



Universidade do Algarve

Fármacos Híbridos com Atividade Antineoplásica

Raquel Alexandra Valadares Barrulas

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação da Professora Doutora Maria de
Lurdes dos Santos Cristiano

2014



Universidade do Algarve

**Fármacos Híbridos com Atividade
Antineoplásica**

Raquel Alexandra Valadares Barrulas

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação da Professora Doutora Maria de
Lurdes dos Santos Cristiano

2014

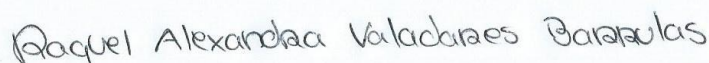
Fármacos Híbridos com Atividade Antineoplásica
Dissertação do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Algarve

Fármacos Híbridos com Atividade Antineoplásica

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

A aluna,



Raquel Alexandra Valadares Barrulas

© A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Dedicatória e Agradecimentos

Primeiramente agradeço aos meus pais e ao meu irmão, a quem dedico este trabalho, por todo o apoio que demonstraram, não só ao longo destes 5 anos, mas ao longo de toda a minha vida. Obrigado pelas noites mal dormidas a pensar em mim e no meu bem-estar.

Agradeço ao meu avô materno que pôde testemunhar todo o meu percurso académico, bem como à minha avó materna e avó paterna, que apesar de não o testemunharem tenho a certeza que ficariam orgulhosas de mim.

Queria também deixar aqui um agradecimento especial aos meus tios e primos por todo o apoio.

Agradeço ao meu namorado, Pedro, por todo o apoio, amor e carinho demonstrados.

Aos meus amigos que vão ficar para toda a vida, bem como à *Feminis Ferventis*, Tuna Académica Feminina da Universidade do Algarve, por todos os bons momentos que me proporcionaram e que contribuíram para a minha evolução enquanto pessoa. Foram acontecimentos marcantes que vão para sempre ficar na minha memória.

Por fim, gostaria de agradecer à minha orientadora, a Professora Doutora Maria de Lurdes dos Santos Cristiano, por toda a ajuda prestada, pela disponibilidade, foi incansável e por isso obrigado.

**“Aquele que tem um *porquê* para viver pode enfrentar
quase todos os *comos*.”**

Friedrich Nietzsche

Resumo

O cancro é das maiores causas de morte no mundo. As neoplasias estão associadas a um crescimento descontrolado das células, resultante de fatores de risco designados por agentes cancerígenos. A elevada extensão da doença e a variedade de tumores identificados requerem um investimento contínuo em novas estratégias terapêuticas, incluindo o desenvolvimento de novos agentes quimioterapêuticos. ^[1,2]

As principais limitações da quimioterapêutica antineoplásica são a baixa seletividade, resultando em toxicidade não específica em relação a células normais, bem como a seleção de resistência a fármacos por células cancerígenas. Para reduzir a massa tumoral, a modalidade comum no tratamento do cancro é a terapia múltipla, que associa vários fármacos com atividade comprovada. Contudo, devido à sua toxicidade intrínseca e a possíveis interações entre eles, esta estratégia está associada a efeitos colaterais graves, dificultando a regressão do tumor e comprometendo a resistência do paciente ao tratamento. ^[3]

Tem-se observado um investimento na investigação conducente ao desenho racional e desenvolvimento de moléculas híbridas. Preferencialmente, estas moléculas deverão ser pró-fármacos que, após bio-ativados, libertam entidades farmacologicamente ativas dirigidas a alvos terapêuticos diferentes ou a pontos diferentes do mesmo alvo, garantindo eficácia, seletividade e retardando a seleção de resistências. O objetivo é desenvolver moléculas multifuncionais que conduzam à redução rápida da massa tumoral, em concentrações nanomolares baixas, apresentem baixa toxicidade para células não cancerígenas e possam ser administradas oralmente. Esta abordagem de tratamento, baseada numa entidade química única, permite contornar problemas associados a interações entre fármacos distintos, comuns em terapia múltipla. ^[4] Neste contexto, foram já propostas moléculas multifuncionais baseadas em diferentes quimiotipos ativos em várias linhas de células cancerígenas. Nesta monografia pretende-se realizar uma revisão bibliográfica sobre os avanços no desenvolvimento de fármacos híbridos ativos em quimioterapia do cancro, suas características farmacológicas e modo de ação, perspetivando os desenvolvimentos nesta área.

Termos Chave: citotoxicidade, fármacos anticancerígenos, fármacos híbridos, quimioterapia, resistência, terapia múltipla.

Abstract

Cancer is one of the leading causes of death in the world. Neoplasms are associated with an uncontrolled growth of cells, which may derive from several causes, called carcinogenic agents. The range of the disease and diversity of tumors identified require a continuous investment in therapeutic strategies, focused mainly on new chemotherapeutic agents.^[1,2]

The main restrictions of antineoplastic chemotherapy are associated to low selectivity, leading to non-specific toxicity towards normal cells and to selection of resistance by cancer cells. Generally, reduction of tumor mass is achieved through a combination chemotherapy strategy whereby several antineoplastic drugs are associated. However, due to their intrinsic toxicity, and to possible interactions between them, this strategy often leads to severe side effects, compromising tumor regression and patient's resistance to the treatment.^[3]

Accordingly, research towards rational design and development of hybrid drugs for antineoplastic therapy is increasing. The general aim is to provide pro-drugs which, upon bio-activation, release several active pharmaceutical ingredients that address several therapeutic targets or different sites in the same target. Such strategy will improve effectiveness and selectivity, while slowing down selection of resistance. Ideally, multifunctional molecules should ensure a fast regression of the tumor mass at low nanomolar concentrations, exhibit low toxicity towards normal cells and allow for oral administration. This approach, based on a single chemical identity, avoids problems associated with drug interactions.^[4]

So far, several multifunctional molecules, based on different chemotypes, have been proposed, and proved to be active in several cancer cell lines.

The aim of this monograph is to provide a comprehensive review on the advances towards the design of hybrid drugs for cancer chemotherapy, highlighting its pharmacologic properties and mode of action, and foreseeing future developments on this prominent subject.

Keywords: anti-cancer drugs, chemotherapy, cytotoxicity, combination therapy, hybrid drugs, resistance.

Índice

Resumo	vi
Abstract.....	vii
Índice de Figuras	x
Índice de Tabelas	xiii
Lista de Abreviaturas.....	xiv
1 Introdução.....	1
1.1 Conceitos gerais	1
1.2 Ciclo Celular	1
1.3 Incidência do cancro.....	2
1.4 Cancro: mortalidade	3
1.5 Causas do cancro	4
1.6 Estratégias de tratamento do cancro.....	5
1.7 Quimioterapia.....	5
2 Conceito de Fármaco Híbrido	8
3 Evolução na investigação em fármacos híbridos	10
4 Fármacos com atuação em proteínas estruturais	11
4.1 Paclitaxel – Daunorrubicina.....	11
4.2 Paclitaxel – Clorambucil.....	13
4.3 Paclitaxel – Camptotecina	14
4.4 Paclitaxel – Epipodofilotoxina/ Ácido glicirretínico/ Camptotecina.....	15
4.5 Derivados da combretastatina A-4	16
4.6 Colquicina – Paclitaxel	17
4.7 Combretastatina A-4 – Lamelarina T.....	19
4.8 Combretastatina A-4 – Chalcona.....	20
4.9 Discodermólido – Dictiostatina	21
4.10 Taltobulina – Dolastatina.....	23
5 Compostos baseados em ureia.....	25
6 Fármacos híbridos baseados em hormonoterapia.....	28
7 Fármacos antimaláricos com atividade antineoplásica	30
8 Inibidores da angiogénese	36
9 Fármacos com atuação direta no <i>DNA</i>	41

Fármacos Híbridos com Atividade Antineoplásica

Dissertação do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Algarve

10	Híbridos que incluem fármacos inorgânicos	43
11	Inibidores de Vias de Sinalização.....	46
11.1	Isatina – Chalcona	46
11.2	Pirazol – Quinolina – Piridina.....	47
12	Conclusão	49
13	Bibliografia.....	53

Índice de Figuras

Figura 1.3.1 – Representação dos tipos de cancro mais comuns bem como da incidência do cancro consoante as regiões.....	3
Figura 1.4.1 – Representação das causas de morte por cancro mais comuns bem como da mortalidade devida a cancro consoante as regiões.	4
Figura 2.1 – Apresentações de fármacos na forma de híbridos.....	8
Figura 2.2 – Representação estrutural da lomustina, 1 , e da carmustina, 2	9
Figura 4.1.1 – Representação estrutural de híbridos compostos por paclitaxel e daunorrubicina, 3a-f	12
Figura 4.2.1 – Representação estrutural de híbridos compostos por paclitaxel (5) e clorambucil (4), 6-8	13
Figura 4.3.1 – Representação estrutural de híbridos compostos por paclitaxel e camptotecina, 9-13	14
Figura 4.4.1 – Representação estrutural da epipodofilotoxina, 14	15
Figura 4.4.2 – Representação estrutural do ácido glicirretínico, 15	15
Figura 4.4.3 – Representação da estrutura base do híbrido composto por paclitaxel, epipodofilotoxina, ácido glicirretínico e camptotecina, 16	16
Figura 4.5.1 – Representação estrutural dos híbridos 19-21 com base em combretastatina A-4, 17 e AC7739, 18	17
Figura 4.6.1 – Representação estrutural do híbrido 22 composto por colquicina e paclitaxel.....	18
Figura 4.6.2 – Representação estrutural dos híbridos 23-27 resultantes da conjugação da colquicina e do paclitaxel.	18
Figura 4.7.1 – Representação estrutural dos híbridos 29-34 , incluindo os sistemas substituídos por <i>N-p</i> -metoxibenzil ou <i>N</i> -PMB, resultantes da conjugação da combretastatina, 17 , e da lamelarina T, 28	20
Figura 4.8.1 – Representação da estrutura geral das chalconas, 35	21

Figura 4.8.2 – Representação estrutural do híbrido 36 resultante da conjugação da combretastatina A-4, 17 , e da chalcona, 35	21
Figura 4.9.1 – Representação estrutural de discodermólido, 37 , dictiostatina, 38 , bem como dos híbridos 39-43 resultantes da sua conjugação.....	22
Figura 4.10.1 – Representação estrutural da dolastina 10, 44	23
Figura 4.10.2 – Representação estrutural da dolastina 15, 45	23
Figura 4.10.3 – Representação estrutural da taltobulina, 46	24
Figura 4.10.4 – Representação estrutural dos híbridos 47-50 resultantes da conjugação da dolastina 10 (44) e 15 (45) com a taltobulina (46).	24
Figura 5.1 – Representação estrutural de híbridos compostos por 1,2,3-triazole, ditiocarbamato e ureia, 51	25
Figura 6.1 – Representação estrutural de híbridos, 54 e 55 , obtidos por conjugação de tirosina e clorambucil.....	28
Figura 6.2 – Representação estrutural de híbridos compostos por tirosinamida e clorambucil, 56 e 57	29
Figura 7.1 – Representação estrutural da artemisinina (58) e seus derivados dihidroartemisinina (59), artemeter (60), artesunato (61).	30
Figura 7.2 – Representação estrutural dos híbridos compostos por artemisinina e acridina, 62	31
Figura 7.3 – Representação estrutural dos grupos de ligação etilenodiamina (63) e 2-metilpiperazina (64).....	32
Figura 7.4 – Representação estrutural dos híbridos compostos por artemisinina e polipirrole, 65-71	33
Figura 7.5 – Representação da estrutura base dos híbridos compostos por artemisinina e guanidina, 72a-h	34
Figura 7.6 – Representação estrutural da cloroquina, 73	34
Figura 7.7 – Representação estrutural do etopósido, 74	35
Figura 8.1 – Representação da estrutura do conjugado paclitaxel-RGD, 75	37
Figura 8.2 – Representação estrutural de monometil auristatina E, <i>MMAE</i> , 76	38

