**Universidade de São Paulo**

**Instituto de Física de São Carlos**

**7600078 – Biologia Celular**

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 16 (2006) 1320–1323

“SAR and inhibitor complex structure determination of a novel class of potent and specific Aurora kinase inhibitors”

Nicola M. Heron,a, Malcolm Anderson,a David P. Blowers,a Jason Breed,a Jonathan M. Eden,a Stephen Green,a George B. Hill,a Trevor Johnson,a Frederic H. Jung,b Helen H. J. McMiken,a Andrew A. Mortlock,a Andrew D. Pannifer,a, Richard A. Pauptit,a Jennifer Pink,a Nicola J. Robertsa, Siân Rowsell

aAstraZeneca, Mereside, Alderley Park, Macclesfield, Cheshire SK10 4TG,UK

bAstraZeneca, Centre de Recherches, 51689 Reims Cedex 2, France

Monografia apresentada na disciplina 7600078 – Biologia Celular do Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo para conclusão do curso

Autores:

Xxxx

Yyyyy

Zzzzz

**Julho – 2020**

**ÍNDICE**

ABSTRACT........................................................................................................................................3

INTRODUÇÃO..................................................................................................................................4

RESULTADOS E DISCUSSÃO........................................................................................................5

Busca em coleções de compostos e relações entre a estrutura e a atividade (SAR)...............5

Melhoramento das características farmacocinéticas e SAR...................................................6

Ensaios de cristalização, difração de raio-X e análise das estruturas cristalográficas............9

CONCLUSÃO..................................................................................................................................16

REFERÊNCIAS................................................................................................................................18

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Padrão de ligações de hidrogênio do derivado 5-pirimidina e modelo de interação do derivado 2-pirimidina..........................................................................................................................7

Figura 2. Estrutura química dos inibidores solúveis da Aurora A......................................................9

Figura 3. Representação esquemática do método de difusão de vapor em gotas suspensas...........................................................................................................................................10

Figura 4.Interação entre o ligante composto 13 e o monômero simetricamente relacionado..........11

Figura 5. Estrutura geral da Aurora A e sítio de ligação do ATP ....................................................12

Figura 6. Fenda entre os domínios N- e C-terminal, sítio de ligação do anel adenina e do anel quinazolina e interações químicas entre o composto **13** e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da Aurora A.......................................................................................................................................13

Figura 7.Alinhamento seqüencial do domínio catalítico da Aurora A**,** Aurora B e cAPK..............14

Figura 8. Sobreposição estrutural dos Cα da alça de ativação da MAP quinase e conformações dos motivos DFG-*in* e DFG-*out* .............................................................................................................14

Figura 9. Sobreposição estrutural dos Cα dos complexos Aurora-ADPNP e Aurora-composto 13,bolsão hidrofóbico formado pelos resíduos Leu177, Leu207, Leu209 e Trp276 e flexibilidade da alça 271-277 no complexo Aurora-ADPNP.............................................................................................15

Figura 10. Superfície de Connolly do sítio de ligação do inibidor composto 13 edo sítio de ligação do análogo de ATP não hidrolisável ADPNP...................................................................................15

**Monografia para conclusão do curso 7600078 – Biologia Celular**

**Artigo:**

“SAR and inhibitor complex structure determination of a novel class of potent and specific Aurora kinase inhibitors”

*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 16 (2006) 1320–1323*

Nicola M. Heron, Malcolm Anderson, David P. Blowers, Jason Breed, Jonathan M. Eden, Stephen Green, George B. Hill, Trevor Johnson, Frederic H. Jung, Helen H. J. McMiken, Andrew A. Mortlock, Andrew D. Pannifer, Richard A. Pauptit, Jennifer Pink, Nicola J. Roberts, Siân Rowsell

**ABSTRACT**

A novel series of 5-aminopyrimidinyl quinazolines has been developed from anilino-quinazoline 1, which was identified in a high throughput screen for Aurora A. Introduction of the pyrimidine ring and optimisation of the substituents both on this ring and at the C7 position of the quinazoline led to the discovery of compounds that are highly specific Aurora kinase inhibitors. Cocrystallisation of one of these inhibitors with a fragment of Aurora A shows the importance of the benzamido group in achieving selectivity.

**1 - Introdução**

Proteínas quinases são enzimas que modificam quimicamente outras proteínas através da transferência de um grupo fosfato. Esta reação pode ter como conseqüência a alteração do estado funcional da proteína alvo através da modificação da atividade enzimática, variação da localização celular ou associação com outras proteínas. Mais de 30% de todas as proteínas conhecidas podem ser modificadas pelo processo de fosforilação.1

As proteínas quinases são conhecidas por regular a grande maioria das vias celulares, especialmente aquelas envolvidas na transdução de sinais. O genoma humano contém, aproximadamente, 500 genes para proteínas quinases, os quais representam aproximadamente 2% de todos os genes de eucariotos. 2

A família das proteínas quinase compreende duas grandes subfamílias: proteínas tirosina quinases e as proteínas serina – treonina quinases. Mais recentemente, histidina quinases, que fosforilam o nitrogênio do grupo imidazol, foram descobertas como enzimas que fazem parte das vias de biosinalização.2

Dentre os membros da subfamília de proteínas serina – treonina quinases, encontram-se as proteínas Aurora quinase.3 Os mamíferos expressam três tipos de Aurora quinase: A, B e C, cujas funções biológicas estão relacionadas à regulação da mitose. A expressão e atividade quinase das enzimas Aurora A e B são determinadas pelo ciclo celular, de forma que somente durante a mitose estas proteínas são expressas e apresentam atividade biológica.4

As proteínas Aurora quinase A, B e C são constituídas por 402, 344 e 309 resíduos de aminoácidos, respectivamente, e apresentam identidade seqüencial de 57% entre A e B, 75% entre B e C e 60% entre A e C.5

As proteínas Aurora A e B encontram-se em locais distintos no interior da célula durante a mitose. A determinação das funções celulares dessas enzimas ainda é objeto de pesquisa, mas acredita-se que a Aurora B tem como função a fosforilação da histona H3 durante a mitose, auxiliando no processo de condensação dos cromossomos, enquanto a Aurora A exerce diferentes funções durante a mitose, como a regulação da maturação dos centrossomos, segregação cromossômica e citocinese.4,6

A amplificação e super expressão do gene Aurora A foi identificada em diversas linhagens de células tumorais (mama, ovários, cólon, próstata, neuroblastoma e cervical). Evidências sugerem que a proteína Aurora A está relacionada à transformação oncogênica através da amplificação do centrossomo, ocasionando uma instabilidade cromossomal.6

Estes resultados levaram a formulação da hipótese de que a inibição da atividade quinase da Aurora A e B pudesse ser útil no tratamento do câncer.4

O desenvolvimento e a aprovação de moléculas inibidoras de quinases, como o **Imatinib** (Gleevec® - Novartis), **Gefitinib** (Iressa® - AstraZeneca) e **Erlotinib** (Tarceva® - Genentech/OSIP) ilustram o potencial terapêutico dessa classe de enzimas. Mais recentemente, um potente inibidor de Aurora A e B, **VX-680** (Vertex Pharmaceutical & Merck),7 mostrou-se capaz de suprimir o crescimento de tumores *in vivo* e atualmente este inibidor encontra-se na Fase I dos testes clínicos.

**2 - Resultados e Discussão**

**2.1 – Busca em coleções de compostos e relações entre a estrutura e a atividade (SAR)**

No presente trabalho, é reportado o planejamento de uma série altamente potente de inibidores de Aurora quinase, além disso, são descritos duas estruturas cristalográficas, sendo uma destas, referente a um inibidor em complexo com o domínio catalítico da Aurora A quinase.

Com o objetivo de se descobrir novas moléculas inibidoras de Aurora quinase, uma coleção de ~250.000 compostos da AstraZeneca foi testada para se avaliar a capacidade de inibição da enzima Aurora A quinase.8 Dentre os compostos testados, a anilino-quinazolina (composto **1**) foi identificada como sendo uma molécula bioativa (do inglês, *hit*), passando para os estágios seguintes do desenvolvimento.3 Esse composto apresentou excelentes níveis de inibição da Aurora A (IC50 = 393 nM) e também foi bastante efetivo no ensaio anti-proliferativo com células MCF7 (Tabela 1).

A primeira avaliação dos dados de relação estrutura-atividade (SAR) sugeriu que compostos que apresentavam um substituinte volumoso na posição *para* da anilina possuíam especificidade razoável para as Aurora quinases.

Os estudos de SAR ao redor do grupo quinazolina resultaram na descoberta do composto **2** (IC50 = 0,11 µM), onde o substituinte metoxila da posição C7 do anel quinazolina foi substituído por 3-(1-morfolino)propoxila, sendo este composto, aproximadamente, quatro vezes mais potente que o composto **1**. A avaliação da atividade inibitória do composto **2** contra a Aurora B demonstrou que este possui boa capacidade inibitória (IC50 = 0,13 µM), enquanto para outras proteínas quinase o composto **2** apresentou atividade moderada (MEK1 IC50 = 1,79 µM, Src IC50 = 1,03 µM, Lck IC50 = 0,88 µM) ou nenhuma atividade (IC50 >10 µM para CDK1, CDK2, CDK4, PLK1, CHK1, IKK1, IKK2 e FAK). Estes resultados sugerem que os derivados de quinazolina são inibidores potentes e seletivos para a Aurora quinase.

