

**Universidade de Lisboa**

**Faculdade de Farmácia**



## **Compostos híbridos:**

**Uma estratégia promissora para descobrir novos  
fármacos antitumorais**

**Rita Alexandra Lampreia Dias**

**Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas**

**2017**

**Universidade de Lisboa**

**Faculdade de Farmácia**



## **Compostos híbridos:**

**Uma estratégia promissora para descobrir novos  
fármacos antitumorais**

**Rita Alexandra Lampreia Dias**

**Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas apresentada  
à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

**Orientadora: Doutora Ana Paula Gameiro Francisco, Professora  
Auxiliar**

**2017**

# Resumo

A hibridação de moléculas biologicamente ativas é uma ferramenta poderosa de química medicinal que compreende a incorporação de dois fármacos ou farmacóforos numa única molécula, com o objetivo de exercer dupla ação e/ou contrabalançar os efeitos secundários conhecidos da outra parte do híbrido. É um novo conceito no design e desenvolvimento de fármacos com o objetivo de desenvolver compostos multifuncionais com um perfil farmacocinético e farmacodinâmico melhorado.

Nesta dissertação são analisados alguns exemplos de fármacos híbridos antitumorais, as suas estruturas, potenciais aplicações e vantagens em relação à quimioterapia convencional. É também examinado o design, a síntese e as oportunidades que este tipo de compostos representam de uma forma geral. Finalmente são discutidos alguns desafios que se colocam durante o processo de desenvolvimento destes fármacos.

**Palavras-chave:** Compostos Híbridos; Fármacos antitumorais; Hibridação Molecular; Desenho de Fármacos

# Abstract

The hybridization of biologically active molecules is a powerful tool in medicinal chemistry which involve the incorporation of two drugs or pharmacophores in a single molecule with the aim of exerting dual drug action and/or to counterbalance the known side effects associated with the other hybrid part. It is a new concept in drug design and development with the intention of producing hybrid compounds with an improved pharmacokinetic as well as pharmacodynamic profiles.

In this dissertation are analysed some examples of anticancer hybrid agents, their structures, potential applications and advantages over conventional chemotherapy. The design, synthesis and opportunities that these types of compounds represent in general are also examined. Finally, it is discussed some of the challenges that arise during the development of these drugs.

**Keywords:** Hybrid Compounds; Anticancer drugs; Molecular Hybridization; Drug Design

# Abreviaturas

- 4-OHT** 4-hidroxitamoxifeno
- ADC** Conjugado Anticorpo-Fármaco, do inglês *Antibody-Drug Conjugate*
- AIM** Autorização de Introdução no Mercado
- BRET** Ensaio de Transferência de Energia de Bioluminescência de Ressonância, do inglês *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*
- c-Met** Proto-oncogene que codifica o recetor do fator de crescimento de hepatócito (HGFR)
- COL** Colquicina
- CPT** Camptotecina
- CSF1R** Recetor do fator estimulador de colónias de macrófagos 1, do inglês *Macrophage Colony-stimulating Factor-1 Receptor*
- EC50** Concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo, do inglês *Half Maximal Effective Concentration*
- EGFR** Recetor do fator de crescimento epidérmico, do inglês *Epidermal Growth Factor Receptor*
- EP** Epipodofilotoxina
- ER +** Células onde existe sobre-expressão das proteínas Recetores de Estrogénio
- FDA** Agência Federal de Alimentação e Fármacos dos EUA, do inglês *Food and Drug Administration*
- FGFR-1** Recetor do Fator de Crescimento de Fibroblastos 1, do inglês *Fibroblast growth factor receptor 1*
- FLT3** Tirosina cinase tipo FMS 3, do inglês *FMS-like Tyrosine Kinase 3*
- GA** Ácido Glicirretínico
- HCT-8** Linhagem Celular de Adenocarcinoma do Cólon
- HDACi** Inibidor da Histona-deacetilase, do inglês *Histone Deacetylases Inhibitors*
- IC50** Concentração do fármaco que inibe metade do efeito máximo, do inglês *Half Maximal Inhibitory Concentration*
- ICI-164,384** Antiestrogénio: *N-n-butyl-N-methyl-11-(3,17β-dihydroxyestra-1,3,5(10)-trien-7α-yl)undecanamide*
- MCF-7** Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humana
- PDGFR** Recetor do Fator de Crescimento derivado de Plaquetas, do inglês *Platelet-derived Growth Factor Receptor*
- PI3k** Fosfoinosítideo 3-cinase, do inglês *Phosphoinositide 3-Kinase*

**RCM** Resumo das Características do Medicamento

**SAHA** Ácido Hidroxâmico Suberoilânida, do inglês *Suberoylanilide Hydroxamic Acid*

**SCFR** Recetor do Fator de Células Estaminais, do Inglês *Stem-cell Factor Receptor*

**SERD** Reguladores negativos seletivos de recetores de estrogénio, do inglês *Selective estrogen receptor downregulators*

**SERM** Moduladores seletivos de recetores de estrogénio, do inglês *Selective estrogen receptor modulators*

**TXL** Paclitaxel

**VEGFR** Recetor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular, do inglês *Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor*

## Índice:

<b>Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>Fármacos Híbridos – Compostos inovadores .....</b>	<b>3</b>
<b>Metodologia para síntese de fármacos híbridos.....</b>	<b>5</b>
<b>Objetivo .....</b>	<b>13</b>
<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>13</b>
<b>Híbridos Antitumorais .....</b>	<b>14</b>
<b>Estramustina .....</b>	<b>14</b>
<b>Híbridos de SERM/SERD e HDACi .....</b>	<b>17</b>
<b>Conjugados de Paclitaxel e Camptotecina .....</b>	<b>21</b>
<b>Aplicações Clínicas de Fármacos Híbridos Anti-tumorais .....</b>	<b>24</b>
<b>Desafios e limitações .....</b>	<b>30</b>
<b>Conclusão.....</b>	<b>32</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>33</b>

## Índice de Figuras:

Figura 1 - Fármacos naturais utilizados para síntese de compostos híbridos.....	6
Figura 2 - Fármacos sintéticos utilizados na síntese de compostos híbridos.....	7
Figura 3 - Técnicas de hibridação molecular.....	8
Figura 4 - Fármacos híbridos ligados diretamente.....	9
Figura 5 - Compostos híbridos com linker clivável.....	10
Figura 6 - Compostos híbridos de paclitaxel com linker clivável e fármacos que lhes deram origem.....	11
Figura 7 - Compostos híbridos com linker não-clivável.....	12
Figura 8 - Esquema descritivo do design de um composto híbrido sobreposto.....	12
Figura 9 - Estrutura da estramustina e dos compostos que lhe deram origem.....	15
Figura 10 - Estrutura dos metabolitos ativos da estramustina.....	15
Figura 11 - Estrutura do estradiol, SERM e SERD.....	18
Figura 12 - Estrutura de inibidores da histona-deacetilases.....	18
Figura 13 – Estruturas de híbridos de HDACi e SERM/SERD.....	19
Figura 14 – Estruturas de Paclitaxel e outros agentes antitumorais usados em conjugados.....	22
Figura 15 – Estrutura de conjugados .....	23
Figura 16 - Estrutura do CUDC-907 .....	26
Figura 17 - Estrutura do Lucitanib (E-3810).....	27
Figura 18 - Estrutura do CUDC-101.....	27

Figura 19 - Estrutura do Pexidartinib (PLX-3397).....	28
Figura 20 - Estrutura da Curaxina (CBL0137).....	29

**Índice de Tabelas:**

Tabela 1 - Ensaio inibição da atividade da angiogénese em híbridos de TXL-CPT.....	23
Tabela 2 - Fármacos que se encontram em ensaios clínicos.....	25

# Introdução

Apesar de todo o progresso científico efetuado até aos dias de hoje, as análises estatísticas do cancro não apresentam valores animadores. A realidade é que o cancro é uma das principais causas de morbilidade e mortalidade em todo o mundo, e que a sua incidência tem vindo a aumentar com aproximadamente 14 milhões de novos casos em 2012. Além disso, é expectável que o número de novos casos aumente em cerca de 70% nos próximos 20 anos. Englobando todas as suas apresentações, o cancro é a segunda causa de morte no mundo e foi responsável por 8.8 milhões de mortes em 2015, o que quer dizer que ao todo, uma em cada seis mortes teve como causa o cancro. Mais ainda, as taxas de mortalidade têm vindo a aumentar em vários tipos de cancro, especialmente os mais fatais como o pâncreas e o fígado. Pulmão, próstata, colo-rectal, estômago e fígado são os tipos de cancro mais comuns nos homens, enquanto que mama, colo-rectal, pulmão, colo do útero e estômago são os tipos mais comuns nas mulheres. Por todos estes motivos, o impacto económico do cancro é massivo e tem vindo a crescer. O total do custo económico anual em 2010 foi estimado em aproximadamente 1.16 triliões de dólares. (1) (2)

Cancro é um conceito abrangente utilizado para designar uma série de doenças, que podem ser caracterizadas por uma proliferação anómala de células que crescem indiscriminadamente e incontrolavelmente para além das suas fronteiras, invadindo partes do corpo contíguas ou até mesmo locais mais longínquos: algumas células podem ser transportadas até órgãos distantes do tumor original pelo sistema sanguíneo ou linfático, processo este designado por metastização. As metástases, definidas pelo crescimento desenfreado em qualquer parte do corpo, são a principal causa de morte devido a estas patologias. Vários pontos dentro desta definição necessitam ser enfatizados, sendo um deles o facto de o cancro ser considerado um grupo de doenças. Mais de 100 tipos de cancro foram classificados. (2) (3)

O cancro possui uma forte componente genética, ou seja, é causado por modificações nos genes que determinam a forma como as células funcionam. O cancro de cada doente tem uma combinação específica de mutações, até mesmo dentro do mesmo tumor podem existir diferentes alterações genéticas. Estas mutações continuam a ocorrer ao longo do tempo, à medida que o tumor se desenvolve, esta particularidade de acumulação ao longo do tempo explica porque existe um aumento do risco de cancro com a idade e o porquê do cancro se ter tornado mais proeminente ao longo das

décadas com o aumento da esperança média de vida. Quanto mais o Homem como espécie e o ser humano como indivíduo vivem, mais tempo existe para acumulação de mutações que podem levar ao cancro. (3) (4)

Assim sendo, pode ser constatado que existe uma grande variedade de tipos e subtipos de cancro, bem como dos processos nos quais está subjacente a carcinogénese, e que por esta razão o cancro em geral é uma grande preocupação da comunidade médico-científica. Existe uma necessidade crescente de compreender a doença e de transpor os conhecimentos obtidos em terapias competentes e ajustadas a cada cancro individual. Numa nova era de ciências e tecnologias do genoma em que as mutações causadoras de cancro podem ser utilizadas como biomarcadores para tomar decisões clínicas, tornou-se clara a vantagem que pode ser retirada deste tipo de informação. (4) (5)

O Projeto Genoma Humano foi responsável por uma grande evolução no desenvolvimento de novas tecnologias de sequenciamento. Este projeto consistiu num esforço internacional coordenado para o mapeamento do genoma do Homem e desencadeou o impulso para a obtenção de meios de diagnóstico e de tratamento inovadores e diferenciados para muitas doenças e condições, como o cancro, a obesidade, o alcoolismo, o HIV, a hipertensão, doenças metabólicas e doenças autoimunes. (6)