Figura 8.3 – Representação estrutural dos híbridos 77-79 , conjugados de camptotecina e paclitaxel.....	38
Figura 8.4 – Representação estrutural do híbrido 80 , que conjuga um mimético do taxol à base de adamantano e colquicina.....	38
Figura 8.5 – Representação estrutural do isoflaveno, 81	39
Figura 8.6 – Representação estrutural do propanolol, 82	39
Figura 8.7 – Representação estrutural dos híbridos compostos por isoflaveno e propanolol, 83a-j	40
Figura 9.1 – Representação estrutural do benzotiazol, 84	41
Figura 9.2 – Representação estrutural dos compostos derivados da pirrolobenzodiazepina, 85	41
Figura 9.3 – Representação estrutural de híbridos de benzotiazol e pirrolobenzodiazepina, 86a-c	42
Figura 10.1 – Representação estrutural da cisplatina, 87 , da carboplatina, 88 , e da oxaliplatina, 89	43
Figura 10.2 – Representação estrutural da acridina, 90	44
Figura 10.3 – Representação estrutural do híbrido PT-ACRAMTU, 91	44
Figura 10.4 – Representação estrutural do ACRAMTU, 92	45
Figura 11.1.1 – Representação estrutural da isatina, 93	46
Figura 11.1.2 – Representação estrutural dos híbridos resultantes da conjugação da isatina e chalcona, 94a-j , 95a-c , 96 (com bromo como substituinte R1).....	46
Figura 11.2.1 – Representação estrutural dos compostos híbridos resultantes da conjugação do pirazol, quinolina e piridina, 97a-l	48

Índice de Tabelas

Tabela 1.7.1 – Exemplos de classes de fármacos anticancerígenos com atuação do <i>DNA</i>	6
Tabela 4.5.1 – Valores de IC ₅₀ da combretastatina A-4 e correspondentes compostos híbridos.	17
Tabela 4.6.1 – Valores de ED ₅₀ para os híbridos 26 e 27 resultantes da conjugação de colquicina e paclitaxel, bem como do paclitaxel (taxol).	19
Tabela 4.9.1 – Valores de IC ₅₀ dos híbridos 42 e 43 , bem como do discodermólido, 37 e da dictiostatina, 38	23
Tabela 5.1 – Atividades dos híbridos mais promissores, os compostos 52 e 53 , obtidos por conjugação de 1,2,3-triazole, ditiocarbamato e ureia. A atividade do 5-fluorouracilo é incluída para referência.	26
Tabela 8.1 – Representação dos híbridos mais promissores, 83d e 83e , bem como dos compostos de referência isoflavono e propanolol.	40
Tabela 9.1 – Valores de IC ₅₀ obtidos para os híbridos 86a-c nas linhas celulares THP-1, A-549, HL-60, <i>Jurkat</i> e U-937.	42
Tabela 11.1.1 – Substituintes R2 nos híbridos resultantes da conjugação da isatina e chalcona 94a-j , 95a-c , 96	47
Tabela 12.1 – Sumarização dos compostos híbridos retratados na dissertação bem como das linhas celulares/modelos e neoplasias alvos de estudo.	50

Lista de Abreviaturas

- 1A9 – linha celular humana do carcinoma do ovário
- A431 – linha celular do carcinoma epidermoide humano
- A549 – linha celular humana do cancro do pulmão
- AhR (*aryl hydrocarbon receptor*) – recetor de hidrocarboneto arílico
- 1A9-PTX10 – linha celular humana 1A9 resistente ao paclitaxel
- AsPC-1 – linha celular humana do cancro do pâncreas
- ATP (*adenosine triphosphate*) – trifosfato de adenosina
- B16 – linha celular do melanoma do murino
- Bcap-37 – linha celular humana do cancro da mama
- CDK (*cyclin-dependent kinase*) – cinases dependentes de ciclinas
- CPT – camptotecina
- DLD-1 – linha celular humana do cancro do cólon
- DNA (*deoxyribonucleic acid*) – ácido desoxirribonucleico
- DU-145 – linha celular humana do cancro da próstata
- EC-9706 – linha celular humana do cancro esofágico
- ED₅₀ – concentração do composto que conduz a uma redução de 50% em absorvância a 562nm (dose eficaz em 50% da amostra)
- EGF's (*epidermal growth factors*) – fatores de crescimento epidérmicos
- EGFR (*epidermal growth factor receptor*) – recetor do fator de crescimento epidérmico
- elF2 – fator eucariótico de iniciação da tradução 2
- ER α (*estrogen receptor alpha*) – recetor de estrogénios alfa
- FGF's (*fibroblast growth factors*) – fatores de crescimento de fibroblastos
- GDP (*guanosine diphosphate*) – guanosina difosfato
- GTP (*guanosine triphosphate*) – guanosina trifosfato
- HBV (*hepatitis B virus*) – vírus da hepatite B
- HCV (*hepatitis C virus*) – vírus da hepatite C
- HCT-116 – linha celular humana do cancro do cólon
- HCT-8 – linha celular humana do adenocarcinoma do cólon
- HeLa – linha celular obtida a partir de células cancerígenas cervicais
- HEK293 – células humanas normais renais embrionárias
- HepG2 – linha celular humana do cancro do fígado

Fármacos Híbridos com Atividade Antineoplásica

Dissertação do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Algarve

HL-60 – linha celular humana da leucemia

HMEC-1 – linha celular humana do endotélio microvascular

HPV (*human papiloma virus*) – vírus do papiloma humano

HSA (*human serum albumin*) – albumina do soro humana

HT-29 – linha celular humana do adenocarcinoma do cólon

HUVEC's (*human umbilical vein endothelial cells*) – células humanas endoteliais da veia umbilical

IC₅₀ – concentração mínima para a obtenção de 50% do efeito inibitório de um fármaco

GI₅₀ – concentração para a inibição do crescimento celular em 50%

KB – linha celular humana do cancro do epidermóide da nasofaringe

KB-3-1 – linha celular humana do cancro do epidermóide da nasofaringe

KB-8-5 – linha celular humana do cancro do epidermóide da nasofaringe

KB-CPT – linha celular humana KB resistente a camptotecina

KB-V1 – linha celular humana do cancro do epidermóide da nasofaringe

KB-VIN – linha celular multirresistente com expressão de glicoproteína P

LN-CAP – linha celular humana do cancro da próstata

MCF-7 – linha celular humana do cancro da mama

MDA-MB-468 – linha celular humana do cancro da mama

MDA-MB-231 – linha celular humana do cancro da mama

MDA-MB-435 – linha celular humana do cancro da mama

MDR (*multidrug-resistant*) – resistência a múltiplos fármacos

MGC-803 – linha celular humana do cancro gástrico

MMAE (*monomethyl auristatin E*) – monometil auristatina E

MMP's (*matrix metalloproteinases*) – metaloproteinases da matriz

MRC-5 – linha celular humana dos fibroblastos pulmonares

μM – micromolar (unidade de medição da concentração molar)

nM – nanomolar (unidade de medição da concentração molar)

NCI/ADR-Res – linha celular humana do cancro do ovário resistente ao paclitaxel

NCI-H460 – linha celular humana do carcinoma do pulmão de células não pequenas

NCI-H522 – linha celular humana do carcinoma do pulmão de células não pequenas

NSCLC (*non-small-cell lung carcinoma*) – carcinoma do pulmão de células não pequenas

OMS – Organização Mundial de Saúde

OV2008 – linha celular humana do cancro do ovário

Fármacos Híbridos com Atividade Antineoplásica

Dissertação do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Algarve

PANC-1 – linha celular humana do cancro do pâncreas

PC-3 – linha celular humana do cancro da próstata

PDGF's (*platelet-derived growth factors*) – fatores de crescimento derivados de plaquetas

Pgp – glicoproteína P

pRB – proteína do retinoblastoma

RGD – péptido de arginina-glicina-ácido aspártico

SHEP – linha celular humana do neuroblastoma

SH – SY5Y – linha celular humana do neuroblastoma

SMMC-7721 – linha celular humana do carcinoma hepatocelular

SNB19 – linha celular humana do glioblastoma multiforme

THP-1 – linha celular humana da leucemia monocítica aguda

tRNA_i^{Met} – iniciador metionina tRNA

tRNA (*transfer ribonucleic acid*) – ácido ribonucleico de transferência

U-937 – linha celular humana do linfoma histiocítico

U87MG – linha celular humana do glioblastoma multiforme

VDA's (*vascular disrupting agents*) – agentes perturbadores vasculares

VEGF's (*vascular endothelial growth factors*) – fatores de crescimento do endotélio vascular

1 Introdução

1.1 Conceitos gerais

As neoplasias resultam de um crescimento celular desregulado devido à falência de mecanismos de controlo do ciclo celular. Podem ser benignas ou malignas, sendo que as neoplasias malignas possuem a capacidade de invadir outros tecidos e são vulgarmente designadas por cancro. ^[5,6]

O processo de carcinogénese pode ser iniciado por um agente carcinogénico químico, como, por exemplo, o fumo do tabaco. Os proto-oncogenes codificam proteínas que estimulam o normal crescimento e divisão celular. Se estes sofrerem mutações tornam-se cancerígenos, sendo denominados de oncogenes. ^[6,7] No processo de carcinogénese, as alterações genéticas consideradas mais comuns são a ativação de proto-oncogenes e a inativação de genes supressores tumorais, sendo que estes codificam proteínas, como a p53, envolvidas em processos de reparação e apoptose. ^[5-7]

É importante referir que algumas pessoas têm predisposição genética para o desenvolvimento de neoplasias, já que alguns genes mutados vão passando de geração em geração. ^[6]

1.2 Ciclo Celular

É importante esclarecer alguns conceitos acerca do ciclo celular, já que é o regulador da divisão das células. Este compreende a interfase G1 de preparação para a duplicação do ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid – DNA*), a interfase S de síntese do *DNA* onde há replicação do material genético, a interfase G2 de preparação para a mitose onde há a deteção de erros e consequente correção após a replicação do *DNA*, e por fim a fase M onde ocorre a mitose propriamente dita. ^[5,8]

As cinases dependentes de ciclinas (*cyclin-dependent kinase – CDK*), pertencentes à família das serina-treonina cinases, bem como as ciclinas são responsáveis pela regulação das transições entre as diferentes fases do ciclo celular, sendo a transição G1-S a mais relevante. Este ponto de transição é também regulado por outra proteína, a proteína do retinoblastoma (pRB). ^[5,8,9]

Além das proteínas referidas existem ainda as proteínas inibidoras do ciclo celular, que são ativadas no caso de lesão do *DNA*. Entre estas destacam-se as proteínas

p15 e p16 (bloqueadoras da atividade das *CDK*), a proteína p21 e a sua reguladora, a p53. Estas proteínas são extremamente importantes, especialmente a p53, e o seu comprometimento, perante um cenário de lesão do *DNA* ou ativação de oncogenes, leva à inibição da apoptose. [5,8,9]

1.3 Incidência do cancro

A taxa de incidência de uma dada doença é definida pelo número de novos casos ocorridos num certo período de tempo, numa população exposta a um fator de risco. [10]

O cancro é a principal causa de mortalidade e morbilidade na Europa, tendo surgido 3,4 milhões de novos casos em 2012. Os tipos de cancro mais comuns incluem o cancro do pulmão, da mama, colo-retal, da próstata, do estômago, da bexiga e do corpo do útero (*corpus uteri*) (figura 1.3.1), sendo seguidamente apresentadas algumas considerações sobre a incidência dos mesmos. [11,12]

O cancro colo-retal é mais comum entre os homens, tendo a incidência aumentado em camadas mais jovens. As maiores taxas de incidência para este tipo de cancro encontram-se em países da Europa Central. [11,12]

O cancro da mama foi o mais comum entre as mulheres de toda a Europa, em 2012. As maiores taxas de incidência verificaram-se em países da Europa do Norte e Ocidental, estando estas associadas a um aumento dos rastreios do cancro da mama. A incidência na Europa Oriental foi muito menor. [11,12]

O cancro da próstata é o mais frequente entre os homens de toda a Europa, estando a sua incidência a aumentar em homens de camadas mais jovens, entre os 35 e os 64 anos. As maiores taxas de incidência encontram-se na Europa do Norte e Ocidental, estando estas mesmas taxas a aumentar na Europa do Sul e Oriental equiparando-se cada vez mais às anteriores. [11,12]

As taxas de incidência relativas ao cancro do pulmão variam consoante o género. No caso dos homens, as maiores taxas de incidência podem ser observadas em países da Europa Central e Oriental e as taxas mais baixas observam-se em países da Europa do Norte. No caso das mulheres verifica-se o inverso. [11]

Sendo o cancro um problema com graves repercussões, tanto ao nível humano e social como ao nível económico, é importante atuar, tanto ao nível da prevenção como do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, no sentido de conseguir um maior controlo.

