do que os complexos p27/p21-CDK [24]. A associação da p27 ao complexo CDK2-Ciclina A causa alterações conformacionais na fenda catalítica da CDK2 que inactivam a cinase ao dificultar a sua ligação ao ATP e bloqueando o local de fosforilação do CAK (cinase de activação da CDK). Em conformidade com os dados estruturais estudados, é referido que uma molécula de p21 ou p27 ligada ao complexo CDK2-Ciclina A é suficiente para inibir a actividade da cinase [25].



## ii) Família INK4

As proteínas INK4 são um grupo de proteínas de repetição de anquirina, que se ligam especificamente à CDK4 e à CDK6 [26, 27]. A p16 inibe especificamente a actividade de cinase da CDK4-Ciclina, *in vitro*. A sobre expressão de p16 leva à paragem do ciclo mitótico em G1, em várias linhas celulares, e suprime a transformação celular, enquanto que a super expressão de p16 em células com défice de pRb funcional não parou a mitose na fase G1 das células [28]. Na estrutura cristalina do complexo p16-CDK6, a p16 liga-se a um dos lados da fenda catalítica da CDK6 mas do lado oposto ao sítio de ligação da ciclina. A superfície côncava da p16 contacta com o terminal-N da CDK6.

As proteínas p15 e p16 são bastante homólogas uma da outra [29]. O aumento dos níveis de p15 associados à inibição da actividade da CDK4 e da CDK6 [30] e a sua sobre expressão impedem o crescimento celular. A sequência genética que codifica a p15 não foi encontrada alterada em linhas celulares de tumores examinadas ao contrário da sequência da p16.

A p18 é um homólogo do importante supressor tumoral p16. A p18 interacciona com o complexo de CDK4-Ciclina D2 pré-montado.

A p19 é outra proteína INK4 que inibe a actividade da CDK6. Embora as dobras e os contactos dos dois complexos binários, p16-CDK6 e p19-CDK6 globais são muito semelhantes, diferem em alguma interacção específica, bem como na área de superfície da interface de ligação. Algumas dessas diferenças são devidas aos resíduos de superfície nas duas proteínas que possuem cargas contrastantes [31].

## B) Moléculas pequenas como inibidores de CDKs

De uma importância ainda maior para o desenvolvimento bem-sucedido de pequenos inibidores de cinases é a compreensão das interacções primárias do inibidor endógeno com os seus substratos. O ATP como substrato das cinases foi co-cristalizado com a CDK2 [32]. As interacções chave da cinase com o ATP incluem ligações de hidrogénio, para além da interacção de fosfato da cadeia. Este tipo de informação estrutural levou ao uso de três métodos principais para a inibição de CDKs, que incluem inibidores ATP-competitivos, inibidores não competitivos, que se ligam na região dos inibidores de péptidos naturais, e moléculas que incorporam ambas as abordagens. Na maioria dos artigos publicados sobre os inibidores de CDK utilizam-se moléculas pequenas como forma de abordagem para o desenvolver inibidores ATP-competitivos [15].

## i) Inibidores de CDK ATP-Competitivos

Nos últimos anos, as CDKs como alvo têm despertado grande interesse e diversas estratégias têm sido realizadas para o desenvolvimento de pequenas moléculas inibidoras das CDKs. No entanto, nenhum destes inibidores foram aprovados para utilização comercial ainda [33].

A primeira geração de inibidores das CDKs consistiu de inibidores ATP-competitivos. Entre eles, devem ser mencionados o flavopiridol, CY-202 (R-Roscovitina), aminotiazole ou alsterpaullona, os quais são utilizados num grande número de ensaios clínicos. No entanto, este tipo de inibidores não correspondem às expectativas, apresentando baixa actividade e/ou toxicidade nos ensaios clínicos. Um dos principais problemas associados com inibidores de cinase ATP-competitivos é a baixa especificidade para a cinase alvo, o que poderia explicar o aparecimento de inúmeros efeitos colaterais durante o tratamento [34]. A este respeito, o exemplo mais conhecido é fornecido pelo flavopiridol, que mostrou provocar a síndrome da lise tumoral hiperaguda, em pacientes com leucemia linfocítica crónica, [35] e danos na camada de foto-receptores dos olhos dos macacos tratados [36]. Além disso, quando administrado em combinação com docetaxel, o flavopiridol induziu neutropenia em pacientes com cancro da mama metastático e a actividade anti tumoral dos compostos combinados tem sido modesta em ensaios clínicos. A actividade anti tumoral limitada pode ser explicada pela baixa dose administrada aos doentes, devido à baixa tolerabilidade deste composto.

Melhoria da especificidade dessas pequenas moléculas pode ajudar a reduzir os efeitos colaterais e aumentando a sua eficácia. Portanto, uma segunda geração de compostos, que estão actualmente em processo de avaliação pré-clínica e clínica, tem sido desenvolvida [37]. Por exemplo, a flavona P276-00, embora pertença à mesma classe química que o flavopiridol, é um inibidor mais selectivo das CDKs, especialmente em relação aos complexos CDK4-Ciclina D1, CDK1-Ciclina B e CDK9 Ciclina-T1, e mostra uma maior actividade anti proliferativa em várias células tumorais humanas. Actualmente, a P276-00 está em fase I-II de ensaios clínicos para o tratamento de tumores com super expressão de ciclina D, como o mieloma múltiplo, linfoma das células de mantle e melanoma [38, 39].

Entre outros inibidores das CDKs, actualmente em ensaios clínicos, o AT7519 é administrado a pacientes com tumores sólidos avançados ou linfoma não-Hodgkin refractário. Esta nova molécula apresenta uma elevada selectividade para a CDK2, embora seja também activo contra a CDK9 e a CDK5, e é relativamente inactivo contra as proteínas

não-CDKs, com exceção da glicogénio sintase  $3\beta$ -cinase. Em ensaios pré-clínicos, o AT7519 mostrou actividade na concentração submicromolar em diferentes linhagens de células tumorais humanas, independentemente do seu estado em relação às proteínas p53 e RBI, e uma actividade reduzida ou ausente nos fibroblastos humanos. Este composto também foi capaz de reduzir a progressão do tumor no cancro do cólon em modelos de xeno enxerto [40].

Outro inibidor das CDKs, que poderia ser um potencial agente terapêutico, é o R547, que mostra uma actividade potente e selectiva contra as CDK1, CDK2 e CDK4. Estudos pré-clínicos confirmaram o R547 como um possível fármaco anti tumoral. Os estudos clínicos estão em andamento para avaliar a eficácia do R547 em tumores sólidos e hematológicos avançados [33, 41].

O ZK 304709 é outro inibidor oral multialvo das CDKs, que está actualmente em fase I de ensaios clínicos. O ZK 304709 inibe, em concentrações nanomolares, não só CDKs diferentes, mas também tirosina cinases envolvidas na angiogénese (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 e receptor do factor de crescimento derivado de plaquetas). Em modelos de rato de cancro do pâncreas, o ZK 304709 induziu a paragem do ciclo celular, apoptose e uma diminuição da densidade de micro vasos, resultando numa redução de 80% no crescimento do tumor primário [42, 43].

Em conclusão, vários inibidores de CDK ATP-competitivos estão actualmente a passar por avaliação pré-clínica e clínica. No entanto, o desenvolvimento de moléculas que visam especificamente as CDKs nos seus sítios de ligação ao ATP é uma tarefa muito complexa. Na verdade, o grande obstáculo na concepção de inibidores de CDKs ATP-competitivos é a elevada homologia que existe entre os sítios de ligação do ATP de cinases celulares. Por esta razão, a maior parte destes fármacos têm efeitos fora do alvo, que limitam a dosagem que pode ser administrada e, por consequência, a eficácia do tratamento [44].

Embora estas dificuldades limitem a utilização dos inibidores de CDKs ATP-competitivos na prática clínica, uma estratégia terapêutica promissora parece ser a utilização destes inibidores de CDKs, em combinação com outros agentes anticancerígenos. Com efeito, um ensaio clínico com sarcoma avançado demonstrou que a administração sequencial de doxorrubicina e de flavopiridol foi mais eficaz do que a administração de doxorrubicina sozinha [45]. Além disso, os inibidores da desacetilase de histona (HDAC) demonstraram sinergia com o flavopiridol em células de diferentes tipos de tumores, tais como cancro da

mama, do pulmão e do cancro esofágico, leucemia e mesotelioma pleural [46-51]. Além disso, tem sido demonstrado que a combinação de vorinostat e flavopiridol foi selectivamente citotóxica para linhas de células de neuroblastoma multirresistentes com perda da função da p53 [52].

## **ii) Inibidores de CDKs Não ATP-Competitivos**

Uma estratégia alternativa para inibição das CDKs usa moléculas não ATP-competitivas, que são, ao invés, competitivas com substratos dos complexos CDK-Ciclina ou inibem as interacções proteína-proteína, que activam esses complexos. Os sítios de interacção geralmente são diferentes entre os diversos reguladores de proteína. Por conseguinte, estas diferenças oferecem a oportunidade para desenvolver inibidores com elevada especificidade [53, 54]. Vários inibidores de CDKs não ATP-competitivos, os quais possuem o potencial de aplicação clínica, têm sido desenvolvidos. Estes novos compostos podem ser classificados como: a) os inibidores derivados de substratos das CDKs, b) inibidores de complexos CDK-Ciclina e c) inibidores da fenda de ligação da ciclina.

### **a) Inibidores derivados de substratos das CDKs**

Uma das primeiras moléculas que pertencem a esta nova classe de inibidores é um peptídeo de 39 resíduos (Spa310) derivado a partir da região espaçadora Rb2/p130, que medeia a interacção entre CDK2-ciclina A e seu substrato Rb2/p130. A Spa310 foi capaz de inibir a actividade de CDK2 e induzir uma diminuição significativa na proliferação das células do cancro do pulmão humano em ratinhos nus xeno transplantados [55].

Outro alvo importante da família das CDKs, em particular da CDK1 e da CDK2, é o supressor de tumor p53 [56, 57]. Um primeiro peptídeo derivado da p53, chamado de CIP (YFTLQIRGERFEMFRELNE), foi baseado no domínio de tetramerização da p53 que se liga a um local de encaixe da CDK2. Este peptídeo de 20 resíduos foi capaz de inibir a fosforilação da CDK2 mediada pela p53 e induzir a morte celular em células de melanoma A375 [58, 59].

Estudos adicionais identificaram um local de encaixe da ciclina que dirige a p53 para a superfície da ciclina A. Este novo local de interacção pode fornecer resultados de interesse farmacêutico, num futuro próximo. [60]

### **b) Inibidores de complexos CDK-Ciclina**

Nos últimos anos, muitos estudos estruturais têm sido focados na identificação das interacções entre a CDK2 monomérica e suas moléculas inibidoras de forma a melhorar a

sua eficácia e especificidade. No entanto, a CDK2 monomérica é inactiva e a sua associação com a ciclina A e fosforilação no resíduo Tirosina 160 são pré-requisitos fundamentais para a sua activação completa [61]. Essa envolve mudanças de conformação e, portanto, usando a forma monomérica da CDK2 como um modelo para projectar inibidores visando a cinase activa pode comprometer os resultados.