Mais recentemente, o International Cancer Genome Consortium foi organizado para coordenar estudos genómicos para a caracterização e sequenciamento de várias centenas de tumores e disponibilizar os dados da pesquisa para toda a comunidade científica. Os dados reunidos permitiram disponibilizar informações relevantes para a compreensão dos mais variados processos de carcinogénese e levar a um aperfeiçoamento das estratégias de descoberta de fármacos para estas patologias. Aumentar o conhecimento acerca das particularidades do genoma de uma célula tumoral e perceber como esta difere de uma célula normal fornece os detalhes necessários para o desenvolvimento de medicamentos mais poderosos e direcionados. Uma das descobertas mais reveladoras ao estudar os perfis genómicos do cancro é que cada tumor individual é único e detentor de uma especificidade característica. Esta pedra basilar que se retira do estudo da genómica do cancro está a guiar a descoberta de novos fármacos anticancerígenos na direção da medicina personalizada. (5) (7)

Para que o tratamento seja efetuado de uma forma adequada e eficaz é muito importante um diagnóstico certo, uma vez que cada tipo de cancro exige um regime de tratamento particular. Este pode integrar radioterapia, quimioterapia, cirurgia,

terapêutica hormonal, imunomodulação ou mais do que uma destas modalidades em conjugação. A determinação dos objetivos de tratamento e dos cuidados paliativos constituem o aspeto crucial na deliberação do esquema terapêutico, uma vez que a principal finalidade é curar o cancro ou prolongar a vida, mantendo a sua qualidade na medida do possível. A decisão da terapêutica deve ser discutida tendo como base o doente e o seu tumor em particular, sendo que cada vez mais se compreende a necessidade de um tratamento personalizado, especialmente neste conjunto de doenças tão diversificado que é o cancro. (2)

## **Fármacos Híbridos – Compostos inovadores**

A terapia antitumoral existente, desenvolvida ao longo de muitos anos de pesquisa e fruto de um esforço conjunto da comunidade científica é ainda escassa para dar resposta a todos os problemas relacionados com o tratamento deste conjunto de patologias. A estratégia de eleição para erradicar células tumorais é a cirurgia, contudo esta não é adequada para inibir ou erradicar células metastizadas. Nestes casos as metodologias utilizadas são a quimioterapia e a radioterapia, que têm como grande desvantagem a falta de seletividade para as células tumorais. Existe assim, uma necessidade de compreender as diferenças entre células normais e mutadas a nível molecular, a fim de identificar alvos específicos nas células cancerígenas. Apenas assim será possível conceber terapêuticas específicas para células tumorais, aumentando a sua eficácia e diminuindo os efeitos secundários. Por esta razão é necessário aspirar a um futuro em que os fármacos antitumorais sejam cada vez mais eficientes. (8) (9)

O uso combinado de dois ou mais agentes tem demonstrado uma importância crescente em quimioterapia. Esta terapêutica combinada, em que dois ou mais fármacos são administrados simultaneamente ao doente, revelou uma menor probabilidade de causa de resistência tendo como comparação a administração de fármacos isolados. A principal explicação para este facto prende-se com a questão da sinergia, onde a combinação de fármacos é mais eficiente do que seria esperado pela adição da atividade de cada fármaco. Espera-se assim, que possa existir uma diminuição da dose administrada e assim, a obtenção de uma janela terapêutica com um maior índice de segurança. (10) (11)

De forma a melhorar a eficiência do uso da farmacoterapia combinada, tem vindo a ser explorada uma nova abordagem: os compostos híbridos. O conceito de farmacóforo foi introduzido pela primeira vez por Ehrlich, este, é definido como uma estrutura molecular que transporta a característica essencial responsável pela atividade biológica. (12) Esta nova classe de compostos terapêuticos que incorpora na mesma molécula dois ou até mais farmacóforos, pode ser desenvolvida com diferentes propósitos. Podem ter o objetivo de contrabalançar os efeitos negativos associados à outra parte do híbrido, amplificar os seus efeitos, ou até mesmo modularem vários alvos biológicos em simultâneo e atuarem por mais do que um mecanismo de ação. Além disso uma parte do composto pode atuar como transportador e dirigir o fármaco para o local de interesse. (13) (14)

Como resultado, existe cada vez mais um interesse renovado na descoberta de agentes terapêuticos que abordem mais do que um alvo biológico ao mesmo tempo. Esta funcionalidade demonstra utilidade em doenças multifatoriais, tais como as doenças metabólicas, distúrbios neurodegenerativos, HIV e cancro. A modulação simultânea de múltiplos alvos pode ser alcançada pela combinação de vários medicamentos com diferentes mecanismos ou através de uma única entidade química que pode modular vários alvos numa doença multifatorial: os compostos híbridos. (10) (15)

O desenvolvimento de medicamentos antitumorais efetivos que possuam reduzida incidência de efeitos secundários, toxicidade diminuída para células saudáveis e baixa resistência a medicamentos constitui uma prioridade no tratamento contra o cancro. É exatamente para ir ao encontro a estas aspirações que cada vez mais são utilizadas combinação de fármacos que possuam expressão ao nível de vários alvos simultaneamente e, que por esta razão, apresentem vantagens em doenças complexas. Para esta finalidade, são utilizados esquemas de tratamento em que vários fármacos citotóxicos são associados. Estes demonstram melhores resultados com menos efeitos secundários, do que terapêutica citotóxica utilizando apenas um agente isolado. O inconveniente destes tratamentos combinados é o facto de por vezes se tratarem de esquemas complexos e muito confusos, comprometendo assim, a adesão à terapêutica por parte do doente. As moléculas híbridas demonstram mais vantagens quando comparadas com uma administração combinada de fármacos isolados. Se esta espécie de novos fármacos for produzida de forma apropriada, os compostos híbridos poderão vir a traduzir-se numa série de vantagens relativamente à terapêutica combinada de fármacos. Pode existir uma melhoria dos perfis de afinidade e seletividade, uma atividade antitumoral mais potente, um perfil de toxicidade mais adequado, formulação mais simples, melhoria na adesão à terapêutica por parte do doente e ainda a criação

de novas propriedades farmacológicas. Desta forma pode dizer-se que os compostos híbridos antitumorais possuem enorme potencial, uma vez que prometem melhorar o perfil farmacocinético e farmacodinâmico dos fármacos que lhes deram origem. (14) (15)

## **Metodologia para síntese de fármacos híbridos**

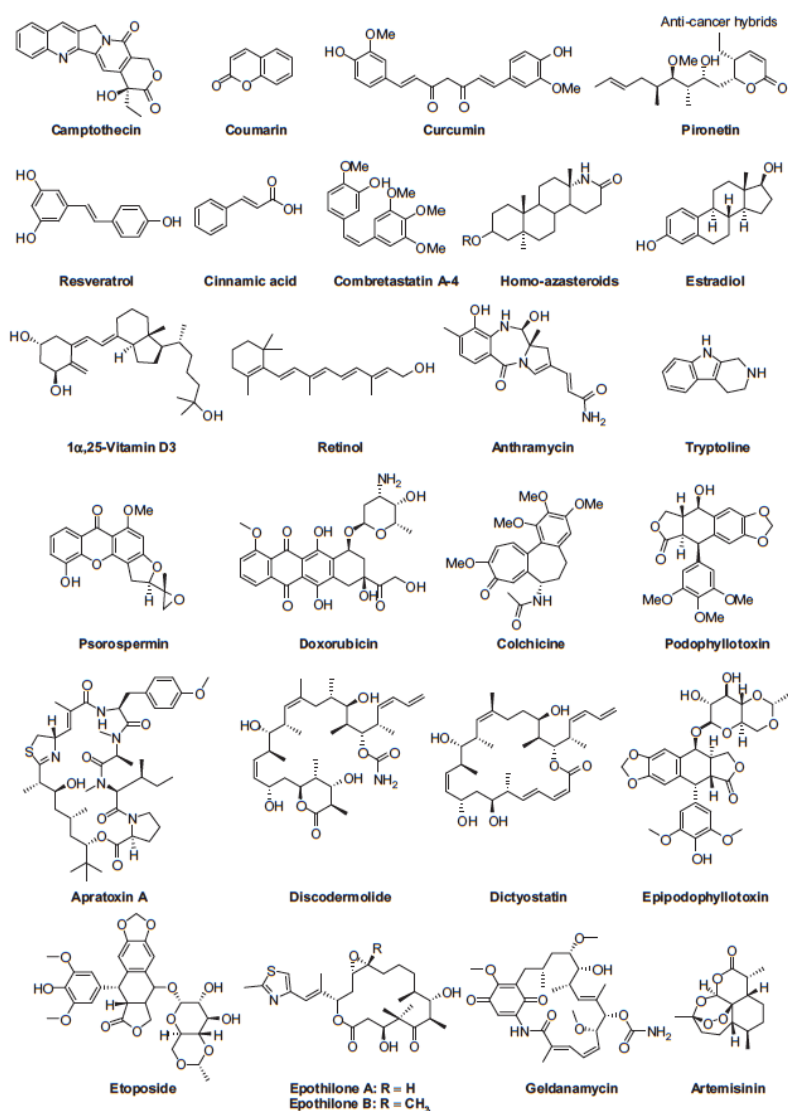
A hibridação molecular é um conceito inovador de desenvolvimento de novos fármacos para a produção de compostos com características superiores aos compostos que lhes deram origem. É uma estratégia de design de fármacos em que a molécula obtida retém algumas particularidades vantajosas dos fármacos originais. (11) A hibridação é comparável à terapêutica combinada tradicional, com a ressalva que as duas moléculas se encontram ligadas de forma covalente numa única entidade molecular. (16)

À primeira vista trata-se de um conceito simples, uma vez que podem ligar-se na mesma molécula dois ou até mais compostos/fármacos antitumorais já conhecidos, sem necessidade de pesquisa de novos compostos revolucionários. Contudo, pode ser mais complexo do que isto uma vez que existem algumas questões a considerar. É necessário compreender que estão a ser combinadas características que têm expressão e utilidade a nível individual, e que estas podem ou não ser mantidas quando combinadas na mesma molécula. Um destes exemplos é a alteração das estruturas químicas primárias de ambos os compostos para permitir a hibridação, esta não pode resultar na perda de atividades por parte dos farmacóforos. Ou seja, tem que ser efetuada uma otimização prévia dos componentes a hibridar, de forma a que sejam preservados os seus perfis de afinidade e atividade direcionados para os alvos terapêuticos em questão. Para além deste fator a ter em consideração quando se faz a hibridação de fármacos, é necessário compreender que os compostos individuais podem atuar em patamares de concentração muito diferentes, como por exemplo uma molécula em concentração micromolar e outra em nanomolar, enquanto que um híbrido usualmente requer atividades em concentrações no mesmo espectro de grandezas. Sendo assim, esta nova ferramenta de design de fármacos antitumorais pressupõe uma preparação prévia exaustiva, nomeadamente ao nível de um estudo antecipado do potencial de hibridação dos compostos. (13) (14)

A seleção de dois (ou mais) fármacos iniciais para a hibridação, baseia-se no seu efeito sinérgico observado ou esperado. Este tipo de compostos pode ser desenvolvido com diferentes propósitos. Podem ter o objetivo de contrabalançar os efeitos negativos associados ao outro composto constituinte do híbrido ou amplificar o seu efeito através