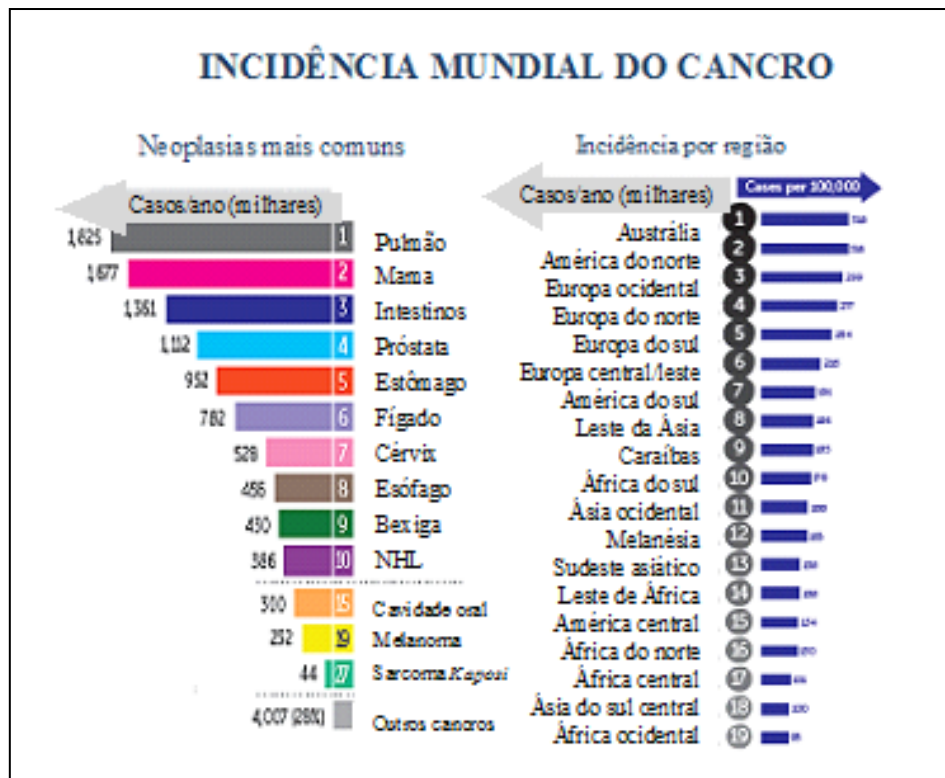


Figura 1.3.1 – Representação dos tipos de cancro mais comuns bem como da incidência do cancro consoante as regiões (imagem adaptada de [13]).

1.4 Cancro: mortalidade

Como já referido, o cancro é a principal causa de mortalidade e morbilidade na Europa. Contudo, a mortalidade tem vindo a diminuir progressivamente ao longo das últimas décadas, devido essencialmente a um investimento no diagnóstico e em terapêuticas farmacológicas. [12]

É importante fazer uma breve caracterização da mortalidade associada ao cancro, já que este é um dos indicadores que nos permite avaliar o nível geral de saúde numa dada região bem como a sua evolução temporal. [10]

Em 2012, o cancro do pulmão foi a causa de morte por cancro mais frequente na Europa (figura 1.4.1), seguido do cancro colo-retal, do cancro da mama e do cancro do estômago. Fazendo uma distinção por género, nos homens a causa de morte mais frequente foi o cancro do pulmão, seguido do cancro colo-retal e do cancro da próstata. Nas mulheres, a causa mais frequente foi o cancro da mama, seguido do cancro colo-retal e do cancro do pulmão. [11]

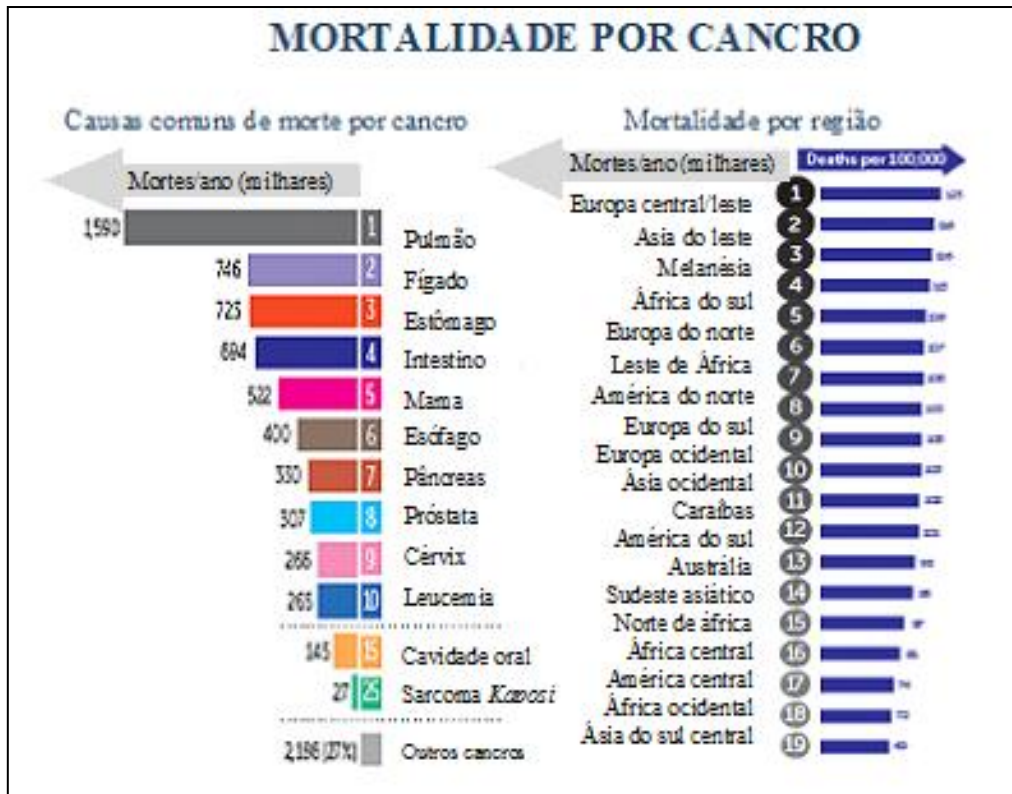


Figura 1.4.1 – Representação das causas de morte por cancro mais comuns bem como da mortalidade devida a cancro consoante as regiões (imagem adaptada de ^[14]).

1.5 Causas do cancro

Existem diversos fatores que potenciam o processo de carcinogénese. Entre eles são de enumerar o tabaco, a dieta desequilibrada, a obesidade, o sedentarismo, alguns agentes infecciosos (vírus do papiloma humano (*human papiloma vírus – HPV*), vírus da hepatite B (*hepatitis B virus – HBV*), vírus da hepatite C (*hepatitis C virus – HCV*), entre outros), a radiação ionizante (raios-X, radiação gama), exposições iatrogénicas tais como a terapêutica hormonal de substituição ou a exposição a carcinogénicos ambientais e ocupacionais (arsénico, asbestos, benzeno, entre outros). ^[15]

Assim, é importante evitar-se, tanto quanto possível, os fatores desencadeantes e potenciadores da carcinogénese, de modo a prevenir o aparecimento de neoplasias. Pode recorrer-se à cirurgia como medida profilática, no caso de lesões com sinais de pré-malignidade e em casos nos quais o risco de vir a desenvolver cancro esteja substancialmente potenciado. ^[5]

1.6 Estratégias de tratamento do cancro

As estratégias de tratamento do cancro dividem-se em quatro categorias, podendo ser usadas em combinação: a cirurgia (indicada para tumores não disseminados), a radioterapia (onde se inclui a terapia fotodinâmica, indicada para tumores localizados), a quimioterapia (onde se inclui a hormonoterapia, bastante usada em neoplasias metastizadas) e o tratamento biológico (onde se inclui a imunoterapia e a terapia génica).^[5,8,16]

É importante referir que, em associação com a cirurgia, e para preservar a função dos órgãos, pode-se optar pela terapia adjuvante ou neoadjuvante. A terapia adjuvante faz uso da quimioterapia de altas doses, frequentemente combinada, ou da radioterapia, de modo a prevenir o desenvolvimento de eventuais metástases após cirurgia. Na terapia neoadjuvante administram-se fármacos anticancerígenos, ou faz-se uso da radioterapia, ou usam-se ambas as modalidades, antes de um procedimento cirúrgico, com o intuito de diminuir o tamanho do tumor.^[17,18]

A presente monografia incidirá na quimioterapia.

1.7 Quimioterapia

A quimioterapia é uma arma de reconhecida eficácia contra o cancro. Para obter a regressão da massa tumoral a estratégia mais usada envolve uma terapia múltipla ou combinada, na qual se usam vários fármacos anticancerígenos com mecanismos de ação distintos. Contudo, a utilização de fármacos anticancerígenos está associada a diversos efeitos colaterais, como mielossupressão, náuseas, vômitos, alopecia, esterilidade, entre outros, tornando-se premente o desenvolvimento de anticancerígenos mais seletivos, menos tóxicos para células normais, com largo espectro de ação e, de preferência, que atuem em diversas fases do ciclo celular.^[5,6]

Os ácidos nucleicos são alvos muito importantes no desenvolvimento de agentes anticancerígenos. Muitos dos fármacos anticancerígenos disponíveis interferem direta ou indiretamente com o *DNA*, tendo mecanismos de ação distintos.^[19]

Na tabela 1.7.1 estão representadas as principais classes de fármacos que atuam no *DNA*.

Fármacos Híbridos com Atividade Antineoplásica

Dissertação do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Algarve

Tabela 1.7.1 – Exemplos de classes de fármacos anticancerígenos com atuação do DNA (tabela adaptada de ^[5,6]).

Atuação direta	Agentes intercalantes	Agentes alquilantes	Cisores de cadeia	Terapia <i>antisense</i>
Exemplos	Dactinomicina Doxorrubicina	Melfalan Lomustina Bussulfan Cisplatina	Caliqueamicina Bleomicina	<i>Oblimersen</i>
Atuação indireta	Antimetabolitos	Antimitóticos	Agentes hormonais	
Exemplos	Tetrahydrofolato Metotrexato 5-Fluorouracilo 6-Mercaptopurina	Vincristina Vimblastina Paclitaxel Docetaxel	Tamoxifeno Flutamida	

Falando um pouco de estratégias de combinação, e tendo como base os fármacos supracitados, podemos referenciar alguns exemplos.

A cisplatina pode ser usada em monoterapia mas também em combinação com outros fármacos como o etopósido, para o cancro testicular e do pulmão, ou o 5-fluorouracilo, para o tratamento do cancro da cabeça, pescoço e esófago. ^[9,20] A oxaliplatina, análogo otimizado da cisplatina, também pode ser usada em combinação com o 5-fluorouracilo e o ácido folínico para o tratamento do cancro colo-retal. ^[9]

Além destes pode-se também referir o caso do metotrexato, que se pode usar em combinação com outros fármacos com vista ao tratamento da leucemia linfoblástica aguda, do linfoma não *Hodgkin*, bem como de tumores sólidos. ^[9]

Estes são apenas alguns exemplos de entre muitos outros, porém todos têm em comum os problemas decorrentes da combinação de diferentes fármacos com modos de ação e efeitos secundários distintos. Esta estratégia, além de estar associada a um aumento da toxicidade, associa-se também ao potencial aumentado de se vir a favorecer fenómenos de resistência cruzada. ^[21] Um outro aspeto a considerar é a frequente dificuldade no ajuste da combinação, já que as diferentes solubilidades dos fármacos podem comprometer os níveis plasmáticos, idealmente constantes. ^[22]

Assim, e perante a necessidade de novas estratégias terapêuticas, tem-se assistido a um investimento crescente na investigação conducente ao desenho racional e desenvolvimento de fármacos híbridos. Os fármacos híbridos são moléculas que incluem dois ou mais farmacóforos, que atuam em alvos diferentes ou em pontos

Fármacos Híbridos com Atividade Antineoplásica

Dissertação do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Algarve

diferentes do mesmo alvo, desenvolvidas como alternativa a associações de fármacos.
[23]

Esta abordagem de tratamento permite contornar problemas associados a interações entre fármacos distintos, comuns em terapia múltipla e aumentar o espectro de ação.^[3,4]

O desenvolvimento destas novas moléculas é fundamental, pois pode constituir uma resposta à necessidade de fármacos anticancerígenos menos tóxicos e com maior seletividade, que retardem a seleção de resistências.