A caracterização de todo o complexo CDK2-Ciclina A conduziu ao desenvolvimento de um péptido pequeno, denominado C4, derivado dos aminoácidos 285-306 da  $\alpha 5$  hélice da ciclina A. Foi mostrado que este péptido não interfere com a formação do complexo, mas forma ligações estáveis com o complexo CDK2-Ciclina A, bloqueando, assim, o complexo na sua conformação inactiva [53].

Para procurar outros sítios de ligação que podem inibir a actividade das CDKs, a triagem de bibliotecas químicas foi realizada [62]. Este rastreio conduziu à identificação do hexapéptido NBII (RWIMYF-NH<sub>2</sub>), o qual é capaz de inibir a actividade da CDK2-Ciclina A. É importante referir que este péptido foi menos eficaz contra um painel de outras cinases. A estrutura cristalina da CDK2-Ciclina A, obtida por raios-X, indicou que o péptido NBII ligar-se-ia um elemento estrutural essencial de ciclina A, induzindo, assim, uma alteração conformacional que pode diminuir a actividade da ciclina A para com a CDK2 [63]. Portanto, o NBII poderia quebrar a ligação do complexo CDK2-ciclina A. A capacidade do NBII se ligar especificamente a um novo sítio de ligação da ciclina A e inibir formação do complexo CDK2-ciclina A proporciona novas possibilidades para a concepção de novas moléculas altamente selectivas [53].

### c) Inibidores da ligação da Ciclina à *groove*

A maioria das proteínas de ligação às CDK-Ciclina, tais como a E2F1, a p21 e a p27, partilhar um motivo de reconhecimento de CDK-ciclina semelhante. Em 1996, Adams e colaboradores identificaram um péptido pioneiro (PVKRRLDL), derivado do factor de transcrição E2F1, capaz de inibir a fosforilação da RB1 mediada pelo complexo CDK2-Ciclina A [64]. Pesquisas posteriores têm-se dedicado a investigar como os CKIs, p21 e p27, bloqueiam a função dos complexos CDK-Ciclina, a fim de projectar novos inibidores de CDKs imitando a p21 e a p27.

A acção inibitória da p21 é baseada na ocupação competitiva de um sítio de ligação da ciclina, nomeada “cyclin binding groove” (CBG), impedindo assim o recrutamento de substratos específicos dos complexos CDK-Ciclina. Com base neste mecanismo, um

octapeptídeo que imita a acção da p21, capaz de inibir a actividade de cinase das CDK, foi produzido [65-67] e um conjunto de medicamentos está actualmente em desenvolvimento [53]. Além disso, um péptido de peso molecular inferior, denominado Composto 2, foi obtido através da modificação do octapeptídeo original. O truncamento do C-terminal, juntamente com optimização da cadeia lateral, a adição de aminoácidos naturais e não naturais e o endurecimento melhorou a eficácia do composto [68].

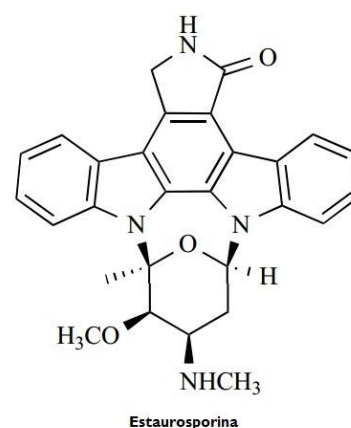
Uma série de peptídeos cíclicos, utilizando o CBG padrão de reconhecimento da p27 como a base para o design, também foram sintetizados [65].

Com base nesses resultados promissores, a Cyclacel Pharmaceuticals desenvolveu uma ampla gama de inibidores peptídeos e peptidomiméticos de complexos CDK-Ciclina dirigidas à CBG. Além disso, desenvolveu uma estratégia computacional, chamado REPLACE (SUBSTITUIR) (substituição com alternativos ligandos parciais através do enriquecimento computacional), que visa o desenvolvimento de pequenas moléculas farmacologicamente activas, por substituição de aminoácidos, utilizando andaimes derivados de peptídeos. Esta abordagem inovadora vai melhorar e acelerar a descoberta de novas moléculas inibidoras de CDKs [53].

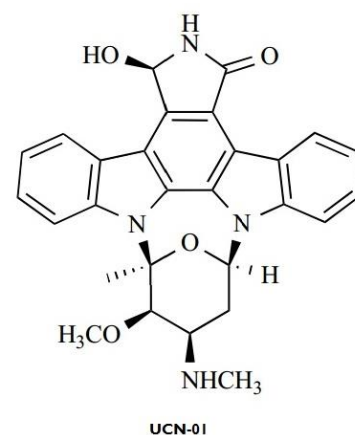
## 2.4) Principais Famílias Químicas das Pequenas moléculas Inibidoras das CDKs e dos seus Derivados (alguns exemplos apenas).

### a) Estaurosporina e Análogos

A estaurosporina, um produto natural, que pertence a uma família de alcalóides microbiana foi isolada a partir do *Streptomyces staurosporeus* [31]. O composto mostrou ter uma capacidade de inibição de CDKs significativa, analisando o seu  $IC_{50}$  (CDK2-ciclina A = 0,007  $\mu$ M, [36] CDK4-ciclina D = 3-10  $\mu$ M). A estaurosporina mostrou ser um inibidor ATP-competitivo da Proteína Cinase C (PKC) provocou a inibição completa de crescimento de linhas celulares de glioma humano. Os níveis de CDK2, cdc2, ciclina A e ciclina B diminuíram, ao passo que os níveis de inibidores de CDKs, p21 e p27 aumentaram durante o tratamento com este composto [69].

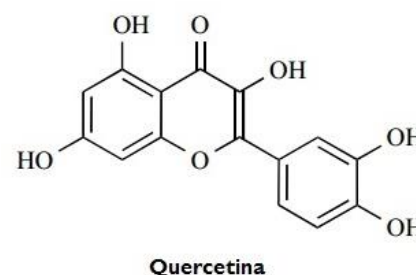


O UCN-01, análogo da 7-hidroxiestaurosporine [70], isolado a partir de culturas de *Streptomyces* sp., é um inibidor selectivo, mas não específico, das cinases com boa actividade contra a PKC e as CDKs ( $IC_{50}$  das PKC = 0.0068  $\mu$ M, da CDK1 = 0,031  $\mu$ M e da CDK2 = 0,03  $\mu$ M). O determinante de sensibilidade ao UCN-01 reside no equilíbrio da actividade da cinase CDK2 e indução da proteína p21 [72].

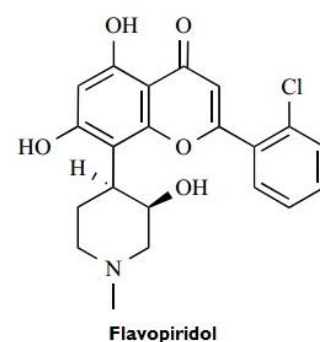


### b) Derivados de Flavonóide

A quercetina, um flavonóide bioactivo omnipresente nas plantas, demonstrou inibir a proliferação de células cancerosas num intervalo de concentração de 0,01  $\mu$ M -10  $\mu$ M [73]. O composto é um inibidor relativamente fraco de CDKs, no entanto, actualmente, o núcleo flavona é um molde estrutural viável para a concepção de fármacos [74].



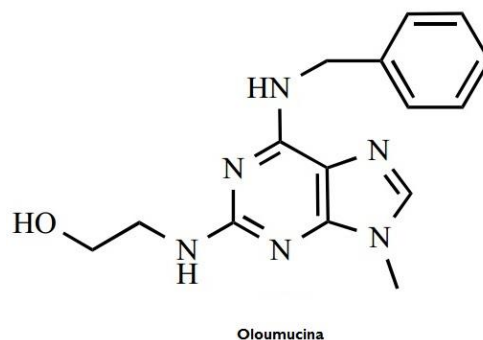
O Flavopiridol (NSC-649890, L86-8275) é uma flavona semi-sintética análoga ao alcalóide rohituquina, um composto presente numa árvore indígena, a *Dysoxylum binectariferum*. Este composto mostrou-se capaz de inibir CDKs, causando a paragem do ciclo celular e inibição do crescimento [75]. Esta flavona é um dos inibidores de CDKs mais avançado, actualmente em ensaios clínicos de Fase II para muitos tumores [76]. O



composto é um inibidor não selectivo que mostra actividade *in vitro* com  $IC_{50}$  (CDK4-ciclina D = 0,4  $\mu$ M, CDK2-ciclina A = 0,1  $\mu$ M, CAK = 0,3  $\mu$ M [77] e CDK1-cyclin B = 0,4  $\mu$ M [78]) e uma actividade muito ligeira para o receptor de tirosina-cinase do Factor de Crescimento Epidérmico (EGF), ( $IC_{50}$  = 21  $\mu$ M) e para a Proteína Cinase A (PKA) ( $IC_{50}$  = 122  $\mu$ M) [79]. Este composto também tem mostrado resultados promissores na terapia de combinação, melhorando a actividade do Taxol em ensaios em humanos [80]. A concepção e síntese de uma pequena biblioteca de 8-amidoflavone, 8-sulfonamidoflavone, 8-amido-7-hidroxi-flavone, e análogos heterocíclicos do flavopiridol são relatadas. A actividade anti-proliferativa e inibidora da CDK2-Ciclina A destes análogos era significativamente mais baixa do que a actividade do Flavopiridol [81].

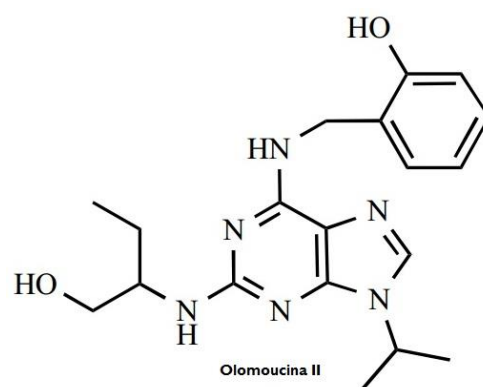
### c) Derivados da Purina

O sistema de anéis da purina é utilizado numa série de inibidores de CDKs, como Olomoucina, que foi identificado como um composto de chumbo activo através da triagem das purinas substituídas com potência moderada [ $IC_{50}$  (CDK1-ciclina B = 7  $\mu$ M, CDK2-ciclina A = 7  $\mu$ M, CDK2/ciclina E = 7  $\mu$ M e CDK5-p35 = 3  $\mu$ M)] [82],

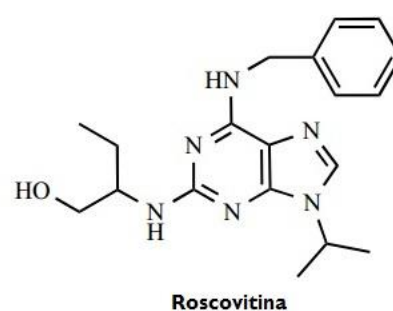


já a Olomoucina tem uma potência anti tumoral com um  $IC_{50}$  = 56  $\mu$ M para células cancerosas HCT-116 [83]. Os efeitos deste composto na inibição do crescimento celular, com a ajuda da radiação-gama, e na apoptose foram estudados na linha de células de Raji (linfoma de Burkitt). A combinação da Olomoucina com a radiação causou um aumento paragem da divisão celular em G2, diminuiu a sobrevivência das células e a síntese de ADN na fracção não-apoptótica das células Raji [84].