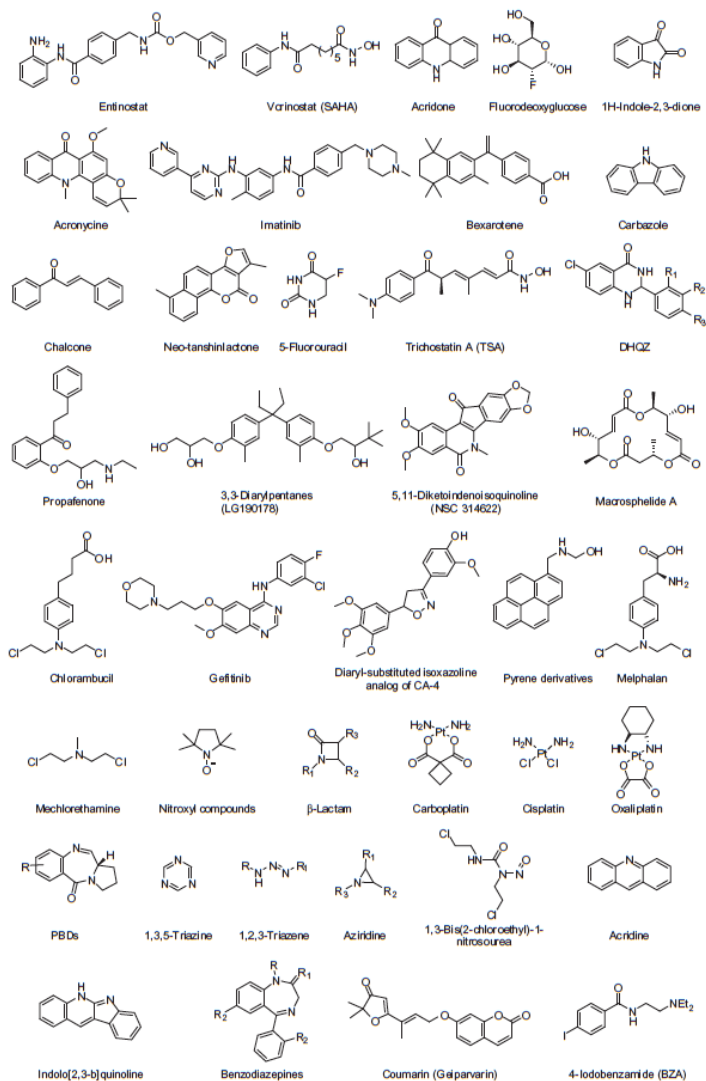
da ligação a outro alvo biológico, ou até mesmo interagir com múltiplos alvos a partir de uma única molécula, diminuindo o risco de interações fármaco-fármaco e minimizando a resistência a fármacos. (17) (18)

As moléculas naturais voltaram a ter uma importância fundamental no desenvolvimento de compostos antitumorais, justificando novos investimentos do setor farmacêutico. A diversidade molecular deste tipo de compostos faz com que estas sejam os protótipos ideais para fármacos híbridos sintéticos e semissintéticos. (19) (20) Alguns produtos naturais possuem vantagem por possuírem uma toxicidade mais baixa como a Curcumina, o Calcitriol, o Retinol, e o Resveratrol. Por outro lado, produtos naturais que possuem uma toxicidade mais elevada como a Combretastatina e Camptotecina também estão a ser muito utilizados para a produção de compostos híbridos. (Figura 1) (15)



**Figura 1 – Fármacos naturais utilizados para síntese de compostos híbridos (15)**

Uma vez que os compostos naturais têm um processo de recolha complexo que pode ser dispendioso em termos de custo e de tempo, os compostos sintéticos são importantes alternativas para a criação de compostos híbridos. (Figura 2) (15)



**Figura 2 – Fármacos sintéticos utilizados na síntese de compostos híbridos (15)**

Após a seleção dos fármacos citotóxicos a serem incorporados num único fármaco, o passo seguinte é combiná-los. Existem dois métodos principais para a construção de moléculas híbridas antitumorais. A primeira abordagem combina duas ou mais moléculas de fármacos completos e na segunda são utilizados apenas os seus farmacóforos. Em ambas as hipóteses as estruturas podem ser ligadas diretamente,

onde os dois fármacos podem sofrer um processo de fusão ou serem incorporados um no outro, ou por intermédio de um ligando (*linker*) que pode ser rígido ou flexível, clivável ou não. O formato que utiliza um linker clivável vai possuir uma libertação das moléculas dependente de determinadas condições enzimáticas ou fisiológicas que predominam no local de ação. (21) (22) O objetivo primordial do uso de um *linker* é criar um vínculo entre as duas moléculas e modular a libertação dos fármacos individuais *in vivo*. (13) Todas estas opções podem ser observadas na figura 3. (22)

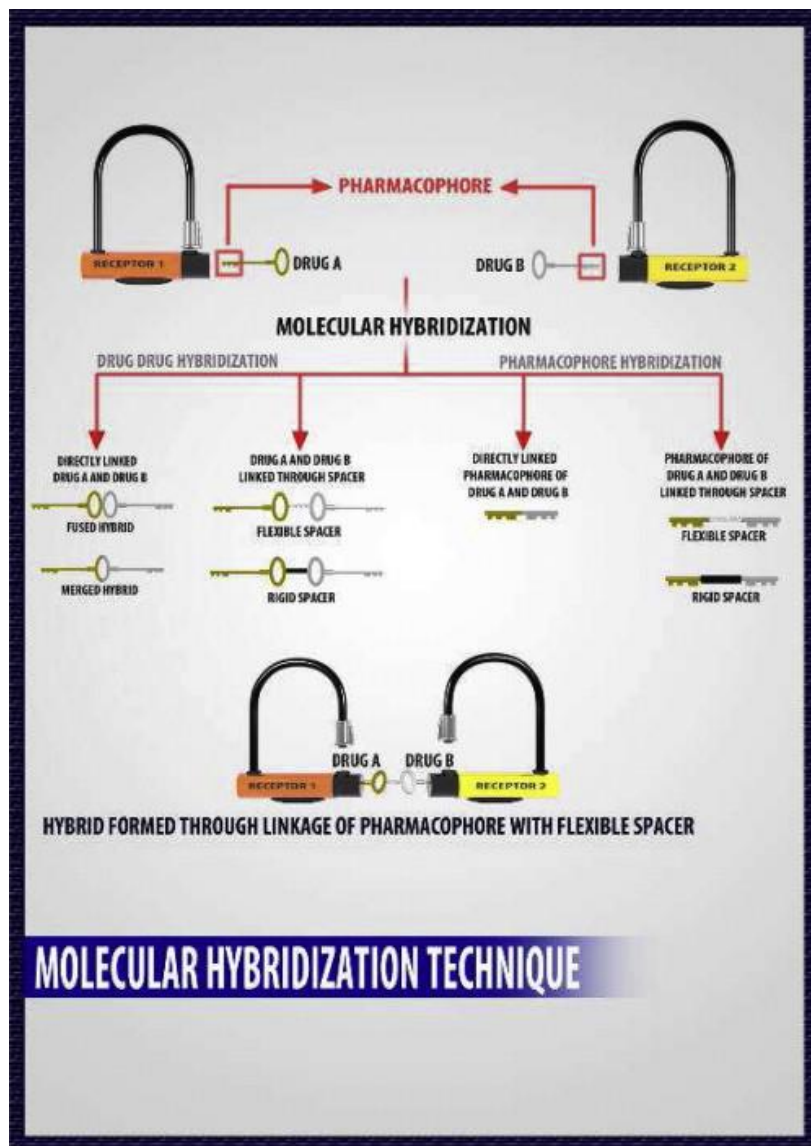
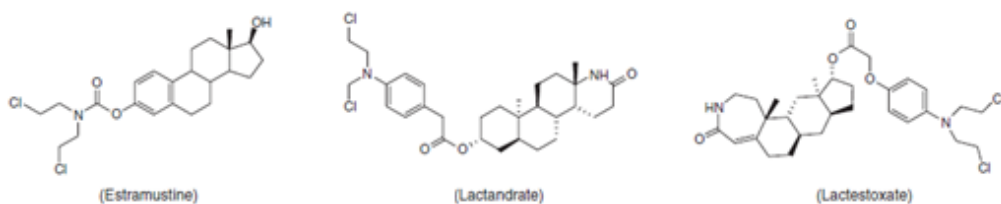


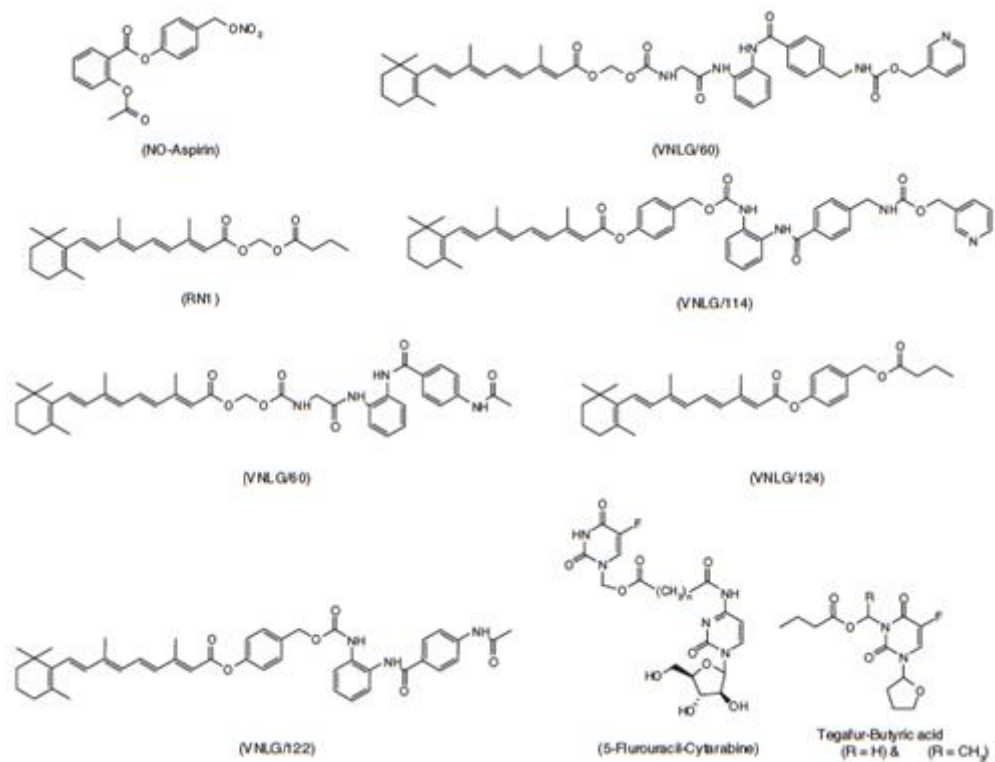
Figura 3 - Técnicas de hibridação molecular (22)

Nesta secção serão exemplificados fármacos sintetizados com as metodologias descritas acima. Fármacos híbridos diretamente ligados são conectados através de um grupo funcional de cada molécula. O principal exemplo deste método é a estramustina. (figura 4). (14)