2 Conceito de Fármaco Híbrido

Como já foi referido, um fármaco híbrido é uma entidade química única que inclui dois ou mais farmacóforos. Contudo, o acoplamento dos grupos farmacologicamente ativos pode ser feito de várias formas, como indicado na figura 2.1. [2,23,24]

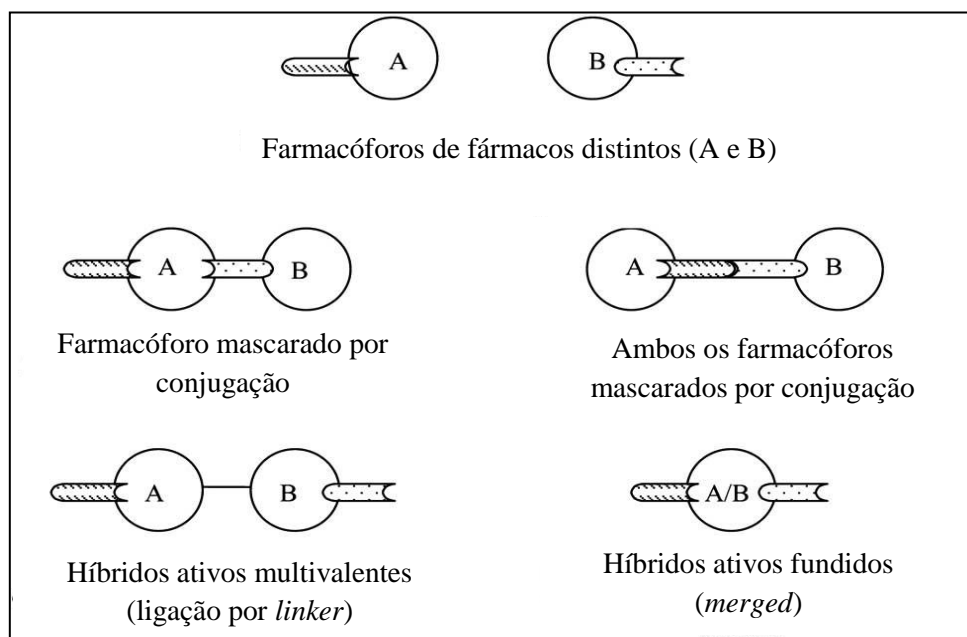


Figura 2.1 – Apresentações de fármacos na forma de híbridos (imagem adaptada de [20]).

A apresentação como pró-fármaco consiste em mascarar um farmacóforo pela conjugação com um outro, ou então em mascarar os dois farmacóforos através da sua conjugação. Esta apresentação depende de enzimas e de processos químicos que levem à sua transformação de maneira a libertar as duas partes da molécula na sua forma ativa, podendo levar a uma redução da toxicidade e a uma melhor distribuição pelos sítios ativos. [20,24]

Os híbridos ativos multivalentes consistem na conjugação de farmacóforos através de uma unidade ligante (*linker*), podendo esta ser clivada ou mantida. Se a unidade ligante não for clivada as moléculas retêm a sua atividade e seletividade para os alvos terapêuticos. No entanto, se a unidade ligante for passível de sofrer clivagem poderá ocorrer uma melhoria de propriedades farmacocinéticas deficitárias, bem como da seletividade e especificidade.

Fármacos Híbridos com Atividade Antineoplásica

Dissertação do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Algarve

Os híbridos ativos fundidos (*merged*) consistem na fusão de dois farmacóforos numa estrutura comum, provenientes de fármacos distintos, com o mesmo mecanismo de ação ou com mecanismos de ação diferentes. Esta apresentação pode ser vantajosa já que a molécula resultante tem menor peso molecular e, conseqüentemente, o impedimento estéreo será menor e a ligação ao sítio ativo poderá ficar facilitada nalguns casos. [20,25]

É de referir que existem alguns fármacos híbridos ou multifuncionais já usados para terapia antineoplásica, de que são exemplo as nitrosoureas lomustina (**1** – figura 2.2) e carmustina (**2**) utilizadas no tratamento de tumores cerebrais. Estes compostos são pró-fármacos que após ativação originam um agente carbamoilante, que pode inibir proteínas essenciais para a multiplicação de células cancerígenas, reagindo por exemplo com resíduos de lisina presentes em enzimas de reparação, e um agente alquilante, o catião 2-cloroetilcarbónio, que pode alquilar proteínas ou cadeias de ácidos nucleicos.

Este tipo de fármacos é mais potente devido ao efeito sinérgico das duas entidades farmacologicamente ativas, e a associação retarda a seleção de resistências. [6]

Assim sendo, é de extrema importância refletir acerca dos desenvolvimentos nesta área de modo a prever atuações futuras numa área em constante mudança.

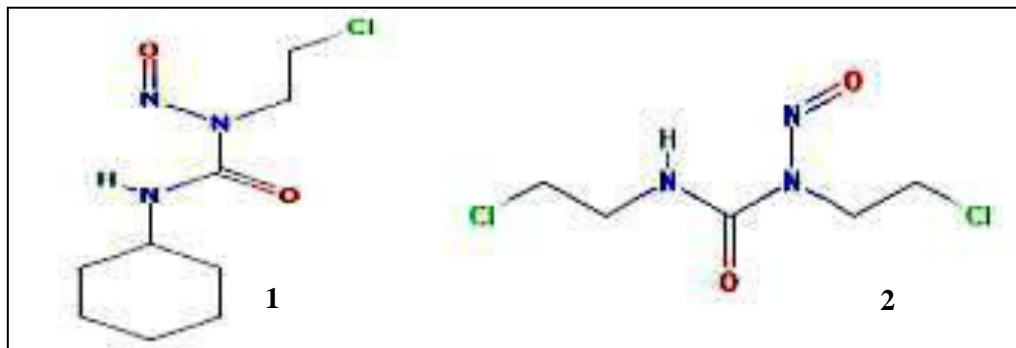


Figura 2.2 – Representação estrutural da lomustina, **1**, e da carmustina, **2** (imagem adaptada de [26,27]).

3 Evolução na investigação em fármacos híbridos

O conceito de fármaco híbrido ganhou especial impacto a partir de 2007. Este impacto foi sinalizado pela publicação do artigo de revisão de Viegas-Junior e colaboradores, ao qual se seguiram os artigos de revisão de *Gediya* e *Njar* e de *Chow* e colaboradores, em 2009. ^[25]

O artigo de Viegas-Junior ^[28] aborda a estratégia de construção de moléculas híbridas para diferentes áreas de atuação, incluindo os compostos com atividade anticancerígena, anti-inflamatória, analgésica, entre outros. São citados ao longo do texto vários autores que têm vindo a trabalhar com impacto no desenvolvimento destes compostos, entre os quais se destacam os grupos de *Kuduk* ^[29], *Lazar* ^[30], *Kamal* ^[31], *Baraldi* ^[32], *Zask* ^[33], entre outros.

Em 2010, *Tsogoeva* publicou uma mini revisão acerca dos desenvolvimentos mais recentes nesta área, tendo como ponto de partida compostos naturais e sintéticos. ^[2] Mais recentemente, em 2013, surgiu uma revisão de *Fortin* e *Bérubé* centrada nos avanços no desenvolvimento de fármacos híbridos com atividade antineoplásica. ^[25]

Todos estes artigos de revisão abordam os fármacos híbridos de uma forma generalizada. Porém, existem outros respeitantes a classes farmacológicas específicas, citados seguidamente.

Solomon e *Lee* publicaram em 2009 um trabalho sobre terapêuticas combinadas tendo por base a cloroquina, um fármaco de elevada eficácia usado como agente anti-malárico e anti-reumatóide. Em 2010, *Breen* e *Walsh*, publicaram um artigo referente a fármacos híbridos com atuação ao nível da polimerização e despolimerização da tubulina. ^[20,21]

Mais recentemente, em 2013, surgiram dois artigos de revisão. Um de *Prokopiou* e colaboradores, referente a fármacos híbridos e conjugados, cujo alvo principal inclui a vasculatura tumoral, outro de *Su*, *Lee* e *Kakadiya*, referente a agentes bifuncionais com capacidade de estabelecer ligações intra e intercadeias com o *DNA*. ^[24,34]

As moléculas propostas nos artigos acima referidos e noutros mais específicos serão alvo de análise neste trabalho, do ponto de vista do seu potencial farmacológico, modo de ação e alvos terapêuticos.

4 Fármacos com atuação em proteínas estruturais

Os microtúbulos são proteínas compostas por duas subunidades, a α - e a β -tubulina, formando-se após polimerização destas moléculas. São importantes na manutenção da estrutura da célula, na exocitose e na libertação de neurotransmissores, também envolvidos na mobilidade celular, e assumem um papel essencial na divisão celular, ao nível da formação do fuso mitótico. Assim, como ponto de partida para o desenho de inibidores, importa analisar a estrutura e função da tubulina.

Cada subunidade de α - e β -tubulina tem um local de ligação de guanosina trifosfato (*guanosine triphosphate* – *GTP*). Na α -tubulina este mantém-se estável, mas na β -tubulina é hidrolisado a guanosina difosfato (*guanosine diphosphate* – *GDP*) após a polimerização. Um microtúbulo com *GTP* é estável e continua a crescer, já um com *GDP* é instável, despolimerizando rapidamente. A inibição da polimerização ou despolimerização da tubulina leva ao bloqueio do ciclo celular e à indução da apoptose. [20,35]

A tubulina inclui o domínio vinca, domínio onde se liga a vincristina, um alcalóide da vinca, o domínio do taxano, onde se liga o paclitaxel e derivados, e ainda o domínio onde se liga a colquicina, localizado entre a β -tubulina e a α -tubulina. [2,20,36]

O domínio vinca na β -tubulina está próximo do sítio de ligação *GTP*. Os derivados da vinca causam a despolimerização dos microtúbulos levando à sua instabilidade e inibem a progressão da mitose, com consequente indução de apoptose.

O domínio do taxano localiza-se na superfície interior dos microtúbulos. Os taxanos induzem a sua estabilização, conduzindo ao aumento da polimerização e à supressão da dinâmica bem como precipitando a paragem do ciclo celular na interfase G2/M, com consequente apoptose. [35]

Relativamente à colquicina, a sua ligação à β -tubulina resulta na formação de um dímero de tubulina com conformação curvada, impedindo-o de adotar uma conformação linear. Este acontecimento deve-se ao impedimento estéreo entre a colquicina e a α -tubulina que inibe a montagem dos microtúbulos. [37]

4.1 Paclitaxel – Daunorrubicina

Considerando a relevância da tubulina como alvo terapêutico e a existência de fármacos direcionados aos domínios da vinca, do taxano e da colquicina, foram

concebidas estruturas híbridas com o intuito de inibir a polimerização ou despolimerização da tubulina e consequentemente bloquear o ciclo celular e induzir a apoptose das células tumorais.

