

# **Proteína quinasas como dianas farmacológicas**

JOSÉ MIGUEL ORTIZ MELÓN

## **RESUMEN**

Las proteína quinasas junto a las proteína fosfatasa son enzimas que regulan el estado de fosforilación de proteínas intracelulares. Debido a su implicación en el desarrollo de enfermedades como el cáncer, la inflamación, y las enfermedades inmunológicas, han emergido recientemente, como dianas celulares en la terapia de estas enfermedades. En este capítulo se describen diferentes estrategias utilizadas para el desarrollo de inhibidores de proteína quinasas específicas, así como, las características de los principales compuestos que se aplican ya en la clínica, o se encuentran en fase de ensayos clínicos. Debido a la gran diversidad de proteína quinasas, esta revisión está centrada en receptores tirosina quinasas y en proteína quinasas de señalización que no han sido consideradas en otros capítulos.

## **SUMMARY**

Protein kinases together with protein phosphatases are regulatory enzymes of the activity of cellular proteins. In addition to its role in the regulation of signalling pathways several of them have emerged as targets for drug design, due to its role in the development of cancer, inflammation or immunological diseases. In this chapter I will describe different approaches that are currently applied to the development of specific protein kinase inhibitors. Also, I will provide an overview of protein kinase inhibitors that are currently in use or in clinical trials. Due to the great diversity of protein kinases I have focused on inhibitors of tyrosine kinase receptors and signalling protein kinases which are not being considered in other chapters.

## INTRODUCCIÓN

En la regulación de la actividad de las proteínas, las modificaciones post-traduccionales constituyen un proceso importante. Una de las principales modificaciones, es la fosforilación reversible de proteínas, que puede llegar a alcanzar a un 3% de todas las proteínas celulares, si bien, de una manera transitoria. El patrón de fosforilación de las proteínas de una célula, está determinado por la acción de proteína quinasas (que fosforilan otras proteínas), y de proteína fosfatasa, que catalizan el proceso inverso de defosforilación. El proyecto del genoma humano ha permitido la identificación de 520 proteína quinasas que constituyen lo que se denomina como el «kinoma» humano (1).

Las proteína quinasas se caracterizan porque unen covalentemente un grupo fosfato, a partir de un ATP donador, a residuos de serina, treonina y / o tirosina, de sus sustratos. La reacción de fosfotransferencia requiere la presencia de tres sitios específicos: un sitio de unión de ATP, un dominio que cataliza la transferencia de un grupo fosfato del ATP, y un sitio para la unión del sustrato (2). De las 520 proteína quinasas identificadas, 90 son tirosina quinasas, 43 son tirosina quinasas «like» y el resto, son serina/treonina quinasas (3). Las tirosina quinasas se dividen generalmente en dos grupos: tirosina quinasas que funcionan como receptores (RTKs) y tirosina quinasas no-receptores (no-RTKs). Las primeras, son proteínas transmembrana que contienen un dominio extracelular por el que se unen a diferentes ligandos, y un dominio intracelular, con actividad tirosina quinasa (4). Las tirosina quinasas que no son receptores de membrana, son proteínas intracelulares que funcionan por debajo de las RTK en rutas de transducción de señal. La actividad tirosina quinasa de RTKs, se activa, por la unión de un ligando y subsiguiente dimerización del receptor. Como consecuencia, el dominio catalítico intracelular del receptor activado se autofosforila en residuos de tirosina. Estos residuos de tirosina, forman sitios de unión para proteínas que contienen dominios SH2, y las proteínas implicadas, transmiten la señal hacia el interior celular, a través de tirosina quinasas no receptoras, o de serina/treonina proteína quinasas (5). La cascada de sucesos de fosforilación resulta en amplificación y transmisión intracelular de la señal.

Las proteína quinasas poseen una amplia variedad de sustratos, tales como, proteínas estructurales, enzimas metabólicos, reguladores del ciclo celular, factores de transcripción, etc. Por ello, las rutas de transducción de señal juegan un papel crucial en la regulación de procesos celulares fundamentales como el metabolismo, la proliferación celular, la diferenciación celular, la supervivencia, la migración o la angiogénesis. El estado de actividad de las proteína

quinasas de señalización, determina el estado de la célula, y la perturbación de la actividad de estas proteína quinasas resulta en una transmisión de señal anormal (6).

Una perturbación de las vías de transducción de señal, produce una desregulación de procesos como angiogénesis, apoptosis, migración celular, control del ciclo celular etc. y puede conducir al desarrollo de fenotipos malignos (7). De este modo, las proteína quinasas son reguladores clave de todos los aspectos de neoplasias, haciendo que la biología del cáncer y de otras enfermedades, se caracterize por una situación molecular de transmisión de señal y actividad proteína quinasa, aberrante (8).

La desregulación de la actividad proteína quinasa, puede tener lugar por diversos mecanismos. Uno de ellos, es una reordenación genética que genere una proteína híbrida, que contenga, el dominio catalítico de la proteína quinasa unido a otra proteína, como es el caso de la fusión de la tirosina quinasa c-Abl a la región «breakpoint cluster» (BCR) en la leucemia mieloide crónica (CML) (9). Un segundo mecanismo, que produce la disrupción de la función normal, es una mutación que hace a una quinasa constitutivamente activa, como es el caso del oncogen c-Kit en tumores gastrointestinales. Un tercer mecanismo, implica la expresión aumentada o aberrante de la proteína quinasa o del ligando para la RTK, como por ejemplo, la amplificación de la RTK, HER-2 (= ErbB2=EGFR2) en el cáncer de mama, o la expresión aberrante del factor de crecimiento vascular (VEGF) y su receptor (VEGFR), que aumentan la angiogénesis y el crecimiento tumoral. Finalmente, la desregulación de la actividad quinasa por activación de oncogenes o pérdida de genes supresores, puede contribuir también a la tumorigénesis. Por ejemplo, la mutación de la GTPasa Ras, que conduce a desregulación de Raf, en tanto, que la pérdida de función de la proteína fosfatasa PTEN activa la serina/treonina quinasa AKT (10)(11).

Las estrategias convencionales en el tratamiento del cáncer se basan en una combinación de cirugía, radioterapia y quimioterapia. Sin embargo, dado que la base molecular que subyace en muchos tipos de cáncer es una disfunción de proteína quinasas, estos enzimas constituyen dianas moleculares del mayor interés para el diseño de inhibidores específicos, (12). En este capítulo revisaremos algunas estrategias terapéuticas utilizadas en el diseño de inhibidores específicos de proteína quinasas de vías de transducción de señal implicadas en diferentes tipos de cáncer y de enfermedades inmunológicas. Asimismo repasaremos el estado de algunos inhibidores de proteína quinasas que han entrado recientemente en la clínica, o que se encuentran en fase avanzada de ensayos clínicos.

## INHIBIDORES DE PROTEÍNA QUINASAS Y ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS

Para llevar a cabo su función, cualquier proteína quinasa debe ser capaz de unir la proteína sustrato y el ATP, antes de que la actividad catalítica pueda transferir el grupo fosfato. De acuerdo con ello, la base de un diseño racional de inhibidores consiste en prevenir la unión de ATP, o del sustrato, o de ambos, de modo que quede bloqueada la función de la proteína quinasa. Aunque la estructura 3D se conoce solamente para menos del 10% de las proteína quinasas humanas, la información de la estructura de este reducido grupo de proteínas, facilita la predicción y comparación de los sitios de unión a ATP de moléculas relacionadas con los sustratos (12). Hay que señalar, que el desarrollo de inhibidores de proteína quinasas como agentes terapéuticos, estuvo durante algún tiempo ralentizada, por la creencia, de que las proteína quinasas no podrían llegar a ser nunca dianas celulares de gran valor. La razón de ello, es la elevada concentración intracelular de ATP (2-10 mM). En un principio, se consideró que esta elevada concentración representaba un obstáculo infranqueable, ya que competiría con los posibles inhibidores, haciendo poco menos que imposible, la inhibición. Por otra parte, el hecho de que todas las proteína quinasas deriven de un ancestro común (1), hace que todas tengan un mecanismo catalítico común, por lo que se consideró improbable el desarrollo de inhibidores específicos, ya que el bloqueo de la actividad de una determinada quinasa, seguramente inhibiría simultáneamente, procesos fisiológicos no relacionados, lo que podría traer consigo graves efectos secundarios (13).

Al objeto de encontrar compuestos que ejercen su efecto inhibitor sobre proteína quinasas, el procedimiento mas extendido, es rastrear grandes colecciones de sustancias químicas, compuestas por cientos de miles de sustancias naturales, o sintéticas. La composición de una librería de estos compuestos, suele estar basada, en la estructura del bolsillo de unión a ATP de una proteína quinasa o de un miembro de la familia (librería basada en la estructura), o bien, en la estructura de compuestos conocidos, que se unen al bolsillo de ATP de la quinasa (librería basada en el ligando). De este modo, se han identificado compuestos que mimetizan a la molécula de ATP. A veces, en una fase posterior, se modifican para competir con la unión de ATP, inhibiendo así, la actividad quinasa de la proteína. El grado de conservación de los sitios de unión de ATP en las diferentes proteína quinasas no es absoluto, y es posible por tanto, desarrollar sustancias con elevada selectividad. Además de elevada selectividad, los inhibidores de proteína quinasas deben ser capaces de unirse con una gran afinidad. Idealmente, esta debe ser de va-

rios ordenes de magnitud mayor que la afinidad de la quinasa por ATP porque el inhibidor, solo estará presente en la célula en concentraciones de rango micromolar-nanomolar (14).

Recientemente, se ha desarrollado una nueva estrategia que emplea lo que se denomina «filtros de selectividad» para aumentar la especificidad del inhibidor. Este método, utiliza como diana dos determinantes del bolsillo de unión de ATP. Por un lado, un residuo denominado «gatekeeper» que es un residuo conservado, situado en la vecindad del bolsillo hidrofóbico variable, que constituye el sitio de unión a ATP. El otro, suele ser un residuo cisteína dentro del centro activo. De 491 proteína quinasas comparadas solo 19 tienen el residuo de cisteína en el lazo conservado de glicina, una región que forma contactos con el ATP unido. Así pues, combinando ambos objetivos en un inhibidor, esto es, la ocupación del bolsillo hidrofóbico y que alquile el residuo cisteína, se ha llegado a diseñar sustancias, que inhiben selectivamente quinasas muy relacionadas. Este tipo de inhibidores, presentan la ventaja de reducir el riesgo de la generación de mutaciones de resistencia, ya que sería necesario, la aparición de dos mutaciones para producir la resistencia (15) (16).

## ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA PROTEÍNA QUINASAS

Se han desarrollado anticuerpos monoclonales contra proteína quinasas, o en el caso de RTKs, contra el ligando, que pueden ser empleados para interrumpir la transmisión de señal a nivel de receptor. Sin embargo, la complejidad de la molécula de inmunoglobulina, su origen murino y la selección de estructuras apropiadas en el antígeno, han sido obstáculos importantes que han retrasado el desarrollo de esta estrategia. Una desarrollo importante, ha sido la sustitución en el gen murino, de la mayoría de sus secuencias, por las correspondientes del gen humano, un proceso que se llama «humanización», que ha permitido convertir a los anticuerpos monoclonales en instrumentos valiosos en la terapia (17). Otra clase de anticuerpos monoclonales son anticuerpos de especificidad dual, que unen una RTK a la célula inmunológica efectora. Con todo, la mayor desventaja de los anticuerpos monoclonales es su coste de producción, que conduce inevitablemente a una medicación costosa. Para obviar este problema, una perspectiva interesante, es la producción de «nanocuerpos» que son fragmentos de anticuerpo que conservan íntegramente, la capacidad de unión al antígeno, lo que disminuye considerablemente los costes de producción y aumentan la especificidad.

## **INTERFERENCIA DE RNA Y RNA ANTISENTIDO**

Una estrategia diferente, es el uso de RNA antisentido (RNA-as) o interferencia de RNA (RNAi o siRNA) para impedir la traducción de proteínas implicadas en el cáncer. La ventaja de las moléculas de siRNA es su elevada especificidad, ya que pueden ser diseñadas específicamente, para neutralizar transcritos de mRNA específicos, que están presentes sólo en células cancerosas. Esto evita, los efectos secundarios indeseables en células sanas, ya que el siRNA así diseñado, no afectaría a la expresión del gen sano (17).

Varios problemas pueden afectar a los fármacos basados en interferencia de DNA. Así, a veces, se forman estructuras secundarias, cuando se emplean RNAs largos, que pueden impedir también la unión a la secuencia diana. Otro problema que puede presentarse, es cuando el siRNA se dirige contra una región del mRNA diana, que no incluye la mutación sino otra región. Aunque inicialmente se pensó, que la especificidad de sustrato de los siRNAs era muy grande, estudios recientes, han indicado que el siRNA puede tolerar algunas mutaciones. Como las proteína quinasas muchas veces contienen mutaciones puntuales, puede resultar difícil diseñar siRNAs que reduzcan específicamente la expresión de la proteína quinasa mutada en las células tumorales, y no afectan a los transcritos de las células normales. Asimismo, las concentraciones relativamente altas que pueden resultar necesarias para llegar a producir el efecto deseado, pueden inducir la expresión de ciertos genes. Por ejemplo, ciertas secuencias de siRNA activan genes de la respuesta inmune en monocitos, resultando en la producción de TNF $\alpha$  y activación de NF $\kappa$ B. Por último, la administración de siRNA representa otra dificultad del tratamiento clínico, ya que el empleo de sistemas de transfección como liposomas o vectores virales pueden producir efectos indeseables (18).

## **INHIBIDORES DE PROTEÍNA QUINASAS EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER**

En los últimos años, siete compuestos inhibidores de quinasas han sido aprobados por la FDA para el tratamiento de distintos tipos de cáncer (Tabla 1). Además se han desarrollado mas de 40 inhibidores de proteína quinasas que se encuentran en fase de ensayos clínicos.

Consideraremos los compuestos mas importantes agrupados en las vías de trasducción de señal en las que actúan.

PROTEÍNA QUINASAS COMO DIANAS FARMACOLÓGICAS

TABLA 1. *Inhibidores de Protein quinasas aprobados como fármacos, quinasas inhibidas y uso clínico*

<i>Fármaco</i>	<i>Nombre registrado</i>	<i>Año</i>	<i>Diana celular</i>	<i>Uso clínico</i>
Imatinib mesilato STI571	Gleevec (Novartis)	2001	Bcr-abl tirosina quinasa c-kit quinasa	Leucemia mieloide crónica (CML), tumor gastrointestinal del estroma (GIST)
Gefitinib ZD 1839	Iressa (Astra Zeneca)	2003	EGFR tirosina quinasa (Her1) o Erb-1	Non Non-small cell cancer de pulmón (NSCL)
Erlotinib OSI-774 CP-358,774	Tarceva	2004	EGFR tirosina quinasa	Cáncer de Páncreas avanzado o metastático combinado con gencitabina
Sorafenib Bay 439006	Nexavar (Bayer)	2005	Raf quinasa, VEGFR, PDGFR- $\beta$ , Flt3 y p38 $\alpha$	Cáncer renal avanzado
Sunitinib SU11248	Stutent (Pfizer)	2006	Múltiples RTK (PDGFR y VEGFR)	GIST y carcinoma renal (RCC)
Dasatinib (Sprycell) BMS-354825	BMS (BristolMyers)	2006	Src-Abl tirosina quinasa	Leucemia mieloide crónica (CML) y Leucemia linfoblástica aguda cromosoma philadelphia- positivo (Ph+ ALL)

### Inhibidores contra RTKs

La familia de los EGFRs consiste en cuatro miembros, que se conocen como EGFR (HER-1, ErbB-1), HER-2 (ErbB-2, neu), HER-3 (ErbB-3), y HER-4 (ErbB-4). La activación del receptor, requiere la unión de factores de crecimiento, y conduce a la oligomerización y autofosforilación en tirosina por el domi-

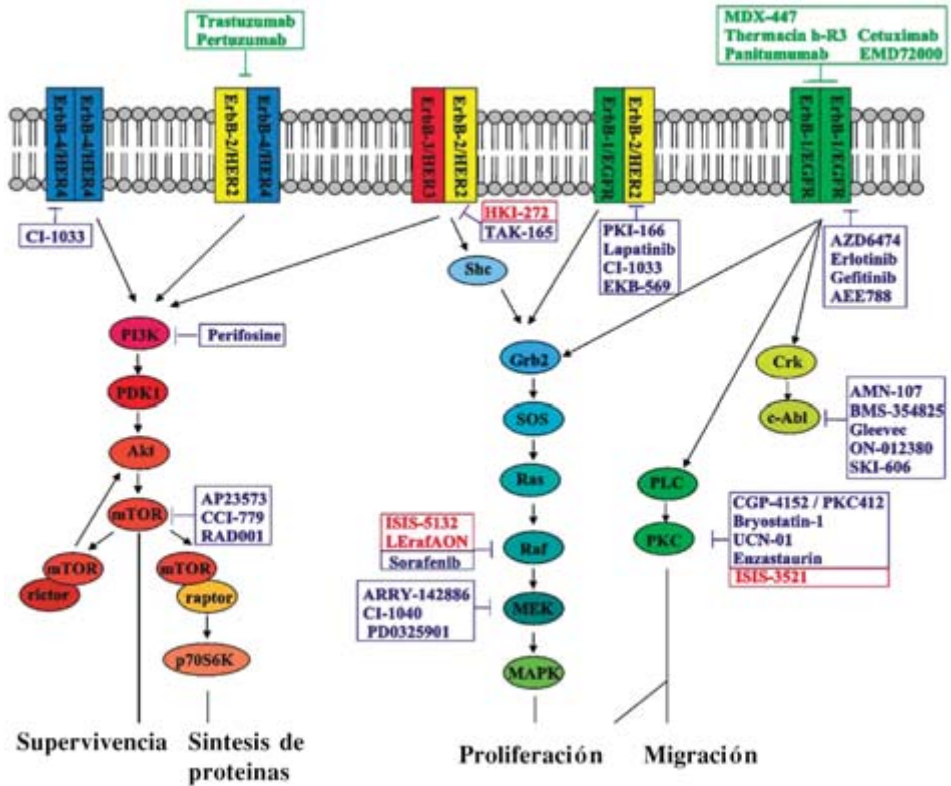


FIGURA 1. Representación esquemática de la ruta de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La familia de EGFR consta de los miembros ErbB1/EGFR, ErbB2/HER-2, ErbB3/HER-3 y ErbB4/HER-4, los cuales forman homo y heterodímeros. Tras su activación, la tirosina quinasa fosforila y activa diferentes rutas de señalización que incluyen la de Ras-Raf-MAPK, la de PI3K/Akt, la de Crk/c-Abl y la de PKC. Esto conduce a activación de factores de transcripción y modulación de procesos celulares como proliferación, supervivencia y síntesis de proteínas. Se han desarrollado diversas estrategias y fármacos para la inhibición específica de quinasas de esta ruta. Las cajas rojas representan oligonucleótidos antisentido, las azules inhibidores de pequeño tamaño que interfieren con la actividad quinasa, las verdes son anticuerpos contra miembros de la familia EGFR.

nio quinasa intracelular del receptor (Fig. 1). Al menos 12 ligandos diferentes se unen a HER-1, HER-3 y HER-4 mientras que no se conoce ningún ligando para HER-2. Esta proteína, funciona como un co-receptor, mediante heterodimerización con los otros miembros de la familia de EGFR (19). Todos los miembros de esta familia, se han implicado en el desarrollo y progresión de numerosos tumores humanos como cáncer de mama, de colon/recto, de ovario, glioma, de pulmón (non-small cell o NSCLC), próstata, esofágico, vejiga, útero, etc. (20). Los



RTKs están activados frecuentemente en células cancerosas incluso en ausencia de ligando debido a la sobreexpresión de los genes, o a formas truncadas. La forma mutante mas frecuente es EGFRVIII, que carece del dominio extracelular y es incapaz de unirse al ligando, pero esta activado constitutivamente. La terapia anti-EGFR incluye análogos de ATP y anticuerpos monoclonales, y varios de ellos, han alcanzado su aprobación para uso clínico o se encuentran en fase avanzada de ensayo clínico. Los resultados obtenidos, indican que la terapia dirigida contra la familia de EGFRs, puede no ser suficiente en el caso de tumores establecidos y que debe ser complementada con quimioterapia (21). La inhibición de EGFR en cambio, resulta ser muy eficaz en la prevención del cáncer.