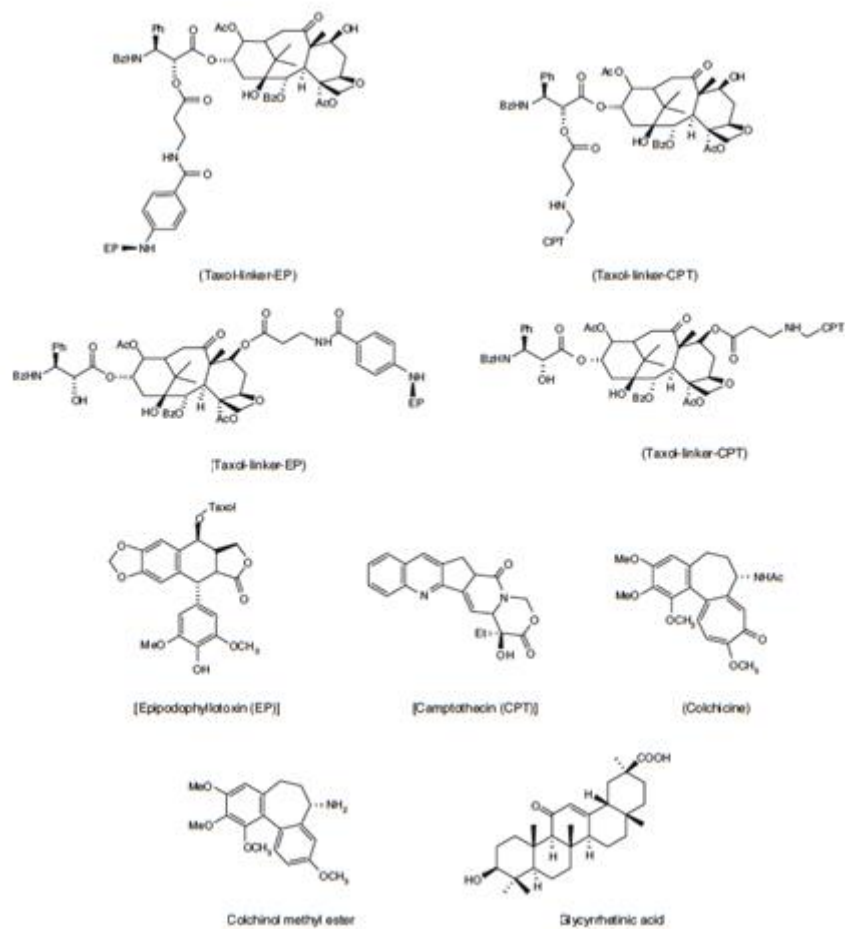


**Figura 4 - Fármacos híbridos ligados diretamente** (14)

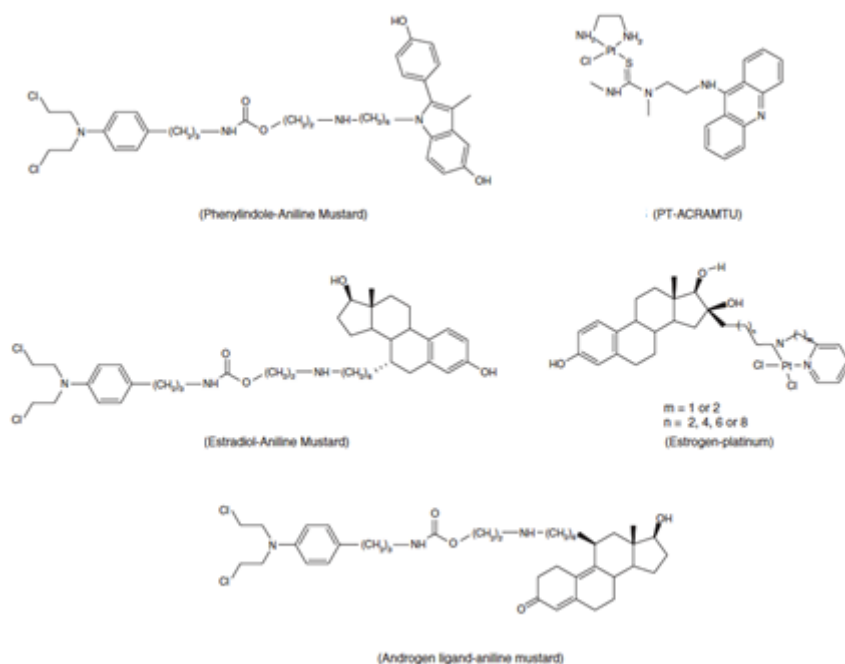
O método mais prevalente para síntese de compostos híbridos antitumorais, até ao momento, é aquele em que são utilizados *linkers*. Destes, os conjugados com *linkers* cliváveis possuem na sua maioria uma ligação éster, possuindo a capacidade de serem clivados pelas numerosas esterases presentes no plasma de forma a libertar os fármacos individuais para agirem isoladamente. Vários híbridos deste tipo são exemplificados nas figuras 5 e 6. Além destes, existem ainda compostos híbridos conectados por ligações químicas não hidrolisáveis, os chamados *linkers* não-cliváveis, detentores de estabilidade tanto do ponto de vista químico como enzimático (figura 7). (14)



**Figura 5 - Compostos híbridos com linker clivável (14)**

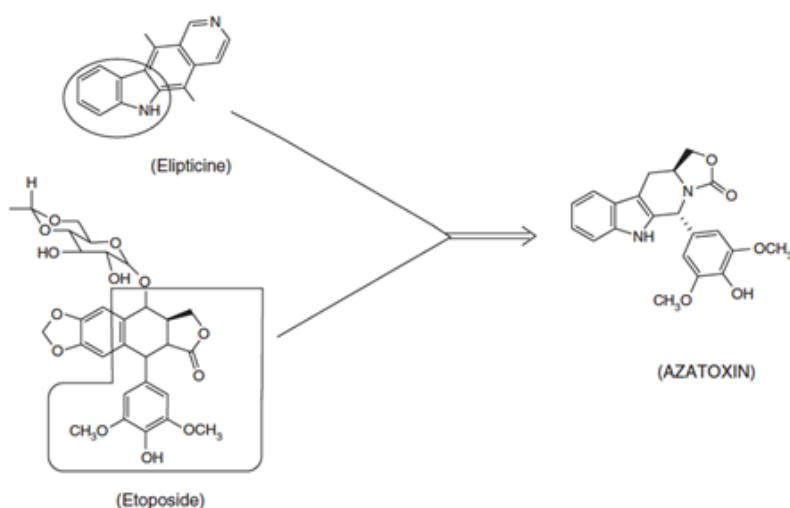


**Figura 6 - Compostos híbridos de paclitaxel com linker clivável e fármacos que lhes deram origem (14)**



**Figura 7 - Compostos híbridos com linker não-clivável** (14)

Fármacos híbridos sobrepostos ou incorporados um no outro possuem algumas variações em relação aos fármacos a partir dos quais foram gerados, especialmente ao nível da estrutura, o que poderá influenciar também os seus valores de atividades. Consoante a estrutura do composto final, este pode reter as propriedades funcionais de qualquer um dos fármacos originais ou de ambos. Existem vários compostos sintetizados desta forma, sendo a produção de um composto do género exemplificado na figura 8. (14)



**Figura 8 - Esquema descritivo do design de um composto híbrido sobreposto**

(14)

## Objetivo

Esta dissertação tem como objetivo entender e discutir a atividade antiproliferativa de algumas moléculas híbridas antitumorais, bem como os seus mecanismos de ação, as suas aplicações e fazer uma análise aos tipos de design que estão a ser utilizados para produzir tais moléculas.

É ainda necessário compreender que tipos de vantagens os fármacos híbridos acrescentam ao imenso universo que é a descoberta e desenvolvimento de fármacos antitumorais e, se a enorme atração, que este campo tem sido alvo por parte de cientistas de todo o mundo é justificada.

Finalmente, como não poderia deixar de ser é preciso falar dos desafios e perspetivas para o futuro do processo de desenvolvimento de fármacos híbridos antitumorais.

## Materiais e Métodos

Para a realização desta dissertação foi efetuada uma pesquisa utilizando várias bases de dados, revistas e editores online científicos, sendo os mais relevantes a *MedLine*, *PubMed*, *ResearchGate*, *Nature.com*, *link.Springer.com*, *Elsevier.com* e *pubs.ACS.org*.

Foram selecionados todos os artigos científicos, *expert opinions* e artigos de revisão cujo título ou resumo foi considerado relevante no contexto da revisão em causa. De seguida procedeu-se à obtenção dos artigos em texto integral. Esta recolha foi efetuada entre Abril e Setembro do ano 2017.

As pesquisas foram realizadas com a utilização de palavras-chave específicas como “*hybrid compounds*”, “*hybrid drugs*”, “*multitargeted-directed compounds*”, “*bi-functional compounds*”, “*multifunctional ligands*”, “*dual-acting compounds*”, “*chimeras*” com adição de outras mais gerais como “cancro”, “terapêutica antiproliferativa”, “fármacos antitumorais”, entre outros. Foram também realizadas pesquisas através da opção “*related articles*” disponibilizados nos vários sites.

Uma vez que se trata de um tema recente não foram colocados quaisquer critérios de exclusão a nível de linha temporal.

# Híbridos Antitumorais

Nos últimos anos tem existido um interesse crescente por este tipo de tecnologia de descoberta de novos fármacos. Vários autores têm utilizado a hibridação de fármacos para desenvolver novas e promissoras alternativas à quimioterapia convencional. (14) (15) (21) (23) (10) (22)

Estas equipas de investigadores dedicam-se a pesquisar compostos com interessante potencial citotóxico e outras ações farmacológicas, como por exemplo modulação hormonal para servirem de modelos para os fármacos híbridos. Depois de sintetizados vários compostos, estes são analisados e discutidas as suas vantagens.

Assim, pode ser encontrada uma panóplia de novos compostos que ainda não tem expressão a nível de prática clínica, mas que mostram resultados animadores e atualmente alguns já se encontram em ensaios clínicos ativos. Nos próximos anos espera-se que alguns destes candidatos a fármacos híbridos obtenham AIM.

Neste momento o único fármaco híbrido aprovado é a estramustina, que apesar de não se tratar de uma novidade continua a ser muito utilizada. (24) Para além da estramustina neste trabalho são abordados alguns fármacos híbridos que demonstram potencial no campo do cancro.

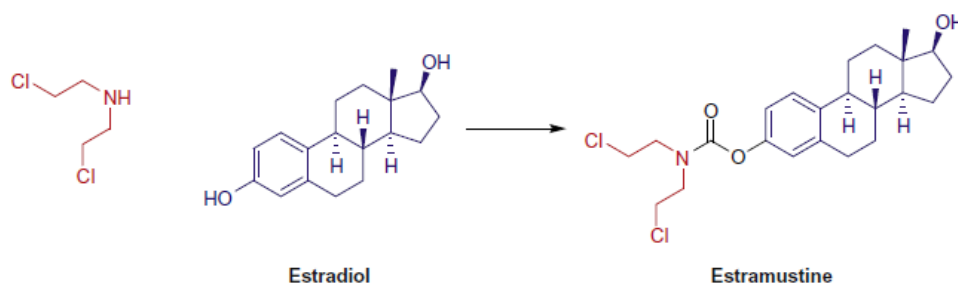
## Estramustina

O fosfato de estramustina foi o primeiro fármaco híbrido antitumoral a obter autorização de introdução no mercado em 1981 pela FDA. A 29 de Outubro de 1982 obteve AIM em Portugal e desde aí é comercializado sob o nome comercial *Estracyt*. É a única molécula híbrida a ser utilizada atualmente na prática clínica para o tratamento do cancro. (25) (24)

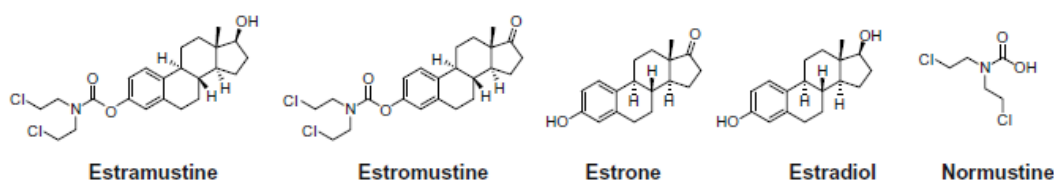
Este fármaco apresenta indicação terapêutica em carcinomas prostáticos em estadios avançados, particularmente em doentes com tumores, que não responderam ao tratamento hormonal e como terapia primária em doentes com prognóstico desfavorável ao tratamento hormonal. (25)