Estas estruturas incluem a conjugação do paclitaxel (**5**, figura 4.2.1) com a daunorrubicina, tendo sido criada uma biblioteca de compostos deste tipo cujas estruturas se encontram representadas na figura 4.1.1, **3a-f**.^[38]

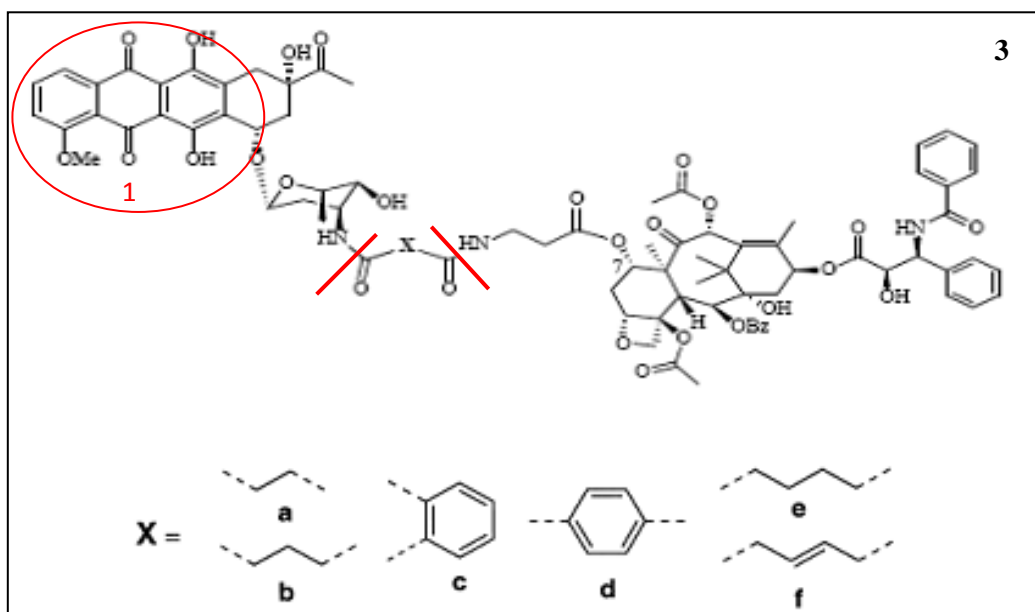


Figura 4.1.1 – Representação estrutural de híbridos compostos por paclitaxel e daunorrubicina, **3a-f** (imagem adaptada de^[20,38]).

A classe de moléculas, representada na figura 4.1.1, tem a capacidade de comportar modificações que possibilitem a otimização de algumas propriedades farmacológicas sem que haja perda de atividade antineoplásica. Contudo, a classe tem uma baixa capacidade de ligação ao *DNA*, já que as moléculas são de grandes dimensões o que dificulta o seu acesso ao interior dos microtúbulos. É por esta razão que os híbridos apresentam uma menor citotoxicidade que o paclitaxel e a daunorrubicina, separadamente.^[38]

Na imagem vemos, em destaque, o sistema de anéis planares, que funciona como agente de intercalação. Este sistema interatua com a dupla hélice do *DNA*, distorcendo-a e bloqueando a replicação através do estabelecimento de interações de *Van der Waals*, e iónicas, com as bases e com os grupos fosfato carregados negativamente.^[9]

4.2 Paclitaxel – Clorambucil

Tendo por base o acoplamento do paclitaxel com o clorambucil, e sendo este um agente alquilante, foi criada uma biblioteca de compostos representados na figura 4.2.1.
[39]

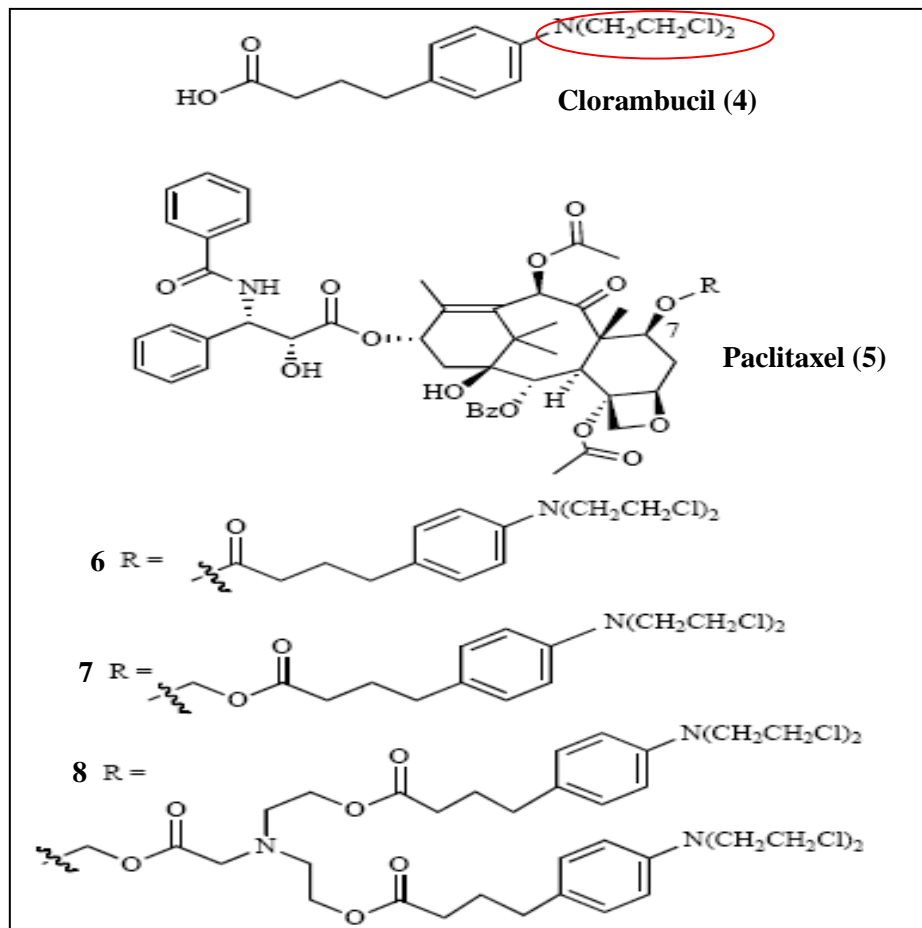


Figura 4.2.1 – Representação estrutural de híbridos compostos por paclitaxel (5) e clorambucil (4), 6-8 (imagem adaptada de ^[20]).

Verificou-se que os híbridos não aumentam a polimerização da tubulina na sua forma conjugada, pois o clorambucil impede o farmacóforo do paclitaxel de interagir com o seu sítio ativo.

O composto 7 mostrou atividade citotóxica significativa na linha celular humana do cancro do cólon HCT-116 com uma concentração mínima para a obtenção de 50% do efeito inibitório (IC_{50}) de 4,6 nM, um valor semelhante ao obtido para o paclitaxel (entre 2 e 4 nM). O composto 6 é mais estável relativamente à clivagem pelas esterases, porém a sua atividade é menor (IC_{50} de 161 nM). Esta observação pode significar que o clorambucil e o paclitaxel não são significativamente ativos na forma conjugada, tendo que ocorrer clivagem para haver atividade. O composto 8 é o mais ativo no modelo *in*

vivo do carcinoma do pulmão do murino M109, devido provavelmente à unidade extra de clorambucil. [39]

Importa referir que os eletrões do azoto (N) do clorambucil estão menos disponíveis para reagir, logo o ião aziridínio não se forma tão facilmente e apenas nucleófilos fortes irão reagir, como o N-7 da guanina, o N-1 e N-3 da adenina e o N-3 da citosina. [36]

4.3 Paclitaxel – Camptotecina

A conjugação do paclitaxel com a camptotecina (CPT), um inibidor da topoisomerase I, deu origem a uma biblioteca de compostos híbridos representados na figura 4.3.1 (9-13). [40]

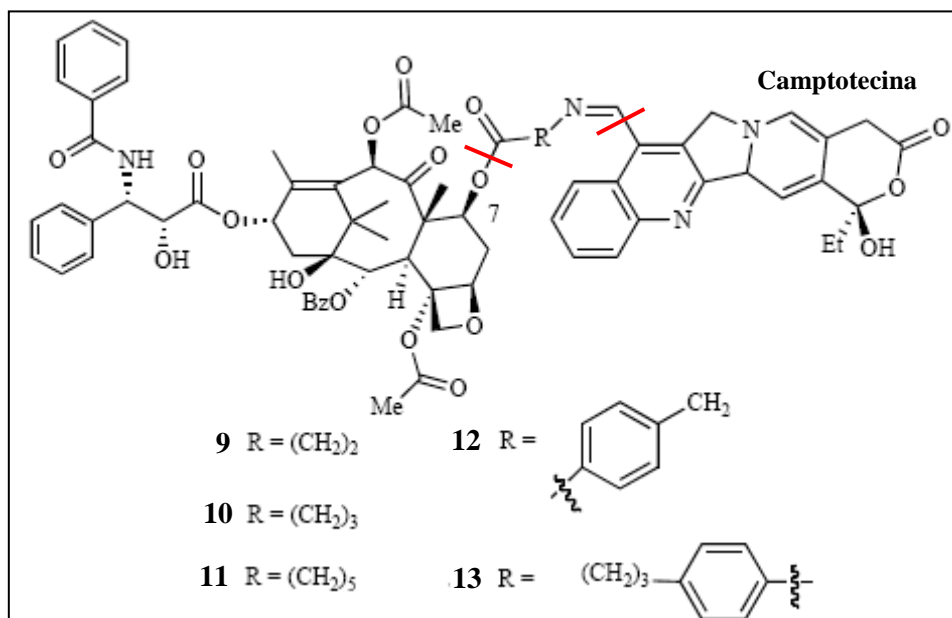


Figura 4.3.1 – Representação estrutural de híbridos compostos por paclitaxel e camptotecina, 9-13 (imagem adaptada de [20]).

Os conjugados 9-13 foram testados para avaliação da sua citotoxicidade em linhas celulares tumorais humanas, entre as quais a MCF-7 (cancro da mama), a PC-3 (cancro da próstata), a KB (epidermoide da nasofaringe), a KB-CPT (KB resistente a camptotecina), a 1A9 (carcinoma do ovário), a 1A9-PTX10 (1A9 resistente ao paclitaxel) e a HCT-8 (adenocarcinoma do cólon). [40]

Todos os conjugados mostraram uma capacidade inibitória elevada, exibindo maior atividade que a camptotecina mas menor que o paclitaxel. Os conjugados 9-11, em que o grupo de ligação é alifático, exibiram maior atividade que os conjugados 12 e

13, em que o grupo de ligação é aromático. Os conjugados **9-11** revelaram-se também mais ativos que o paclitaxel ou a camptotecina na inibição da replicação celular da linha HCT-8. Nenhum dos conjugados exibiu maior atividade que o paclitaxel na linha celular resistente a este mesmo fármaco, e todos eles se mostraram significativamente menos potentes que a camptotecina como inibidores da topoisomerase I *in vitro*.^[40]

4.4 Paclitaxel – Epipodofilotoxina/ Ácido glicirretínico/ Camptotecina

Tendo por base a inibição da topoisomerase I e II foi criada uma biblioteca de moléculas híbridas compostas por paclitaxel e epipodofilotoxina (figura 4.4.1 – **14**) /ácido glicirretínico (figura 4.4.2 – **15**) /camptotecina cuja estrutura base está representada na figura 4.4.3.

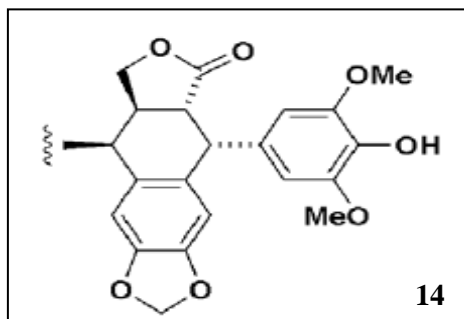


Figura 4.4.1 – Representação estrutural da epipodofilotoxina, **14** (imagem adaptada de ^[41]).

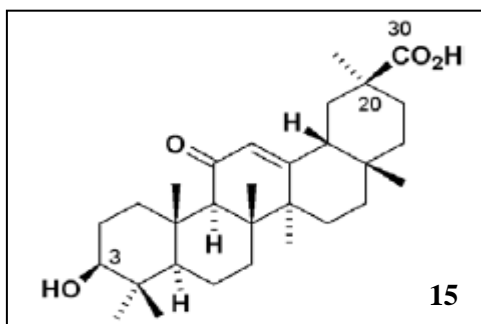


Figura 4.4.2 – Representação estrutural do ácido glicirretínico, **15** (imagem adaptada de ^[41]).