**Tabela 1.** Relação estrutura-atividade (SAR) *in vitro* dos compostos derivados de quinazolina a

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **1** | | | **2-4** | | |
| **Composto** | **X** | **Y** | **Aurora A IC50 (nM)** | **Células MCF7 IC50 (nM)** | **Log *D* b** |
| **1** |  |  | 393 | 1250 | 3,7 |
| **2** | C | C | 110 | 198 | 3,5 |
| **3** | C | N | 3 | 210 | 2,7 |
| **4** | N | C | 629 | - |  |

a com exceção do composto **4**, todos os valores de IC50 representam a média de pelo menos

duas curvas dose-resposta independentes; a variação é de ±15%.

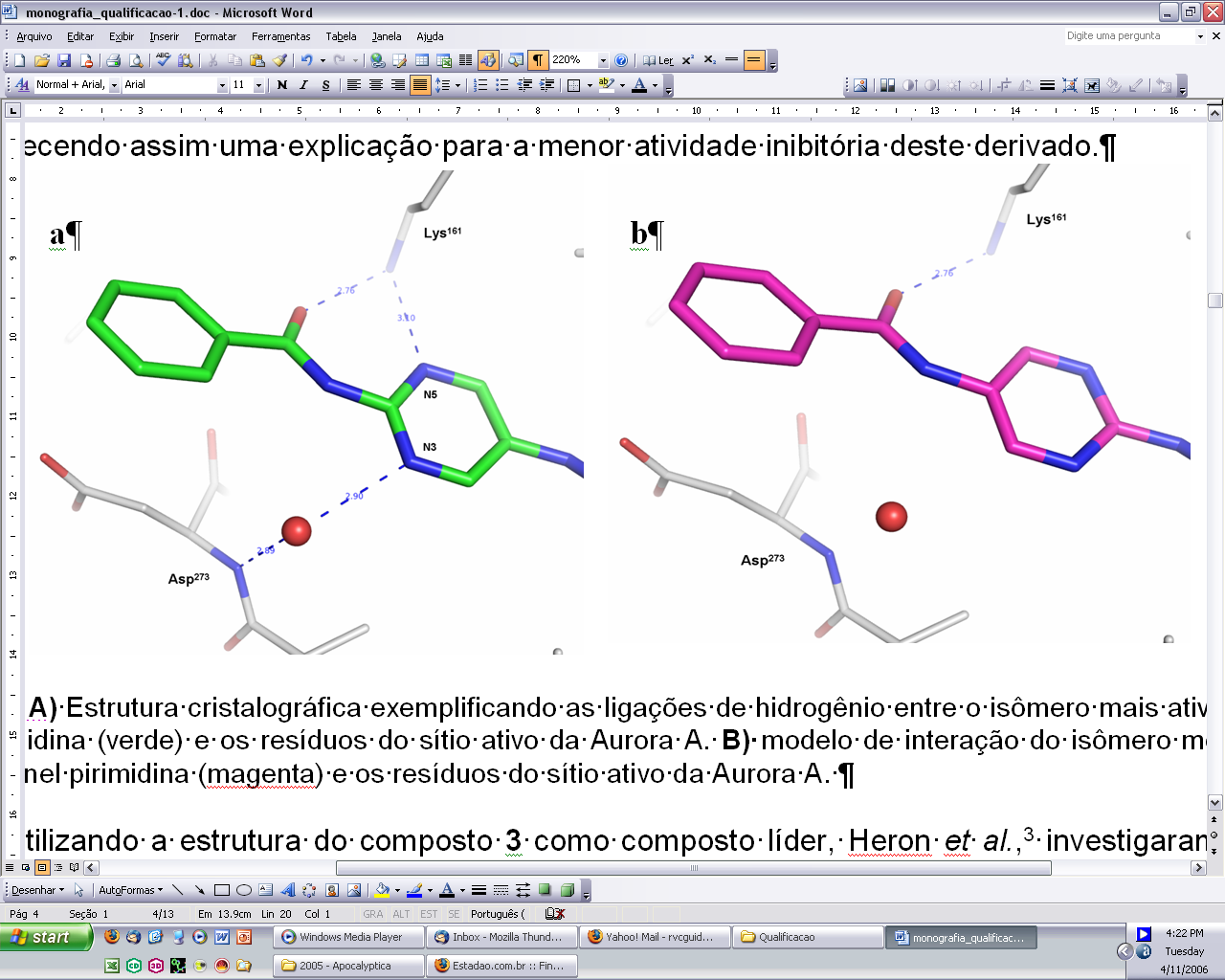
bMedido em pH 7,4

**2.2 – Melhoramento das características farmacocinéticas e SAR**

As características farmacocinéticas de um fármaco dependem principalmente de suas propriedades físico-químicas.9 Por exemplo, moléculas muito lipofílicas encontram-se principalmente nos tecidos adiposos, enquanto as muito hidrofílicas são facilmente excretadas pelos rins. Compostos aniônicos podem se ligar às proteínas plasmáticas enquanto os catiônicos podem se ligar aos ácidos nucléicos. Dessa maneira, moléculas que apresentam tais características não estarão em quantidade suficiente para interagir com seus respectivos alvos biológicos e produzir o efeito terapêutico necessário, logo apresentarão baixa biodisponibilidade.9 Baseado nisto, Heron *et al.*,3 observaram que o composto **2**, apesar de potente e seletivo, apresentava alta lipofilicidade, baixa solubilidade em água (2,5 µM) e alta ligação às proteínas plasmáticas (0,3% livre). Diante disso, Heron *et al*,3 procuraram diminuir o log *D* (coeficiente de partição octanol/solução tampão pH 7,4) através da substituição do grupo anilina por um grupo heterocíclico, como a pirimidina. Estratégia semelhante foi utilizada anteriormente para aumentar a solubilidade e polaridade do agente antifúngico **tioconazol** (Tralen® - Pfizer), administrado por via tópica. A introdução de um substituinte polar (OH) e a substituição dos anéis heterocíclicos (imidazol e tiofeno) por grupos heterocíclicos mais polares (dois anéis triazol), levou a obtenção do fármaco **fluconazol** (Zoltec® - Pfizer), administrado por via oral, que apresenta maior solubilidade e atividade contra as infecções sistêmicas.9

O derivado 5-pirimidina (composto **3**, Tabela 1) apresentou menor lipofilicidade (log *D* = 2,7) e aumento da fração livre no plasma (4,5% livre), apesar da solubilidade em solução aquosa continuar baixa. Além disso, a modificação estrutural que resultou no composto **3** aumentou a potência inibitória deste composto (IC50 = 3,0 nM, Tabela 1). O isômero estrutural 2-pirimidina (composto **4**) também foi sintetizado e teve sua capacidade inibitória da Aurora A avaliada. Entretanto, este composto mostrou-se aproximadamente 200 vezes menos ativo que o isômero 5-pirimidina.

Analisando-se o complexo cristalográfico entre o domínio catalítico da Aurora A e um derivado de quinazolínico (código PDB = 2C6E), podemos observar que o anel pirimidina presente na molécula do inibidor corresponde ao isômero mais potente. A análise das interações do anel 5-pirimidina do inibidor com os resíduos do sítio ativo sugere que este isômero é mais potente devido à capacidade de formar duas ligações de hidrogênio a mais que o isômero 2-pirimidina: i) entre o N3 do anel pirimidina com uma molécula de água, a qual está interagindo com o NH da cadeia principal do Asp273, ii) entre o N5 do anel pirimidina com o Nz da cadeia lateral da Lys161 (Figura 1A). De acordo com este modo de interação, o isômero 2-pirimidina presente no composto **4** não seria capaz de realizar tais interações com os resíduos presentes no sítio ativo da Aurora A (Figura 1B), oferecendo assim uma explicação para a menor atividade inibitória deste derivado.



**Figura 1. A)** Estrutura cristalográfica exemplificando as ligações de hidrogênio entre o isômero mais ativo 5-pirimidina (verde) e os resíduos do sítio ativo da Aurora A. **B)** modelo de interação do isômero menos ativo 2-pirimidina (magenta) e os resíduos do sítio ativo da Aurora A.

Utilizando a estrutura do composto **3** como composto líder (do inglês, *lead compound*), Heron *et al.*,3 investigaram os efeitos no padrão de substituição do anel fenila do gupo benzamida. Os resultados obtidos sugerem uma preferência por substituintes pequenos e lipofílicos, por exemplo, os análogos 3-cloro e 3-cloro, 4-flúor (compostos **5** e **6,** Tabela 2). Estes compostos apresentaram-se bastante potentes contra a Aurora A nos ensaios cinéticos, bem como, demonstraram aumento significativo na atividade inibitória avaliada no ensaio celular (80 e 20 nM, respectivamente). A introdução de substituintes maiores (compostos **7** e **8**) foi desfavorável para a potência desses compostos e a introdução do substituinte sulfonilamina (composto **9**) resultou numa diminuição de 1000 vezes na atividade quando comparada com o composto **3** (Tabela 2). A substituição do anel fenila por um substituinte heterocíclico (4-piridil, composto **10**) ou alquílico (*n*-butila, composto **11**) proporcionou moléculas com maior solubilidade em água, entretanto, a diminuição da potência, tanto nos ensaios enzimático como celular, mostrou que essas moléculas seriam inviáveis para os estágios posteriores do desenvolvimento.