O fosfato de estramustina é um pró-fármaco, que é convertido no trato gastrointestinal a estramustina. A estramustina é metabolizada em estromustina que é o principal metabolito presente em circulação. A estramustina e a estromustina são posteriormente

metabolizadas nos estrogénios correspondentes: o estradiol e a estrona. Tanto a estramustina como a estromustina possuem atividade citotóxica. Assim sendo, os metabolitos encontrados em maior quantidade no plasma são a estramustina, a estromustina, o estradiol e a estrona (figuras 9 e 10). (25)



**Figura 9 - Estrutura da estramustina e dos compostos que lhe deram origem (15)**



**Figura 10 - Estrutura dos metabolitos ativos da estramustina (15)**

É um composto híbrido sintético, na medida em que combina estradiol e a normustina, uma mostarda azotada, através de um carbamato. A principal função do estradiol é direcionar o fármaco híbrido, ou seja, baseia-se no conceito que um transportador encaminha um agente citotóxico até ao local de ação onde este será libertado, tendo como objetivo a diminuição de efeitos sistémicos secundários indesejáveis. Apesar de o objetivo desta combinação ter sido a melhoria do transporte do agente citotóxico para células da próstata cancerígenas sensíveis ao estradiol, *in vivo* a estramustina parece não atuar como agente alquilante. As mostardas azotadas possuem um mecanismo de ação citotóxica baseado no seu efeito alquilante, contudo neste caso verificou-se a criação de um novo mecanismo, uma vez que este fármaco possui um efeito anti-mitótico. (15) (26) (27)

Segundo o RCM do *Estracyt* comercializado pela *Pfizer* o fosfato de estramustina é descrito como um fármaco antitumoral com um duplo mecanismo de ação. A estrona e o estradiol apresentam actividade anti-gonadotrófica, originando uma redução nos

níveis de testosterona, efeito similar ao observado após castração cirúrgica. A estramustina e a estromustina possuem um efeito disruptor dos microtúbulos nas células tumorais. Este efeito é provocado pela inibição da formação de microtúbulos na metáfase e de uma diminuição de microtúbulos na interfase. (25)

A estramustina pode assim, ser considerada um marco histórico na tecnologia de desenvolvimento de fármacos híbridos, uma vez que consiste no primeiro fármaco do género a ser comercializado. Mas esta molécula é muito mais do que isto, não se trata de um fármaco obsoleto, uma vez que atualmente continua a ser alvo de estudos para outras indicações que não a acima mencionada.

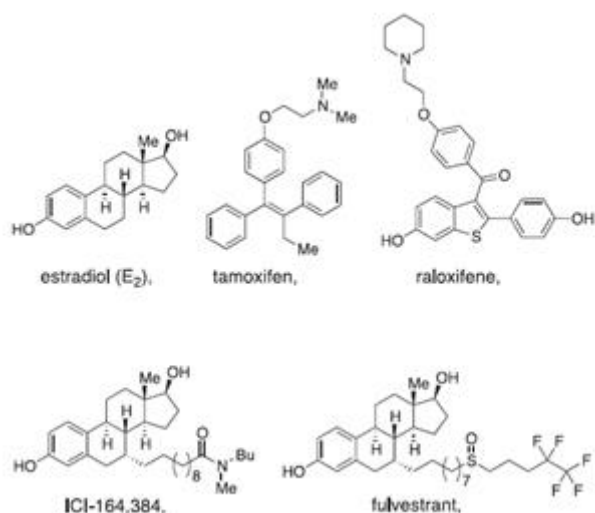
Apesar dos avanços que têm vindo a ser feitos no âmbito do cancro da mama, especialmente na sua deteção precoce, muitos doentes com este adenocarcinoma continuam a desenvolver metástases, e por isso é ainda relevante considerar novas alternativas de tratamento. O fosfato de estramustina demonstrou resultados positivos no tratamento de cancro da mama metastizado e está em ensaios clínicos de fase II para avaliar a sua eficácia em mulheres que possuam cancro da mama metastizado que tenham sido previamente tratadas com inibidores da aromatase e para quem este tratamento tenha falhado. (Identificador *ClinicalTrials.gov*: NCT02866955) (28) Outro ensaio clínico de fase II que se encontra em curso, tem como objetivo avaliar a segurança e os benefícios da combinação da terapia de supressão de androgénios com quimioterapia em homens com cancro da próstata que não responderam a terapia local e não são candidatos a prostatectomia ou radioterapia. O Degarelix é o fármaco bloqueador hormonal que será utilizado e como quimioterapia para além da estramustina também serão avaliados a Doxorubicina, o Cetoconazol e o Docetaxel. (Identificador *ClinicalTrials.gov*: NCT02560051) (29) (15)

## Híbridos de SERM/SERD e HDACi

O cancro da mama é a forma de cancro mais comum nas mulheres. (1) Assim, é compreensível que este continue a ser alvo de estudo principalmente para a descoberta de agentes terapêuticos cada vez mais evoluídos que possuam os melhores benefícios clínicos possíveis combinados com o mínimo de toxicidade secundária.

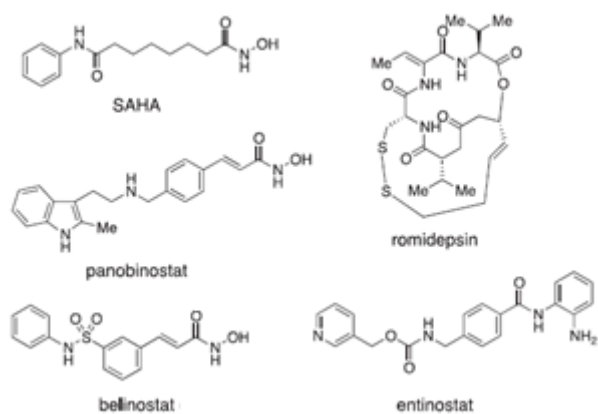
Em 2015 um grupo de investigadores da Universidade de Montréal e Universidade McGill liderados por Mendonza-Sanchez sintetizou e avaliou uma série de compostos híbridos de SERM/SERD e HDACi. (30)

Os estrogénios em geral e o estradiol em particular possuem uma função preponderante no controlo de algumas características relacionadas com a maturação sexual feminina, como por exemplo o desenvolvimento normal de tecido mamário. Em tumores hormono-dependentes, que representam cerca de 3/4 de todos os cancros de mama, os recetores de estrogénio sofrem sobre-expressão, representando assim a sua estimulação estrogénica uma grande contribuição para a carcinogénese mamária. Deste modo os recetores de estrogénio apresentam-se como um alvo relevante no tratamento destas patologias. Existem duas classes principais de inibidores competitivos de recetores de estrogénio: SERM – Moduladores seletivos de recetores de estrogénio (exemplificados pelo Raloxifeno e pelo Tamoxifeno) e os antiestrogénios puros SERD – Reguladores negativos seletivos de recetores de estrogénio (exemplificados pelo Fulvestrant e pelo ICI-164,384). Os SERM demonstram efeito antagonista (anti-estrogénico) em células do cancro de mama, mas efeitos agonistas (estrogénico) no útero e no tecido ósseo. Por outro lado, antiestrogénios puros como o Fulvestrant são antagonistas em todo o tipo de tecidos. Apesar destes fármacos terem revolucionado o tratamento do cancro da mama ainda existe a necessidade de terapêuticas melhoradas. Na figura 11 está representada a estrutura do estradiol e de alguns SERM e SERD. (30)



**Figura 11 - Estrutura do estradiol , SERM e SERD (30)**

As histona-deacetilases e histona-acetiltransferases regulam a acetilação das histonas e de outras proteínas, que por sua vez regulam a compactação e descompactação da cromatina para promover ou reprimir a sua transcrição, possuindo assim um papel preponderante na regulação de genes envolvidos no controlo do ciclo celular. A expressão aberrante destas proteínas tem sido observada em tumores hematológicos e tumores sólidos incluindo o cancro da mama. Recentemente, os inibidores destas proteínas – HDACi têm surgido como potenciais agentes terapêuticos anti-tumorais. Alguns HDACi obtiveram AIM nos últimos anos como o Vorinostat (também conhecido como SAHA), Romidepsina, Belinostat para linfomas e Panobinostat para o mieloma múltiplo. Na figura 12 apresentam-se as estruturas de alguns HDACi. (30) (31)

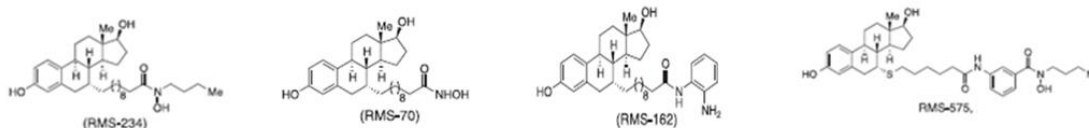


**Figura 12 - Estrutura de inibidores da histona-deacetilases (30)**

Alguns estudos demonstraram que os HDACi em monoterapia apresentam resultados clínicos muito limitados em doentes com tumores sólidos. (32) (33) Nestes estudos os HDACi foram combinados com outras terapias para o tratamento do cancro como agentes citotóxicos, radioterapia, terapia hormonal, entre outros. O Tamoxifeno em combinação com diferentes HDACi funcionam de uma forma sinérgica na supressão da proliferação celular em cancro de mama hormono-dependente.(30) (31) Outro estudo demonstrou que a combinação de SAHA com Fulvestrant é mais potente a regular os recetores de estrogénio em células de adenocarcinoma mamário do que o Fulvestrant em monoterapia. (30) (34)

Embora a terapêutica de combinação de fármacos seja o método mais usual para serem observados os efeitos benéficos de dois fármacos diferentes, o grupo de cientistas da Universidade de Montréal e Universidade McGill decidiu examinar a hibridação de SERM/SERD com HDACi numa única molécula. Neste ensaio foram testadas quatro moléculas híbridas baseadas em estruturas de ICI-164,384 e Fulvestrant potencialmente úteis no tratamento de adenocarcinoma mamário. (30)

Foram sintetizados 4 fármacos híbridos: RMS-70, RMS-162, RMS-234 e RMS-575 possuindo como esqueleto o ICI-164,384, com alteração da cadeia lateral para abranger um grupo para ligação com o zinco do local de ação, resultando no aumento de atividade HDACi, enquanto mantiveram atividade anti-estrogénica. A estrutura destes híbridos é representada na figura 13. Posteriormente foram avaliadas as atividades anti-estrogénica, inibidora de histona-deacetilases e antiproliferativa. (30)



**Figura 13 – Estrutura de híbridos HDACi e SERM/SERD (30)**

Na avaliação da atividade anti-estrogénica foram utilizados como comparadores o ICI-164,384 e o 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT). No ensaio BRET o híbrido RMS-575 demonstrou o melhor efeito antagonista e no ensaio da luciferase apesar de nenhum dos híbridos ser mais potente do que qualquer um dos padrões, todos os híbridos

apresentaram forte atividade anti-estrogénica com o RMS-575, mais uma vez, a ser o mais potente. (30)

Em relação à avaliação de inibição de HDAC apesar de terem demonstrado uma potência mais fraca do que ambos os padrões: SAHA e Entinostat, todos os híbridos apresentaram atividade inibitória contra HDAC3, sendo o RMS-70 o mais potente. Contra o HDAC6, apenas o RMS-70 possui uma potência dentro da magnitude do SAHA, enquanto que os outros híbridos são significativamente menos potentes. (30)

No que diz respeito à atividade antiproliferativa, os compostos híbridos apresentaram atividade tanto para linhagens celulares ER positivas como para ER negativas, esta última atividade devido à integração da função HDACi nas moléculas, uma vez que os antiestrogénios não tem atividade contra linhagens ER negativas. O composto RMS-575 apresentou os valores mais promissores neste campo. (30)

Dos quatro híbridos estudados alguns demonstraram maior potencial do que outros, sendo necessários novos ensaios para melhorar a afinidade para cada alvo, ou até mesmo para produzir novos híbridos que possuam estas duas valências, mas que detenham níveis de atividade antiproliferativa ainda mais forte. Ficou bem explícito que fármacos que associem características inibitórias de histona-deacetilases a atividade antiestrogénicas possuem bastante relevância para o tratamento do cancro da mama. O potencial de HDACi, até agora apenas utilizados em tumores hematológicos, é aumentado com a adição de atividade antiestrogénica, o que promove a sua utilização potencial em adenocarcinomas mamários.