Olomoucina II [6 - [(2-hidroxibenzil) amino]-2 - [[1 - (hidroximetil) propil] amino]-9-isopropilpurina] exhibe actividade inibidora 10 vezes maior do que a Roscovitina, um potente e específico inibidor da CDK1, e mostra ter um  $IC_{50}$  de 0,02  $\mu$ M contra CDK1-ciclin B [85]. Além da regulação do ciclo celular e das cinases CDK1 e CDK2, a Olomoucina II também exerce especificidade para a CDK7 e para a CDK9, com importantes funções na regulação da transcrição do ARN [86].



A R-Roscovitina é um derivado de purina de segunda geração. Este composto mostra uma potência melhorada 10 vezes para CDK1-Ciclina B ( $IC_{50}$  = 0,7  $\mu$ M), CDK2-ciclina E ( $IC_{50}$  = 0,7  $\mu$ M) e CDK5-p35 ( $IC_{50}$  = 0,16  $\mu$ M) e mantém a selectividade no que diz respeito a uma série de outras cinases [87]. O isómero R apresenta maior actividade inibidora da CDK1 e da CDK5 do que o isómero S. A R-Roscovitina (Seliciclib ou CYC202) permite uma concentração activa no tumor, uma modulação de marcadores farmacodinâmicos e uma inibição do crescimento do tumor com  $IC_{50}$  = 15  $\mu$ M em linhagens celulares HCT-116 [88]. Este composto inibe completamente a CDK5-p25 no intervalo de concentração de 10 a 50  $\mu$ M [89].





#### d) Derivados do Indol

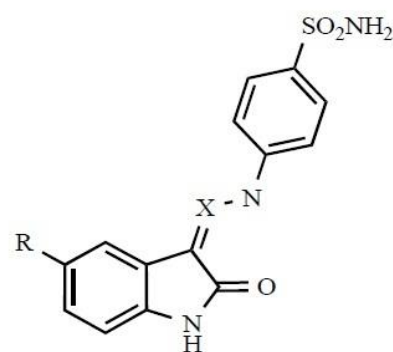
Os Oxindoles estão relatados como inibidores potentes da CDK2. Duas classes estreitamente relacionadas de compostos à base de oxindoles, 1H-indol-2,3-diona-3-fenilhidrazona e 3-(anilino metileno)-1,3-dihidro-2H-indol-2-onas mostraram-se capazes de inibir potentemente a CDK2 [92]. Os compostos nesta série inibiram a CDK2 com uma potência aproximadamente 10 vezes maior do que para a CDK1.

Um novo derivado indolinona 3-substituído, SU9516 [3-[1-(3H-imidazol-4-il)-met-(Z)-ilideno]-5-metoxi-1,3-di-hidro-indol-2-ona] liga-se e inibe selectivamente a actividade da CDK2. Esta inibição resulta numa diminuição dependente do tempo (4-64%) na fosforilação da proteína do retinoblastoma pRb, um aumento na activação da caspase-3 (5-84%), e alterações no ciclo celular, resultando na falta de um G0-G1 ou um bloqueio G2-M [93]. Descobertas recentes sugerem que este composto mata células leucémicas através da inibição da CTD da ARN Polimerase II por fosforilação em associação com a lesão oxidativa e baixa regulação da Mcl-1 ao nível de transcrição, culminando na lesão mitocondrial e morte celular [94].

Indolocarbazoles 6-substituídos ((a) e (b)) representam uma nova classe de inibidores da CDK4-Ciclina D1, que são estruturalmente homólogos da Estaurosporina. Estes compostos são inibidores potentes, selectivos e ATP-competitivos do complexo CDK4-Ciclina D1 e são capazes de inibir o crescimento de células nas linhagens celulares tumorais humanas HCT-116 e NCI H460. [95]

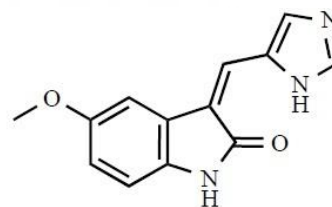
#### e) Derivados de piridina

Estudos de rastreio revelaram que as pirazolo [3,4-b]piridinas, tais como a SQ-67563 [ $IC_{50}$  (CKD1-Ciclina B = 0,15  $\mu$ M, CDK2-Ciclina E = 0,11  $\mu$ M)] e a SQ-67454 [ $IC_{50}$  (CDK1-Ciclina B =

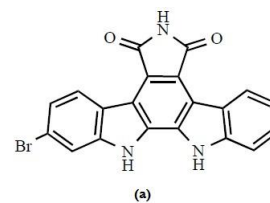


Oxindoles

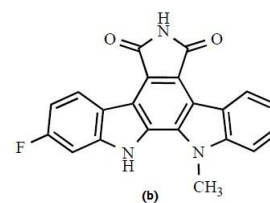
- a. X = N; R = H, Br, Cl, Oxazolil  
b. X = CH; R = H, Cl, Oxazolil



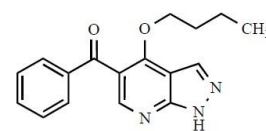
SU9516



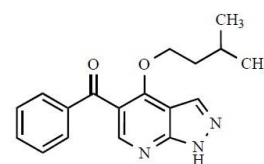
(a)



(b)



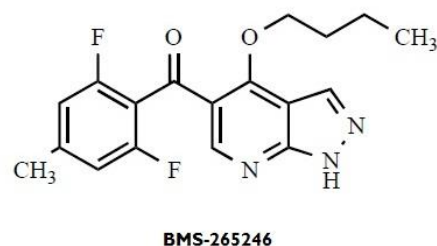
SQ-67563



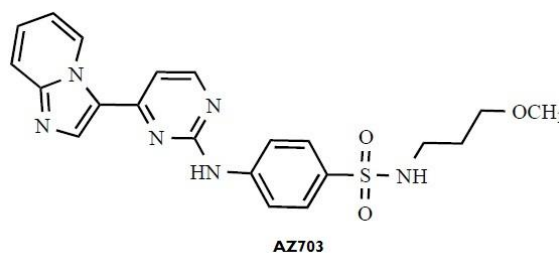
SQ-67454

0,24  $\mu\text{M}$ , CDK2-Ciclina E = 0,18  $\mu\text{M}$ ]) como inibidores de CDK com actividade potente *in vitro* [97].

Estudos de estrutura-actividade em 1H-pirazol [3,4-b] piridina resultaram na descoberta de um inibidor selectivo e potente para as CDK1 e CDK2, com o nome de código BMS-265246 (31) que apresenta um  $\text{IC}_{50}$  (CDK1-Ciclina B = 0,006  $\mu\text{M}$ ), CDK2-Ciclina E = 0,009  $\mu\text{M}$ ). [96]



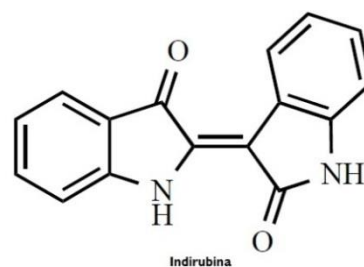
Estudos *in vitro* revelaram ainda que o AZ703, um novo derivado de imidazopiridina é um inibidor selectivo de CDK1 e CDK2. O composto exhibe um modo de acção consistente com a indução de G<sub>1</sub>, S e



paragem da fase G<sub>2</sub>-M. Também mostrou actividade potente como anti proliferativo em uma vasta série de linhagem de células tumorais [98, 99]. As actividades inibidoras do AZ703 em termos de  $\text{IC}_{50}$  são: CDK2-Ciclina E = 0,004  $\mu\text{M}$ , CDK2-Ciclina A = 0,003  $\mu\text{M}$ , CDK1-Ciclina B = 0,006  $\mu\text{M}$ , CDK4-Ciclina D = 3,058  $\mu\text{M}$ , CDK7-Ciclina H = 1,510  $\mu\text{M}$ . [100].

#### f) Derivados de Indirubina

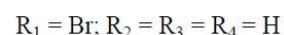
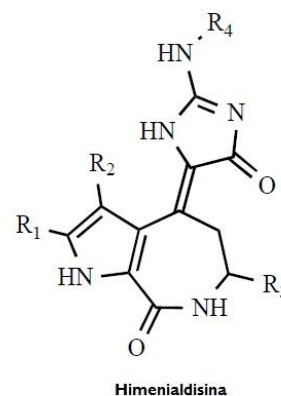
A Indirubina, um isómero de índigo, é indicada como um inibidor de CDKs ( $\text{IC}_{50}$  CDK1-Ciclina B = 10  $\mu\text{M}$ , CDK5-p25 = 10 $\mu\text{M}$ ). O composto é o ingrediente activo da *Gangui Lohui Wan*, uma receita medicinal tradicional chinesa usada contra a Leucemia mielóide crónica (LMC) [101]. O Composto e alguns derivados



de indirubina têm sido descritos como inibidores de CDKs competindo nos locais de ligação do ATP com elevada selectividade entre as várias famílias de cinases [102]. O efeito anti proliferativo da Indirubina nas células cancerígenas humanas resulta da inibição dos genes ou das proteínas de regulação do ciclo celular, parando o ciclo celular na fase G<sub>2</sub>/M [103].

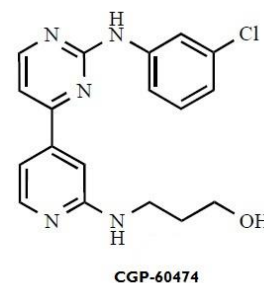
### g) Himenialdisina e Análogos

A Himenialdisina (HMD) [4-(2-amino-5-oxo-3H-imidazol-4-ilideno)-2-bromo-1,5,6,7-tetrahidropirrolo[2,3-c]azepina-8-ona] é um produto natural, que foi isolada a partir de esponjas marinhas incluindo *Hymeniacidon Aldis*, *Axinella verrucosa*, e *Aaurantiaca* no início de 1980 com base nos seus efeitos anti proliferativos em cultura de células de leucemia linfocítica *canthella* [104-105]. Foi demonstrado que exibe uma forte actividade inibidora contra várias CDKs intimamente relacionadas, tais como CDK1-Ciclina B ( $IC_{50} = 0,022 \mu M$ ), CDK2-Ciclina A ( $IC_{50} = 0,07 \mu M$ ), CDK2-Ciclina E ( $IC_{50} = 0,04 \mu M$ ), e CDK5-p25 ( $IC_{50} = 0,028 \mu M$ ). A HMD actua de forma ATP-competitiva, e a estrutura de co-cristal com a CDK2 revelou que a HMD ocupa o local de ligação do ATP e forma muitas das ligações de hidrogénio como foram vistas em outros complexos de inibidores de CDKs [106]. Apesar das actividades potentes contra estas cinases, a HMD é relativamente selectiva *in vitro* e exibe apenas moderada a fraca actividade contra muitas outras cinases [107]. Um número de análogos da HMD foi sintetizado com potência nanomolar contra CDKs [108].