*Erlotinib*, (*Tarceva*™) es un inhibidor competitivo de ATP de HER-1/EGFR Su efecto se ha estudiado en diferentes tipos de cáncer como NSCLC, cáncer de páncreas, cáncer ovárico etc. Ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de pacientes de NSCLC avanzado o metastásico (22).

*Gefitinib* (*Iressa* o ZD1839) es también un inhibidor de EGFR (inhibidor competitivo de ATP) y ha sido empleado en casos de NSCLC, cáncer de colon, mama, piel etc. En el año 2003 fue aprobado para el tratamiento de NSCLC.

*CI-1033*. También llamado *Canertinib*, es un compuesto que pertenece al grupo de anilinoquinazolininas. También se llama PD183805 y es un análogo soluble de PD 169414. Inhibe irreversiblemente a todos los miembros de la familia ErbB. Esta inhibición impide la activación de la ruta de señalización que transcurre por PI3K/Akt y Ras /Map quinasa. Como la interacción con la quinasa es irreversible, sus efectos duran mucho, y estimula la degradación del receptor. Sin embargo la toxicidad de este compuesto ha resultado un problema que se está tratando de mejorar (23).

*Cetuximab*. Conocido también como *Erbix* o IMC-C225, es un inhibidor de EGFR desarrollado a partir de un panel de anticuerpos por inmunización de ratones con células de carcinoma epidermoide humano, las cuales expresan elevados niveles de EGFR. Uno de estos anticuerpos es Mab225 y una versión química humanizada, impide la unión del receptor al sustrato. La inhibición de EGFR, conduce a disminución de la capacidad de proliferación, angiogénesis, metástasis y aumento de apoptosis. Además, se ha comprobado un efecto antiangiogénico indirecto de *Cetuximab* debido a represión de factores angiogénicos como VEGF, IL-8 y bFGF. Se esta utilizando en ensayos clínicos de fase III en pacientes de cáncer de colon con resultados prometedores (24).

*Transtuzumab* (*Herceptina*). Se considera uno de los éxitos históricos en el desarrollo de inhibidores de proteína quinasa en el tratamiento del cáncer. Se

trata de un anticuerpo monoclonal contra HER2/ErbB2 aprobado en 1998. HER2 es un miembro de la familia de EGFR que se encuentra sobreexpresado en 30% de los cánceres de mama invasivos. *Herceptina*, inhibe la actividad de HER2 al impedir la activación del receptor inducida por la unión del ligando (25). La FDA aprobó el uso clínico de *Herceptina* para el tratamiento de cáncer de mama metastático y se encuentra en ensayos clínicos de fase II para el tratamiento del osteosarcoma y cáncer de endometrio.

### **Receptores del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR)**

Los tumores sólidos, independientemente de su tipo y origen, precisan para su crecimiento, de oxígeno y nutrientes que solo pueden ser aportados por una buena irrigación sanguínea, por ello, estimulan la formación de nuevos vasos sanguíneos, mediante la producción de factores como VEGF que son mitogénicos para células vasculares endoteliales y que juegan un papel esencial en la angiogénesis. Los VEGFs son segregados por células tumorales y macrófagos y se unen a VEGFR, otra familia de RTKs. Hay tres miembros de VEGFR: VEGFR1 (conocido también como fms-like tirosina quinasa o FLT1), VEGFR2 (Kinase insert domain receptor KDR o FLK-1) y VEGFR3 (también conocido como fms-like tirosina quinasa 4 o FLT 4) (Fig.2). La variante soluble sVEGFR1 carece del dominio intracelular tirosina quinasa. VEGFR1 y VEGFR2 median el proceso de angiogénesis mientras que VEGFR2 y VEGFR3 están implicados en linfoangiogénesis, es decir el crecimiento de nuevos vasos linfáticos. La linfoangiogénesis, acompaña muchas veces a la angiogénesis y contribuye a la metástasis tumoral. La expresión de VEGFR es específica de célula. Todo ello, hace que la angiogénesis constituya una estrategia muy interesante, en el tratamiento anticanceroso. Se han desarrollado en este sentido, fármacos que inhiben el ligando VEGF o la actividad tirosina quinasa de sus receptores, pero también, anticuerpos que inhiben VEGFR, ribozimas que degradan VEGFR mRNA así como receptores solubles que atrapan e inactivan VEGF (26). Los problemas que pueden surgir en la terapia antiangiogénica son hemorragias inesperadas y el que, en general, se trata de una estrategia útil en terapia combinada, pero que es insuficiente si se utiliza sola.

*Avastina*. *Avastina* o *Bevacizumab* es un anticuerpo monoclonal contra VEGF. *Avastina* bloquea VEGF y previene la angiogénesis (27). Los resultados más interesantes obtenidos, han sido en casos de cáncer renal, NSCLC y cáncer de colon. La FDA aprobó el uso de *Avastina* como fármaco de primera línea para el tratamiento de cáncer de colon y en combinación con Paclitaxel e

PROTEÍNA QUINASAS COMO DIANAS FARMACOLÓGICAS

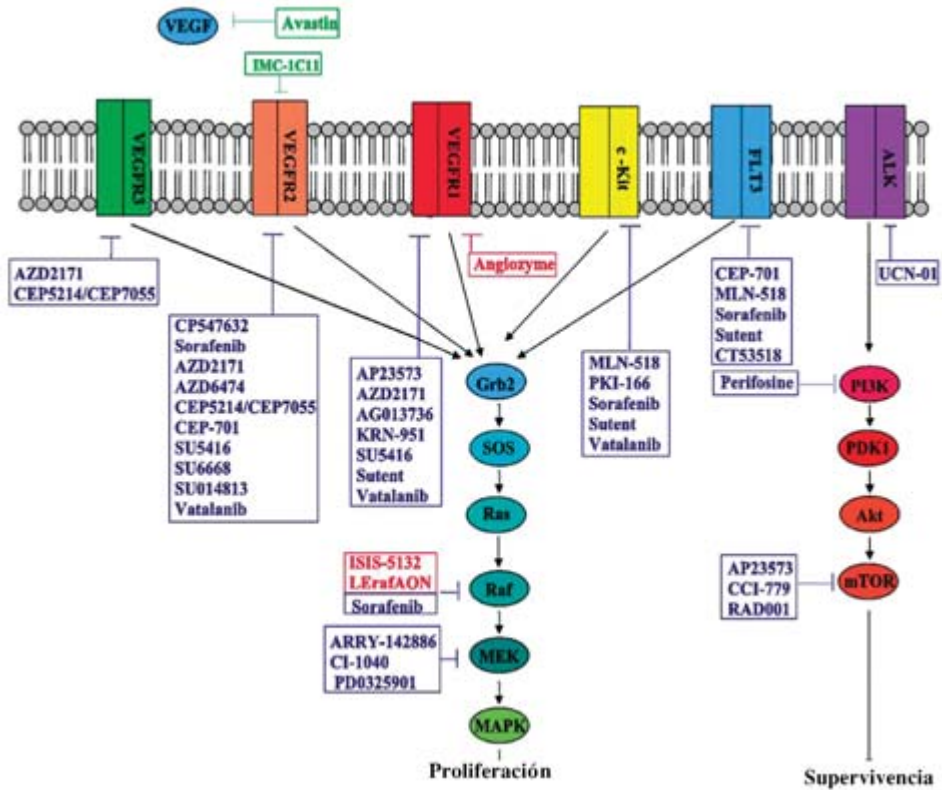


FIGURA 2. Señalización a través de tirosina quinasa receptoras de clase III (RTKs). Estas RTKs se caracterizan por una inserción entre los dos elementos conservados del dominio tirosina quinasa y incluye a la familia del receptor del factor de crecimiento endotelial (VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3). Esta clase III de RTKs modula procesos de proliferación, migración celular y supervivencia. Las cajas rojas representan oligonucleótidos antisentido, las azules contienen inhibidores de bajo peso molecular que interfieren con la actividad quinasa del enzima, y las verdes incluyen anticuerpos contra miembros de la familia de RTKs clase III.

interferón para el tratamiento de cáncer de mama metastático y de carcinoma de célula renal avanzado.

*CP547632.* Es un inhibidor selectivo y potente de la actividad de VEGFR2 (28). Ha alcanzado la fase II con pacientes de cáncer ovárico y NSCLC

*Zactima.* ZD6474 es un derivado de anilinoquinazolina que posee una actividad inhibitora potente contra VEGFR2 y también EGFR y Ret.

*Inhibidores tipo SU.* Debido a que los inhibidores competitivos de ATP favorecen la aparición de mutaciones que confieren resistencia en la terapia anti-

cáncer, se ha buscado desarrollar fármacos que inhiban simultáneamente a varias quinasas. El primero de ellos fue el compuesto SU 5416 o *Semaxanib*. El mas eficiente es sin embargo, SU11248 o *Sunitinib malato* (Stuent). El amplio espectro de inhibición de este compuesto incluye a VEGFR, PDGFR, c-Kit y Flt3. En el año 2006 fue aprobado para su uso, en casos de cáncer gastrointestinal y carcinoma renal (29) (30).

### **Receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR)**

Los PDGFRs forman otra familia de RTKs que se denomina clase III. Se caracterizan por una inserción entre las dos elementos conservados del dominio tirosina quinasa. Esta familia contiene dos miembros, PDGFR $\alpha$  y PDGFR $\beta$ . Se han descrito cuatro ligandos PDGF-A, PDGF-B, PDGFR-C y PDGF-D. PDGF-A y PDGF-B pueden formar homo y heterodímeros. PDGFR $\alpha$  se une a dímeros PDGF-AA, -BB,-AB, y CC con afinidad similar, mientras que PDGFR $\beta$  tiene su mayor afinidad para PDGF- AA y AB. El dominio intracelular de PDGFR fosforilado puede unir a mas de 10 proteínas diferentes que contienen dominios SH2, como las tirosina quinasas de transducción de señal Src, PI3K, PLC $\gamma$ , SHP-2 y GAP y el factor de transcripción STAT. La diversidad de las proteínas que interaccionan con PDGFR puede estimular una gran variedad de rutas de señalización y participa en varios procesos celulares (Fig. 3). En particular, PDGFR y sus ligandos participan en la migración celular y en la proliferación de células del mesénquima. Anomalías en el sistema de señalización PDGF/PDGFR contribuyen a un numero importante de enfermedades. Así, anormalidades en la actividad y /o expresión de la actividad de PDGFR están implicadas en la leucemia mieloide y en muchos tumores sólidos como cáncer de mama, de próstata, cáncer ovárico, pulmón, melanoma, osteoblastoma, glioblastoma, etc.