## Conjugados de Paclitaxel e Camptotecina

O Paclitaxel (TXL) e a Camptotecina (CPT) são ambos agentes antitumorais atualmente em uso clínico.

O Paclitaxel foi aprovado pela FDA para o tratamento de cancro nos ovários em 1992 e para o tratamento do cancro da mama em 1994. Trata-se de um agente antimitótico derivado de um composto natural, isolado a partir da casca de teixo. Este composto possui um mecanismo citotóxico muito particular. *In vivo* liga-se à subunidade  $\beta$  da tubulina e promove a sua polimerização, o que vai estabilizar os microtúbulos. Esta estabilização é responsável por desencadear a apoptose da célula de rápida divisão. (35)

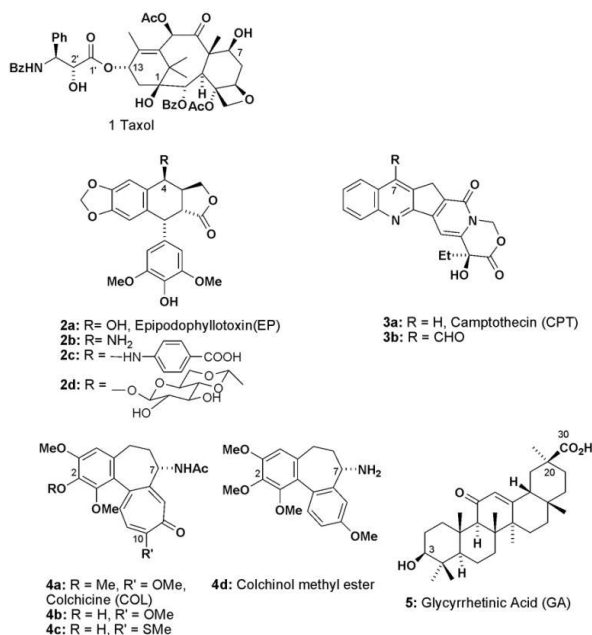
A camptotecina é um alcaloide natural que tem vindo a ser submetido a contínuas modificações estruturais com o objetivo de desenvolver agentes terapêuticos anti-tumorais. Trata-se de uma substância antineoplásica que atua como um inibidor específico da topoisomerase I do ADN. A inibição da topoisomerase pela camptotecina induz lesões na cadeia do ADN bloqueando assim a sua replicação e sendo responsável pela atividade citotóxica. (36)

Apesar de ambos Paclitaxel e Camptotecina possuírem uma atividade anti-tumoral potente, alguns estudos têm demonstrado que tratamentos com estes fármacos podem resultar numa série de efeitos secundários indesejáveis e resistência a fármacos. Desta forma, continua a ser essencial o desenvolvimento de novos agentes com menos efeitos secundários e uma atividade superior. Com este objetivo um grupo de investigadores da Universidade da Carolina do Norte testou a atividade citotóxica de cinco conjugados de Paclitaxel – Camptotecina unidos por um *linker* de éster e imina. (37) Os conjugados demonstraram atividade citotóxica potente, sendo que dois deles apresentaram atividade citotóxica aumentada contra a replicação de células HCT-8 quando comparados tanto com o Paclitaxel como a Camptotecina. Os compostos em que os dois fármacos iniciais foram ligados através de aminoácidos alifáticos demonstrando uma atividade citotóxica superior aos híbridos nos quais o Paclitaxel e a Camptotecina foram conectados através de aminoácidos aromáticos. (37)

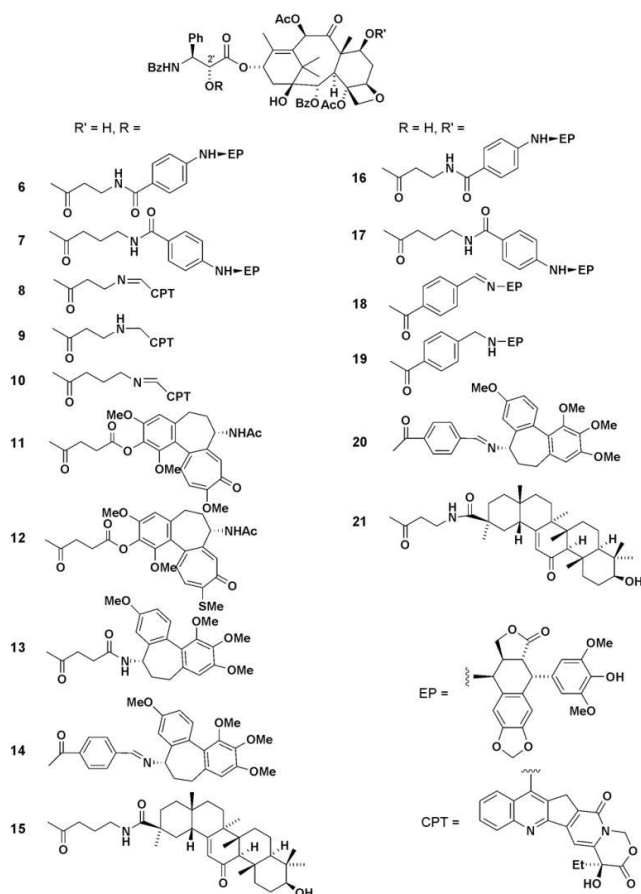
Além disso, neste estudo chegou-se à conclusão que os compostos híbridos sintetizados não possuíam atividade inibitória da topoisomerase I ao contrário do que ocorria com a Camptotecina e o efeito citotóxico superior que foi alcançado em algumas linhagens celulares foi atribuído a um novo mecanismo de ação que se obteve pela conjugação dos fármacos. (37)

Este estudo é demonstrativo do efeito sinérgico que pode ser obtido através da hibridação de fármacos citotóxicos, apesar de alguns mecanismos não se encontrarem totalmente elucidados.

Noutro ensaio realizado por Nakagawa-Goto e colaboradores, quinze diferentes conjugados de Paclitaxel foram sintetizados através da sua ligação a vários compostos antitumorais incluindo Camptotecina e outros como a Epipodofilotoxina (EP), Colquicina (COL) e Ácido Glicirretínico (GA) (figuras 14 e 15). A atividade citotóxica destes conjugados foi analisada em várias linhagens celulares tumorais humanas. Destes resultados, os mais relevantes encontraram-se nos compostos híbridos de TXL-CP [8-10], que apresentaram valores mais expressivos e mesmo mais potentes do que o Paclitaxel (composto 1) - ED50 = 14.8, 3.1, 19.4 nM comparado com 55.5 nM em células de carcinoma da próstata humano PC-3. Além disso, estes híbridos de TXL-CPT também demonstraram atividade inibitória da angiogénese (tabela 1). Comparados com outros conjugados, as iminas 8 e 10 demonstraram possuir atividade significativa com valores de EC50 0.73 e 0.98 µg/mL, respetivamente. (38)



**Figura 14 – Estruturas de Paclitaxel 1 e outros agentes antitumorais usados em conjugados 3-5 (38)**



**Figura 15 – Estrutura de conjugados 6-21 (38)**

**Tabela 1 – Ensaio inibição da atividade da angiogénese - híbridos de TXL-CPT (38)**

Compound	ED <sub>50</sub> (nM)	Compound	ED <sub>50</sub> (nM)
6	4.93	13	15.8
8	0.73	14	43.0
9	2.09	18	230
10	0.98	20	293
11	13.84	21	150
12	9.33		

Por estas razões, os conjugados 8 a 10 de Paclitaxel e Camptotecina apresentam-se como potenciais candidatos anti-tumorais, particularmente para o cancro da próstata.

## Aplicações Clínicas de Fármacos Híbridos Anti-tumorais

Sendo esta uma nova ferramenta para desenvolver novas entidades químicas para o tratamento do cancro, a hibridação de fármacos está a tornar-se um método cada vez mais notório em todo o mundo. Estes novos compostos têm sido desenhados e sintetizados por vários grupos de cientistas no campo da química medicinal. (15)

Atualmente existem várias estratégias para produção de fármacos que utilizam o conceito de transportador, sendo uma delas a produção de ADCs (conjugados fármaco-anticorpo). Esta combinação tem como objetivo juntar os benefícios de fármacos citotóxicos altamente potentes por um lado e por outro a seletividade aos antígenos tumorais que é conseguida pelo uso de anticorpos. (39) Estes conduzem um agente citotóxico ao local de ação de uma forma segura. Um princípio semelhante tem sido utilizado para formular novos híbridos no combate ao cancro.

Uma característica que distingue células tumorais de células saudáveis é a sobre-expressão de certos recetores e biomarcadores para simplificar a entrada de nutrientes nas células e suportar a proliferação celular acelerada. Um exemplo deste facto é a sobre-expressão de recetores de vitaminas na superfície de células tumorais e, por esta razão, agonistas sintéticos destes recetores ou as próprias vitaminas podem ser utilizados como transportadores para fármacos antitumorais, dirigindo-os especificamente aos locais de ação, contribuindo assim para um aumento da eficácia e para a diminuição de efeitos tóxicos sistémicos. Da mesma forma, os esteroides também podem ser utilizados como transportadores para construir híbridos em adenocarcinomas que sejam hormono-dependentes e transportar fármacos citotóxicos para estes locais. (15)

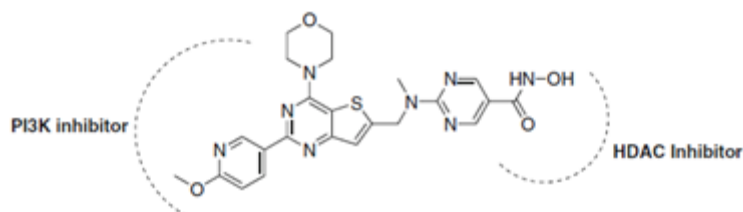
Desta forma, as moléculas híbridas revestem-se de uma série de possibilidades a vários níveis. As hipóteses de combinação são infinitas e as abordagens podem ser da mais variada natureza. Desde as mais simples, em que dois ou mais fármacos com diferentes mecanismos de ação têm como objetivo atuarem em vários alvos; ligação de fármacos citotóxicos a transportadores ou até mesmo contrabalançar os efeitos secundários associados à outra parte do híbrido.