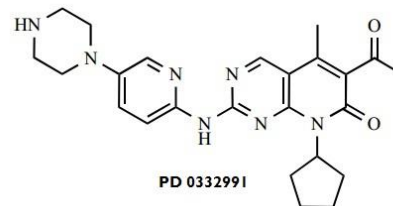


### h) Derivados da Pirimidina

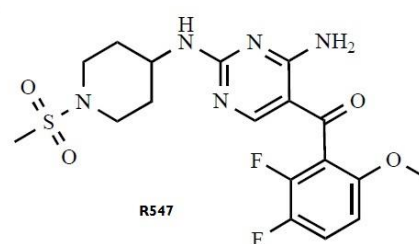
A fenilpirimidina, CGP-60474, é um potente inibidor tanto da CDK1 ( $IC_{50} = 0,017 \mu M$ ) e como da CDK2 ( $IC_{50} = 0,05-0,08 \mu M$ ) [109].



O composto PD 0332991 é um potente inibidor da CDK4-Ciclina D1, com o valor de  $IC_{50}$  de  $0,011 \mu M$ , e da CDK2-Ciclina A, com um  $IC_{50}$  superior a  $5 \mu M$  [110]. Este composto apresenta boas propriedades farmacocinéticas em ratos, com 56% de biodisponibilidade oral, e um nível elevado de selectividade para o complexo CDK4-Ciclina D1 contra mais de 36 outras cinases [111].



Um inibidor ATP-competitivo potente e selectivo é o R547 [4-Amino-2-(1-metanosulfonilpiperidina-4-ilamino) pirimidina-5-il] (2,3-difluoro-6-metoxifenil)-metanona que mostra uma

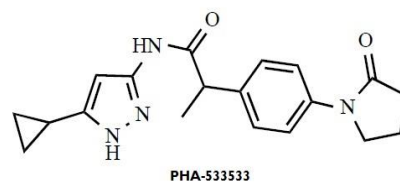


significativa na actividade anti tumoral *in vivo*. Nos ensaios livres de células, o composto inibiu eficazmente a CDK1-Ciclina B, a CDK2-Ciclina E e a CDK4-Ciclina D1 (KI = 0,001-0,003  $\mu\text{M}$ ) e era inactivo (KI > 5  $\mu\text{M}$ ) contra um painel de mais 120 cinases não relacionadas. Em ensaios *in vitro*, o composto inibiu eficazmente a proliferação de linhagens celulares de tumor humano HCT-116 (IC<sub>50</sub> = 0,08  $\mu\text{M}$ ). A sua actividade inibidora do crescimento celular é caracterizada por um boqueio do ciclo celular em G1 e G2 e fases indução de apoptose [112].

### i) Derivados do Pirazol

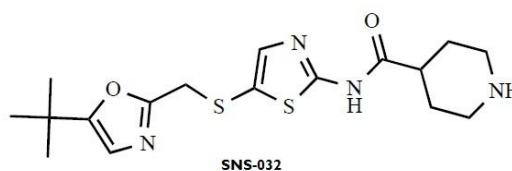
Dentre as diversas classes de potenciais inibidores do complexo CDK2-Ciclina A inibidores do tipo 3-aminopyrazoles recebem especial atenção por causa do seu baixo peso molecular e o que contribui para a expansão rápida da classe [113].

O PHA-533533 [(2S)-N-(5-ciclopropil-1H-pirazol-3-il)-2-[4-(2-oxo-1-pirrolidinil) fenil]-propanamida] [114] inibiu o complexo CDK2-Ciclina A com uma KI de 0,031  $\mu\text{M}$  e um IC<sub>50</sub> de 0,037  $\mu\text{M}$ , contrariando a proliferação de linhagens celulares diferentes de células de tumor com um IC<sub>50</sub> na gama sub-micromolar [115].



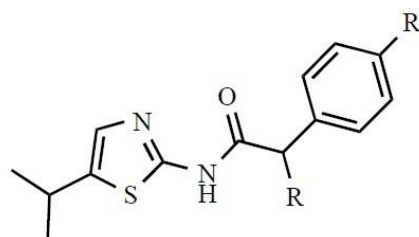
### j) Derivados do Tiazol

Um tiazol selectivo e ATP – competitivo para a CDK2 é o SNS-032 (anteriormente BMS-387032) {N-[5 - [[5 - (1,1-Dimetiletil)-2-oxazolil] metil] tio]-2-tiazolil] -4-piperidinocarboxamida}



que mostrou, num ensaio enzimático isento de células, inibir o complexo CDK2-Ciclina E com um IC<sub>50</sub> = 0,048  $\mu\text{M}$  e foi 10 a 20 vezes mais selectivo sobre os complexos CDK1-Ciclina B e CDK4-Ciclina D, respectivamente. A actividade anti-proliferativa foi estabelecida num ensaio de citotoxicidade celular onde mostrou ter um IC<sub>50</sub> = 0,095  $\mu\text{M}$  [116].

Os derivados de Fenilacetamidotiazol são activos como inibidores de CDK-Ciclina e, assim, são úteis para o tratamento de doenças proliferativas celulares associadas a uma actividade celular dependente de cinase alterada. As doenças

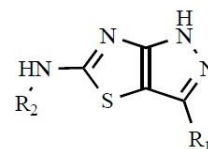


R = H, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alkyl  
R<sub>1</sub> = 5-membered heterocycle

Derivados de Fenilacetamidotiazol

proliferativas incluem o cancro e uma grande variedade de outras condições, tais como a doença de Alzheimer, infecções virais, doenças auto-imunes e desordens neurodegenerativas [117].

Os compostos 5-amino-3-substituídos pirazol [4,5-d] tiazóis reivindicam utilidade no tratamento do cancro, bem como outros estados de doença associados com a angiogénese indesejada e/ou proliferação celular, tais como o crescimento de tumores, a proliferação celular, retinopatia diabética, glaucoma, psoríase e artrite reumatóide através de uma administração de quantidade e efectiva de tais compostos [118].

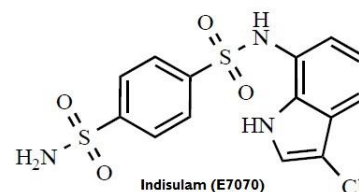


R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = alkyl, aryl, heteroaryl, cycloalkyl

5-amino-3-substituídos pirazol [4,5-d] tiazóis

### k) Outros compostos

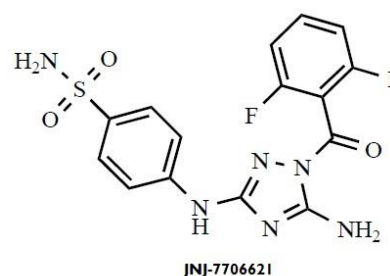
O Indisulam (E7070) [N-(3-cloro-7-indolil)-1,4-benzenedisulphonamide], uma nova sulfonamida anti tumoral, foi descoberto a partir de bibliotecas sulfonamida-dirigidas [119]. Este composto induziu



Indisulam (E7070)

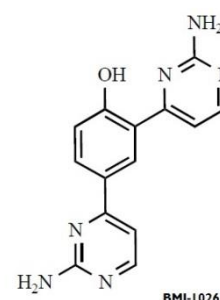
perturbação na transição G1/S, levou à paragem na fase G2 em células cancerígenas do cólon humano HCT116 e células de cancro do pulmão humano A549. O estudo acrescentou ainda que o Indisulam inibiu a fosforilação de pRb, reduziu a expressão das proteínas ciclina A, ciclina B1, CDK2 e reprimiu a actividade da CDK2 com a indução das proteínas p53 e p21, mas apenas nas células parentais A549 [120].

O JNJ-7706621 é um novo inibidor do ciclo celular que mostrou capacidade de inibição de várias CDKs (IC<sub>50</sub> CDK1-Ciclina B = 0,006 µM, CDK2-Ciclina A = 0,002 µM e CDK4-Ciclina D1 = 0,11 µM) [121]. O composto bloqueia selectivamente a proliferação de células tumorais de várias origens, mas foi cerca de 10 vezes menos eficaz na inibição do crescimento de células humanas normais *in vitro*, [122].



JNJ-7706621

O BMI-1026 (100), uma arilo aminopirimidina, induziu uma forte alteração do ciclo celular com potente actividade inibitória contra as CDKs, (IC<sub>50</sub> CDK1-Ciclina B = 0,0083 µM, CDK2-Ciclina A = 0,0023 µM e CDK5/p25 = 0,009 µM) [123].



BMI-1026

Tabela 1: Os inibidores de CDKs-chave. Valores IC<sub>50</sub> em µM [Adaptado de Sapra Sharma P, Sharma R, Tyagi R. *Inhibitors of Cyclin Dependent Kinases: Useful Targets for Cancer Treatment*. Bentham Science Publishers Ltd: Current cancer Targets, 2008, 8, 53-75].

Compound Name	CDK1/B	CDK2/A	CDK2/E	CDK4/D
Staurosporine	-	0.007	-	3-10
UCN-1	0.031	0.03	-	-
Flavopiridol	0.4	0.1	-	0.4
Olomucine II	0.02	-	-	-
R-Roscovitine, CYC202, Seliciclib	0.7	-	0.7	-
Purvalanol B	-	0.006	0.009	-
CVT-31351	4.2	0.5	-	-
SB-210878	-	-	-	0.54
SQ-67563	0.15	-	0.11	-
SQ-67454	0.24	-	0.18	-
BMS-265246	0.006	-	0.009	-
AZ703	0.006	0.003	0.004	3.058
CGP-60474	0.02	-	0.05	-
PD 0332991	-	> 5	-	0.011
NU6027	~ 2.9	~2.2	-	-
R547*	0.001-0.003	-	0.001-0.003	0.001-0.003
Indirubin-3'-monoxime	0.18	-	-	-
PNU292137	-	0.037	-	-
PHA-533533	-	0.037	-	-
-	-	-	0.018	0.012
SNS-032, BMS-387032	-	-	0.048	-
Alsterpaullone	0.035	-	-	-
Kenpaullone	0.4	-	-	-
Hymenialdisine	0.022	0.07	0.04	-
GW9499	-	-	0.0035	-
GW5181	-	-	0.0062	-
Variolin B	0.06	0.08	-	-
Indisulam, E7070	-	-	-	-
JNJ-770662	0.006	0.002	-	0.11
BMI-1026	0.0083	0.0023	-	-
AZD5438	-	-	-	-
AG-024322	-	-	-	-
AT7519	-	-	-	-
ZK-CDK	-	-	-	-



### 3. Estado Actual

As CDKs representam, sem dúvida, um alvo terapêutico interessante e seus inibidores farmacológicos têm sido propostos para o tratamento do cancro. [124] Até o momento, foram desenvolvidos II classes de inibidores de CDKs ATP-competitivos: Derivados de Estaurosporina, de Flavonóides, da Purina, do Indole, da Pirimidina, da Indirubina, do Pirazol, do Tiazol e da Hymenialdisina derivative. [125]. Uma breve visão geral de diferentes dos Inibidores das CDKs actualmente em desenvolvimento clínico está resumida tabela seguinte:

Tabela 2: Inibidores de CDK primeira e segunda geração em ensaios clínicos em curso em 2012 [Adaptado de Canavese M, Santo L, Raje N. *Cyclin dependent kinases in cancer*. Landes Bioscience: Cancer Biology & Therapy 13:7, 451-457; May 2012.].