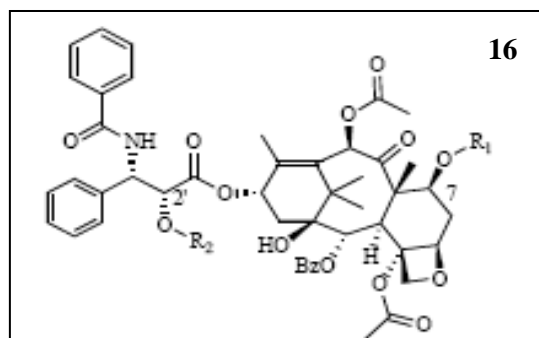


Figura 4.4.3 – Representação da estrutura base do híbrido composto por paclitaxel, epipodofilotoxina, ácido glicirretínico e camptotecina, **16** (imagem adaptada de ^[20]).

Os híbridos com o grupo de ligação no C2' ou C7 foram avaliados relativamente à citotoxicidade nas linhas celulares humanas 1A9, A549 (cancro do pulmão), MCF-7, KB, MRC-5 (fibroblastos pulmonares), LN-CAP (cancro da próstata), PC-3, DU-145 (cancro da próstata) e na linha celular multirresistente com expressão de glicoproteína P (Pgp) KB-VIN.

Constatou-se que a atividade citotóxica depende da posição do grupo de ligação bem como da sua natureza química. Os híbridos ligados na posição C2' mostraram melhor atividade do que os ligados em C7, em todas as linhas celulares, provavelmente porque a substituição na posição C2' conduz à inibição da rotação da ligação C2'-C3', aumentando a força de interação com a subunidade β da tubulina. ^[41]

4.5 Derivados da combretastatina A-4

A combretastatina A-4 é um inibidor da polimerização de microtúbulos que se liga ao sítio de ligação da colquicina. Apresenta também forte atividade anticancerígena em diversas linhas celulares humanas, incluindo algumas linhas celulares tumorais resistentes a vários fármacos (*multidrug-resistant* – MDR). Surgiu assim a proposta de conceber e preparar uma biblioteca de moléculas híbridas representadas na figura 4.5.1 pelas estruturas **19-21**. ^[42]

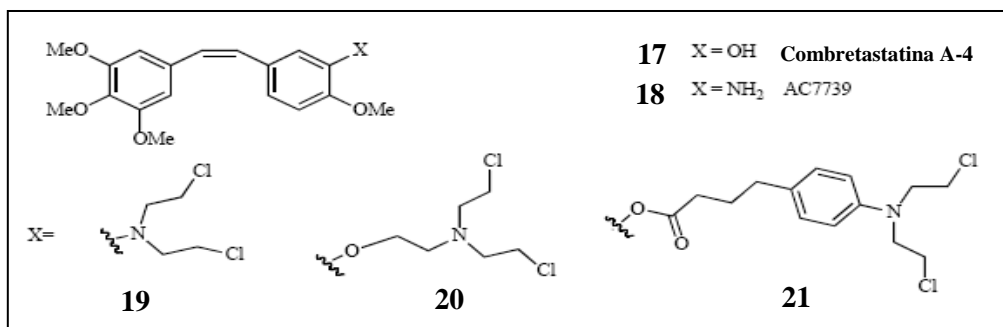


Figura 4.5.1 – Representação estrutural dos híbridos **19-21** com base em combretastatina A-4, **17** e AC7739, **18** (imagem adaptada de ^[20]).

Os híbridos **19-21** resultam da conjugação da combretastatina A-4 com um agente alquilante do *DNA* derivado da clormetina. Por exemplo, o híbrido **21** resulta da conjugação da combretastatina A-4 com o clorambucil. O mecanismo de ação desta classe baseia-se na alquilação do *DNA*. ^[25,42]

Estes compostos foram testados em culturas da linha celular humana do neuroblastoma SH – SY5Y, estando os valores de IC₅₀ representados na tabela 4.5.1. Todos mostraram induzir um bloqueio seletivo na interfase G2/M, sendo a sua citotoxicidade atribuída à ligação com a tubulina. ^[42]

Tabela 4.5.1 – Valores de IC₅₀ da combretastatina A-4 e correspondentes compostos híbridos (tabela adaptada de ^[42]).

Composto	17	19	20	21
IC ₅₀ (nM)	1,5 ± 0,28	860 ± 220	230 ± 72	0,64 ± 0,11

Verificou-se que, para concentrações mais elevadas dos híbridos **19** e **20**, houve mudança de inibição da polimerização da tubulina para inibição da despolimerização. Estes híbridos mostraram ser mais eficazes que a combretastatina A-4 e que o híbrido **21**, a concentrações elevadas. ^[42]

4.6 Colquicina – Paclitaxel

A conjugação da colquicina, um agente com propriedades anti-inflamatórias e anticancerígenas, com o paclitaxel, que combina a inibição da polimerização da tubulina com a estabilização dos microtúbulos, surgiu como estratégia de impedir o empacotamento de microtúbulos característico da terapia de combinação. Esta estratégia de conceção originou o híbrido **22**, representado na figura 4.6.1. ^[43]

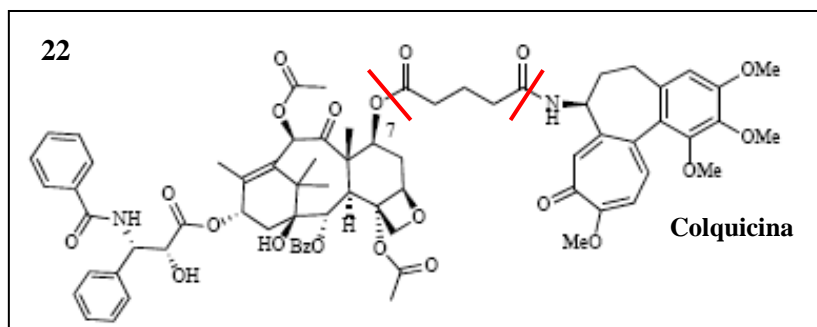


Figura 4.6.1 – Representação estrutural do híbrido **22** composto por colquicina e paclitaxel (imagem adaptada de ^[20]).

Foram preparados outros híbridos, cuja estrutura se representa na figura 4.6.2 (**23-27**). Estes compostos foram testados nas linhas celulares humanas 1A9 (carcinoma do ovário), A549 (cancro do pulmão), MCF-7 (cancro da mama), LN-CAP (cancro da próstata), PC-3 (cancro da próstata), DU-145 (cancro da próstata), KB (epidermoide da nasofaringe), MRC-5 (fibroblastos pulmonares) e KB-VIN (multirresistente com expressão de Pgp). ^[41]

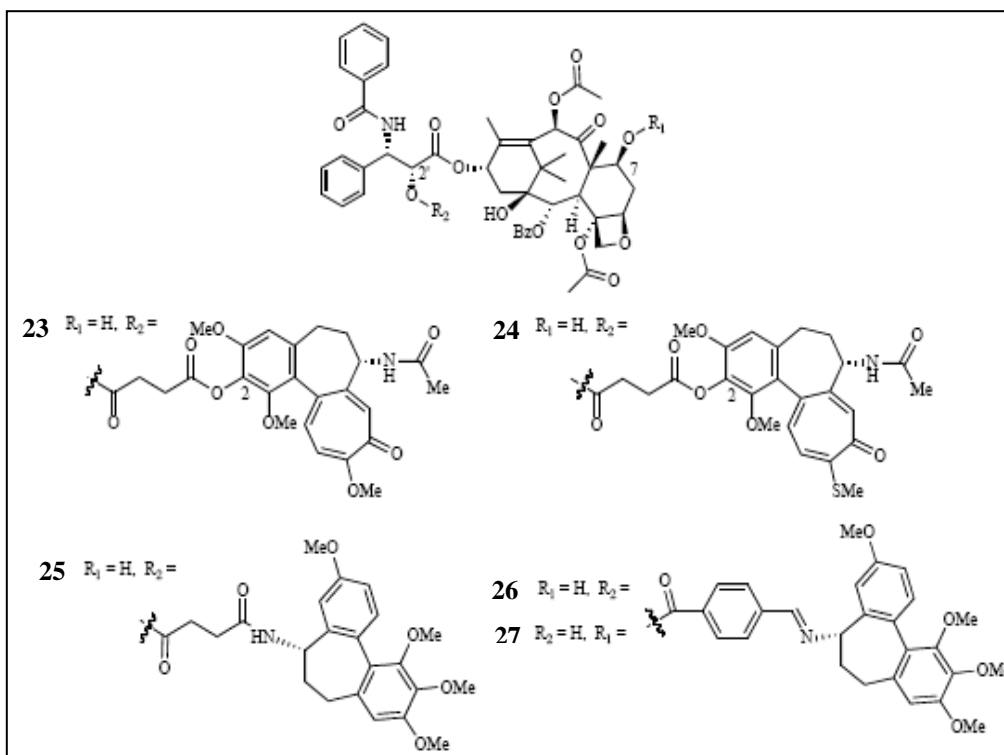


Figura 4.6.2 – Representação estrutural dos híbridos **23-27** resultantes da conjugação da colquicina e do paclitaxel (imagem adaptada de ^[20]).

De entre os compostos preparados, apenas os híbridos **26** e o **27** exibem atividade comparável ao paclitaxel nas linhas celulares usadas, sem que haja diferença

de atividade entre os que estabelecem ligação em C-2' (híbrido **26**) ou em C-7' (híbrido **27**). Contudo, estas entidades químicas não exibem atividade superior ao paclitaxel na linha celular com expressão de Pgp, pois não ultrapassam este mecanismo de resistência. Os valores de ED₅₀, ou seja, da concentração do composto que conduz a uma redução de 50% em absorvância a 562nm (dose eficaz em 50% da amostra), encontram-se representados na tabela 4.6.1, apenas para as linhas celulares que conduziram a uma inibição de pelo menos 50%.^[41]

Tabela 4.6.1 – Valores de ED₅₀ para os híbridos **26** e **27** resultantes da conjugação de colquicina e paclitaxel, bem como do paclitaxel (taxol) (tabela adaptada de^[41]).

Composto	ED ₅₀ (nM)						ED ₅₀ (µM)		
	1A9	A549	MCF-7	LN-CAP	PC-3	DU-145	KB	KB-VIN	MRC-5
Taxol	1,0	2,3	1,1	2,6	55,5	1,3	1,8	311	NT
26	2,3	3,8	NT	NT	NT	NT	5,4	308	NT
27	2,3	3,8	NT	NT	NT	NT	2,3	308	NT

NT = não testado.