Como já foi discutido, dentro desta classe de fármacos apenas a estramustina obteve AIM. Atualmente, contudo, existem já alguns fármacos com características híbridas que se encontram em várias fases de ensaios clínicos (Tabela 2) (10)

**Tabela 2 - Fármacos que se encontram em ensaios clínicos (15)**

<b>Fármaco</b>	<b>Fase</b>	<b>Laboratório</b>
<b>Estramustina</b>	Aprovado pela FDA	Pfizer
<b>CUDC - 907</b>	Fase I/II	Curis, Inc.
<b>E-3810</b>	Fase I/II	Servier
<b>CUDC -101</b>	Fase I	Curis, Inc.
<b>PLX3397</b>	Fase I/II	Plexxicon Inc.
<b>Curaxina</b>	Fase I	Incuron, LLC

O composto CUDC-907 (figura 16) tem a capacidade de interagir com as fosfoinositídeo 3-cinases e as histona-deacetilases simultaneamente. As PI3-cinases são uma família de enzimas envolvidas em várias funções celulares como o crescimento celular, proliferação e diferenciação. Em vários tipos de cancro estas cinases estão mutadas e encontram-se muito mais ativas, sendo por isso alvos interessantes para fármacos antiproliferativos em cancros com estas características. Este composto encontra-se atualmente ativo em dois ensaios clínicos: fase II para linfoma difuso de grandes células B recidivante ou refratário (Identificador *ClinicalTrials.gov*: NCT02674750) (40) e em fase I para tumores sólidos avançados ou recidivantes (Identificador *ClinicalTrials.gov*: NCT02307240) (41). (10) (15)



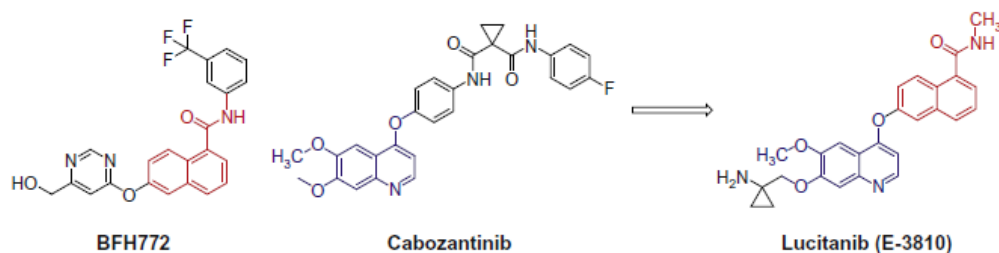
**Figura 16 - Estrutura do CUDC-907 (10)**

Lucitanib (figura 17), também conhecido como E-3810, é um híbrido de BFH-722 e Cabozantinib. É um inibidor múltiplo construído para inibir a ação de vários fatores angiogênicos que permitem que os tumores cresçam. Os alvos são os recetores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR-1) e do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) que são fatores relevantes na angiogénese. O Lucitanib é um fármaco experimental que ainda não se encontra aprovado para o tratamento do cancro. (42)

BFH722 é um potente inibidor do recetor do fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR2) que demonstra potencial terapêutico no tratamento de tumores sólidos e outras doenças onde a angiogénese desempenha um papel relevante. (15)

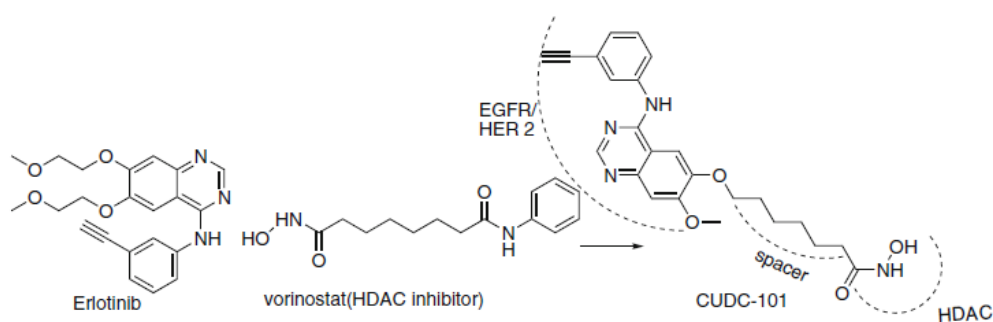
Cabozantinib é um inibidor da c-Met (uma proteína com atividade tirosina cinase) e do VEGFR2. A c-Met, também chamada de proteína tirosina cinase Met ou recetor do fator de crescimento do hepatócito (HGFR), é uma proteína codificada pelo gene MET. A ativação anormal do gene MET em cancro desencadeia a formação de novos vasos sanguíneos (angiogénese), fornecendo nutrientes ao tumor e sendo responsável por alastrar células tumorais para outros órgãos. (42) (43)

O Lucitanib demonstrou fortes propriedades antiangiogénicas assim como atividade antitumoral. Este encontra-se atualmente em ensaios clínicos de fase II em doentes que possuam mutações nos recetores FGF, VEGF, PDGF ou outros marcadores que sejam sensíveis ao Lucitanib (Identificador *ClinicalTrials.gov*: NCT02747797). (44) (15)



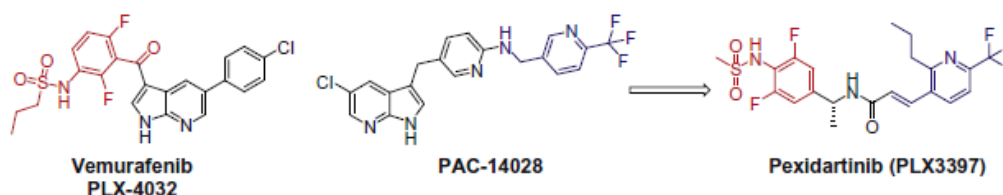
**Figura 17 - Estrutura do Lucitanib (E-3810) (15)**

CUDC-101 (figura 18) é um híbrido de Vorinostat (inibidor das histona-deacetilases) e Erlotinib. O Erlotinib é um inibidor da tirosina cinase do recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR também conhecido como HER1). O EGFR é expresso na superfície das células normais e sobre-expresso em células tumorais. As mutações do EGFR podem conduzir à ativação de vias anti-apoptóticas e de sinalização de proliferação. O Erlotinib bloqueia a sinalização mediada pelo EGFR em tumores que possuam mutações no recetor do fator de crescimento epidérmico. Devido a este bloqueio da sinalização, a proliferação de células é interrompida e a morte celular é induzida através de apoptose. (45) O composto CUDC-101 exibe atividade antiproliferativa superior à maioria dos HDACi *in vitro*. Um estudo de fase I do CUDC-101 encontra-se em curso para tumores na cabeça e pescoço, gástricos, mama, fígado e pulmão de não pequenas células (Identificador *ClinicalTrials.gov*: NCT01171924). (46) (10) (15)



**Figura 18 - Estrutura do CUDC-101 (10)**

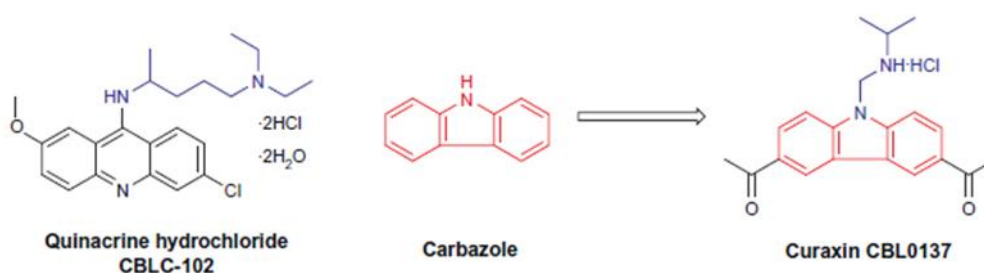
Vemurafenib, é um fármaco aprovado para o tratamento de melanoma metastizado que tem como alvo a enzima BRAF, esta está envolvida na transdução de sinais para o interior das células, que estão diretamente relacionados com o crescimento celular. O Vemurafenib funciona em doentes que possuam uma mutação BRAF, que está presente em mais de metade dos melanomas. O PAC-14028 é um antagonista do TRPV1 que demonstra eficácia numa série de condições como dor inflamatória, dor visceral e doença inflamatória dos intestinos. O Pexidartinib – PLX-3397 (figura 19), um híbrido do Vemurafenib e PAC-14028, liga-se e inibe a fosforilação do recetor do fator de células estaminais (SCF), do recetor do fator estimulador de colónias de macrófagos (CSF1) e da tirosina cinase tipo FMS (FLT3), o que resulta na inibição da proliferação de células tumorais e inibição de macrófagos, osteoclastos e mastócitos envolvidos em cancro ósseo metastizado. Este fármaco foi e continua a ser testado em vários ensaios clínicos, nomeadamente para cancro da próstata avançado resistente a castração (Identificador *ClinicalTrials.gov*: NCT01499043) (47) e glioblastoma recorrente (Identificador *ClinicalTrials.gov*: NCT01349036) (48). Além disso também está a ser testado em combinação com outros fármacos, como por exemplo em ensaio de fase I em combinação com Paclitaxel em tumores sólidos avançados (Identificador *ClinicalTrials.gov*: NCT01525602). (15) (49) (50)



**Figura 19 - Estrutura do Pexidartinib (PLX-3397) (15)**

O Cloridrato de Quinacrina foi originalmente utilizado como antimalárico, mas suplantado pela Quinolina em anos mais recentes. No presente tem sido estudado no tratamento de vários tipos de cancro devido à sua capacidade de inibição da topoisomerase. (51)

A Curaxina (CBL0137) (figura 20) é um híbrido de cloridrato de Quinacrina e carbazol que tem como alvo a ativação do p53, o que origina a apoptose de células tumorais. A Curaxina encontra-se em ensaios clínicos de fase I para neoplasmas sólidos metastizados ou irrecutíveis (Identificador *ClinicalTrials.gov*: NCT01905228). (15) (10) (52)



**Figura 20 - Estrutura da Curaxina (CBL0137)** (15)

## Desafios e limitações

Como é expetável na maioria de tecnologias revolucionárias em ascensão, existem ainda questões gerais que necessitam de ser ultrapassadas no design e desenvolvimento de fármacos híbridos, é por isso necessário reconhecer as suas limitações e desafios para o futuro.

Em teoria, os compostos híbridos apresentam-se como compostos mais fortes a nível farmacológico, quando comparados com fármacos que apenas possuem um alvo. A maioria dos compostos híbridos, devido à sua natureza possuem elevada massa molecular e alta lipofilia, o que segundo a regra de Lipinski afetará a biodisponibilidade oral do fármaco. Assim as propriedades farmacocinéticas destes compostos têm de ser afinadas desde o início para evitar este tipo de problemas. (10) (15)

Outro desafio é a síntese de compostos com *linkers* cliváveis. Sendo este o método de ligação mais utilizado, esta questão reveste-se de grande importância. Assim como noutro tipo de design de fármacos, nomeadamente nos ADC é importante que a estabilidade dos *linkers* permita que os compostos citotóxicos sejam transportados de forma segura até ao local de ação. Se esta questão for comprometida, a mesma irá resultar no aumento de efeitos secundários sistémicos indesejáveis. (14)

Um dos grandes problemas da terapêutica combinada é a existência de interações, esta questão continua a ser relevante no design de compostos híbridos. A natureza e a extensão deste tipo de interações podem ser determinadas através de estudos *in vitro* ou a partir de simulação automatizada em softwares computacionais baseados em algoritmos. Desta forma é importante que estes estudos sejam feitos antes da síntese dos compostos híbridos para compreender se o balanço entre o efeito sinérgico e antagonista é benéfico na construção de tais compostos. (14) (15)

Existe assim, uma grande necessidade em ser executado um estudo prévio aprofundado das propriedades das moléculas separadamente e daquilo que irá representar a sua combinação na mesma estrutura. As variáveis a considerar no design e produção de compostos híbridos são muito vastas.

Finalmente, também deverá ser considerado o facto da maioria destes compostos envolver uma série de passos de síntese intermédios morosos e complexos, o que obviamente se reflete em custos de produção elevados.