Los compuestos *CEP-751* y *CEP2563* inhiben receptores tirosina quinasa como PDGFR por unión al dominio quinasa del receptor, impidiendo la autofosforilación y la señalización consiguiente (31). *CEP-751* inhibe también a la familia Trk. En modelos de xenotransplantes poseen actividad inhibidora frente a un buen numero de tumores.

### **Inhibidores contra tirosina quinasas no receptores**

*c-Abl*. El protooncogen *c-abl* fue identificado originalmente debido a su homología con el oncogen viral *v-abl* cuyo producto génico induce transformación neoplásica en ratón.

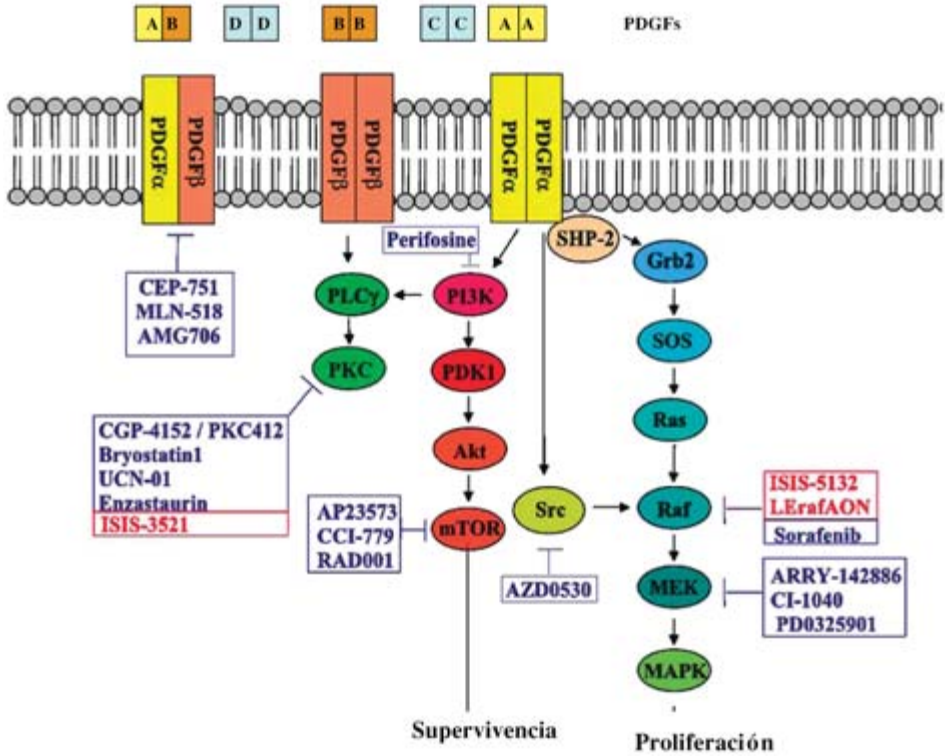


FIGURA 3. Señalización a través de receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR). Esta ruta controla procesos de proliferación, migración y supervivencia. La familia de PDGFR consta de dos miembros PDGFR y PDGFR que unen homo y heterodímeros de los cuatro ligandos PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, y PDGF-D. La ruta de señalización puede ser mediada por PI3K/Akt, PKC, y Ras-Raf-MAPK. Los códigos de color son como los empleados en la Fig.1.

El gen celular *c-abl* codifica una tirosina quinasa intracelular que tiene funciones en rutas de señalización que regulan la proliferación, y en la regulación del crecimiento celular y del ciclo celular (Fig. 1). Esta proteína, está implicada también en los mecanismos que regulan la morfología celular y la adhesión intercelular. Por otra parte, *c-Abl* inhibe la migración de fibroblastos. Finalmente, *c-Abl* afecta a la expresión genética, debido a que posee un dominio de unión a DNA, por el que interacciona con el factor de transcripción CREB (32). Por otra parte *c-Abl* está implicado en la CML que está asociada a la translocación genética que da lugar al cromosoma Filadelfia. Esta translocación recíproca, implica a los brazos largos de los cromosomas 9 y 22, y da lugar a la yuxtaposición de partes de BCR y de *c-abl* dando lugar al híbrido *bcr-abl* que

codifica una proteína de fusión de 129 kDa llamada BCR-ABL. Esta proteína, es la causa de la transformación neoplásica de células madre que conducen a CML. Aunque la acción de la proteína quimérica no está bien establecida, la proteína de fusión da lugar a una actividad tirosina quinasa incrementada en comparación con ABL (33).

*Imatinib mesilato* (STI 1571, *Gleevec*). El *Imatinib mesilato* fue uno de los primeros inhibidores de proteína quinasa desarrollados como agentes anticancerígenos, y es probablemente, la mejor prueba del potencial terapéutico del diseño racional de fármacos anticáncer. El *Imatinib mesilato*, inhibe la actividad tirosina quinasa de la proteína de fusión BCR-ABL en 90% de los pacientes de CML y en 5-25% de los pacientes de ALL (34). Por otra parte, inhibe también la actividad tirosina quinasa de PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$  y el receptor de c-KIT, y por ello, se emplea en pacientes de cáncer gastrointestinal (GIST) (35). Desde el descubrimiento de *Gleevec* se han desarrollado otros compuestos para combatir el fenómeno de la resistencia. AMN-107 es un compuesto 20 veces más potente que *Gleevec* y posee actividad inhibitoria en la mayoría de los casos de mutación. Ha alcanzado la fase II de ensayos clínicos para pacientes de CML y otros cánceres de la sangre. Otros compuestos desarrollados son *BMS 354825* y *ON-012380*.

### *Src*

Src fue identificado originalmente como el gen transformante en el genoma del sarcoma de Rous que daba lugar al sarcoma en pollos. La proteína Src es el prototipo de una familia de compuesta por ocho miembros: Fyn, Yes, Lck, Hck, Blk, Fgr, Lyn, y Yrk (36). Src se encuentra sobreexpresado y activado en un buen número de cánceres. El inhibidor *AZD0530* ha entrado en fase I de ensayos clínicos.

## **Inhibidores contra serina/treonina quinasa**

### *PI3K/Akt*

Akt/PKB (proteína quinasa B) es una familia de serina/treonina quinasa. Se han identificado tres genes en humanos que codifican PKB $\alpha$ /AKT1, PKB $\beta$ /AKT2 y PKB $\gamma$ /AKT3 respectivamente. Las proteínas AKT/PKB son mediadores de rutas de transmisión de señal y se activan en respuesta a factores de crecimiento y otros estímulos extracelulares. Contribuyen a varias funciones celulares tales como, el metabolismo de nutrientes, crecimiento celular, regulación



de la transcripción y supervivencia celular. AKT/PKB actúa como un efector por debajo de fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K). PI3K puede ser activada por RTK y receptores acoplados a proteínas G, y la activación de PI3K genera fosfatidil inositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) a partir de fosfatidil inositol-3,4-difosfato (PIP2). PIP3 no activa directamente AKT/PKB pero recluta AKT/PKB a la membrana plasmática en donde es fosforilada y activada.

AKT/PKB tiene un papel importante en el desarrollo de varios cánceres humanos. Así se ha observado, la sobreexpresión de AKT 2 en 30-40% de carcinomas ováricos y cánceres de páncreas debido a amplificación génica. Asimismo Akt1 se encuentra amplificado en cánceres gástricos. En 50% de cánceres de próstata y 40% de cánceres de mama y ováricos se produce un aumento de la actividad AKT1 quinasa. AKT2 se encuentra aumentada en carcinomas hepatocelulares y en cánceres de colon y recto (37). En resumen la implicación de AKT/PKB en el cáncer humano ha impulsado el desarrollo de inhibidores de la ruta de señalización PI3K/AKT.

*Perifosina* es un compuesto sintético análogo de miltefosina. Experimentos *in vitro* con líneas celulares cancerosas, indican actividad inhibidora de la ruta PI3K/Akt, la cual está asociada con supervivencia y crecimiento tumoral. En la actualidad se encuentra en fase II de ensayos clínicos en combinación con otros compuestos (38).

### *mTOR*

El crecimiento y proliferación de células tumorales depende de señales externas como factores de crecimiento y señales que indican disponibilidad de nutrientes y aporte sanguíneo. Muchas de estas señales son conducidas a través de la serina/treonina quinasa mTOR (mammalian target of rapamycin). mTOR es una proteína de 289 kDa que pertenece a la familia de PI3K y quinasas relacionadas (PIKK). El dominio catalítico de estos miembros se asemeja al de PI3K. Las PIKKs incluyen las subfamilias TOR (target of rapamycin), ATM (ataxia-telengectasia mutada) y ATR (relacionada con Rad3). La quinasa mTOR actúa como un interruptor central del metabolismo celular, señalizando rutas de crecimiento y proliferación. mTOR forma parte de una ruta de señalización PI3K/AKT/mTOR que regula la respuesta de células tumorales a nutrientes y factores de crecimiento, y controla el aporte de sangre y angiogénesis a través de efectos sobre VEGF en células endoteliales y tumorales. Esta ruta, se encuentra activada en muchos cánceres, especialmente en aquellos con una elevada actividad de PI3K, o en los que se encuentra mutada el supresor tumoral PTEN. Se estima, que la ruta de señalización de mTOR está activada en un 50%

de los casos de cáncer de próstata, en un 30-60% de gliomas malignos, 30-50% de carcinoma de endometrio, 50% de melanomas etc. Esto hace a esta ruta una diana atractiva para el desarrollo de inhibidores terapéuticos (39). Hallazgos recientes indican, que mTOR existe al menos en dos complejos distintos: un complejo sensible a rapamicina en el que se encuentra asociada a la proteína raptor (proteína reguladora asociada a mTOR) y un complejo insensible a rapamicina que incluye a la proteína rictor. Este último no es capaz de unión a rapamicina-FKBP12 y por ello es insensible a rapamicina. El complejo rapamicina-rictor parece regular el citoesqueleto a través de PKC que cataliza de la fosforilación de Ser-473 de AKT/PKB (40). A pesar de la existencia de este complejo insensible a rapamicina, análogos de esta, han entrado en ensayos clínicos para la inhibición del complejo de mTOR sensible a rapamicina, que se encuentra hiperactivado en muchos cánceres. El antibiótico rapamicina (*sirolimus*) interacciona con el receptor citoplásmico FK506-binding protein12 (FKBP12) y el complejo mTOR-FKBP12, interacciona específicamente con mTOR e inhibe la señalización por esta proteína. Aunque rapamicina ha sido utilizada fundamentalmente como un fármaco inmunosupresor en el trasplante de órganos, algunos derivados de rapamicina se encuentran ahora en ensayos clínicos como fármacos anti cancerosos (41). El desarrollo de inhibidores específicos de la ruta mTOR-rictor constituye una nueva estrategia terapéutica en cáncer en relación con la ruta AKT/PKB.