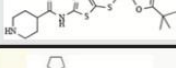
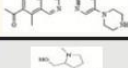

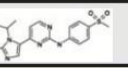
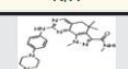
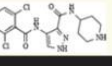

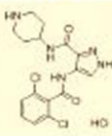
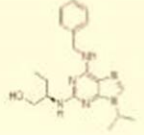
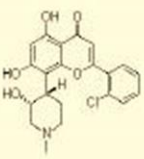
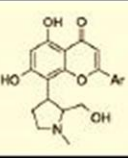
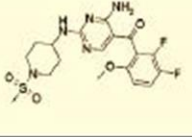
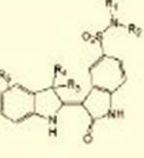
Chemical structure	Name	Generation	Target	Disease	Route administration	Development status
	Flavopiridol	I	CDK2, 7, 9	Lymphoma/MM	IV	Phase I-III
	R-Roscovitine	I	CDK2, 7, 9	MM/Lung cancer	oral	Phase I-II
	UCN-01	I	CDK1, 2	Leukemia	IV	Phase I
	SNS-032	II	CDK2, 7, 9	B-malignancies/MM	IV	Phase I-II
	PD-0332991	II	CDK4, 6	Lymphoma/MM/Breat cancer	oral	Phase I
	P-276-00	II	CDK4/Cyclin D1	Neoplasms	IV	Phase I
	R-547	II	CDK1, 2, 4	Neoplasms	IV	Phase I-II
	AZD5438	II	CDK1, 2	Neoplasms	oral	Phase I
N/A	ZK 304709	II	CDK1, 2, 4, 7, 9	Pancreatic tumor	oral	Phase I
	PHA-848125	II	CDK1, 2, 4, 5	Solid Tumors	oral	Phase I-II
	AT7519	II	CDK1, 2, 4, 6, 7, 9	MM	IV	Phase I-II

Tabela 3 – Inibidores de CDKs em ensaios clínicos, em 2013 [Adaptado de Esposito L; Indovina P; Magnotti F; Conti D; Giordano A. *Anticancer Therapeutic Strategies Based on CDK Inhibitors*. Bentham Science Publishers: Current Pharmaceutical Design, 2013, 19, 5327-5332.]

Compound	Structure	Main targets	Clinical phase
AT7519		CDK2, CDK4, CDK5 and CDK9	I
CY-202 (R-Roscovitine)		CDK1, CDK2, CDK5, CDK7 and CDK9	II
Flavopiridol		CDK1, CDK2, CDK4, CDK6, CDK7 and CDK9	II
P276-00		CDK1, CDK4 and CDK9	I
RS47		CDK1, CDK2, CDK4	I
ZK304709		CDK1, CDK2, CDK4, CDK7 and CDK9	I



#### 4. Conclusão

As CDKs são essenciais para a condução de cada fase do ciclo celular, portanto, a intervenção terapêutica baseada na inibição de CDKs representa uma estratégia interessante para o tratamento de pacientes com cancro. Com base nos artigos disponíveis, verifica-se que os inibidores farmacológicos mono-específicos são mais aplicáveis para o tratamento de condições patológicas nas quais uma cinase é desregulada, enquanto a utilização simultânea de vários inibidores de CDKs parece mais provável para aumentar a possibilidade de atingir a meta, no caso de cancro. [125]

Desde a primeira descoberta do papel fundamental da CDKI na condução do ciclo celular, um progresso significativo tem sido feito no entendimento do processo finamente controlado ciclo celular. Hoje em dia, é bem reconhecido que os complexos CDK-Ciclina têm um papel importante no controle do ciclo celular e a actividade aberrante das CDKs é uma característica de vários tipos de cancro humano [33].

Assim, as abordagens terapêuticas baseadas na inibição de CDKs representam uma estratégia promissora para o tratamento do cancro. Durante a última década, uma pesquisa intensiva em pequenas moléculas que têm como alvo as CDK foi realizada, utilizando-se diferentes abordagens terapêuticas.

A primeira geração de inibidores das CDKs consistia em pequenas moléculas ATP-competitivas. Embora estes compostos tenham mostrado uma baixa especificidade para as cinases alvo, o que provoca efeitos secundários indesejáveis, durante os tratamentos, alguns estudos sugerem que a sua utilização em combinação com outros

Além disso, o recente aumento do conhecimento tanto sobre a estrutura e a regulação dos complexos CDK-Ciclina, tem levado ao desenvolvimento de estratégias de inibição mais específicas. Com efeito, o desenvolvimento de inibidores de CDKs que interagem com locais de não-ligação ao ATP é uma abordagem promissora, que tem atraído o interesse de muitas companhias farmacêuticas envolvidas em programas de oncologia [44, 53].

No entanto, espera-se que num futuro próximo, a eficácia e a especificidade dos inibidores de CDKs não ATP-competitivos vai melhorar ainda mais, devido a uma melhor compreensão das interações entre as CDKs e os seus substratos e proteínas reguladoras. Portanto, acreditamos que novas estratégias baseadas na inibição CDKs terão implicações importantes no campo da terapia anticancerígena direccionada [126].

## Bibliografia

- [1] Malumbres M, Barbacid M. *Mammalian cyclin-dependent kinases*. Trends Biochem Sci **2005**; 30:630-41.
- [2] Canavese M, Santo L, Raje N. *Cyclin dependent kinases in cancer*. Landes Bioscience: Cancer Biology & Therapy 13:7, 451-457; May **2012**.
- [3] Esposito L; Indovina P; Magnotti F; Conti D; Giordano A. *Anticancer Therapeutic Strategies Based on CDK Inhibitors*. Bentham Science Publishers: Current Pharmaceutical Design, **2013**, 19, 5327-5332.
- [4] Sapra Sharma P, Sharma R, Tyagi R. *Inhibitors of Cyclin Dependent Kinases: Useful Targets for Cancer Treatment*. Bentham Science Publishers Ltd: Current cancer Targets, **2008**, 8, 53-75.
- [5] Foye, W. O. Ed. *Cancer Chemotherapeutic Agent*. American Chemical Society: Washington DC, **1995**.
- [6] Morgan, D. O. *Principles of CDK Regulation*. Nature **1995**, 374 (6518), 131-134.
- [7] Harper, J. W.; Adams, P. D. *Cyclin-Dependent Kinases*. Chem. Rev. **2001**, 101 (8), 2511-2526.
- [8] Legraverend, M.; Grierson, D. S. *The Purines: Potent and Versatile Small Molecule Inhibitors and Modulators of Key Biological Targets*. Bioorg. Med. Chem. **2006**, 14 (12), 3987-4006.
- [9] Vermeulen, K.; Van Bockstaele, D. R.; Berneman, Z. N. *The Cell Cycle: a Review of Regulation, Dereglulation and Therapeutic Targets in Cancer*. Cell Prolif. **2003**, 36 (3), 131-149.
- [10] Bridges, A. J. *Chemical Inhibitors of Protein Kinases*. Chem. Rev. **2001**, 101 (8), 2541-2571.
- [11] Heady, L.; Fernandez-Serra, M.; Mancera, R. L.; Joyce, S.; Venkitaraman, A. R.; Artacho, E.; Skylaris, C. - K.; Ciacchi, L. C.; Payne, M. C. *Novel Structural Features of CDK Inhibition Revealed by an ab initio Computational Method Combined with Dynamic Simulations*. J. Med. Chem. **2006**, 49 (17), 5141-5153.
- [12] Bain, J.; McLauchlan, H.; Elliott, M.; Cohen, P. *The Specificities of Protein Kinase Inhibitors: an Update*. Biochem. J. **2003**, 371 (Pt. 1), 199-204.
- [13] Park, H.; Yeom, M. S.; Lee, S. *Loop Flexibility and Solvent Dynamics as Determinants for the Selective Inhibition of Cyclin-Dependent Kinase 4: Comparative Molecular Dynamics Simulation Studies of CDK2 and CDK4*. ChemBioChem **2004**, 5 (12), 1662-1672.
- [14] Ikuta, M.; Kamata, K.; Fukasawa, K.; Honma, T.; Machida, T.; Hirai, H.; Suzuki-Takahashi, I.; Hayama, T.; Nishimura, S. *Crystallographic Approach to Identification of Cyclin-Dependent Kinase 4 (CDK4)-Specific Inhibitors by Using CDK4 Mimic CDK2 Protein*. J. Biol. Chem. **2001**, 276 (29), 27548-27554.
- [15] Sielecki, T. M.; Boylan, J. F.; Benfield, P. A.; Trainor, G. L. *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors: Useful Targets in Cell Cycle Regulation*. J. Med. Chem. **2000**, 43(1), 1-18.
- [16] Nakayama, K.; Nakayama K. *Cip/Kip Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors: Brakes of the Cell Cycle Engine During Development*. Bioessays **1998**, 20(12), 1020-1029.
- [17] Chim, C. S.; Fung, T. K.; Wong, K. F.; Lau, J. S.; Law, M.; Liang, R. *Methylation of INK4 and CIP/KIP Families of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor in Chronic Lymphocytic Leukaemia in Chinese Patients*. J. Clin. Pathol. **2006**, 59(9), 921-926.
- [18] Maddika, S.; Ande, S. R.; Panigrahi, S.; Paranjothy, T.; Weglarczyk, K.; Zuse, A.; Eshraghi, M.; Manda, K. D.; Wiechec, E.; Los, M. *Cell Survival, Cell Death and Cell Cycle Pathways are Interconnected: Implications for Cancer Therapy*. Drug Resist. Updat. **2007**, 10(1-2), 13-29.
- [19] Peter, M.; Herskowitz, I. *Joining the Complex: Cyclin-Dependent Kinase Inhibitory Proteins and the Cell Cycle*. Cell **1994**, 79 (2), 181-184.
- [20] Mainprize, T. G.; Taylor, M. D.; Rutka, J. T.; Dirks, P. B. *Cip/Kip Cell-Cycle Inhibitors: a Neuro-Oncological Perspective*. J. Neurooncol. **2001**, 51 (3), 205-218.
- [21] Xiong, Y.; Hannon, G. J.; Zhang, H.; Casso, D.; Kobayashi, R.; Beach, D. *p21 is a Universal Inhibitor of Cyclin Kinases*. Nature **1993**, 366 (6456), 701-704.
- [22] Janicke, R. U.; Sohn, D.; Essmann, F.; Schulze-Osthoff, K. *The Multiple Battles Fought by Anti-Apoptotic p21*. Cell Cycle **2007**, 6 (4), 407-413.
- [23] Russo, A. A.; Jeffrey, P. D.; Patten, A. K.; Massague, J.; Pavletich, N. P. *Crystal Structure of p27Kip1 Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Bound to the Cyclin A-CDK2 Complex*. Nature **1996**, 382 (6589), 325-331.
- [24] Hall, M.; Bates, S.; Peters, G. *Evidence for Different Modes of Action of Cyclin Dependent Kinase Inhibitors: p15 and p16 Bind to Kinases, p21 and p27 Bind to Cyclins*. Oncogene **1995**, 11 (8), 1581-1588.