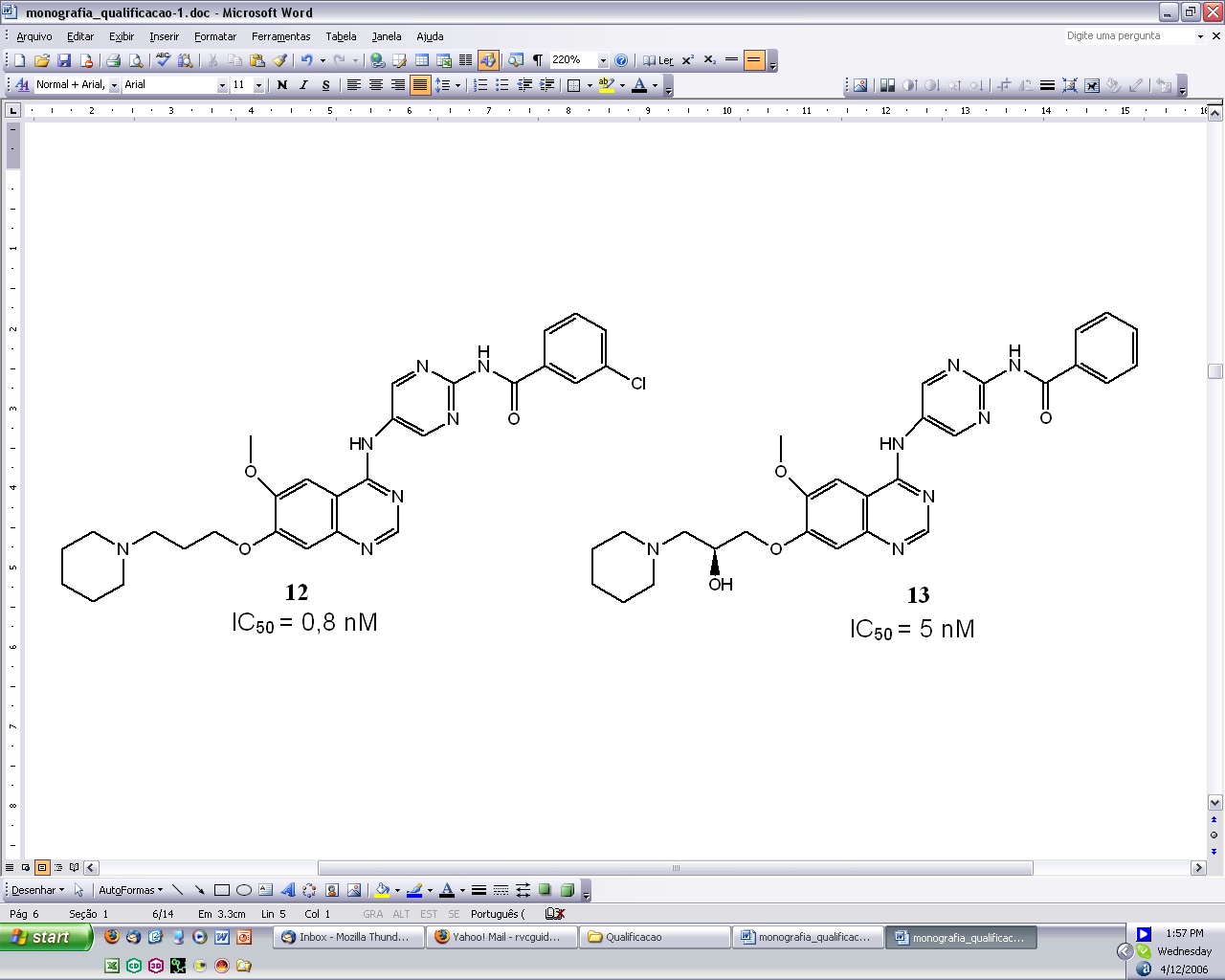
Apesar de benéfico para a potência, a introdução de halogênios no anel fenila resultou num aumento da lipofilicidade dessas moléculas, o que ocasionou uma redução na solubilidade em solução aquosa e uma maior ligação às proteínas plasmáticas desses compostos (1,4 µM e 0,4% livre, respectivamente para o composto **6**).

Estudos de modelagem molecular indicaram que o substituinte morfolina do C7 do anel quinazolina estaria posicionado numa região acessível ao solvente. O refinamento posterior do modelo sugeriu que haveria possibilidade para a introdução de substituintes nesta parte da molécula que pudessem aumentar a solubilidade do composto. Baseado neste modelo, a substituição do grupo morfolina por um grupo básico como a piperidina foi capaz de aumentar a solubilidade para 3.600 µM (composto **12**). Embora altere razoavelmente a potência inibitória dessa molécula contra a Aurora A no ensaio enzimático (IC50 = 0,8 nM) e no ensaio celular (IC50 = 24 nM) quando comparada aos demais análogos, essa modificação molecular ainda apresentou níveis bastante aceitáveis de potência tornando assim o composto **12** (Figura 2) um potencial candidato a fármaco contra o câncer. Diante desse resultado, Heron *et al.*3 ainda retiraram o substituinte cloro do anel fenila e adicionaram um grupo hidroxila na cadeia alifática entre o C7 do anel quinazolina e o grupo piperidina (composto **13,** Figura 2). Essas modificações estruturais fizeram com que o composto **13** apresentasse uma solubilidade razoável mantendo a potência no ensaio enzimático e celular (IC50 = 5 nM e 128 nM, respectivamente). 10

**Tabela 2.** Relação estrutura-atividade (SAR) *in vitro* do anel benzamidaa

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | | |
| **Composto** | **X** | **Aur A IC50 (nM)** |
| **5** | 3-clorofenila | <0,10 |
| **6** | 3-cloro-4-flúorfenila | 0,15 |
| **7** | 3-bromo-4-metilfenila | 70 |
| **8** | 4-etilfenila | 85 |
| **9** | (4-dipropilaminosulfonil)fenila | 3.900 |
| **10** | 4-piridil | 690 |
| **11** | *n*-butila | 17 |

a todos os valores de IC50 representam a média de pelo menos três resultados experimentais



**Figura 2.** Estrutura química dos inibidores solúveis da Aurora A.

**2.3 – Ensaios de cristalização, difração de raio-X e análise das estruturas cristalográficas**

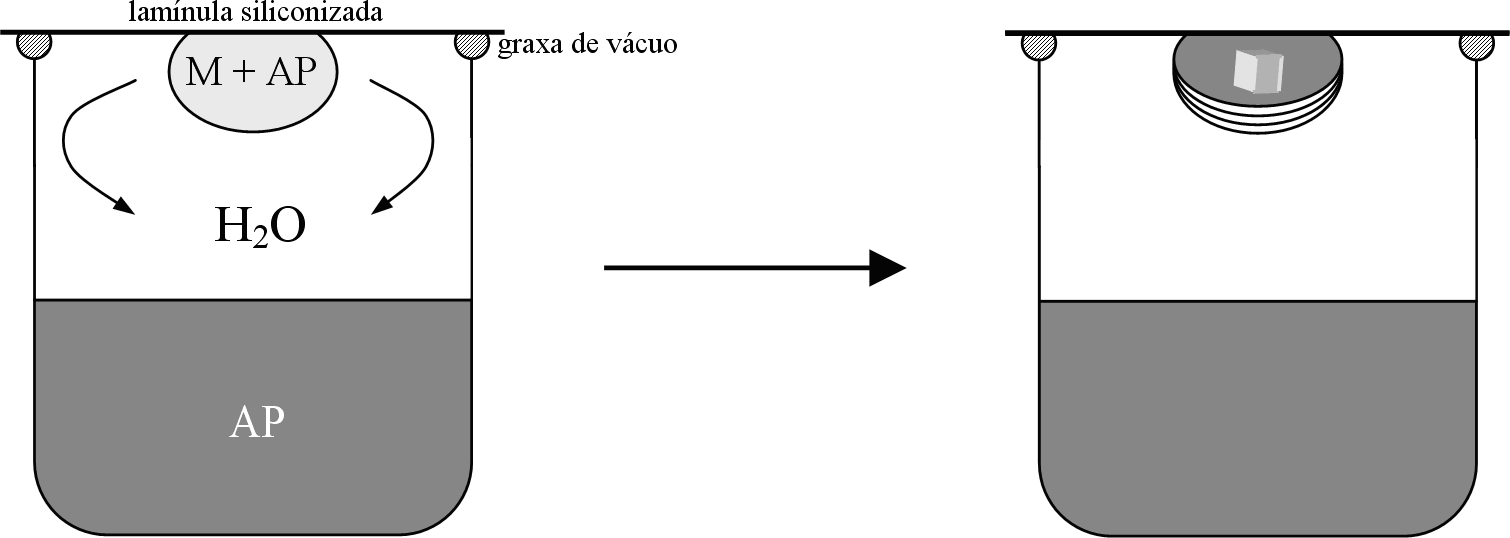
Com o objetivo de melhor compreender o modo de interação desses compostos com o sítio ativo da Aurora A, ensaios de co-cristalização foram realizados com o composto **13** e o domínio catalítico recombinante da Aurora A**.**3

O processo de formação de cristais ocorre a partir de uma solução supersaturada de proteína, sendo a velocidade com que se atinge esse estado supersaturado essencial para diferenciar a formação de cristais, microcristais ou precipitado amorfo. Devido ao fato da grande maioria das proteínas serem muito instáveis e rapidamente perderem sua estrutura nativa, os cristais de proteínas crescem geralmente em condições toleráveis de temperatura, força iônica e com pequenas faixas de variação de pH, próximas ao pH fisiológico.11

No presente trabalho,3 dois complexos cristalinos diferentes foram obtidos: i) **Aurora-ADPNP**: Aurora A em complexo com um análogo de ATP não hidrolisável (código PDB, 2C6D) e ii) **Aurora-composto** **13**: Aurora A em complexo com o composto **13** (código PDB, 2C6E).Para obtenção dos complexos, foi utilizado o domínio catalítico recombinante da Aurora quinase A com a mutação T287D, a qual mimetiza uma quinase fosforilada (ativada).3,12

Existem diversos métodos de cristalização de proteínas, os quais são utilizados de acordo com o tipo da amostra e com as condições do laboratório. O método de difusão de vapor é um processo de equilíbrio entre duas soluções através da fase de vapor em um meio fechado. A solução menos concentrada perde seu solvente volátil até que os potenciais químicos das duas soluções se igualem. Assim, uma solução contendo a proteína a ser cristalizada com solução tampão, agentes precipitantes e aditivos, é equilibrada contra um reservatório contendo uma solução do agente precipitante a uma concentração mais alta que a da gota (Figura 3).11

O método de difusão de vapor pode ser conduzido de duas maneiras principais: gota suspensa (*hanging drop*) ou gota assentada (*sitting drop*). O método empregado para a cristalização dos complexos **Aurora-ADPNP** e **Aurora-composto** **13** foi o da gota suspensa. Neste método a gota contendo a proteína de interesse é colocada sobre uma lamínula de vidro siliconizada e, posteriormente fixada com graxa na parte superior do poço, de forma que a gota fique interna ao reservatório (Figura 3).11



**Figura 3.** Representação esquemática do método de difusão de vapor em gotas suspensas usado na obtenção de cristais de proteínas. (M) macromolécula (AP) agente precipitante.