Los análogos de Rapamicina que se encuentran en fase I o II de ensayo clínico mas interesante son AP23573, CCI-779 o *temsirolimus* y RAD0001 o *everolimus*.

## Proteína quinasa C

Esta familia de serina/treonina proteína quinasas consta de varios miembros divididos en tres grupos: las clásicas PKCs ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), las nuevas PKCs ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  y  $\theta$ ), y las atípicas ( $\lambda$ ,  $\zeta$  y  $\tau$ ). La activación de PKC tiene lugar en respuesta a varios factores de crecimiento, y da lugar a distintas respuestas celulares como diferenciación, proliferación, apoptosis y migración (Fig. 1). En diferentes tipos de cáncer se ha reconocido un papel importante para PKC. Mutaciones en genes de PKC que den lugar a quinasas constitutivamente activas son muy raras. En cambio, se ha descrito frecuentemente, un aumento en la expresión o en la actividad de distintos efectores situados por encima, en la ruta de señalización, en tumores. Se han descrito así mismo, niveles de expresión aumentados o disminuidos de isoenzimas de PKC (o actividad aumentada o disminuida de isoformas) en diferentes cánceres. Así, se han asociado actividades elevadas de



PKC $\alpha$  y PKC $\beta$  con movilidad e invasividad de células tumorales que favorecen un papel de inductor de la proliferación y supresión de la apoptosis. PKC $\beta$  parece jugar además un papel importante en la angiogénesis. Por otra parte, una disminución de la expresión de PKC $\delta$  conduce a inhibición de la apoptosis (42). Debido a estos papeles en el cáncer se han desarrollado inhibidores contra PKC algunos de los cuales se citan a continuación:

*CGP-4152/PKC412*. PKC 412(4'-N-benzoil-staurosporina) es un inhibidor de PKC de amplio espectro que inhibe también otras tirosina quinasas como FLT3, KIT, PDGFR, y VEGFR-2. Se ha utilizado en estudios clínicos de fase I en casos de NSCLC con resultados de estabilización de tumor en combinación con 5-fluorouracilo o cisplatino. En otros estudios de fase II se ha observado reducción de tumor pero también una importante asociación con proteínas del plasma (43).

*Briostatina* es una lactona macrocíclica producida por una bacteria simbiote de un invertebrado marino. Briostatina-1 se une al dominio regulador de PKC y tras exposición prolongada, produce una disminución de la expresión. En numerosas líneas celulares y en tumores sólidos, briostatina inhibe proliferación, y promueve apoptosis. Se han iniciado estudios de fase I. Los resultados obtenidos indican una limitada actividad clínica como monoterapia. Debido a ello, se llevan a cabo estudios combinados con otros citotóxicos (44).

*ISIS-3521*. Conocido también como LY900003 o *Affinitak*, es un oligonucleótido antisentido dirigido contra PKC $\alpha$ . En sistemas celulares preclínicos, este compuesto reduce PKC en líneas celulares de glioblastoma. Como fármaco anticáncer ha entrado en estudios de fase I y II solo o en combinación con cisplatino y gemcitabina, en pacientes en estado avanzado de NSCLC y otros tumores sólidos. En la actualidad se explora su efectividad en estudios clínicos de fase II en muchos y variados tipos de cáncer (45).

*UCN-01*. UCN-01 es una 7-hidroxy staurosporina fue aislado como un inhibidor selectivo de PKC dependiente de Ca<sup>2+</sup> y fosfolípidos. Se ha probado en ensayos clínicos de fase I y en estudios en combinación con otros fármacos, y es en estos casos donde su efecto parece mas significativo (46) (47).

*Enzastaurina* o LY317615. Es un inhibidor selectivo de PKC $\beta$  con actividad antiangiogénica. Se ha probado en estudios clínicos de fase I con buenos resultados y en la actualidad se ensaya en estudios de fase II con gliomas o linfomas (48).

## INHIBIDORES DE PROTEÍNA QUINASAS CON ACTIVIDAD EN LA INFLAMACIÓN CRÓNICA Y EN ENFERMEDADES INMUNOLÓGICAS

### p38

Durante la infección bacteriana, un componente de la pared celular bacteriana de bacterias Gram negativas, el lipopolisacárido (LPS) estimula las células del sistema inmune, a producir citoquinas proinflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) y la interleuquina 1 (IL-1) los cuales, son liberados a la circulación, donde colaboran en el montaje de la respuesta inmune, que combate la infección bacteriana (49). Este mecanismo de defensa actúa, sin embargo, como una espada de doble filo, ya que la producción descontrolada de citoquinas proinflamatorias es la causa de enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis reumatoide (AR), la enfermedad inflamatoria intestinal, y el shock séptico.

Hace más de 20 años Smith Kline and French (SKF) desarrolló una nueva clase de compuestos de estructura piridinil imidazol cuyo representante es SFK86002 que mostraban elevada eficacia en modelos animales de enfermedad inflamatoria crónica. Más tarde, al finales de los años 1980 se encontró que este compuesto era capaz de suprimir la producción de IL-1 y TNF $\alpha$  por LPS en monocitos. La diana molecular de otro piridinil imidazol SB202190 condujo a la identificación de la MAPK p38, como la diana molecular de esta sustancia.

p38 MAP quinasa, es en realidad una familia de proteínas, que contiene cuatro isoformas:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ . Estas isoformas forman parte de la ruta de señalización de la respuesta celular a estímulos de estrés ambiental, como los producidos por citoquinas proinflamatorias, endotoxina, irradiación UV y shock osmótico. Una vez activada por MAPKKs, p38, fosforila y activa a otras quinasas como MK2 y numerosos factores de transcripción. Esta activación da lugar a cambios en la expresión de diferentes genes (50).

Varios inhibidores de p38 han alcanzado la fase de ensayo clínicos (51). Compuestos como *VX-702*, *SB681323*, *IRB-796*, *Ro-320-1195*, *BMS 582949* inhiben las isoformas p38 $\alpha$  y p38 $\beta$  pero no las otras isoformas. *BIRB-796* es un inhibidor alostérico que ha alcanzado la fase II de ensayo clínico (52).

La mayoría de los inhibidores conocidos de p38 se unen al bolsillo de unión a ATP e inhiben la quinasa compitiendo por la unión de ATP (53). El inhibidor *BIRB-796* se une en cambio a un bolsillo diferente del de unión de ATP resultando en un cambio de conformación (54). Se ha observado, que algunos inhi-

bidores como el compuesto RWJ68354 (trialil-imidazol) son mas potentes inhibidores de la expresión de TNF $\alpha$  en monocitos que lo que cabria esperar (55). Esto es posiblemente debido a la inhibición adicional de alguna otra quinasa.

### Jak3 quinasa

La familia de quinasas JAK se compone de las isoformas JAK1, JAK2, JAK3 y la tirosina quinasa 2 (TYK2). Estas quinasas citoplásmicas se caracterizan por contener un dominio quinasa y otro pseudoquinasa. La existencia de estos dos dominios en tandem es bastante singular, ya que el dominio pseudoquinasa aunque carece de actividad quinasa, regula la actividad catalítica de autofosforilación. El dominio quinasa comparte las características de otras tirosina quinasas, así el bolsillo catalítico se localiza en una región central y está rodeado por los lados por dos hojas  $\beta$ . Las quinasas JAK se asocian con varios receptores de citoquinas y son responsables de la trasducción de señal por citoquinas. Así, tras la unión de citoquinas al receptor, se produce un suceso inicial de fosforilación, que conduce a la fosforilación cruzada de JAKs y a la activación por fosforilación en tirosina, de los receptores. Estos residuos fosforilados constituyen sitios de unión para otras moléculas de señalización, en particular, los llamados transductores de señal y activadores de transcripción (STATs). Los STATs unidos a receptor, son fosforilados por JAKs, dimerizan y se translocan al núcleo para regular la expresión genética (Fig. 4).

A diferencia de otras parejas de JAK/ receptor de citoquina, JAK3 se asocia específicamente con la cadena  $\gamma$  ( $\gamma_c$ ) que es un componente compartido por receptores de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21. Debido a esta interacción específica con  $\gamma_c$ , JAK3 tiene un papel esencial en la transducción de señal dependiente de  $\gamma_c$  en el desarrollo linfoide y en la homeostasis del sistema inmune. Este papel de JAK3 queda demostrado en la inmunodeficiencia severa combinada (SCID) (56). Como consecuencia de mutaciones en JAK3, los pacientes de SCID son muy susceptibles a infecciones, debido a la falta de las funciones celulares de linfocitos B, T y NK. El fenotipo de estos pacientes indica, que tanto la pérdida de función de JAK3 como de  $\gamma_c$  dan lugar a esta inmunodeficiencia.