- [25] Hengst, L.; Gopfert, U.; Lashuel, H. A.; Reed, S. I. *Complete Inhibition of CDK/cyclin by One Molecule of p21Cip1*. *Genes Dev.* **1998**, *12*(24), 3882-3888.
- [26] Gao, C. Y.; Zalenka, P. S. *Cyclins, Cyclin-Dependent Kinases and Differentiation*. *Bioessays* **1997**, *19*(4), 307-315.
- [27] Carnero, A.; Hannon, G. J. In *Cyclin Dependent Kinase (CDK) Inhibitors*; Vogt, P. K.; Reed, S. I.; Eds.; Springer: New York, **1997**, pp. 43-55.
- [28] Guan, K. L.; Jenkins, C. W.; Li, Y.; Nichols, M. A.; Wu, X.; O'Keefe, C. L.; Matera, A. G.; Xiong, Y. *Growth Suppression by p18, a p16<sup>INK4/MTS1</sup>- and p14<sup>INK4B/MTS2</sup>-Related CDK6 Inhibitor, Correlates with Wild-Type pRb Function*. *Genes Dev.* **1994**, *8*(24), 2939-2952.
- [29] Hannon, G. J.; Beach, D. *p15<sup>INK4B</sup> is a Potential Effector of TGF $\beta$ -Induced Cell Cycle Arrest*. *Nature* **1994**, *371* (6494), 257-261.
- [30] Reynisdottir, I.; Polyak, K.; Iavarone, A.; Massague, J. *Kip/Cip and INK4 CDK Inhibitors Cooperate to Induce Cell Cycle Arrest in Response to TGF $\beta$* . *Genes Dev.* **1995**, *9* (15), 1831-1845.
- [31] Brotherton, D. H.; Dganaraj, V.; Wick, S.; Brizula, L.; Domaille, P. J.; Volyanik, E.; Xu, X.; Parisin, E.; Smith, B. O.; Archer, S. J.; Serrano, M.; Brenner, S. L.; Blundell, T. L.; Laue, E. D. *Crystal Structure of the Complex of the Cyclin-Dependent Kinase CDK6 Bound to the Cell-Cycle Inhibitor p19<sup>INK4d</sup>*. *Nature* **1998**, *395* (6699), 244-250.
- [32] Kim, S. H. *Structure-Based Inhibitor Design for CDK2, a Cell Cycle Controlling Protein Kinase*. *Pure Appl. Chem.* **1998**, *70*(3), 555-565.
- [33] Lapenna S, Giordano A. *Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer*. *Nat Rev Drug Discov* **2009**; *8*(7): 547-66.
- [34] Jessen BA, Lee L, Koudriakova T, et al. *Peripheral white blood cell toxicity induced by broad spectrum cyclin-dependent kinase inhibitors*. *J Appl Toxicol* **2007**; *27*(2): 133-42.
- [35] Byrd JC, Lin TS, Dalton JT, et al. *Flavopiridol administered using a pharmacologically derived schedule is associated with marked clinical efficacy in refractory, genetically high-risk chronic lymphocytic leukemia*. *Blood* **2007**; *109*(2): 399-404.
- [36] Saturno G, Pesenti M, Cavazzoli C, et al. *Expression of serine/threonine protein-kinases and related factors in normal monkey and human retinas: the mechanistic understanding of a CDK2 inhibitor induced retinal toxicity*. *Toxicol Pathol* **2007**; *35*(7): 972-83.
- [37] Malumbres M, Pevarello P, Barbacid M, Bischoff JR. *CDK inhibitors in cancer therapy: what is next?* *Trends Pharmacol Sci* **2008**; *29*(1): 16-21.
- [38] Joshi KS, Rathos MJ, Joshi RD, et al. *In vitro antitumor properties of a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, P276-00*. *Mol Cancer Ther* **2007**; *6*(3): 918-25.
- [39] Joshi KS, Rathos MJ, Mahajan P, Wagh V, Shenoy S, Bhatia D, et al. *P276-00, a novel cyclin-dependent inhibitor induces G1-G2 arrest, shows antitumor activity on cisplatin-resistant cells and significant in vivo efficacy in tumor models*. *Mol Cancer Ther* **2007**; *6*(3): 926-34.
- [40] Squires MS, Feltell RE, Wallis NG, et al. *Biological characterization of AT7519, a small-molecule inhibitor of cyclin-dependent kinases, in human tumor cell lines*. *Mol Cancer Ther* **2009**; *8*(2): 324-32.
- [41] DePinto W, Chu XJ, Yin X, et al. *In vitro and in vivo activity of R547: a potent and selective cyclin-dependent kinase inhibitor currently in phase I clinical trials*. *Mol Cancer Ther* **2006**; *5*(11): 2644-58.
- [42] Siemeister G, Luecking U, Wagner C, Detjen K, McCoy C, Bosslet K. *Molecular and pharmacodynamic characteristics of the novel multi-target tumor growth inhibitor ZK 304709*. *Biomed Pharmacother* **2006**; *60*(6): 269-72.
- [43] Scholz A, Wagner K, Welzel M, et al. *The oral multitarget tumour growth inhibitor, ZK 304709, inhibits growth of pancreatic neuroendocrine tumours in an orthotopic mouse model*. *Gut* **2009**; *58*(2): 261-70.
- [44] Rizzolio F, Tuccinardi T, Caligiuri I, Lucchetti C, Giordano A. *CDK inhibitors: from the bench to clinical trials*. *Curr Drug Targets* **2010**; *11*(3): 279-90.
- [45] Luke JJ, D'Adamo DR, Dickson MA, et al. *The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol potentiates doxorubicin efficacy in advanced sarcomas: preclinical investigations and results of a phase I dose-escalation clinical trial*. *Clin Cancer Res* **2012**; *18*(9): 2638-47.
- [46] Nguyen DM, Schrupp WD, Tsai WS, et al. *Enhancement of depsipeptide-mediated apoptosis of lung or esophageal cancer cells by flavopiridol: activation of the mitochondria-dependent deathsignaling pathway*. *J Thorac Cardiovasc Surg* **2003**; *125*(5): 1132-42.
- [47] Nguyen DM, Schrupp WD, Chen GA, et al. *Abrogation of p21 expression by flavopiridol enhances depsipeptide-mediated apoptosis in malignant pleural*

- mesothelioma cells*. Clin Cancer Res **2004**; 10(5): 1813-25.
- [48] Almenara J, Rosato R, Grant S. *Synergistic induction of mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia cells by flavopiridol and the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)*. Leukemia **2002**; 16(7): 1331-43.
- [49] Gao N, Dai Y, Rahmani M, Dent P, Grant S. *Contribution of disruption of the nuclear factor-kappaB pathway to induction of apoptosis in human leukemia cells by histone deacetylase inhibitors and flavopiridol*. Mol Pharmacol **2004**; 66(4): 956-63.
- [50] Rosato RR, Almenara JA, Yu C, Grant S. *Evidence of a functional role for p21/WAF1/CIP1 down-regulation in synergistic antileukemic interactions between the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate and flavopiridol*. Mol Pharmacol **2004**; 65(3): 571-81.
- [51] Rosato RR, Almenara JA, Kolla SS, *et al*. *Mechanism and functional role of XIAP and Mcl-1 down-regulation in flavopiridol/vorinostat antileukemic interactions*. Mol Cancer Ther **2007**; 6(2): 692-702.
- [52] Huang JM, Sheard MA, Ji L, Sposto R, Keshelava N. *Combination of vorinostat and flavopiridol is selectively cytotoxic to multidrug resistant neuroblastoma cell lines with mutant TP53*. Mol Cancer Ther **2010**; 9(12): 3289-301.
- [53] Orzaez M, Gortat A, Mondragon L, Bachs O, Perez-Paya E. *ATPnoncompetitive inhibitors of CDK-cyclin complexes*. Chem Med Chem **2009**; 4(1): 19-24.
- [54] McInnes C. *Progress in the evaluation of CDK inhibitors as antitumor agents*. Drug Discov Today **2008**; 13(19-20): 875-81.
- [55] Bagella L, Sun A, Tonini T, *et al*. *A small molecule based on the pRb2/p130 spacer domain leads to inhibition of cdk2 activity, cell cycle arrest and tumor growth reduction in vivo*. Oncogene **2007**; 26(13): 1829-39.
- [56] Okorokov AL. *p53 in a crosstalk between DNA repair and cell cycle checkpoints*. Cell Cycle **2003**; 2(3): 233-5.
- [57] Morgan SE, Kastan MB. *p53 and ATM: cell cycle, cell death, and cancer*. Adv Cancer Res **1997**; 71: 1-25.
- [58] De Azevedo WF, Leclerc S, Meijer L, Havlicek L, Strnad M, Kim SH. *Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine*. Eur J Biochem **1997**; 243(1-2): 518-26.
- [59] Arris CE, Boyle FT, Calvert AH, *et al*. *Identification of novel purine and pyrimidine cyclin-dependent kinase inhibitors with distinct molecular interactions and tumor cell growth inhibition profiles*. J Med Chem **2000**; 43(15): 2797-804.
- [60] Luciani MG, Hutchins JR, Zheleva D, Hupp TR. *The C-terminal regulatory domain of p53 contains a functional docking site for cyclin A*. J Mol Biol **2000**; 300(3): 503-18.
- [61] Jeffrey PD, Russo AA, Polyak K, *et al*. *Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclin A-CDK2 complex*. Nature **1995**; 376(6538): 313-20.
- [62] Canela N, Orzaez M, Fucho R, *et al*. *Identification of an hexapeptide that binds to a surface pocket in cyclin A and inhibits the catalytic activity of the complex cyclin-dependent kinase 2-cyclin A*. J Biol Chem **2006**; 281(47): 35942-53.
- [63] Wadia JS, Stan RV, Dowdy SF. *Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis*. Nat Med **2004**; 10(3): 310-5.
- [64] Adams PD, Sellers WR, Sharma SK, Wu AD, Nalin CM, Kaelin WG, Jr. *Identification of a cyclin-cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors*. Mol Cell Biol **1996 Dec**; 16(12): 6623-33.
- [65] Andrews M], McInnes C, Kontopidis G, *et al*. *Design, synthesis, biological activity and structural analysis of cyclic peptide inhibitors targeting the substrate recruitment site of cyclin-dependent kinase complexes*. Org Biomol Chem **2004**; 2(19): 2735-41.
- [66] Zheleva DI, McInnes C, Gavine AL, Zhelev NZ, Fischer PM, Lane DP. *Highly potent p21(WAF1)-derived peptide inhibitors of CDKmediated pRb phosphorylation: delineation and structural insight into their interactions with cyclin A*. J Pept Res **2002**; 60(5): 257-70.
- [67] Atkinson GE, Cowan A, McInnes C, Zheleva DI, Fischer PM, Chan WC. *Peptide inhibitors of CDK2-cyclin A that target the cyclin recruitment-site: structural variants of the C-terminal Phe*. Bioorg Med Chem Lett **2002**; 12(18): 2501-5.
- [68] Kontopidis G, Andrews M], McInnes C, *et al*. *Truncation and optimisation of peptide inhibitors of*