Ainda na questão dos custos é relevante discutir o alto investimento que é necessário para que este tipo de compostos obtenha AIM. Tendo em conta os rigorosos requerimentos regulatórios atuais necessários para a aprovação de fármacos antitumorais com um único agente, é expectável que os requerimentos a que os compostos híbridos sejam submetidos possuam um nível superior de complexidade.

Várias questões necessitam de ser analisadas para a obtenção de AIM. Existe a complexidade da interpretação da farmacocinética dos fármacos, particularmente tendo em conta a interação fármaco-fármaco intrínseca, os seus produtos de metabolização, com particular consideração pelos produtos de degradação dos *linkers*. Estes agentes híbridos devem demonstrar efeitos sinérgicos ou aditivos e benefícios especiais como a eficácia contra a resistência ao cancro, de forma a justificar a sua relevância no mercado farmacêutico. (14) (10)

# Conclusão

Os compostos híbridos são estruturas inovadoras que apresentam potencial para se tornarem fármacos relevantes no tratamento do cancro. Claro que, como em todas as tecnologias emergentes, apresentam algumas limitações sérias às quais é necessário ser dada relevância para serem antecipadas e resolvidas numa fase inicial do processo de design e desenvolvimento. Se estas dificuldades forem ultrapassadas, as vantagens que este tipo de fármacos oferece são bastante interessantes. Os fármacos híbridos têm a capacidade de modular, amplificar e exercer ação farmacológica dupla. A presença de dois ou mais farmacóforos numa única unidade não só aumenta a sinergia dos seus efeitos biológicos, mas também aumenta a sua capacidade de inibir mais de um alvo biológico.

Tais híbridos, se forem criados de forma eficaz, podem oferecer várias vantagens em relação às combinações de fármacos, como uma atividade biológica antitumoral mais potente, menor toxicidade, melhor adesão ao regime terapêutico por parte do doente, melhor perfil farmacocinético e especialmente ultrapassar o problema de resistência a fármacos.

Doenças complexas, multifatoriais como o cancro que ainda possuem muitos desafios por ultrapassar na área da terapêutica, por ainda não possuírem um tratamento que seja eficaz a todos os níveis, têm muito a ganhar com este tipo de abordagens. Dito isto, e tendo em conta que estes fármacos se baseiam numa terapêutica dirigida é necessário que exista um conhecimento aprofundado das várias vias, recetores, alvos e mediadores envolvidos no despoletar e no desenvolvimento de tumores para suportar um design racional dos inibidores múltiplos.

Assim os fármacos híbridos podem ser descritos como uma estratégia promissora para a descoberta de novos fármacos antitumorais. Apesar da complexidade envolvida no desenvolvimento desta nova classe de fármacos, a verdade é que se estes forem produzidos corretamente podem dar resposta a várias questões em simultâneo, dotando-os por isso de um enorme interesse para o tratamento do cancro.

# Referências Bibliográficas

1. Stewart B. World Cancer Report. 2014.
2. World Health Organization. Cancer - Fact sheet. WHO. 2017.
3. Pecorino L. Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, targets, and therapeutics. Oxford University Press. 2012. 1-342 p.
4. Dellaire G, Arceci RJ. JNB. Cancer Genomics - From Bench to Personalized Medicine. Academic Press; 2013. 510 p.
5. Zhang J, Baran J, Cros A, Guberman JM, Haider S, Hsu J, et al. International Cancer Genome Consortium Data Portal—a one-stop shop for cancer genomics data. Database J Biol Databases Curation. 2011 Sep 16;2011.
6. Institute NHGR. An Overview of the Human Genome Project [Internet]. [cited 2017 Aug 24]. Available from: <https://www.genome.gov/12011238/>
7. Sheth M; JZ. Collaborative Genomics Projects: A Comprehensive Guide. Academic Press; 2016.
8. Bonavida B. Resistance to Chemotherapy. In: Molecular Mechanisms of Tumor Cell Resistance to Chemotherapy Targeted Therapies to Reverse Resistance. Springer; 2013. p. 287.
9. Folger O, Jerby L, Frezza C, Gottlieb E, Ruppin E, Shlomi T. Predicting selective drug targets in cancer through metabolic networks. Mol Syst Biol. 2011 Jun 21;7(1).
10. Rana A, Alex JM, Chauhan M, Joshi G, Kumar R. A review on pharmacophoric designs of antiproliferative agents. Med Chem Res. 2015;24(3):903–20.
11. Viegas Junior C, Danuello A, Bolzani V, Barreiro E, Fraga C. Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes. Vol. 14, Current medicinal chemistry. 2007. 1829-1852 p.
12. Yang S-Y. Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances. Drug Discov Today. 2010;15(11):444–50.
13. Meunier B. Hybrid Molecules with a Dual Mode of Action: Dream or Reality? Acc Chem Res. 2008 Jan 1;41(1):69–77.
14. Gediya LK, Njar VC. Promise and challenges in drug discovery and development of hybrid anticancer drugs. Expert Opin Drug Discov. 2009;4(11):1099–111.
15. Zhao Q, Huang G. Anticancer Hybrids. In: Design of Hybrid Molecules for Drug Development. 2017. p. 193–218.
16. Biot C, Chibale K. Novel Approaches to Antimalarial Drug Discovery. Vol. 6, Infectious disorders drug targets. 2006. 173-204 p.
17. Morphy R, Kay C, Rankovic Z. From magic bullets to designed multiple ligands. Drug Discov Today. 2004;9(15):641–51.
18. Hulsman N, Medema JP, Bos C, Jongejan A, Leurs R, Smit MJ, et al. Chemical Insights in the Concept of Hybrid Drugs: The Antitumor Effect of Nitric Oxide-Donating Aspirin Involves A Quinone Methide but Not Nitric Oxide nor Aspirin. J

- Med Chem. 2007 May 1;50(10):2424–31.
19. Yuan H, Ma Q, Ye L, Piao G. The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules*. 2016;21(5).
  20. Dasari B, Jimmidi R, Arya P. Selected hybrid natural products as tubulin modulators. *Eur J Med Chem*. 2015;94:497–508.
  21. Fortin S, Bérubé G. Advances in the development of hybrid anticancer drugs. *Expert Opin Drug Discov*. 2013 Oct 1;8(8):1029–47.
  22. Nepali K, Sharma S, Sharma M, Bedi PMS, Dhar KL. Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for anticancer hybrids. *Eur J Med Chem*. 2014;77:422–87.
  23. Bérubé G. An overview of molecular hybrids in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2016 Mar 3;11(3):281–305.
  24. FDA. Drugs@FDA: FDA Approved Drug Products: Emcyt [Internet]. [cited 2017 Aug 12]. Available from: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&applno=018045>
  25. Pfizer L. Resumo das Características do Medicamento - Estracyt. Infomed. 2005.
  26. Hauser AR, Merryman R. Estramustine Phosphate Sodium. *Drug Intell Clin Pharm*. 1984 May 1;18(5):368–74.
  27. Dahllöf B, Billström A, Cabral F, Hartley-Asp B. Estramustine Depolymerizes Microtubules by Binding to Tubulin. *Cancer Res*. 1993 Oct 1;53(19):4573 LP-4581.
  28. Clinicaltrials.gov. Evaluation of the Efficacy of Estramustine in Patient With Breast Cancer Progression After Treatment With Aromatase Inhibitor. (EFESE). 2017.
  29. Clinicaltrials.gov. Hormone Therapy Plus Chemotherapy as Initial Treatment for Local Failures or Advanced Prostate Cancer. 2016.
  30. Mendoza-Sanchez R, Cotnoir-White D, Kulpa J, Jutras I, Pottel J, Moitessier N, et al. Design, synthesis and evaluation of antiestrogen and histone deacetylase inhibitor molecular hybrids. *Bioorg Med Chem*. 2015;23(24):7597–606.
  31. Thurn KT, Thomas S, Moore A, Munster PN. Rational therapeutic combinations with histone deacetylase inhibitors for the treatment of cancer. *Future Oncol*. 2011 Feb;7(2):263–83.
  32. Johnstone RW. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2002 Apr;1(4):287–99.
  33. Wang EC, Min Y, Palm RC, Fiordalisi JJ, Wagner KT, Hyder N, et al. Nanoparticle formulations of histone deacetylase inhibitors for effective chemoradiotherapy in solid tumors. *Biomaterials*. 2015 May 19;51:208–15.
  34. De Los Santos M, Martínez-Iglesias O, Aranda A. Anti-estrogenic actions of histone deacetylase inhibitors in MCF-7 breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. 2007;14(4):1021–8.
  35. NortonHealthcare. Resumo das Características do Medicamento - PAXENE 6 mg/ml.

36. Azevedos. Resumo das Características do Medicamento - Irinotecano Azevedos 40 mg/2 ml. 2009.
37. Ohtsu H, Nakanishi Y, Bastow KF, Lee F-Y, Lee K-H. Antitumor agents 216. Synthesis and evaluation of paclitaxel–camptothecin conjugates as novel cytotoxic agents<sup>1</sup>. *Bioorg Med Chem*. 2003;11(8):1851–7.
38. Nakagawa-Goto K, Nakamura S, Bastow KF, Nyarko A, Peng C-Y, Lee F-Y, et al. Antitumor Agents. 256 Conjugation of Paclitaxel with Other Antitumor Agents: Evaluation of Novel Conjugates as Cytotoxic Agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007 May 15;17(10):2894–8.
39. Sievers EL, Senter PD. Antibody-Drug Conjugates in Cancer Therapy. *Annu Rev Med*. 2013 Jan 14;64(1):15–29.
40. Clinicaltrials.gov. Study to Evaluate the Efficacy and Safety of CUDC-907 in Patients With RR DLBCL, Including Patients With MYC Alterations. 2017.
41. Clinicaltrials.gov. Open Label, Multi-center Study to Assess the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of CUDC-907 in Subjects With Advanced/Relapsed Solid Tumors. 2016.
42. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor-tyrosine kinases. *Cell*. 2010 Jun 25;141(7):1117–34.
43. Geller G, Laskin J, Cheung WY, Ho C. A retrospective review of the multidisciplinary management of medullary thyroid cancer: eligibility for systemic therapy. *Thyroid Res*. 2017;10(1):6.
44. Clinicaltrials.gov. Lucitanib (E3810) in Patients With Advanced Cancer and FGFR, VEGFR, or PDGFR Pathway Aberrations. 2016.
45. Roche. Resumo das Características do Medicamento - Tarceva 25 mg.
46. Clinicaltrials.gov. A Phase Ib Expansion Study Investigating the Safety, Efficacy, and Pharmacokinetics of Intravenous CUDC-101 in Subjects With Advanced Head and Neck, Gastric, Breast, Liver and Non-small Cell Lung Cancer Tumors. 2016.
47. Clinicaltrials.gov. Pilot Study of PLX3397 in Patients With Advanced Castration-Resistant Prostate Cancer (CRPC). 2015.
48. Clinicaltrials.gov. A Phase 2 Study of PLX3397 in Patients With Recurrent Glioblastoma. 2015.
49. Clinicaltrials.gov. Safety Study of PLX3397 and Paclitaxel in Patients With Advanced Solid Tumors. 2017.
50. PubChem. Pexidartinib [Internet]. [cited 2017 Sep 2]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pexidartinib>
51. Preet R, Mohapatra P, Mohanty S, Sahu SK, Choudhuri T, Wyatt MD, et al. Quinacrine has anticancer activity in breast cancer cells through inhibition of topoisomerase activity. *Int J Cancer*. 2012 Apr 1;130(7):1660–70.
52. Clinicaltrials.gov. A Phase 1 Trial of CBL0137 in Patients With Metastatic or Unresectable Advanced Solid Neoplasm. 2017.