A diferencia de otros miembros de la familia que se expresan en todos los tejidos JAK3 se expresa sólo en células del sistema hematopoiético como células T, B, NK, timocitos y plaquetas. La mayoría de las sustancias inmunosupresoras como ciclosporina, rapamicina y esteroides actúan sobre dianas moleculares que están distribuidas en muchos tejidos y presentan

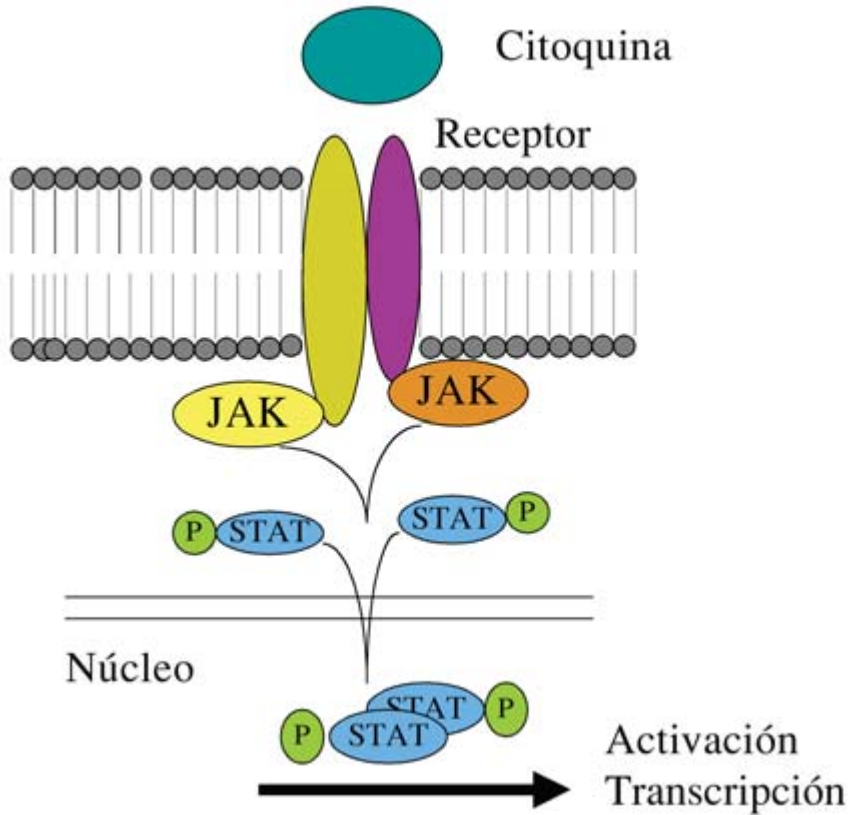


FIGURA 4. Ruta de señalización de JAK. JAK: Quinasa Janus; STAT: transductor de señal y activador de transcripción.

efectos secundarios indeseables como toxicidad renal o son neurotóxicos, por lo que los inhibidores de JAK3 representan una nueva clase de inmunomoduladores muy interesante. El compuesto *CP-690,550* de Pfizer y el *R348* de Rigels y *INCB18424* de Incyte se encuentran en fase de ensayos clínicos (57)(58)(59). Una cuestión importante en el desarrollo de inhibidores de JAK3 es la cuestión de la selectividad frente a otros miembros de la familia de JAKs. Así JAK2 media la señalización de citoquinas hemato-poieticas como eritropoietina, GM-CSF y trombopoietina, y el bloqueo de JAK2, puede producir distintos tipos de anemia. Algo parecido ocurre con JAK1 que esta implicado en otras rutas de señalización inducidas por otras citoquinas como IFNs y citoquinas gp130. La inhibición de JAK1 aumenta la velocidad de infección bacteriana o viral.

## BTK

La tirosina quinasa Bruton es un miembro de las tirosina quinasa no receptores que se expresa en el carcinoma hepatocelular. Sin embargo se expresa de manera primaria en células B, células mastoideas, plaquetas y células mieloides. El gen *Btk* se identificó inicialmente como el componente genético responsable de la agammaglobulinemia ligada al cromosoma X. El nombre de este producto genético, la tirosina quinasa Bruton, se debe al nombre del médico que primero describió esta enfermedad que se caracteriza, por una reducción en el número de células B maduras, lo que resulta en una inmunodeficiencia severa. La maduración de células B está afectada por una vía de señalización que implica a BTK y está mediada por calcio, de manera, que cuando esta vía está interrumpida, las células B quedan en un estado inmaduro. La terapia convencional para el tratamiento de XLA es la inyección intravenosa de gammaglobulina (59).

Una gran cantidad de moléculas señalizadoras interactúan con esta quinasa, por lo que participa en una variedad de rutas de señalización (60). De ahí, el potencial de moduladores de BTK para el tratamiento de enfermedades de células B y en particular de la anemia linfoblástica.

*Dasatinib* es un inhibidor de quinasa de amplio espectro desarrollado para el tratamiento de la leucemia mielóide crónica (CML) (61). Aunque este compuesto es un potente inhibidor del dominio quinasa de Bcr-Abl, se ha encontrado más recientemente que inhibe también las quinasa BTK y TEC. En estudios *in vitro* se encontró, que este compuesto es tres veces más potente contra BTK que contra c-Abl. Las consecuencias fisiológicas de esta inhibición es que *Dasatinib* inhibe la liberación de histamina de basófilos primarios y bloquea la secreción de citoquinas pro inflamatorias en células inmunes. Esto conduce a la conclusión de que *Dasatinib* actúa como un inmunosupresor potente que afecta al desarrollo celular de células B y T, así como a la función de leucocitos. Aunque estos efectos pueden no ser deseables en el tratamiento de la leucemia, en cambio, pueden ser de gran utilidad en el tratamiento de enfermedades inmunológicas como la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn y la enfermedad alérgica. Otros compuestos inhibidores de BTK como *Cgi 1746*, *LFM-A13* y *ácido terreico* se encuentran en fase de desarrollo.

## PKCθ

Como miembro de la familia de PKCs, PKCθ se expresa específicamente en células T, células de músculo esquelético y plaquetas. Durante la acti-

vación de células T, PKC $\theta$  transduce señales de TCR/CD3 y CD28 a moléculas efectoras como NF $\kappa$ B, lo que da lugar a activación de la transcripción de genes como IL-2 y su receptor de alta afinidad CD25. Recientemente, PKC $\theta$  ha emergido como una diana potencial de enfermedades inmunológicas basado en su expresión específica en células T y en los estudios knockout de este gen (62).

Novartis ha desarrollado un inhibidor pan PKC el NVP-AEB071 como un inmunosupresor para el trasplante de órganos y soriasis. NVP-AEB071 inhibe la producción de IL-2 por células T CD4+. Este compuesto, se ha mostrado capaz de prolongar el tiempo de supervivencia en el trasplante de riñón y de corazón en monos. También es capaz de reducir la soriasis. En la actualidad se encuentra en fase II de ensayos clínicos para el trasplante de órganos.

## Rho quinasa

Las Rho quinasa son una familia de serina /treonina quinasa activadas por la proteína de unión a GTP Rho A. Rho quinasa tiene numerosos sustratos, como la quinasa de cadena ligera de miosina (MLCK), LIM quinasa, y la subunidad reguladora de miosina fosfatasa MYPT1. Esto conduce a su implicación en múltiples aspectos de motilidad celular que van desde la contracción del músculo liso a la migración celular de neuritas (Fig. 5). La multitud de sustratos descritos, ha conducido a la investigación de Rho quinasa como una diana terapéutica para una multitud de patologías, desde vascular a neurológicas, cáncer o asma (63)(64)(65).

Varias investigaciones han mostrado que Rho quinasa está implicada en la contracción del músculo liso bronquial y como consecuencia en el funcionamiento de las vías respiratorias, de manera, que se ha considerado una diana potencial interesante en el asma de carácter alérgico. Desde este punto de vista el inhibidor de Rho quinasa Y-27632, es un protector bronquial a la obstrucción de vías respiratorias inducidas por histamina y PGF<sub>2</sub>. Adicionalmente Y-27632 reduce la expresión de la actina del músculo liso, lo que contribuye a la remodelación de las vías respiratorias (66).La regulación de Rho quinasa del músculo liso vascular, ha conducido a la consideración de una posible diana terapéutica en la enfermedad cardiovascular, hipertensión y glaucoma (65).

*Fasudil* también denominado HA-1077 y AT-877 es un inhibidor de Rho quinasa que está comercializado en Japón desde hace diez años para el tratamiento de casos agudos del espasmo vascular.

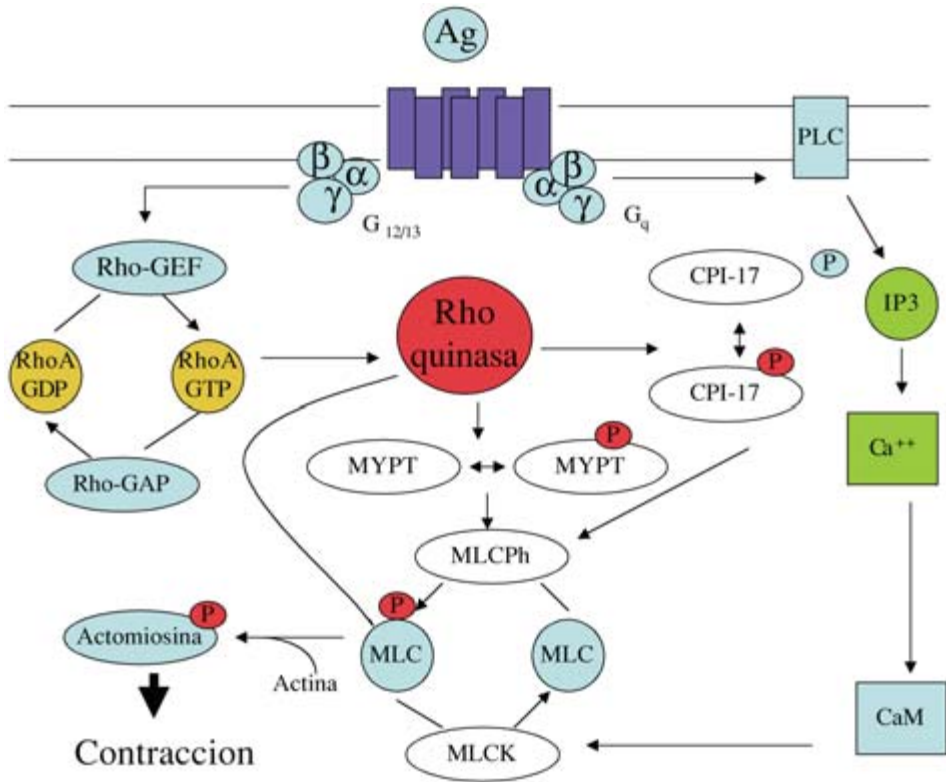


FIGURA 5. Diagrama de la ruta de RhoA-Rho quinasa en músculo liso. La activación de rho quinasa produce la inhibición de MLCP (fosfatasa de la cadena ligera de miosina). La contracción se produce por un aumento en la forma fosforilada de la cadena ligera de miosina. CPI17: proteína de 17 kD inhibidora de proteína fosfatasa 1 (PP1) potenciada por PKC; MLC: cadena ligera de miosina; MLCK: quinasa de MLC; MYPT1: miosina fosfatasa subunidad reguladora 1.