- cyclin-dependent kinase 2-cyclin a through structure-guided design*. Chem Med Chem **2009**; 4(7): 1120-8.
- [69] Harmalkar, M. N.; Shirsat, N. V. *Staurosporine-Induced Growth Inhibition of Glioma Cells is Accompanied by Altered Expression of Cyclins, CDKs and CDK Inhibitors*. Neurochem. Res. **2006**, 31(5), 685-692.
- [70] Grosios, K. UCN-01 Kyowa Hakko Kogyo Co. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2001**, 2 (2), 287-297.
- [71] Senderowicz, A. M. *Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinase Modulators for Cancer Therapy*. Prog. Drug Res. **2005**, 63, 183-206.
- [72] Abe, S.; Kubota, T.; Otani, Y.; Furukawa, T.; Watanabe, M.; Kumai, K.; Kitajima, M. *Sensitivity of UCN-01 Lies in the Balance of CDK2 Kinase and p21*. Gan To Kagaku Ryoho. **2000**, 27 (8), 1260-1266
- [73] Kuo, P. C.; Liu, H. F.; Chao, J. I. *Survivin and p53 Modulate Quercetin-Induced Cell Growth Inhibition and Apoptosis in Human Lung Carcinoma Cells*. J. Biol. Chem. **2004**, 279 (53), 55875-55885.
- [74] Vijayababu, M. R.; Kanagaraj, P.; Arunkumar, A.; Ilangovan, R.; Aruldas, M. M.; Arunakaran, J. *Quercetin-Induced Growth Inhibition and Cell Death in Prostatic Carcinoma Cells (PC-3) are Associated with Increase in p21 and Hypophosphorylated Retinoblastoma Proteins Expression*. J. Cancer Res. Clin. Oncol. **2005**, 131 (11), 765-771.
- [75] Wirger A.; Perabo F. G.; Burgemeister, S.; Haase, L.; Schmidt, D. H.; Doehn, C.; Mueller, S. C.; Jocham, D. *Flavopiridol, an Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases, Induces Growth Inhibition and Apoptosis in Bladder Cancer Cells in vitro and in vivo*. Anticancer Res. **2005**, 25 (6B), 4341-4347.
- [76] Morris, D. G.; Bramwell, V. H.; Turcotte, R.; Figueredo, A. T.; Blackstein, M. E.; Verma, S.; Matthews, S.; Eisenhauer, E. A. *A Phase II Study of Flavopiridol in Patients With Previously Untreated Advanced Soft Tissue Sarcoma*. Sarcoma **2006**, 1, 1-7.
- [77] Sedlacek, H. H.; Czech, J.; Naik, R.; Kaur, G.; Worland, P.; Losiewicz, M.; Parker, B.; Carlson, B.; Smith, A. *Flavopiridol (L86-8275; NSC 649890), a New Kinase Inhibitor for Tumor Therapy*. Int. J. Oncol. **1996**, 9, 1143-1168.
- [78] Losiewicz, M. D.; Carlson, B. A.; Kaur, G.; Sausville, E. A.; Worland, P. J. *Potent Inhibition of Cdc2 Kinase Activity by the Flavonoid L86-8275*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **1994**, 201(2), 589-595.
- [79] Czech, J.; Hoffman, D.; Naik, R.; Sedlacek, H. *Antitumoral Activity of Flavone L86-8275*. Int. J. Oncol. **1995**, 6, 31-36.
- [80] Bible, K. C.; Kaufmann, S. H. *Cytotoxic Synergy Between Flavopiridol (NSC 649890, L86-8275) and Various Antineoplastic Agents: the Importance of Sequence of Administration*. Cancer Res. **1997**, 57 (16), 3375-3380.
- [81] Ahn, Y. M.; Vogeti, L.; Liu, C. J.; Santhapuram, H. K.; White, J. M.; Vasandani, V.; Mitscher, L. A.; Lushington, G. H.; Hanson, P. R.; Powell, D. R.; Himes, R. H.; Roby, K. F.; Ye, Q.; Georg, G. I. *Design, Synthesis, and Antiproliferative and CDK2-Cyclin a Inhibitory Activity of Novel Flavopiridol Analogues*. Bioorg. Med. Chem. **2007**, 15(2), 702-713.
- [82] Vesely, J.; Havlicek, L.; Strnad, M.; Blow, J. J.; Donella-Deana, A.; Pinna, L.; Letham, D. S.; Kato, J. Y.; Detivaud, L.; LeClerc, S.; Meijer, L. *Inhibition of Cyclin Dependent Kinases by Purine Analogues*. Eur. J. Biochem. **1994**, 224(2), 771-786.
- [83] Raynaud, F. I.; Whittaker, S. R.; Fischer, P. M.; McClue, S.; Walton, M. I.; Barrie, S. E.; Garrett, M. D.; Rogers, P.; Clarke, S. J.; Kelland, L. R.; Valenti, M.; Brunton, L.; Eccles, S.; Lane, D. P.; Workman, P. *In vitro and in vivo Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationships for the Trisubstituted Aminopurine Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors Olomoucine, Bohemine and CYC202*. Clin. Cancer Res. **2005**, 11(13), 4875-4887.
- [84] Boutis, A.; Papazisis, K.; Pistevou-Gompaki, K.; Lambropoulos, A.; Sofroniadis, I.; Papageorgiou, A.; Destouni, E.; Kortsaris, A. *Cyclin-Dependent Kinase (CDK) Inhibitor Olomoucine Enhances Gamma-Irradiation-Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Raji Cells*. Anticancer Res. **2006**, 26(5A), 3493-3498.
- [85] Krystof, V.; Lenobel, R.; Havlicek, L.; Kuzma, M.; Strnad, M. *Synthesis and Biological Activity of Olomoucine II*. Bioorg. Med. Chem. Lett. **2002**, 12 (22), 3283-3286
- [86] Krystof, V.; McNae, I. W.; Walkinshaw, M. D.; Fischer, P. M.; Muller, P.; Vojtesek, B.; Orsag, M.; Havlicek, L.; Strnad, M. *Antiproliferative Activity of Olomoucine II, a Novel 2,6,9-Trisubstituted Purine*

- Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor*. Cell. Mol. Life Sci. **2005**, 62(15), 1763-1771.
- [87] Bach, S.; Knockaert, M.; Reinhardt, J.; Lozach, O.; Schmitt, S.; Baratte, B.; Koken, M.; Coburn, S. P.; Tang, L.; Jiang, T.; Liang, D. C.; Galons, H.; Dierick, J. F.; Pinna, L. A.; Meggio, F.; Totzke, F.; Schachtele, C.; Lerman, A. S.; Carnero, A.; Wan, Y.; Gray, N.; Meijer, L. *Roscovitine Targets, Protein Kinases and Pyridoxal Kinase*. J. Biol. Chem. **2005**, 280(35), 31208-31219.
- [88] Raynaud, F. I.; Whittaker, S. R.; Fischer, P. M.; McClue, S.; Walton, M. I.; Barrie, S. E.; Garrett, M. D.; Rogers, P.; Clarke, S. J.; Kelland, L. R.; Valenti, M.; Brunton, L.; Eccles, S.; Lane, D. P.; Workman, P. *In vitro and in vivo Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationships for the Trisubstituted Aminopurine Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors Olomucine, Bohemine and CYC202*. Clin. Cancer Res. **2005**, 11(13), 4875-4887.
- [89] Mapelli, M.; Massimiliano, L.; Crovace, C.; Seeliger, M. A.; Tsai, L. -H.; Meijer, L.; Musacchio, A. *Mechanism of CDK5/p25 Binding by CDK Inhibitors*. J. Med. Chem. **2005**, 48 (3), 671-679.
- [90] MacCallum, D. E.; Melville, J.; Frame, S.; Watt, K.; Anderson, S.; Gianella Borradori, A.; Lane, D. P.; Green, S. R. *Seliciclib (CYC202, R-Roscovitine) Induces Cell Death in Multiple Myeloma Cells by Inhibition of RNA Polymerase II-Dependent Transcription and Down-Regulation of Mcl-1*. Cancer Res. **2005**, 65(12), 5399-5407.
- [91] Coley, H. M.; Shotton, C. F.; Thomas, H. *Seliciclib (CYC202; RRoscovitine) in Combination with Cytotoxic Agents in Human Uterine Sarcoma Cell Lines*. Anticancer Res. **2007**, 27(1A), 273-278.
- [92] Bramson, H. N.; Corona, J.; Davis, S. T.; Dickerson, S. H.; Edelstein, M.; Frye, S. V.; Gampe, R. T. Jr.; Harris, P. A.; Hassell, A.; Holmes, W. D.; Hunter, R. N.; Lackey, K. E.; Lovejoy, B.; Luzzio, M. J.; Montana, V.; Rocque, W. J.; Rusnak, D.; Shewchuk, L.; Veal, J. M.; Walker, D. H.; Kuyper, L. F. *Oxindole-Based Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinase 2 (CDK2): Design, Synthesis, Enzymatic Activities, and X-ray Crystallographic Analysis*. J. Med. Chem. **2001**, 44(25), 4339-4358.
- [93] Lane, M. E.; Yu, B.; Rice, A.; Lipson, K. E.; Liang, C.; Sun, L.; Tang, C.; McMahon, G.; Pestell, R. G.; Wadler, S. *A Novel CDK2-Selective Inhibitor, SU9516, Induces Apoptosis in Colon Carcinoma cells*. Cancer Res. **2001**, 61(16), 6170-6177.
- [94] Gao, N.; Kramer, L.; Rahmani, M.; Dent, P.; Grant, S. *The Three-Substituted Indolinone Cyclin-Dependent Kinase 2 Inhibitor 3-[1-(3H-Imidazol-4-yl)-meth-(Z)-ylidene]-5-methoxy-1,3-dihydro-indol-2-one (SU9516) Kills Human Leukemia Cells via Down-Regulation of Mcl-1 Through a Transcriptional Mechanism*. Mol. Pharmacol. **2006**, 70(2), 645-655.
- [95] Zhu, G.; Conner, S. E.; Zhou, X.; Shih, C.; Li, T.; Anderson, B. D.; Brooks, H. B.; Campbell, R. M.; Considine, E.; Dempsey, J. A.; Faul, M. M.; Ogg, F. C.; Patel, B.; Schultz, R. M.; Spencer, C. D.; Teicher, B.; Watkins, S. A. *Synthesis, Structure-Activity Relationship, and Biological Studies of Indolocarbazoles as Potent Cyclin D1-CDK4 Inhibitor*. J. Med. Chem. **2003**, 46(11), 2027-2030.
- [96] Misra, R. N.; Rawlins, D. B.; Xiao, H.-Y.; Shan, W.; Bursuker, I.; Kellar, K. A.; Mulheron, J. G.; Sack, J. S.; Tokarski, J. S.; Kimball, D. S.; Webster, K. R. *1H-Pyrazolo[3,4-b]pyridine Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinases: Highly Potent 2,6-Difluorophenacyl Analogues*. Bioorg. Med. Chem. Lett. **2003**, 13(14), 2405-2408.
- [97] Misra, R. N.; Rawlins, D. B.; Xiao, H. -Y.; Shan, W.; Bursuker, I.; Kellar, K. A.; Mulheron, J. G.; Sack, J. S.; Tokarski, J. S.; Kimball, D. S.; Webster, K. R. *1H-Pyrazolo[3,4-b]pyridine Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinases*. Bioorg. Med. Chem. Lett. **2003**, 13(6), 1133-1136.
- [98] Byths, K. F.; Geh, C.; Forder, C. L.; Oakes, S. E.; Thomas, A. P. *The Cellular Phenotype of AZ703, a Novel Selective Imidazo[1,2-a]pyridine Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor*. Mol. Cancer Ther. **2006**, 5(3), 655-664.
- [99] Cai, D.; Byth, K. F.; Shapiro, G. I. *AZ703, an Imidazo[1,2-a]pyridine Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases 1 and 2, Induces E2F-1-Dependent Apoptosis Enhanced by Depletion of Cyclin-Dependent Kinase 9*. Cancer Res. **2006**, 66(1), 435-444.
- [100] Dweyer, M. P.; Guzi, T. J.; Paruch, K.; Doll, R. J.; Keertikar, K. M.; Girijavallabham, V. M. *Novel Pyrazolopyridines as Cyclin Dependent Kinase Inhibitors*. WO 2004/026872 A1, April 1, **2004**.
- [101] Xiao, Z.; Hao, Y.; Liu, B.; Qian, L. *Indirubin and Meisoindigo in the Treatment of Chronic Myelogenous Leukemia in China*. Leuk. Lymphoma **2002**, 43(9), 1763-1768.