4.7 Combretastatina A-4 – Lamelarina T

Sendo a combretastatina A-4 um inibidor da polimerização dos microtúbulos e a lamelarina T um alcalóide com propriedades inibidoras da topoisomerase I, citotóxicas, antibacterianas e anti-mitóticas, surgiu a proposta de os conjugar numa só molécula.^[44]

Foi assim criada então uma biblioteca de compostos híbridos, representados na figura 4.7.1, **29-34**. Os híbridos **29** e **30** inibem a polimerização da tubulina, apresentando um IC₅₀ semelhante ao da combretastatina A-4 (IC₅₀ = 1,1 ± 0,1 µM), sendo o IC₅₀ do híbrido **29** igual a 1,4 ± 0,1 µM e o do **30** igual a 1,3 ± 0,2 µM. Os híbridos **31-34** revelaram-se inativos, com um IC₅₀ superior a 40 µM. Os autores consideram que, neste caso, não é mantida a integridade conformacional da componente bioativa, comprometendo a ligação da molécula ao sítio ativo.^[44]

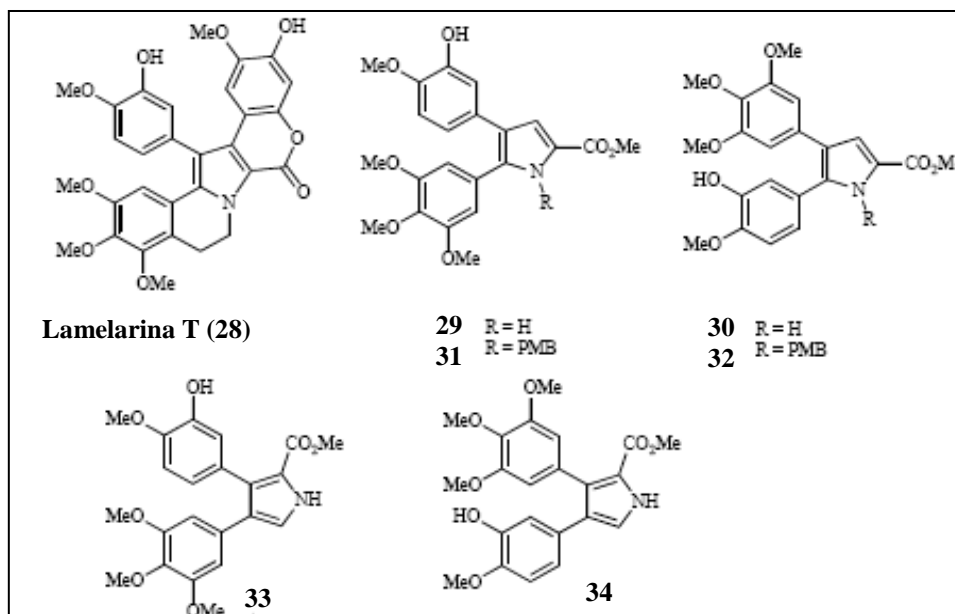


Figura 4.7.1 – Representação estrutural dos híbridos **29-34**, incluindo os sistemas substituídos por *N-p*-metoxibenzil ou *N*-PMB, resultantes da conjugação da combretastatina, **17**, e da lamellarina T, **28** (imagem adaptada de ^[20]).

4.8 Combretastatina A-4 – Chalcona

As chalconas (figura 4.8.1, **35**) pertencem à família dos flavonóides. Encontram-se na literatura exemplos de chalconas com propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas, antioxidantes, anti-maláricas e anti-tumorais. Algumas chalconas inibem a polimerização da tubulina, através da ligação ao sítio ativo da colquicina e da alquilação de nucleófilos celulares. Assim, tendo em conta o mecanismo de ação da combretastatina A-4, foi criada uma biblioteca de compostos híbridos que foram testados em várias linhas celulares tumorais, incluindo HCT-116, B16 (melanoma do murino), A431 (carcinoma epidermóide humano) e em células humanas endoteliais da veia umbilical (*human umbilical vein endothelial cells – HUVEC's*). ^[20,45-47]

O híbrido **35**, representado na figura 4.8.1, foi o que exibiu, comparativamente, maior atividade, embora menor que a exibida pela combretastatina A-4. Estudos de relação estrutura-atividade realizados mostraram a importância do grupo 2,4 – dihidroxifenilo, em destaque na figura 4.8.2, para a atividade citotóxica. ^[20]

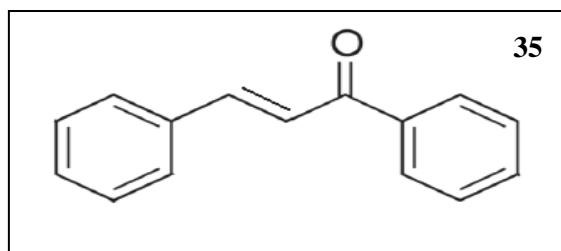


Figura 4.8.1 – Representação da estrutura geral das chalconas, **35** (imagem adaptada de [45]).

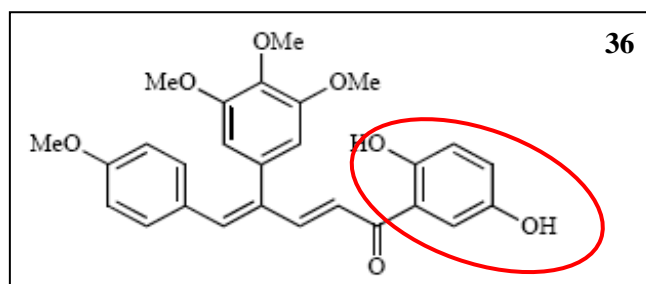


Figura 4.8.2 – Representação estrutural do híbrido **36** resultante da conjugação da combretastatina A-4, **17**, e da chalcona, **35** (imagem adaptada de [20]).

4.9 Discodermólido – Dictiostatina

Tanto o discodermólido (figura 4.9.1, **37**) como a dictiostatina (figura 4.9.1, **38**) são agentes estabilizadores de microtúbulos com atividade semelhante ao paclitaxel, que provocam paragem da mitose através da acumulação de células na interfase G2/M, com consequente indução de apoptose. A dictiostatina é ativa em linhas celulares resistentes ao paclitaxel e tem uma forte afinidade para ligação com a tubulina. O discodermólido retém a atividade em linhas celulares tumorais resistentes a múltiplos fármacos, *MDR*. [48–50]

Perante estes resultados, foi concebida e preparada uma biblioteca de moléculas híbridas compostas por discodermólido e dictiostatina, como representado na figura 4.9.1 (**39-43**).

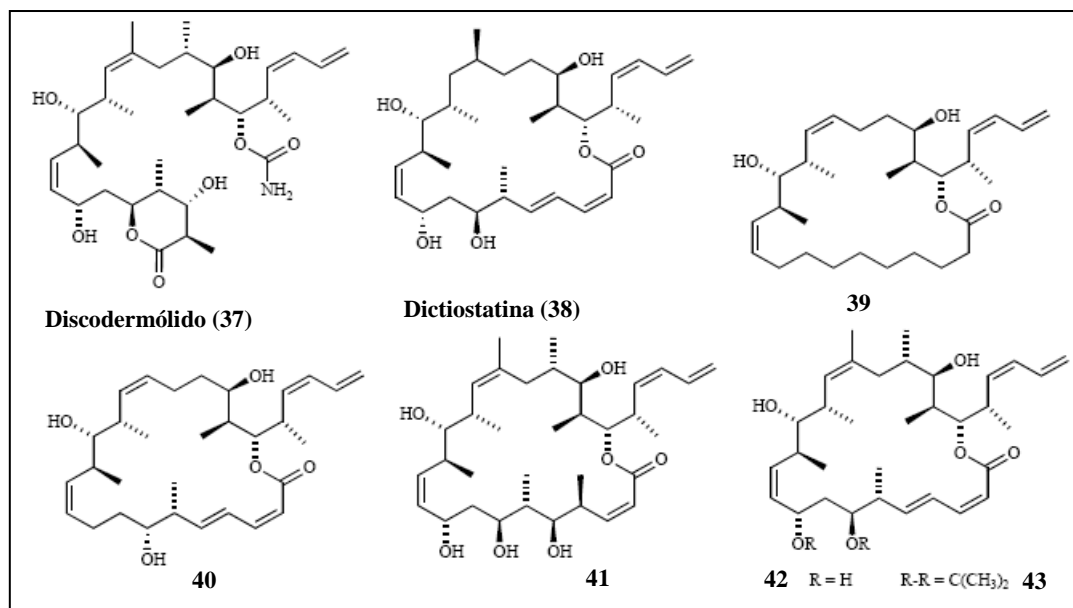


Figura 4.9.1 – Representação estrutural de discodermólido, **37**, dictiostatina, **38**, bem como dos híbridos **39-43** resultantes da sua conjugação (imagem adaptada de ^[20]).

O híbrido **39** foi testado em linhas celulares humanas do cancro da mama, MDA-MB-231, e do ovário, OV2008, tendo demonstrado fraca citotoxicidade, com valores de concentração para a inibição do crescimento celular em 50% (GI₅₀) de $27 \pm 1 \mu\text{M}$ e de $16 \pm 1 \mu\text{M}$, respetivamente. Estes valores são considerados baixos quando comparados com os exibidos pelo discodermólido, com GI₅₀ de $0,016 \pm 0,003 \mu\text{M}$ e de $0,072 \pm 0,005 \mu\text{M}$, respetivamente. O híbrido **40** apresentou maior citotoxicidade, embora menor que a do discodermólido, apresentando um GI₅₀ de $1,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$ para a linha celular MDA-MB-231 e um GI₅₀ para a linha celular 2008 de $1,0 \pm 0,1 \mu\text{M}$. ^[49]

O híbrido **41** foi testado nas linhas celulares A549, MDA-MB-231 e do adenocarcinoma do cólon HT-29, tendo apresentado valores de GI₅₀ de $0,399 \mu\text{M}$, $0,208 \mu\text{M}$ e $0,170 \mu\text{M}$, respetivamente. Estes valores são próximos dos exibidos pelo discodermólido. ^[48]

Os híbridos **42** e **43** foram testados nas linhas celulares humanas de cancro pancreático, PANC-1 e AsPC-1, bem como do cancro do cólon DLD-1. O composto **42** manteve a sua atividade na linha celular humana do cancro do ovário resistente ao paclitaxel (NCI/ADR-Res), com valores de IC₅₀ que se apresentam na tabela 4.9.1. Já o composto **43** mostrou possuir, comparativamente, menor citotoxicidade, como se verifica na tabela 4.9.1, o que leva a crer que o hidroxilo em C7, ou em C9, ou ambos,

são fundamentais para a interação com a tubulina ou para a manutenção da conformação ativa. ^[50]

Tabela 4.9.1 – Valores de IC₅₀ dos híbridos **42** e **43**, bem como do discodermólido, **37** e da dictioestatina, **38** (tabela adaptada de ^[50]).

	IC ₅₀ nM			
	PANC-1	AsPC-1	DLD-1	NCI/ADR-Res
37	59 ± 34	98 ± 34	29 ± 8	160 ± 34
38	4,2 ± 0,5	6,2 ± 0,6	2,2 ± 0,5	6,6 ± 0,4
42	12,9 ± 2,0	33,9 ± 6,4	5,9 ± 1,1	66,4 ± 15,2
43	4860 ± 150	4850 ± 450	2350 ± 180	2930 ± 300

4.10 Taltobulina – Dolastatina

As dolastinas, 10 (figura 4.10.1, **44**) e 15 (figura 4.10.2, **45**) são conhecidas como inibidores da polimerização da tubulina. A taltobulina (figura 4.10.3, **46**) é um fármaco anticancerígeno que se liga ao local da vinca mas é reconhecida como um substrato pobre para a Pgp. Assim, surgiu a ideia de criar uma biblioteca de moléculas híbridas, representadas na figura 4.10.4 (**47-50**), obtidas por conjugação da dolastina com a taltobulina. ^[33]

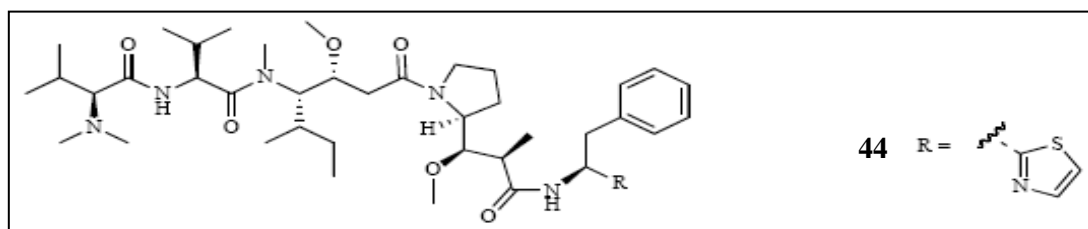


Figura 4.10.1 – Representação estrutural da dolastina 10, **44** (imagem adaptada de ^[20]).

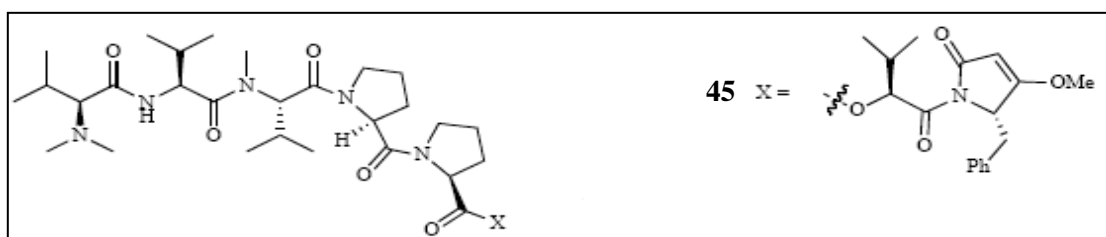


Figura 4.10.2 – Representação estrutural da dolastina 15, **45** (imagem adaptada de ^[20]).