En la actualidad se conocen dos isoformas de Rho quinasa denominadas ROCK1 y ROCK2. Aunque ambas isoformas tienen los mismos sustratos y son 92% idénticas en el dominio quinasa experimentos con «knockouts» indican que ambas formas pueden tener funciones diferentes. Tanto *Fasudil* como Y-27632 inhiben ambas Rho quinasa y solo a concentraciones 10 veces más elevadas inhiben también a otras quinasa. Con objeto de obtener una mayor selectividad se ha desarrollado un derivado de *Fasudil* más selectivo denominado H-1152P (67).

TABLA 2. *Inhibidores de Proteína quinasa de propiedades antiinflamatorias.*

<i>Inhibidor</i>	<i>Proteína quinasa</i>	<i>Indicaciones</i>	<i>Fase</i>
AMG-548	p38	AR	I
BIRB-796	p38	Soriasis, AR, Crohn	II
SB-681323	p38	AR	II
VX-702	p38	AR, S.coronario	II
Ro 320-1195	p38	AR	
CP-690,550	JAK3	AR, Soriasis	I
Dasatinib	BTK	AR, Crohn,alergia	
Cgi-1746	BTK		
LFM-A13	BTK		
NVP-AEBO71	PKC	Soriasis,Transplante II	
Fasudil	Rho	Raynaud,	III
	Aterosclerosis	II	
Y-39983	Rho	Glaucoma	I

## PROBLEMAS Y PERSPECTIVAS FUTURAS

El desarrollo de inhibidores de proteína quinasa específicos, ha abierto un nuevo campo prometedor, tanto en la terapia anticáncer como en el tratamiento de las enfermedades antiinflamatorias o autoinmunes. En lo referente al cáncer se han obtenido resultados prometedores con inhibidores específicos de proteína quinasa como es el caso del *imatinib mesilato* y otros compuestos como se ha expuesto anteriormente. Así mismo, hay numerosos compuestos que están en fase de ensayos clínicos que van a dar lugar a nuevos fármacos en los próximos años. Hay varios problemas que conviene tener presente. Uno de ellos, se refiere al hecho de que los tumores raramente se deben a la alteración de una sola proteína quinasa. De ahí el que un solo inhibidor puede no ser suficiente para eliminar la actividad de la célula cancerosa ya que varias quinasa pueden ejercer la actividad perturbante y en consecuencia, puede ser necesario la combinación de varios inhibidores para obtener efectos positivos. Por otra parte, es preciso considerar que las proteína quinasa no solo regulan proliferación y apoptosis sino que participan también en otros procesos celulares.

Recientemente, se han secuenciado las proteína quinasa que se encuentran mutadas en un grupo de pacientes de cáncer de mama encontrándose diferentes



patrones de mutaciones. En un estudio similar en pacientes de cáncer de colon se encontró que el patrón de mutación comprendía ocho proteína quinasas diferentes. Estos estudios demuestran que casi 40% de los tumores de colon tienen alteraciones en proteínas que son miembros de la familia de proteínas de PI3K haciendo que esta ruta constituya una diana muy interesante para la intervención terapéutica. Este tipo de estrategia que permite mapear el espectro de mutaciones en muestras concretas debe conducir al diseño de terapias basada en un cocktail de inhibidores adaptado al caso específico de cada paciente.

Numerosos estudios clínicos han mostrado que el uso de inhibidores de proteína quinasas puede no ser suficiente, y que en cambio, combinado con la quimioterapia clásica, se puede obtener una respuesta aditiva o sinérgica.

Una cuestión de gran importancia es la cuestión de la selectividad de un determinado inhibidor entre la gran superfamilia de proteína quinasas. El tema de la selectividad se complica por el hecho de que la eficacia de un inhibidor observado en oncología puede beneficiarse de una cierta amplitud de espectro. Sin embargo en aplicaciones no oncológicas esto puede no ser deseable. Por ejemplo, varias quinasas juegan un papel en la inmunidad natural dando lugar a la posibilidad de que inhibidores con una cierta amplitud puedan conducir a un mayor riesgo frente a la infección bacteriana.

## ABREVIATURAS

ATP, Adenosina tri fosfato; RTK, Tirosina quinasa receptor; SH2, Dominio 2 de homología Src; Abl, Abelson; CML, Leucemia mieloide crónica; BCR, Break point cluster; EGFR, Receptor del factor de crecimiento epidérmico; VEGF, Factor de crecimiento vascular endotelial; VEGFR, Receptor de VEGF; GTP, Guanosina tri fosfato; RNA-as, RNA antisentido; RNAi, RNA de interferencia; siRNA, pequeño RNA de interferencia; mRNA, RNA mensajero; P<sub>b</sub>, pares de bases; RNA ds RNA de doble cadena; TNF $\alpha$ , Factor de necrosis tumoral; FDA, Food and Drug Administration; NSCL, Non small cell lung cancer; PI3K, Fosfatidil inositol 3 quinasa; Map, Proteína activada por mitógenos; IL, Interleuquina; FGF, Factor de crecimiento de fibroblastos; PDGFR, Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas; PDGF, Factor de crecimiento derivado de plaquetas; PLC, Fosfolipasa C; STAT, Transductor de señal y activador de transcripción; ALL, Anemia linfobástica aguda; PKC, Proteína quinasa C; c-AMP, AMP cíclico; PKB, Proteína quinasa B; PDK1, Quinasa dependiente de fosfoinosítidos; TOR target of rapamycin; FKBP12, FK-506 binding protein 12; LPS, Lipopolisacárido; AR, Artritis reumatoide; BTK, Quinasa de Bruton.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., y Sudarsanam, S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science*. **298**, 1912-1934.
2. Hubbard, M. J., y Cohen, P. (1993) On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *TIBS*. **18**, 172-177.
3. Schlessinger, J. (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. **103**, 211-225.
4. Hubbard, S. R., y Till, J. H. (2000) Protein tyrosine kinase structure y function. *Annu Rev Biochem*. **69**, 373-398.
5. Pawson, T. (2004) Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell*. **116**, 191-203.
6. Cohen, P. (2001) The role of protein phosphorylation in human health y disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *Eur J Biochem*. **268**, 5001-5010.
7. Cohen, P. (2002) Protein kinases—the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov*. **1**, 309-315.
8. Bianco, R., Melisi, D., Ciardiello, F., y Tortora, G. (2006) Key cancer cell signal transduction pathways as therapeutic targets. *Eur J Cancer*. **42**, 290-294.
9. Hantschel, O., y Superti-Furga, G. (2004) Regulation of the c-Abl y Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **5**, 33-44.
10. Downward, J. (2003) Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. **3**, 11-22.
11. Altomare, D. A., y Testa, J. R. (2005) Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene*. **24**, 7455-7464.
12. Noble, M. E., Endicott, J. A., y Johnson, L. N. (2004) Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science*. **303**, 1800-1805.
13. Dancey, J., y Sausville, E. A. (2003) Issues y progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov*. **2**, 296-313.
14. Force, T., Kuida, K., Namchuk, M., Parang, K., y Kyriakis, J. M. (2004) Inhibitors of protein kinase signaling pathways: emerging therapies for cardiovascular disease. *Circulation*. **109**, 1196-1205.
15. Ahn, N. G., y Resing, K. A. (2005) Cell biology. Lessons in rational drug design for protein kinases. *Science*. **308**, 1266-1267.
16. Cohen, M. S., Zhang, C., Shokat, K. M., y Taunton, J. (2005) Structural bioinformatics-based design of selective, irreversible kinase inhibitors. *Science*. **308**, 1318-1321.

17. Groner, B., Hartmann, C., y Wels, W. (2004) Therapeutic antibodies. *Curr Mol Med.* **4**, 539-547.
18. Sioud, M. (2004) Therapeutic siRNAs. *Trends Pharmacol Sci.* **25**, 22-28.
19. Leahy, D. J. (2004) Structure y function of the epidermal growth factor (EGF/ErbB) family of receptors. *Adv Protein Chem.* **68**, 1-27.
20. Menard, S., Casalini, P., Campiglio, M., Pupa, S. M., y Tagliabue, E. (2004) Role of HER2/neu in tumor progression y therapy. *Cell Mol Life Sci.* **61**, 2965-2978.
22. Grandis, J. R., y Sok, J. C. (2004) Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. *Pharmacol Ther.* **102**, 37-46.
22. Tibes, R., Trent, J., y Kurzrock, R. (2005) Tyrosine kinase inhibitors y the dawn of molecular cancer therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **45**, 357-384.
23. Levitzki, A. (2003) Protein kinase inhibitors as a therapeutic modality. *Acc Chem Res.* **36**, 462-469.
24. Li, S., Schmitz, K. R., Jeffrey, P. D., Wiltzius, J. J., Kussie, P., y Ferguson, K. M. (2005) Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell.* **7**, 301-311.
25. Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J., y Norton, L. (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.* **344**, 783-792.
26. Bicknell, R., y Harris, A. L. (2004) Novel angiogenic signaling pathways y vascular targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **44**, 219-238.
27. Marx, J. (2005) Cancer. Encouraging results for second-generation antiangiogenesis drugs. *Science.* **308**, 1248-1249.
28. Beebe, J. S., Jani, J. P., Knauth, E., Goodwin, P., Higdon, C., Rossi, A. M., Emerson, E., Finkelstein, M., Floyd, E., Harriman, S., Atherton, J., Hillerman, S., Soderstrom, C., Kou, K., Gant, T., Noe, M. C., Foster, B., Rastinejad, F., Marx, M. A., Schaeffer, T., Whalen, P. M., y Roberts, W. G. (2003) Pharmacological characterization of CP-547,632, a novel vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase inhibitor for cancer therapy. *Cancer Res.* **63**, 7301-7309.
29. Mendel, D. B., Laird, A. D., Xin, X., Louie, S. G., Christensen, J. G., Li, G., Schreck, R. E., Abrams, T. J., Ngai, T. J., Lee, L. B., Murray, L. J., Carver, J., Chan, E., Moss, K. G., Haznedar, J. O., Sukbuntherng, J., Blake, R. A., Sun, L., Tang, C., Miller, T., Shirazian, S., McMahon, G., y Cherrington, J. M. (2003) In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor y platelet-derived growth factor receptors: deter-