- [102] Hoessel, R.; LeClerc, S.; Endicott, J. A.; Nobel, M. E.; Lawrie, A.; Tunnah, P.; Leost, M.; Damiens, E.; Marie, D.; Marko, D.; Niederberger, E.; Tang, W.; Eisenbrand, G.; Meijer, L. *Indirubin, the Active Constituent of a Chinese Antileukaemia Medicine, Inhibits Cyclin-Dependent Kinases*. *Nat. Cell Biol.* **1999**, 1(1), 60-67.
- [103] Marko, D.; Schatzle, S.; Friedel, A.; Genzlinger, A.; Zankl, H.; Meijer, L.; Eisenbrand, G. *Inhibition of Cyclin-Dependent Kinase 1 (CDK1) by Indirubin Derivatives in Human Tumour Cells*. *Br. J. Cancer* **2001**, 84(2), 283-289.
- [104] Cimino, G.; De Rosa, S.; De Stefano, S.; Mazzarella, L.; Puliti, R.; Sodano, G. *Isolation and X-ray Crystal Structure of a Novel Bromo Compound from Two Marine Sponges*. *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23(7), 767-768.
- [105] Schmitz, F. J.; Gunasekera, S. P.; Lakshmi, V.; Tillekeratne, L. M. V. *Marine Natural Products: Pyrrololactams from Several Sponges*. *J. Nat. Prod.* **1985**, 48(1), 47-53.
- [106] Meijer, L.; Thunnissen, A. -M. W. H.; White, A. W.; Garnier, M.; Nikolic, M.; Tsai, L. -H.; Walter, J.; Cleverley, K. E.; Salinas, P. C.; Wu, Y. -Z.; Biernat, J.; Mandelkow, E. -M.; Kim, S. -H.; Pettit, G. R. *Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases, GSK-3 $\beta$  and CKI by Hymenialdisine, a Marine Sponge*. *Chem. Biol.* **2000**, 7(1), 51-63.
- [107] Tasdemir, D.; Mallon, R.; Greenstein, M.; Feldberg, L. R.; Kim, S. C.; Collins, K.; Wojciechowicz, D.; Mangalindan, G. C.; Concepción, G. P.; Harper, M. K.; Ireland, C. M. *Aldisine alkaloids from the Philippine Sponge *Stylissa massa* are Potent Inhibitors of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase-1 (MEK-1)*. *J. Med. Chem.* **2002**, 45(2), 529-532
- [108] Wan, Y.; Hur, W.; Cho, C. Y.; Liu, Y.; Adrian, F. J.; Lozach, O.; Bach, S.; Mayer, T.; Fabbro, D.; Meijer, L.; Gray, N. S. *Synthesis and Target Identification of Hymenialdisine Analogs*. *Chem. Biol.* **2004**, 11(2), 247-259.
- [109] Kuo, G. H.; Deangelis, A.; Emanuel, S.; Wang, A.; Zhang, Y.; Connolly, P. J.; Chen, X.; Gruninger, R. H.; Rugg, C.; Fuentes-Pesquera, A.; Middleton, S. A.; Jolliffe, L.; Murray, W. V. *Synthesis and Identification of [1,3,5]Triazine-Pyridine Biheteroaryl as a Novel Series of Potent Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors*. *J. Med. Chem.* **2005**, 48(14), 4535-4546.
- [110] Toogood, P. L.; Harvey, P. J.; Repine, J. T.; Sheehan, D. J.; VanderWel, S. N.; Zhou, H.; Keller, P. R.; McNamara, D. J.; Sherry, D.; Zhu, T.; Brodfuehrer, J.; Choi, C.; Barvian, M. R.; Fry, D. W. *Discovery of a Potent and Selective Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinase 4/6*. *J. Med. Chem.* **2005**, 48(7), 2388-2406
- [111] Markwalder, J. A.; Arnone, M. R.; Benfield, P. A.; Boisclair, M.; Burton, C. R.; Chang, C. H.; Cox, S. S.; Czerniak, P. M.; Dean, C. L.; Doleniak, D.; Grafstrom, R.; Harrison, B. A.; Kaltenbach, R. F. III.; Nugiel, D.; Rosi, K. A.; Sherk, S. R.; Sisk, L. M.; Stouten, P.; Trainor, G. L.; Worland, P.; Seitz, S. P. *Synthesis and Biological Evaluation of 1-Aryl-4,5-dihydro-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-one Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinases*. *J. Med. Chem.* **2004**, 47(24), 5894-5911.
- [112] DePinto, W.; Chu, X. J.; Yin, X.; Smith, M.; Packman, K.; Goelzer, P.; Lovey, A.; Chen, Y.; Qian, H.; Hamid, R.; Xiang, Q.; Tovar, C.; Blain, R.; Nevins, T.; Higgins, B.; Luistro, L.; Kolinsky, K.; Felix, B.; Hussain, S.; Heimbrook, D. *In vitro and in vivo Activity of R547: a Potent and Selective Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Currently in Phase I Clinical Trials*. *Mol. Cancer Ther.* **2006**, 5(11), 2644-2658.
- [113] Pevarello, P.; Brasca, M. G.; Amichi, R.; Orsini, P.; Traquandi, G.; Corti, L.; Piutti, C.; Sansonna, P.; Villa, M.; Pierce, B. S.; Pulici, M.; Giordano, P.; Martina, K.; Fritzen, E. L.; Nugent, R. A.; Casale, E.; Cameron, A.; Ciomei, M.; Roletto, F.; Isacchi, A.; Fogliatto, G. P.; Pesenti, F.; Pastori, W.; Marsiglio, A.; Leach, K. L.; Clare, P. M.; Fiorentini, F.; Varasi, M.; Vulpetti, A. *3-Aminopyrazole Inhibitors of CDK2/cyclin A as Antitumor Agents. 1. Lead Finding*. *J. Med. Chem.* **2004**, 47(13), 3367-3380.
- [114] Pevarello, P.; Brasca, M. G.; Orsini, P.; Traquandi, G.; Longo, A.; Nesi, M.; Orzi, F.; Piutti, C.; Sansonna, P.; Varasi, M.; Cameron, A.; Vulpetti, A.; Roletto, F.; Alzani, R.; Ciomei, M.; Albanese, C.; Pastori, W.; Marsiglio, A.; Pesenti, E.; Fiorentini, F.; Bischoff, J. R.; Mercurio, C. *3-Aminopyrazole Inhibitors of CDK2/cyclin A as Antitumor Agents. 2. Lead Optimization*. *J. Med. Chem.* **2005**, 48(8), 2944-2956.
- [115] Nesi, M.; Borghi, D.; Brasca, M. G.; Fiorentini, F.; Pevarello, P. *A Practical Synthesis of the Major 3-Hydroxy-2-pyrrolidinone Metabolite of a Potent CDK2/cyclin A Inhibitor*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16(12), 3205-3208.

- [116] Misra, R. N.; Xiao H. Y.; Kim, K. S.; Lu, S.; Han W. C.; Barbosa, S. A.; Hunt, J. T.; Rawlins, D. B.; Shan, W.; Ahmed, S. Z.; Qian, L.; Chen, B. C.; Zhao, R.; Bednarz, M. S.; Kellar, K. A.; Mulheron, J. G.; Batorsky, R.; Roongta, U.; Kamath, A.; Marathe, P.; Ranadive, S. A.; Sack, J. S.; Tokarski, J. S.; Pavletich, N. P.; Lee, F. Y.; Webster, K. R.; Kimball, S. D. *N-(Cycloalkylamino)acyl-2-aminothiazole Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinase 2. N-[5-[[[5-(1,1-dimethylethyl)-2-oxazolyl]methyl]thio]-2-thiazolyl]-4-piperidinecarboxamide (BMS-387032), a Highly Efficacious and Selective Antitumor Agent*. *J. Med. Chem.* **2004**, 47(7), 1719-1728.
- [117] Pevarello P.; Amici, R.; Villa, M.; Salom, B.; Vulptti, A.; Varasi, M.; Brasca, M. G.; Traquandi, G.; Nesi, M. *Phenylacetamido-Thiazole Derivatives, Process for Their Preparation and Their Use as Antitumor Agents*. WO 03/008365, January 30, **2003**
- [118] Chong, W. K. M.; Duvadie, R. K. *Pyrazole-Thiazole Compounds, Pharmaceutical Compositions Containing them, and Methods of their Use for Inhibiting Cyclin-Dependent Kinases*. WO 02/12250, February 14, **2002**.
- [119] Supuran, C. T. *Indisulam: an Anticancer Sulfonamide in Clinical Development*. *Expert Opin. Investig. Drugs.* **2003**, 12(2), 283-287.
- [120] Fukuoka, K.; Usuda, J.; Iwamoto, Y.; Fukumoto, H.; Nakamura, T.; Yoneda, T.; Narita, N.; Saijo, N.; Nishio, K. *Mechanisms of Action of the Novel Sulfonamide Anticancer Agent E7070 on Cell Cycle Progression in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells*. *Invest. New Drugs* **2001**, 19(3), 219-227
- [121] Lin, R.; Connolly, P. J.; Huang, S.; Wetter, S. K.; Lu, Y.; Murray, W. V.; Emanuel, S. L.; Gruninger, R. H.; Fuentes-Pesquera, A. R.; Rugg, C. A.; Middleton, S. A.; Jolliffe, L. K. *1-Acyl-1H-[1,2,4] triazole-3,5-diamine Analogues as Novel and Potent Anticancer Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors: Synthesis and Evaluation of Biological Activities*. *J. Med. Chem.* **2005**, 48(13), 4208-4211.
- [122] Emanuel, S.; Rugg, C. A.; Gruninger, R. H.; Lin, R.; Fuentes-Pesquera, A.; Connolly, P. J.; Wetter, S. K.; Hollister, B.; Kruger, W. W.; Napier, C.; Jolliffe, L.; Middleton, S. A. *The in vitro and in vivo Effects of JNJ-7706621: a Dual Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases and Aurora Kinases*. *Cancer Res.* **2005**, 65(19), 9038-9046.
- [123] Seong, Y. S.; Min, C.; Li, L.; Yang, J. Y.; Kim, S. Y.; Cao, X.; Kim, K.; Yuspa, S. H.; Chung, H. H.; Lee, K. S. *Characterization of a Novel Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor, BMI-1026*. *Cancer Res.* **2003**, 63(21), 7384-7391.
- [124] McInnes C. *Progress in the evaluation of CDK inhibitors as antitumor agents*. *Drug Discov Today* **2008**; 13:875-81.
- [125] Cirillo D, Pentimalli F, Giordano A. *Peptides or small molecules? Different approaches to develop more effective CDK inhibitors*. *Curr Med Chem* **2011**; 18:2854-66.
- [126] Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. *CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond*. *Dev Cell* **2008**; 14(2): 159-69.