Nos experimentos de co-cristalização um dado inibidor ou ligante é adicionado à gota de cristalização contendo a solução de proteína e espera-se, portanto, que aquele se ligue a esta formando um complexo que possa cristalizar adequadamente.13Para a obtenção dos dois complexos cristalinos foi adicionado às respectivas gotas de cristalização, uma solução de 5 mM de cada um dos ligantes.3 A forma de se constatar se os cristais obtidos estavam na forma de complexo com algum dos ligantes foi através da resolução da estrutura tridimensional por difração de raio-X. Os dados cristalográficos de ambos os cristais foram coletados na linha PX9.6 do SRS (*Synchrotron Radiation Source)* de Daresbury, UK.

Os resultados do processamento dos dados cristalográficos e os parâmetros estatísticos do refinamento final das duas estruturas estão resumidos na Tabela 3

**Tabela 3.** Dados cristalográficos e estatísticas do refinamento.

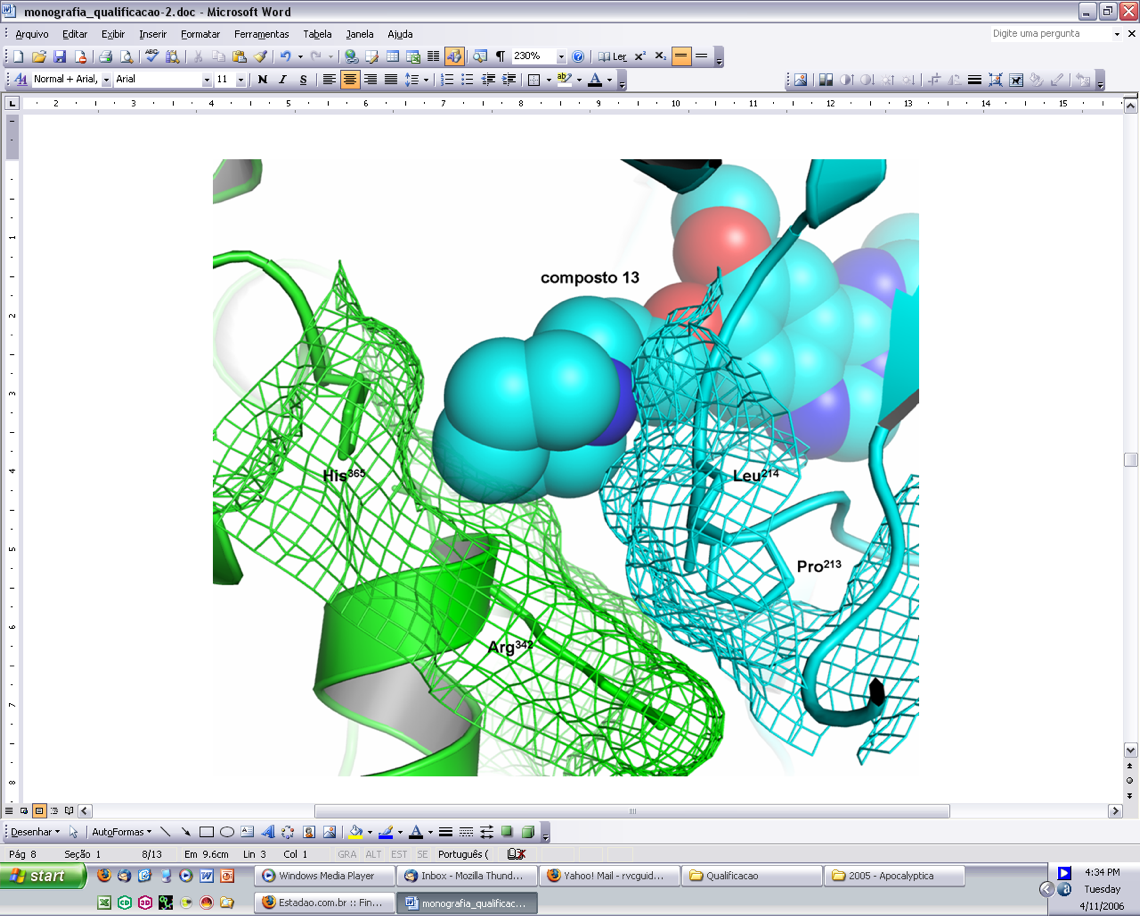
|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **Aurora-ADPNP** | **Aurora-composto 13** |
| Grupo espacial | P3221 | P21 |
| Cela unitária | 86,5; 86,5; 78,3 Å | 52,6; 88,4; 67,8 Å |
| Parâmetros | 90; 90; 120o | 90; 90,01; 90o |
| Reflexões totais coletadas | 62.278 | 36.664 |
| Número de reflexões únicas | 17.003 | 26.294 |
| Rsym (%)\* | 3,6 (32.6) | 6,6 (30,5) |
| Faixa de resolução (Å) | 38-2,2 (2,25-2,2) | 53-2,1 (2,25-2,2) |
| I/σI | 19,3 (3,0) | 7 (2,1) |
| Completeza (%) | 97,1 (83,2) | 72,5 (25,5) |
| Rfree , Rwork (%) | 23; 28 | 22; 27 |
| Desvio de rms nos ângulos de ligação (O) | 0,006 | 0,0019 |
| Desvio de rms nos comprimentos de ligação (Å) | 1,2 | 1,8 |

* números em parênteses são referentes aos dados obtidos na maior faixa de resolução

O método empregado para determinação das fases iniciais foi o de substituição molecular e a estrutura da PKA (AMP-cíclicoquinase) de camundongo (código PDB 1ATP),14 cuja identidade seqüencial com a Aurora A é de 31%, foi utilizada como modelo de busca para a o conjunto de dados **Aurora-ADPNP**. Devido a grande semelhança entre as estruturas dos complexos **ADPNP** e **composto 13** (rmsdCα = 1,25 Å) obtidos foi possível utilizar a estrutura **Aurora-ADPNP** para a resolução da estrutura **Aurora-composto 13**.

Analisando-se os dados apresentados na Tabela 3 podemos observar que os parâmetros estatísticos da coleta dos dois conjuntos de dados diferem razoavelmente. O cristal obtido referente ao complexo **Aurora-ADPNP** pertence ao grupo espacial P3221, enquanto o cristal referente ao complexo **Aurora-composto 13** pertence ao grupo espacial P21. Essa diferença no grupo espacial dos complexos obtidos pode ser devido a dois fatores: i) as soluções de cristalização nas quais os cristais foram obtidos diferem bastante, ou seja, o complexo **Aurora-ADPNP** foi obtido em uma solução que continha como agente precipitante uma solução 0,1M de citrato/fosfato de sódio em solução tampão 0,2M K2HPO4, 1,6M NaH2PO4, pH 3,8, enquanto o complexo **Aurora-composto 13** foi obtido em uma solução na qual havia 22% de PEG 4000 e 0,2M de sulfato de amônio como agentes precipitantes. Essas diferenças poderiam favorecer a cristalização da proteína em um determinado grupo espacial em relação a outros. ii) os diferentes ligantes fazem com que a proteína sofra alterações conformacionais as quais envolvem resíduos que participam dos contatos cristalinos, dessa maneira, novos contatos são estabelecidos favorecendo a cristalização num determinado grupo espacial.