- mination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res.* **9**, 327-337.
30. Fiedler, W., Serve, H., Dohner, H., Schwittay, M., Ottmann, O. G., O'farrell, A. M., Bello, C. L., Allred, R., Manning, W. C., Cherrington, J. M., Louie, S. G., Hong, W., Brega, N. M., Massimini, G., Scigalla, P., Berdel, W. E., y Hossfeld, D. K. (2005) A phase 1 study of SU11248 in the treatment of patients with refractory or resistant acute myeloid leukemia (AML) or not amenable to conventional therapy for the disease. *Blood.* **105**, 986-993.
  31. Strock, C. J., Park, J. I., Rosen, M., Dionne, C., Ruggeri, B., Jones-Bolin, S., Denmeade, S. R., Ball, D. W., y Nelkin, B. D. (2003) CEP-701 y CEP-751 inhibit constitutively activated RET tyrosine kinase activity y block medullary thyroid carcinoma cell growth. *Cancer Res.* **63**, 5559-5563.
  32. Johannessen, M., Delghandi, M. P., y Moens, U. (2004) What turns CREB on? *Cell Signal.* **16**, 1211-1227.
  33. Ren, R. (2005) Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer.* **5**, 172-183.
  34. Deininger, M., Buchdunger, E., y Druker, B. J. (2005) The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood.* **105**, 2640-2653.
  35. Duffaud, F., y Blay, J. Y. (2003) Gastrointestinal stromal tumors: biology y treatment. *Oncology.* **65**, 187-197.
  36. Playford, M. P., y Schaller, M. D. (2004) The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene.* **23**, 7928-7946.
  37. Bellacosa, A., Kumar, C. C., Di Cristofano, A., y Testa, J. R. (2005) Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res.* **94**, 29-86.
  38. Senderowicz, A. M. (2003) Novel small molecule cyclin-dependent kinases modulators in human clinical trials. *Cancer Biol Ther.* **2**, S84-95.
  39. Chan, S. (2004) Targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR): a new approach to treating cancer. *Br J Cancer.* **91**, 1420-1424.
  40. Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., y Sabatini, D. M. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* **307**, 1098-1101.
  41. Bjornsti, M. A., y Houghton, P. J. (2004) The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* **4**, 335-348.
  42. Koivunen, J., Aaltonen, V., y Peltonen, J. (2006) Protein kinase C (PKC) family in cancer progression. *Cancer Lett.* **235**, 1-10.

43. Virchis, A., Ganeshaguru, K., Hart, S., Jones, D., Fletcher, L., Wright, F., Wickremasinghe, R., Man, A., Csermak, K., Meyer, T., Fabbro, D., Champain, K., Yap, A., Prentice, H. G., y Mehta, A. (2002) A novel treatment approach for low grade lymphoproliferative disorders using PKC412 (CGP41251), an inhibitor of protein kinase C. *Hematol J.* **3**, 131-136.
44. Marshall, J. L., Bangalore, N., El-Ashry, D., Fuxman, Y., Johnson, M., Norris, B., Oberst, M., Ness, E., Wojtowicz-Praga, S., Bhargava, P., Rizvi, N., Baidas, S., y Hawkins, M. J. (2002) Phase I study of prolonged infusion Bryostatín-1 in patients with advanced malignancies. *Cancer Biol Ther.* **1**, 409-416.
45. Villalona-Calero, M. A., Ritch, P., Figueroa, J. A., Otterson, G. A., Belt, R., Dow, E., George, S., Leonardo, J., Mccachren, S., Miller, G. L., Modiano, M., Valdivieso, M., Geary, R., Oliver, J. W., y Holmlund, J. (2004) A phase I/II study of LY900003, an antisense inhibitor of protein kinase C- $\alpha$ , in combination with cisplatin and gemcitabine in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* **10**, 6086-6093.
46. Bhonde, M. R., Hanski, M. L., Magrini, R., Moorthy, D., Muller, A., Sausville, E. A., Kohno, K., Wiegand, P., Daniel, P. T., Zeitz, M., y Hanski, C. (2005) The broad-range cyclin-dependent kinase inhibitor UCN-01 induces apoptosis in colon carcinoma cells through transcriptional suppression of the Bcl-x(L) protein. *Oncogene.* **24**, 148-156.
47. Dees, E. C., Baker, S. D., O'reilly, S., Rudek, M. A., Davidson, S. B., Aylesworth, C., Elza-Brown, K., Carducci, M. A., y Donehower, R. C. (2005) A phase I and pharmacokinetic study of short infusions of UCN-01 in patients with refractory solid tumors. *Clin Cancer Res.* **11**, 664-671.
48. Robertson, M. J., Kahl, B. S., Vose, J. M., De Vos, S., Laughlin, M., Flynn, P. J., Rowland, K., Cruz, J. C., Goldberg, S. L., Musib, L., Darstein, C., Enas, N., Kutok, J. L., Aster, J. C., Neuberg, D., Savage, K. J., Lacasce, A., Thornton, D., Slapak, C. A., y Shipp, M. A. (2007) Phase II study of enzastaurin, a protein kinase C beta inhibitor, in patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* **25**, 1741-1746.
49. Kotlyarov, A., Neininger, A., Schubert, C., Eckert, R., Birchmeier, C., Volk, H. D., y Gaestel, M. (1999) MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF- $\alpha$  biosynthesis. *Nat Cell Biol.* **1**, 94-97.
50. Adams, J. L., Badger, A. M., Kumar, S., y Lee, J. C. (2001) p38 MAP kinase: molecular target for the inhibition of pro-inflammatory cytokines. *Prog Med Chem.* **38**, 1-60.
51. Kumar, S., Boehm, J., y Lee, J. C. (2003) p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov.* **2**, 717-726.

52. Mclay, L. M., Halley, F., Souness, J. E., Mckenna, J., Benning, V., Birrell, M., Burton, B., Belvisi, M., Collis, A., Constan, A., Foster, M., Hele, D., Jayyosi, Z., Kelley, M., Maslen, C., Miller, G., Ouldelhkim, M. C., Page, K., Phipps, S., Pollock, K., Porter, B., Ratcliffe, A. J., Redford, E. J., Webber, S., Slater, B., Thybaud, V., y Wilsher, N. (2001) The discovery of RPR 200765A, a p38 MAP kinase inhibitor displaying a good oral anti-arthritic efficacy. *Bioorg Med Chem.* **9**, 537-554.
53. Pipaon, C., Gutierrez, P., Montero, J. C., Lorenzo, M., Eguiraun, A., De La Fuente, J. A., Pandiella, A., Leon, J., y Ortiz, J. M. (2002) Mitogen-activated protein kinase routes as targets in the action of diaza-anthracene compounds with a potent growth-inhibitory effect on cancer cells. *Mol Cancer Ther.* **1**, 811-819.
54. Pargellis, C., Tong, L., Churchill, L., Cirillo, P. F., Gilmore, T., Graham, A. G., Grob, P. M., Hickey, E. R., Moss, N., Pav, S., y Regan, J. (2002) Inhibition of p38 MAP kinase by utilizing a novel allosteric binding site. *Nat Struct Biol.* **9**, 268-272.
55. Lin, T. H., Metzger, A., Diller, D. J., Desai, M., Henderson, I., Ahmed, G., Kimble, E. F., Quadros, E., y Webb, M. L. (2006) Discovery and characterization of triaminotriazine aniline amides as highly selective p38 kinase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther.* **318**, 495-502.
56. Russell, S. M., Tayebi, N., Nakajima, H., Riedy, M. C., Roberts, J. L., Aman, M. J., Migone, T. S., Noguchi, M., Markert, M. L., Buckley, R. H., O'shea, J. J., y Leonard, W. J. (1995) Mutation of Jak3 in a patient with SCID: essential role of Jak3 in lymphoid development. *Science.* **270**, 797-800.
57. Kudlacz, E., Perry, B., Sawyer, P., Conklyn, M., Mccurdy, S., Brissette, W., Flanagan and, M., y Changelian, P. (2004) The novel JAK-3 inhibitor CP-690550 is a potent immunosuppressive agent in various murine models. *Am J Transplant.* **4**, 51-57.
58. Cortes, J. R., Perez, G. M., Rivas, M. D., y Zamorano, J. (2007) Kaempferol inhibits IL-4-induced STAT6 activation by specifically targeting JAK3. *J Immunol.* **179**, 3881-3887.
59. Deuse, T., Velotta, J. B., Hoyt, G., Govaert, J. A., Taylor, V., Masuda, E., Herlaar, E., Park, G., Carroll, D., Pelletier, M. P., Robbins, R. C., y Schrepfer, S. (2008) Novel immunosuppression: R348, a JAK3- and Syk-inhibitor attenuates acute cardiac allograft rejection. *Transplantation.* **85**, 885-892.
60. Lindvall, J. M., Blomberg, K. E., Valiaho, J., Vargas, L., Heinonen, J. E., Berglof, A., Mohamed, A. J., Nore, B. F., Vihinen, M., y Smith, C. I. (2005) Bruton's tyrosine kinase: cell biology, sequence conservation, mutation spectrum, siRNA modifications, and expression profiling. *Immunol Rev.* **203**, 200-215.

61. Hantschel, O., Rix, U., Schmidt, U., Burckstummer, T., Kneidinger, M., Schutze, G., Colinge, J., Bennett, K. L., Ellmeier, W., Valent, P., y Superti-Furga, G. (2007) The Btk tyrosine kinase is a major target of the Bcr-Abl inhibitor dasatinib. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**, 13283-13288.
62. Pfeifhofer, C., Kofler, K., Gruber, T., Tabrizi, N. G., Lutz, C., Maly, K., Leitges, M., y Baier, G. (2003) Protein kinase C theta affects Ca<sup>2+</sup> mobilization and NFAT cell activation in primary mouse T cells. *J Exp Med.* **197**, 1525-1535.
63. Mueller, B. K., Mack, H., y Teusch, N. (2005) Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nat Rev Drug Discov.* **4**, 387-398.
64. Riento, K., y Ridley, A. J. (2003) Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **4**, 446-456.
65. Shimokawa, H., y Rashid, M. (2007) Development of Rho-kinase inhibitors for cardiovascular medicine. *Trends Pharmacol Sci.* **28**, 296-302.
66. Henry, P. J., Mann, T. S., y Goldie, R. G. (2005) A rho kinase inhibitor, Y-27632 inhibits pulmonary eosinophilia, bronchoconstriction and airways hyperresponsiveness in allergic mice. *Pulm Pharmacol Ther.* **18**, 67-74.
67. Tamura, M., Nakao, H., Yoshizaki, H., Shiratsuchi, M., Shigyo, H., Yamada, H., Ozawa, T., Totsuka, J., y Hidaka, H. (2005) Development of specific Rho-kinase inhibitors and their clinical application. *Biochim Biophys Acta.* **1754**, 245-252