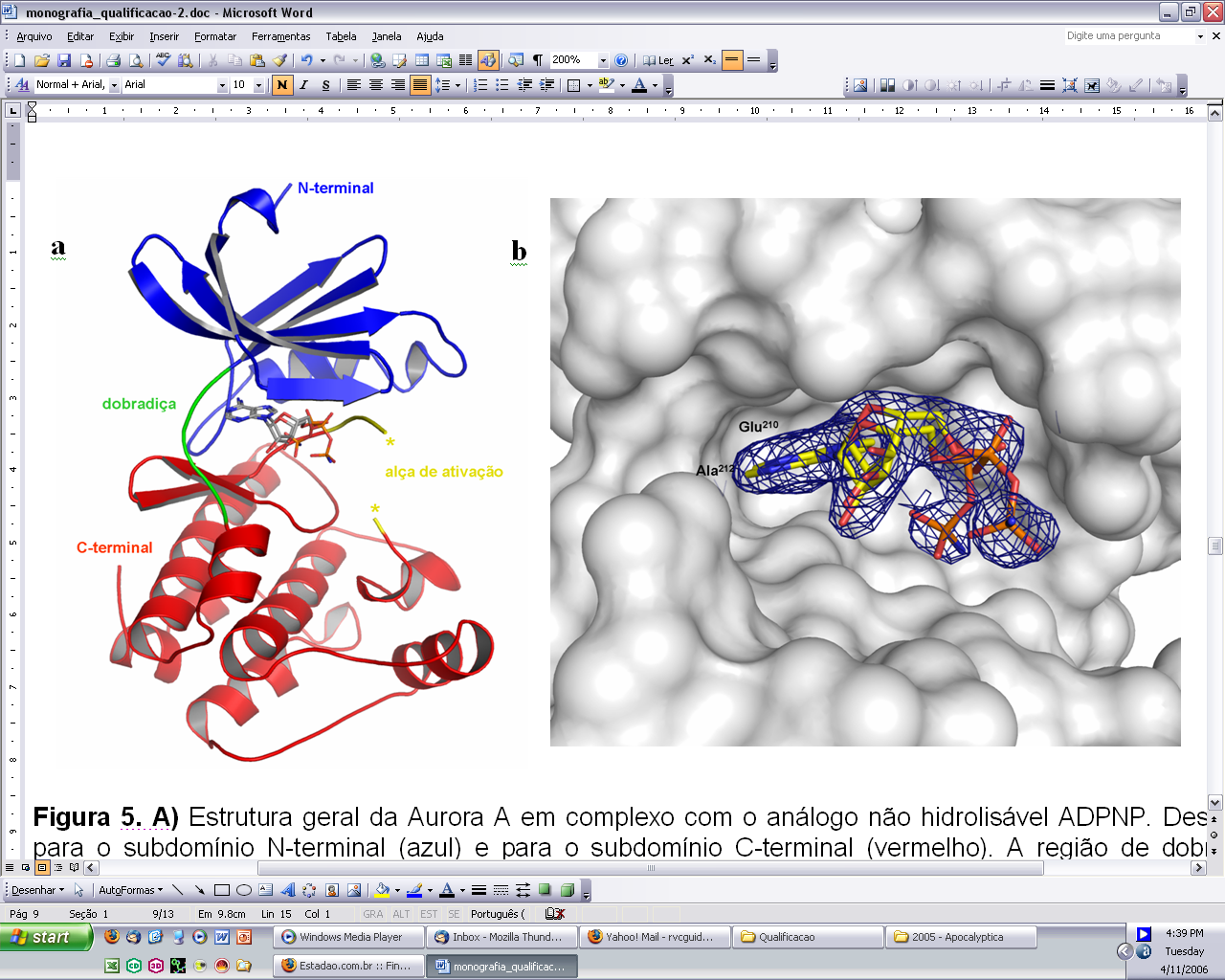
Um fato interessante, resultado do empacotamento cristalino do complexo **Aurora-composto 13**, é a formação de um contato cristalino entre o monômero simetricamente relacionado e o ligante “composto **13**”.O substituinte piperidina do composto **13** interage, através de interações de van der Waals, com as cadeias laterais dos resíduos His365e Arg342, pertencentes ao monômero simetricamente relacionado (Figura 4).



**Figura 4.** Interação entre o ligante “composto **13**” (representado em esferas) presente no sítio ativo da Aurora A (ciano) e os resíduos His365e Arg342 do monômero simetricamente relacionado (verde). A superfície (malha) representada corresponde à superfície de Connolly de cada um dos resíduos ilustrados. Além da interação entre o composto **13** e os resíduos His365e Arg342, há também contato cristalino (interação de van der Waals) entre as cadeias laterais dos resíduos Pro213 e Leu214 (ciano) com a cadeia lateral da Arg342 (verde).

O domínio catalítico da Aurora A apresenta um enovelamento com dois subdomínios globulares característico das proteínas quinase, com os sítios de ligação do ATP e do inibidor situados entre os subdomínios (Figura 5A).15 O domínio catalítico é constituído por um subdomínio N-terminal (resíduos 123-210) e um subdomínio C-terminal (resíduos 217-388). Esses subdomínios estão ligados entre si através de uma região de dobradiça (resíduos 211-216) que representa uma parte importante do sítio catalítico. Em ambas as estruturas cristalográficas obtidas a alça de ativação (resíduos 279-290) que contém a mutação T287D estão desordenadas (mapa descontínuo de densidade eletrônica), sugerindo que essa região apresenta certa mobilidade (Figura 5A). Esta desordem relacionada à alça de ativação também é observada em outras estruturas de Aurora quinase.6,12,16

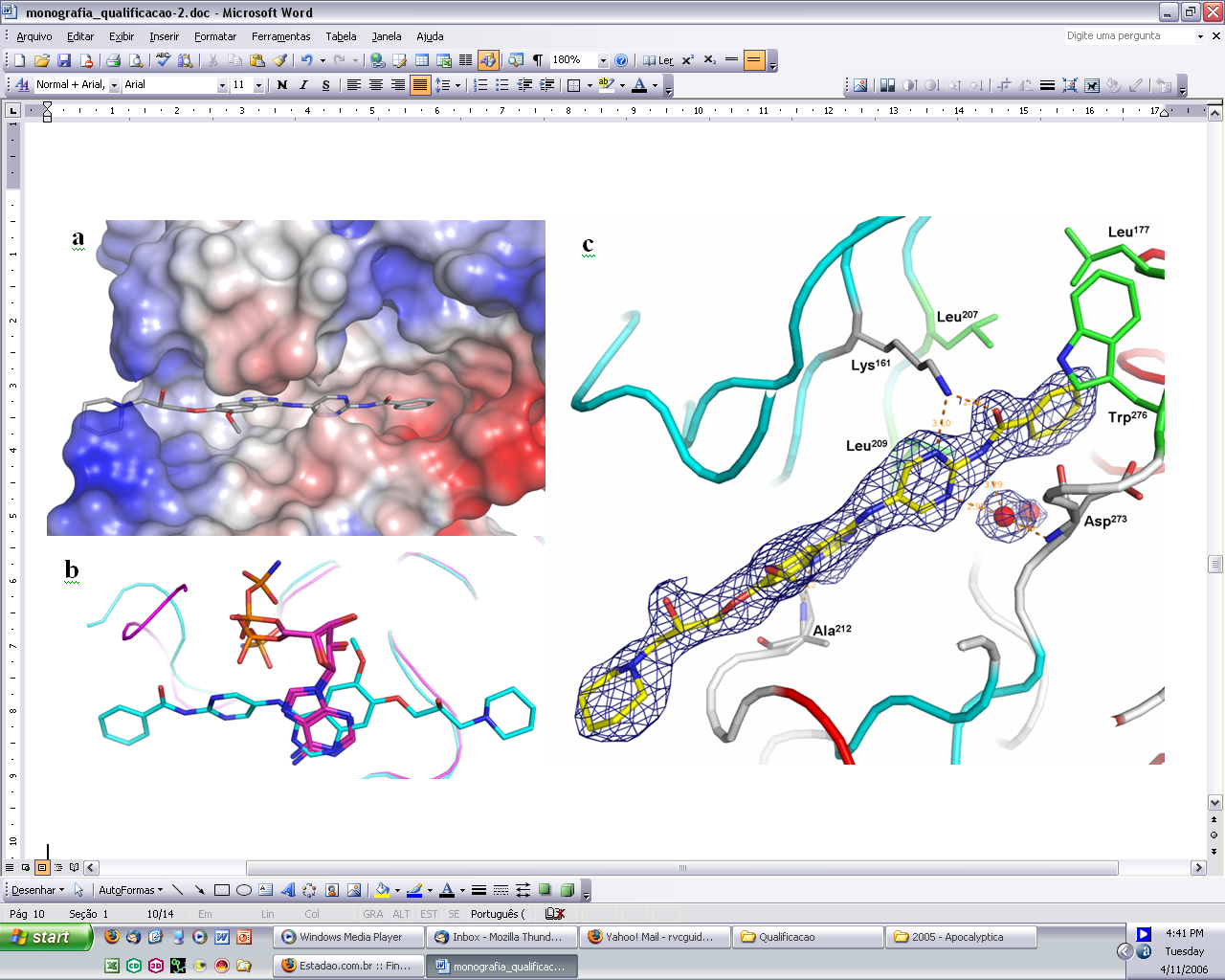
A molécula de **ADPNP** está modelada em duas conformações que diferem entre si principalmente na orientação dos grupos fosfatos (Figura 5B). Uma conformação corresponde àquela normalmente encontrada, a outra, Heron *et al.*3 não consideram de relevância biológica, pois acreditam ser devido à ausência de Mg2+ na condição de cristalização na qual o complexo foi obtido.



**Figura 5.** **A)** Estrutura geral da Aurora A em complexo com o análogo não hidrolisável **ADPNP**. Destaque para o subdomínio N-terminal (azul) e para o subdomínio C-terminal (vermelho). A região de dobradiça (verde) e a alça de ativação (amarelo) são características importantes no enovelamento das proteínas quinase para a interação com a adenosina. **B)** Superfície de Conolly do sítio de ligação do ATP e o mapa de densidade eletrônica 2*Fo-Fc*(1.0 σ) para o análogo **ADPNP** (colorido de acordo com o tipo de átomo) evidenciando a dupla conformação dos grupos fosfatos do ligante.

Apesar da mutação (T287D) para manter a proteína em sua conformação ativa, a estrutura resolvida apresenta conformação típica das quinases cataliticamente inativas. Os autores consideram que o baixo pH (3,8), no qual o complexo foi obtido, favoreceu a protonação do resíduo de ácido aspártico mutante, fazendo com que este não mais mimetizasse a treonina fosforilada encontrada na proteína selvagem ativa. Apesar de adotar a conformação inativa, a Aurora quinase A é capaz de interagir com o composto **13** e com o análogo de ATP sendo útil para o desenvolvimento baseado na estrutura do receptor.

O inibidor 4-aminopirimidinaquinazolina (composto **13**) apresenta uma conformação estendida, ocupando toda a extensão da fenda entre os dois subdomínios (sítio de ligação - Figura 6A). A extensão do sítio de ligação da Aurora A é maior que o sítio de ligação da PKA,14 possibilitando a interação entre a Aurora A e inibidores maiores em comprimento. Esta observação explicaria os resultados de SAR obtidos anteriormente, onde foi observado que substituintes grandes na posição *para* da anilina eram favoráveis para a potência e seletividade.

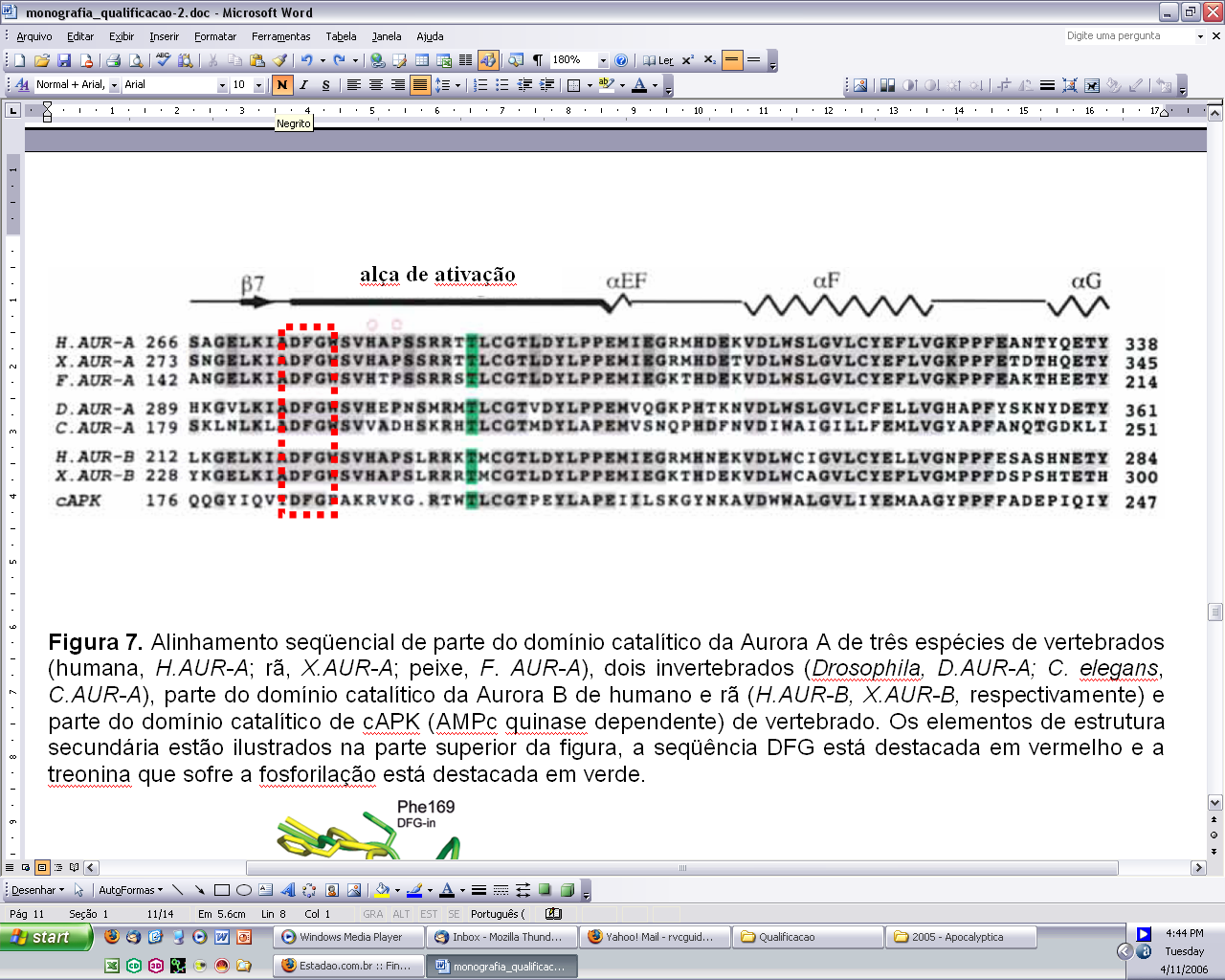


**Figura 6. A)** Superfície de Connolly mostrando a extensão da fenda entre os domínios N- e C-terminal, e o modo de interação estendido do composto **13**. **B)** Sobreposição estrutural dos Cα da **Aurora-ADPNP** e **Aurora-composto 13** ilustrando que o anel quinazolina do inibidor (ciano) interage no mesmo sítio de ligação do anel adenina do análogo de ATP (magenta) (rmsdCα = 1,25 Å). **C)** Interações químicas estabelecidas pelo composto **13** e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da Aurora A. A molécula do inibidor (colorida de acordo com o tipo de átomo) está apresentada dentro do mapa de densidade eletrônica 2*Fo-Fc*(1.0 σ). As cadeias laterais dos resíduos que formam o bolsão hidrofóbico estão coloridas em verde, as ligações de hidrogênio estão ilustradas em laranja e as moléculas de água em vermelho (esferas). A proteína esta apresentada em diagrama de tubos colorido de acordo com a estrutura secundária (vermelho = α-hélices; ciano = folhas β; alças = branco).

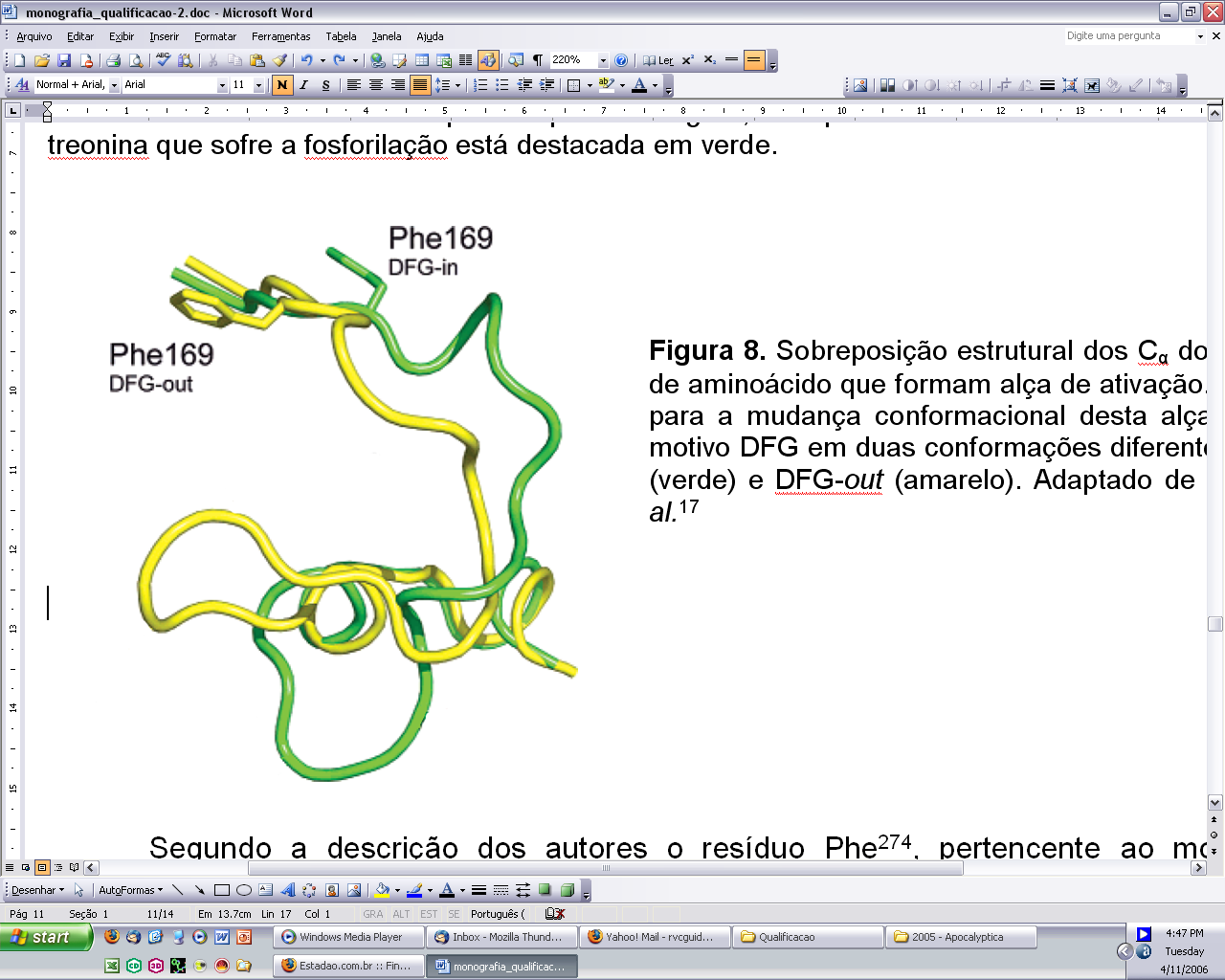
O anel quinazolina interage no mesmo sítio de interação do anel adenina do ATP (Figura 6B) formando uma ligação de hidrogênio, clássica dos inibidores de quinase, com o NH da cadeia principal da Ala212 (Figura 6C). O substituinte benzamida do anel pirimidina encontra-se num bolsão hidrofóbico formado pelos resíduos Leu177, Leu207, Leu209 e Trp276, enquanto o grupo piperidina estende-se para o solvente (Figura 6C). O Nz do resíduo conservado Lys161 forma duas ligações de hidrogênio com a molécula do inibidor: uma com N5 do anel pirimidina e outra com o oxigênio carbonílico da ligação amida, enquanto o N3 do anel pirimidina e o NH da cadeia principal do Asp273 interagem entre si através de ligação de hidrogênio mediada por duas moléculas de água (Figura 6C).

A interação do substituinte benzamida do composto **13** com o bolsão hidrofóbico presente no sítio de ligação desloca a cadeia lateral da Phe274, a qual faz parte de um motivo estrutural conservado conhecido como seqüência DFG localizada no início da alça de ativação (Figura 7).17 O deslocamento da cadeia lateral da Phe274 promove um rearranjo estrutural do motivo DFG de sua conformação conhecida como DFG-*in* para a conformação DFG-*out* (Figura 8).

A molécula do inibidor estabiliza a conformação DFG-*out*, a qual impede que a alça de ativação adote a conformação ativa. Esta observação poderia contribuir para o mecanismo de inibição deste composto.

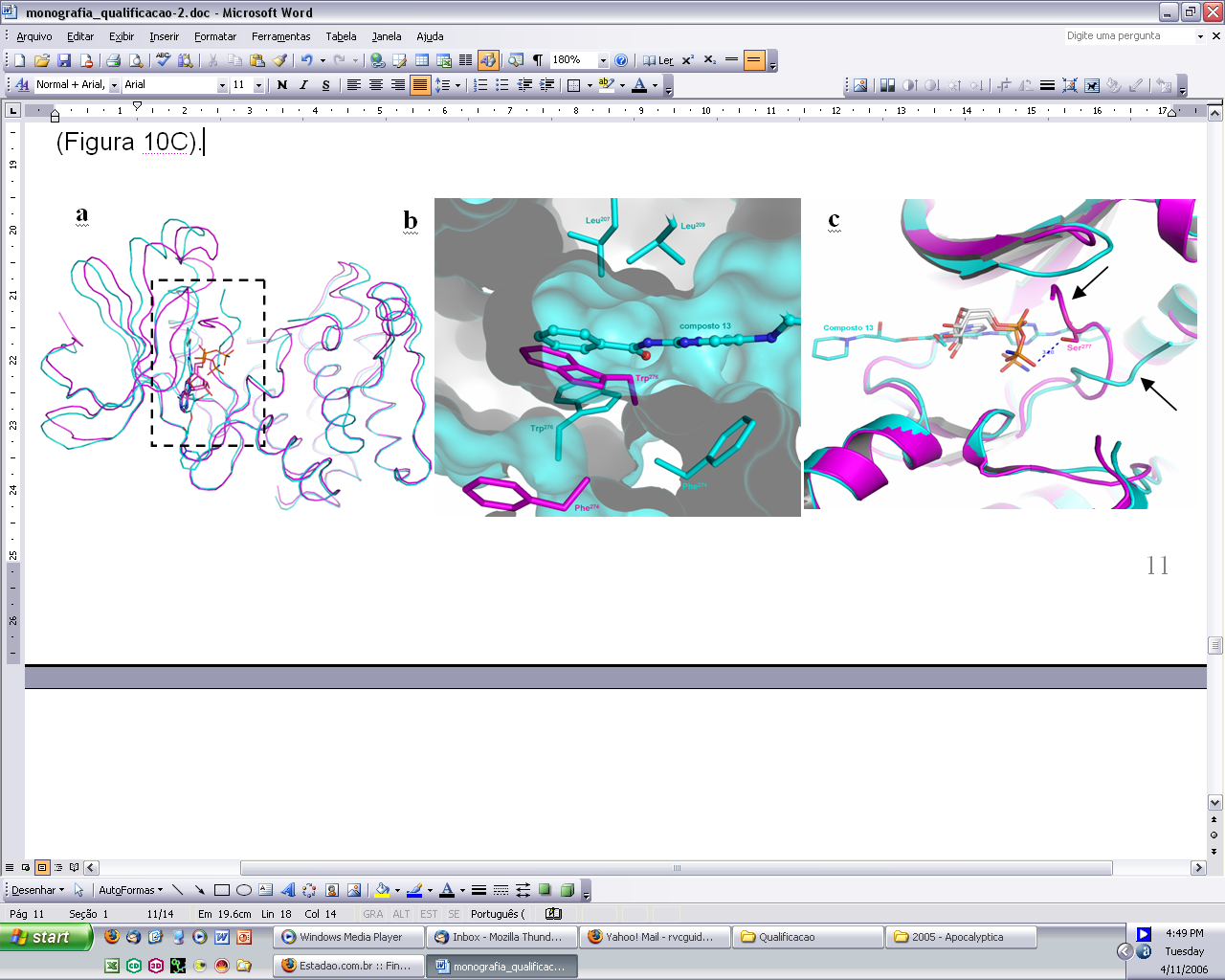


**Figura 7.** Alinhamento seqüencial de parte do domínio catalíticoda Aurora Ade três espécies de vertebrados (humana, *H.AUR-A*; rã, *X.AUR-A*; peixe, *F*. *AUR-A*), dois invertebrados (*Drosophila, D.AUR-A; C. elegans*, *C.AUR-A*), parte do domínio catalíticoda Aurora B de humano e rã (*H.AUR-B, X.AUR-B,* respectivamente) e parte do domínio catalíticode cAPK (AMPc quinase dependente) de vertebrado. Os elementos de estrutura secundária estão ilustrados na parte superior da figura, a seqüência DFG está destacada em vermelho e a treonina que sofre o processo fosforilação está destacada em verde.

****

**Figura 8.** Sobreposição estrutural dos Cα dos resíduos de aminoácido que formam alça de ativação da MAP quinase. Destaque para o rearranjo estrutural das alças e do motivo DFG apresentado em duas conformações diferentes: DFG-*in* (verde) e DFG-*out* (amarelo). Adaptado de Sullivan *et al.*17

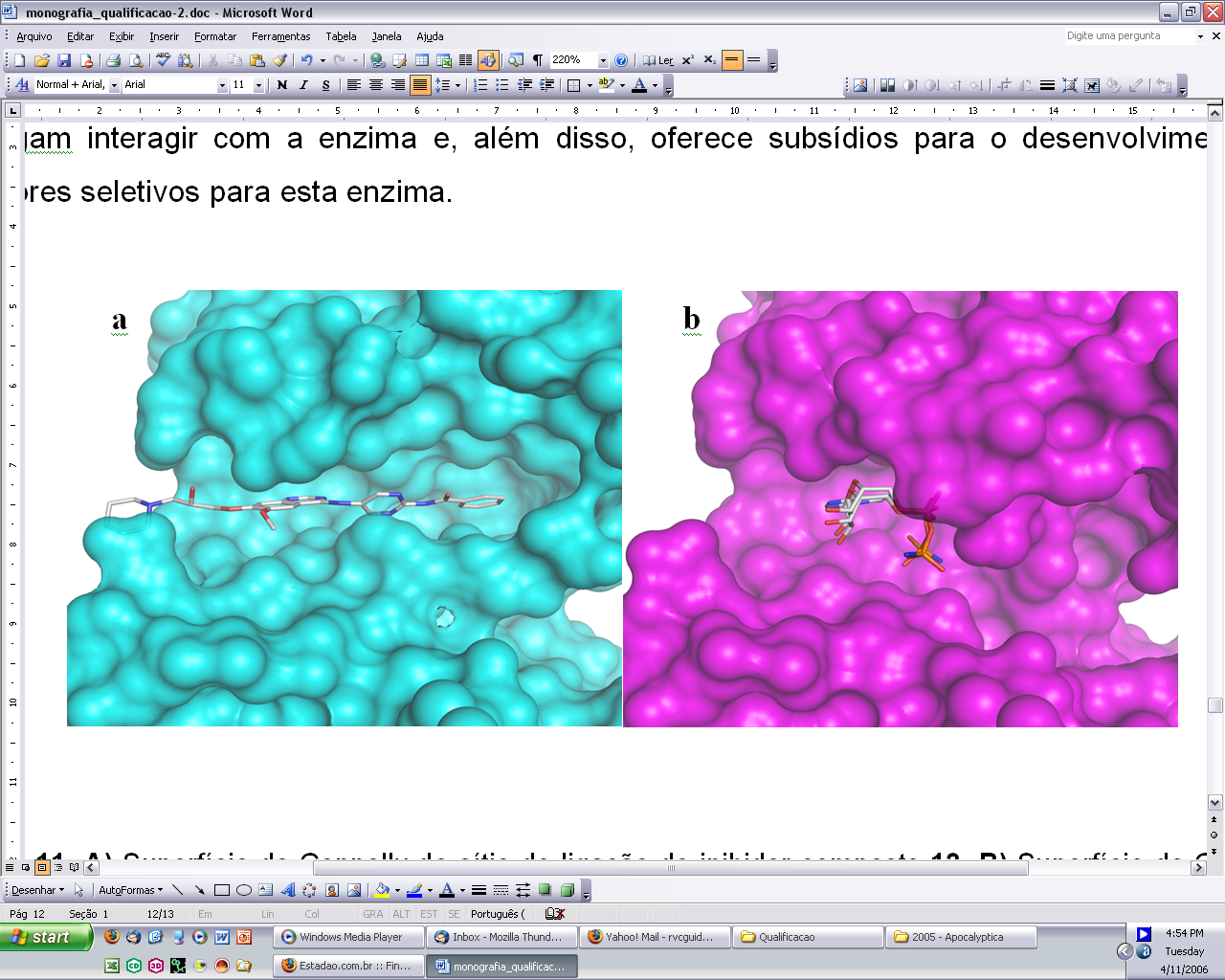
Segundo a descrição dos autores o resíduo Phe274, pertencente ao motivo estrutural conservado DFG, na estrutura **Aurora-ADPNP** ocuparia o mesmo bolsão hidrofóbico ocupado pelo substituinte benzamida do composto **13** no complexo **Aurora-composto 13**. Entretanto, uma análise detalhada da sobreposição dos Cα das estruturas cristalográficas (Figura 9A) revelou que o resíduo que ocupa bolsão hidrofóbico descrito é o resíduo Trp276 (Figura 9B).



**Figura 9. A)** Sobreposição estrutural dos Cα dos complexos **Aurora-ADPNP** (magenta) e **Aurora-composto 13** (ciano)**. B)** Detalhe para o bolsão hidrofóbico formado pelos resíduos Leu177, Leu207, Leu209 e Trp276 no complexo **Aurora-composto 13** (ciano)**.** Na estrutura **Aurora-ADPNP** o bolsão hidrofóbico é ocupado pela cadeia lateral do resíduo Trp276 (magenta). **C)** Detalhe para a flexibilidade da alça 271-277 (setas) e para a ligação de hidrogênio entre o oxigênio do grupo fosfato do ADPNP e a cadeia lateral da Ser277.

Devido à presença de um análogo de ATP na estrutura **Aurora-ADPNP**, a alça formada pelos resíduos 271-277 fecha-se sobre o sítio ativo e dessa maneira, a hidroxila da cadeia lateral da Ser277 forma ligação de hidrogênio com um dos oxigênios do grupo fosfatodo análogo **ADPNP** (Figura 10C).

A flexibilidade conformacional da alça 271-277 faz com que haja um aumento significativo do sítio de ligação da Aurora A, o que fica evidenciado pela diferença entre as áreas acessíveis ao solvente para os complexos **Aurora-ADPNP** (284 Å2) e **Aurora-composto 13** (462 Å2) (Figura 10A e 10B). Essa flexibilidade conformacional permite que ligantes grandes, como o composto **13,** consigaminteragir com a enzima e, além disso, oferece subsídios para o desenvolvimento de inibidores seletivos para esta enzima.



**Figura 10.** **A)** Superfície de Connolly do sítio de ligação do inibidor composto **13**. **B)** Superfície de Connolly do sítio de ligação do análogo de ATP não hidrolisável **ADPNP**.

**3 – Conclusões e Perspectivas**

Nesta monografia foi apresentado o planejamento e síntese de uma série de análogos de quinazolina biologicamente ativos contra a enzima Aurora quinase A.

Esta enzima é descrita como um potencial alvo para agentes anti-tumorais e recentemente, várias moléculas com capacidade de inibir sua atividade biológica foram descritas na literatura. Em busca rápida na base de dados *ISI Web of Knowledge*18 procurando pelas palavras chaves “*inhibitor* *and Aurora*” somente no título do artigo retornou 23 trabalhos publicados em periódicos atualmente, dentre eles, revistas científicas importantes como *Nature*, *PNAS*, *Cancer Research, Drug Discovery Today* e *Journal of Medicinal Chemistry*. Destes 23 artigos, 20 foram publicados entre março de 2004 e março de 2006.

O trabalho realizado pelos autores é de boa qualidade, pois mostra de uma maneira geral e resumida as etapas iniciais envolvidas no planejamento de um novo fármaco. Além disso, o que torna esse artigo bastante interessante é o fato dele ter sido realizado por uma equipe de pesquisadores provenientes de uma das maiores indústria farmacêutica mundial, a AstraZeneca. Quando uma indústria farmacêutica tornar público os resultados biológicos obtidos ilustra quais são as atuais estratégias empregadas e os interesses comerciais para a obtenção de um novo medicamento.

No decorrer do presente trabalhoHeron *et al.*3 planejaram e sintetizaram uma série de novos, potentes e seletivos derivados de quinazolina inibidores da Aurora quinase A. Os autores aumentaram significativamente a potência (~4000 vezes) e melhoraram as propriedades físico-químicas dessa classe de compostos obtendo no final do estudo uma molécula que foi solúvel em solução aquosa, potente e seletiva para a proteína Aurora quinase A. Além disso, resolveram as estruturas de dois complexos cristalográficos, um complexo entre um desses inibidores (composto **13**) e o domínio catalítico da Aurora A e outro complexo com um análogo não hidrolisável de ATP e o domínio catalítico da Aurora A.

Entretanto é necessário o levantamento de alguns pontos não discutidos pelos autores, como por exemplo, analisando-se do ponto de vista cristalográfico, o complexo **Aurora-composto 13** apresenta parâmetros estatísticos bastante ruins, ressaltando a baixa completeza (72,5%) e redundância (~1,4) dos dados, tanto que, esses valores foram omitidos da Tabela 3 presente no artigo. Esses valores significam que este não é um conjunto de dados completo e, além disso, os dados foram medidos somente uma vez, o que prejudica a certeza da medida.

Analisando-se as condições da coleta dos dados desse cristal, pode-se observar que este foi coletado a temperatura ambiente, fato que contribui para diminuir consideravelmente o tempo de meia-vida de um cristal exposto a radiação ionizante. A razão pela qual os pesquisadores optaram pela coleta de dados a temperatura ambiente é bastante curiosa, uma vez que , o outro complexo descrito (**Aurora-ADPNP**) foi coletado a temperatura criogênica. Provavelmente esta estratégia foi utilizada em virtude da instabilidade dos cristais quando expostos à soluções crio-protetoras ou ao processo de congelamento, o qual aumenta consideravelmente a mosaicidade dos cristais de proteínas.

Os autores descrevem muito bem os avanços obtidos no aumento da potência dos inibidores e a relação entre a estrutura e a atividade dos derivados de quinazolina, entretanto, para o composto **13** os autores não reportam o valor de IC50, limitando-se a reportar somente a solubilidade deste inibidor em solução aquosa. Esta omissão aguça a curiosidade uma vez que a hidroxila adicionada para aumentar a solubilidade introduziu um centro quiral na molécula do composto **13.**

De maneira geral, este é um trabalho interessante que ilustra os esforços e as dificuldades associadas ao processo de desenvolvimento de inibidores potentes e seletivos. Os resultados obtidos foram úteis para a compreensão das relações entre as estruturas e as atividades dessa classe de inibidores.

**4 - Referências Bibliográficas**

1. Nelson D.L., Cox M.M., **2000**, *Worth Publishers, 3o ed*., 282.

2. Scapin G. **2002,** *Drug Discov. Today,* *7*,601-11.

3. Heron N.M., Anderson M., Blowers D.P., Breed J., Eden J.M., Green S., Hill G.B., Johnson T., Jung F.H., McMiken H.H., Mortlock A.A., Pannifer A.D., Pauptit R.A., Pink J., Roberts N.J., Rowsell S., **2006,** *Bioorg. Med. Chem. Lett., 16*, 1320-3.

4. Jung F.H., Pasquet G., Lambert-van der Brempt C., Lohmann J.J., Warin N., Renaud F., Germain H., De Savi C., Roberts N., Johnson T., Dousson C., Hill G.B., Mortlock A.A., Heron N., Wilkinson R.W., Wedge S.R., Heaton S.P., Odedra R., Keen N.J., Green S., Brown E., Thompson K., Brightwell S. **2006**, *J. Med. Chem*. *49*, :955-70.

5. Keen N, Taylor S. **2004,** *Nat Rev Cancer*. *12*, 927-36.

6. Nowakowski J., Cronin C.N., McRee D.E., Knuth M.W., Nelson C.G., Pavletich N.P., Rogers J., Sang B.C., Scheibe D.N., Swanson R.V., Thompson D.A. **2002**, *Structure, 12*, 1659-67.

7. Harrington E.A., Bebbington D., Moore J., Rasmussen R.K., Ajose-Adeogun A.O., Nakayama T., Graham J.A., Demur C., Hercend T., Diu-Hercend A., Su M., Golec J.M., Miller K.M., **2004**,*Nat. Med*., *10,* :262-7.

8. Ditchfield C, Johnson VL, Tighe A, Ellston R, Haworth C, Johnson T, Mortlock A, Keen N, Taylor SS. **2003,** *J. Cell. Biol*. *161*, 267-80.

9. Patrick G.L. **2001,** *Oxford University Press*, 2o ed., 220 – 29.

10. Mortlock A.A., Keen N.J., Jung F.H., Heron N.M., Foote K.M., Wilkinson R.W., Green S. **2005,** *Curr. Top. Med. Chem., 5*, 807-21.

11.Drenth, J. **1995**, Principles of protein X-ray crystallography, 2.ed, Chernow Editorial Services, Inc.

12. Cheetham GM, Knegtel RM, Coll JT, Renwick SB, Swenson L, Weber P, Lippke JA, Austen DA. **2002,** *J. Biol. Chem., 277*,42419-22.

13. Ducruix A., Giege, R. **1992**, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins - A Practical Approach*,* *Oxford University Press.*, 331.

14. Zheng J.H., Trafny E.A., Knighton D.R., Xuong N.H., Taylor S.S., Teneyck L.F., Sowadski J.M. **1993**,*Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr* ., 49, 362-5.

15. Bossemeyer D., Engh R.A., Kinzel V., Ponstingl H., Huber R., **1993**,*EMBO J. 12*, 849-59.

16. Fancelli D., Berta D., Bindi S., Cameron A., Cappella P., Carpinelli P., Catana C., Forte B., Giordano P., Giorgini M.L., Mantegani S., Marsiglio A., Meroni M., Moll J., Pittala V., Roletto F., Severino D., Soncini C., Storici P., Tonani R., Varasi M., Vulpetti A., Vianello P. **2005,** *J. Med. Chem. 48*, 3080-4.

17. Sullivan J.E., Holdgate G.A., Campbell D., Timms D., Gerhardt S., Breed J., Breeze A.L., Bermingham A., Pauptit R.A., Norman R.A., Embrey K.J., Read J., VanScyoc W.S., Ward W.H. **2005**,*Biochemistry, 44,* 16475-90.

18. ISI Web of Knowledge, http://portal.isiknowledge.com/