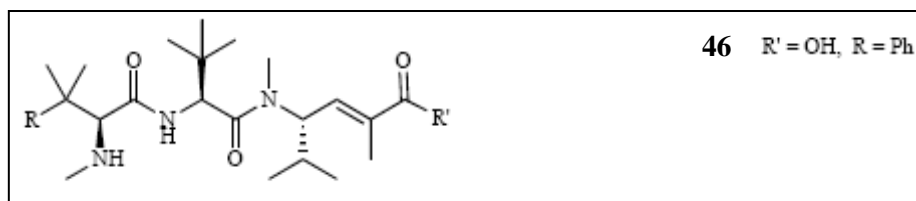


Figura 4.10.3 – Representação estrutural da taltobulina, **46** (imagem adaptada de [20]).

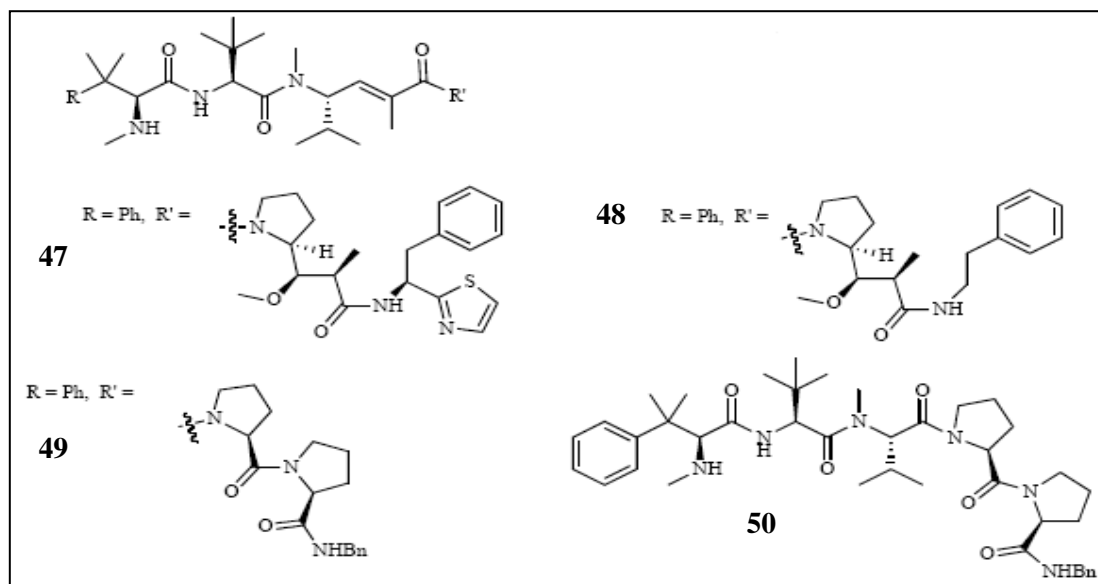


Figura 4.10.4 – Representação estrutural dos híbridos **47-50** resultantes da conjugação da dolastina 10 (**44**) e 15 (**45**) com a taltobulina (**46**) (imagem adaptada de [20]).

Os híbridos **47-50** foram testados nas linhas celulares humanas cancerígenas do epidermóide da nasofaringe KB-3-1 (sem expressão de Pgp), KB-8-5 (com expressão moderada de Pgp) e KB-V1 (com expressão elevada de Pgp). As dolastinas 10 e 15 e a taltobulina foram testadas como compostos de referência, sendo que a dolastina 10 foi o composto que exibiu maior atividade contra células KB-3-1, com um IC_{50} de 0,073 nM. [20,33]

Na linha celular KB-3-1 o híbrido com maior potência é o **50**, com um IC_{50} de 0,25 nM. Relativamente à suscetibilidade da Pgp em linhas celulares resistentes, verificou-se uma menor suscetibilidade em relação aos híbridos **47** e **48** que aos híbridos **49** e **50**, muito provavelmente devido ao dipéptido terminal. [33]

5 Compostos baseados em ureia

Alguns compostos com funções ureia exibem atividade contra diversos tipos de neoplasias.

De modo a utilizar esta funcionalidade na conceção de moléculas híbridas, *Duan* e colaboradores (2013) combinaram derivados da ureia com ditiocarbamatos e 1,2,3-triazole.

A razão desta combinação prende-se com o facto de o heterociclo 1,2,3-triazole ser muito versátil. Está presente em agentes antifúngicos, antialérgicos, antituberculostáticos, anti-inflamatórios e, em associação, apresenta atividade antineoplásica. ^[51]

Alguns ditiocarbamatos apresentam atividade antibacteriana e antifúngica, estando a ser também estudados para aplicação em tratamentos anticancerígenos. ^[52] Desta combinação resultou uma biblioteca de compostos cuja estrutura base, **51**, se encontra representada na figura 5.1.

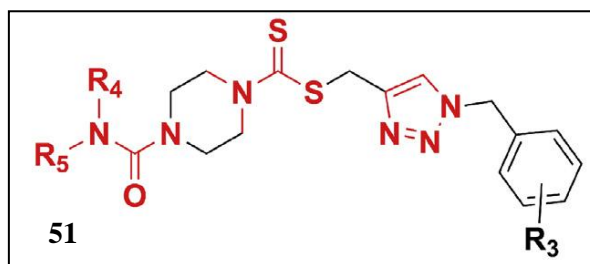


Figura 5.1 – Representação estrutural de híbridos compostos por 1,2,3-triazole, ditiocarbamato e ureia, **51** (imagem adaptada de ^[52]).

Os compostos foram testados nas linhas celulares cancerígenas humanas, MGC-803 (linha celular humana do cancro gástrico), MCF-7, SMMC-7721 (linha celular humana do carcinoma hepatocelular) e EC-9706 (linha celular humana do cancro esofágico).

Após análise da atividade antiproliferativa, e tendo como referência o fluorouracilo, verificou-se que a atividade era mais pronunciada nas linhas celulares MGC-803 e MCF-7. De entre todos os compostos testados salientam-se os resultados exibidos pelos conjugados **52** e **53**, representados na tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Atividades dos híbridos mais promissores, os compostos **52** e **53**, obtidos por conjugação de 1,2,3-triazole, ditiocarbamato e ureia. A atividade do 5-fluorouracilo é incluída para referência (tabela adaptada de ^[52]).

Compostos	R ₃	R ₄ R ₅ NH	IC ₅₀ (μM)			
			MCG-803	MCF-7	SMMC-7721	EC-9706
5-Fluorouracilo	---	---	7,14±1,26	7,33±0,54	26,71±2,66	0,32±0,25
52	<i>o</i> -F	(CH ₃) ₂ CHNH	1,62±0,12	1,86±0,41	7,13±0,36	20,84±2,19
53	<i>p</i> -F	(CH ₃) ₂ CHNH	0,76±0,03	1,66±0,53	5,97±1,02	12,19±1,34

Os dois compostos referidos não evidenciaram citotoxicidade significativa relativamente a células HEK293 (células humanas normais renais embrionárias). Porém, mostraram induzir apoptose em células cancerígenas, aumentando o número de células na interfase G2/M e levando, conseqüentemente, a um decréscimo de células nas fases G1 e S. ^[52]

Os compostos baseados em ureia são também relevantes ao nível da inibição da tradução. Começando por falar do complexo ternário, importa referir que este resulta da associação do fator eucariótico de iniciação da tradução 2 (eIF2) com *GTP* e com o iniciador metionina *tRNA* (*tRNA_i^{Met}*). A formação deste complexo é considerada um passo crítico na tradução, já que o papel primordial do fator eIF2 na tradução é a transferência do *tRNA_i^{Met}* para a subunidade 40S do ribossoma. ^[53,54]

Um modo de inibir a tradução é através da fosforilação da subunidade alfa do fator eIF2 (eIF2α), impedindo a formação do complexo ternário *eIF2-GTP-tRNA_i^{Met}* o que, conseqüentemente, compromete a síntese proteica. Esta reação de fosforilação ocorre sob certas condições, como sejam infeções virais, apoptose e transformações celulares. ^[54]

A redução da quantidade de complexo ternário inibe a tradução, o que por sua vez leva a uma diminuição na proliferação de células cancerígenas. Se a expressão do fator mutado eIF2α – S51A aumentar, bem como a expressão de *tRNA_i^{Met}*, aumenta também a quantidade de complexo ternário, havendo um descontrolo na tradução e conseqüentemente na proliferação de células tumorais.

Desta forma, a inibição da formação do complexo ternário pode ser uma abordagem a considerar no tratamento do cancro. Com base no que foi dito, identificaram-se N,N' – diarilureias com capacidade de induzir a fosforilação de eIF2α,

Fármacos Híbridos com Atividade Antineoplásica

Dissertação do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Algarve

reduzir o complexo ternário $eIF2-GTP-tRNA_i^{Met}$ e inibir os processos iniciadores da tradução. Deste modo, as N,N' – diarilureias passaram a ser consideradas no desenvolvimento de fármacos híbridos. ^[53]

6 Fármacos híbridos baseados em hormonoterapia

A hormonoterapia é usada para o tratamento de tumores hormonodependentes, de que são exemplo os tumores da mama, endométrio, tiróide, próstata, rim, ovário, linfomas, leucemia e melanomas. ^[18]

Com o objetivo do tratamento destes tumores, foram desenvolvidas moléculas híbridas que combinam duas ou mais entidades químicas ligadas entre si por unidades ligantes, em que uma delas é um esteróide. O intuito desta estratégia é incorporar na molécula um componente com elevada atividade antineoplásica, mas com reduzida capacidade de atingir um tecido específico sozinho, necessitando de outro componente molecular que direcione o conjunto para um tecido específico, de modo a reduzir a toxicidade. O exemplo descrito em seguida resulta da combinação de um esteróide com um fármaco da família das clormetina, com elevado potencial alquilante. ^[25,55]

O recetor de estrogénios alfa (*estrogen receptor alpha – ER α*) está expresso na mama, ovário e útero, sendo responsável pelos níveis de estradiol. Os tumores hormonodependentes são estimulados pelo *ER α* , pelo que este é um alvo a ter em conta no desenvolvimento de fármacos anticancerígenos. ^[55]

Recentemente foi criada uma biblioteca de compostos derivados da tirosina e clorambucil, **54** e **55**, representados na figura 6.1. A tirosina tem como intuito mimetizar o anel fenólico do núcleo de estradiol. Por seu lado, o clorambucil é uma molécula com atividade anticancerígena que atua por alquilação do *DNA*. ^[19,25,55]

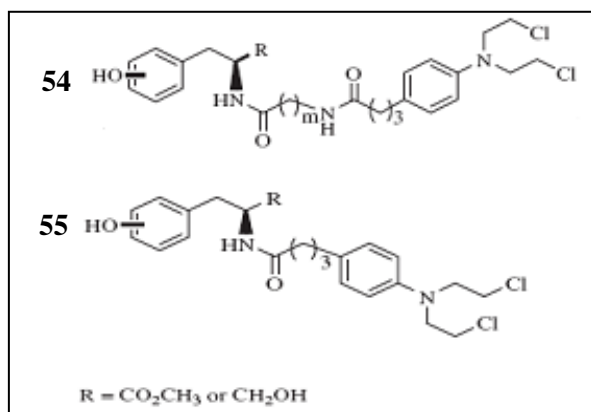


Figura 6.1 – Representação estrutural de híbridos, **54** e **55**, obtidos por conjugação de tirosina e clorambucil (imagem adaptada de ^[55]).

Após análise estrutural e de atividade verificou-se que a citotoxicidade dos conjugados é superior à do clorambucil mas que a tirosina não se encaixa perfeitamente

no $ER\alpha$. Assim, efetuou-se uma otimização estrutural que conduziu aos compostos **56** e **57**, representados na figura 6.2. Nestes compostos, que combinam o clorambucil com a tirosinamida, a estrutura mais alongada permite um melhor encaixe no sítio ativo. [55]

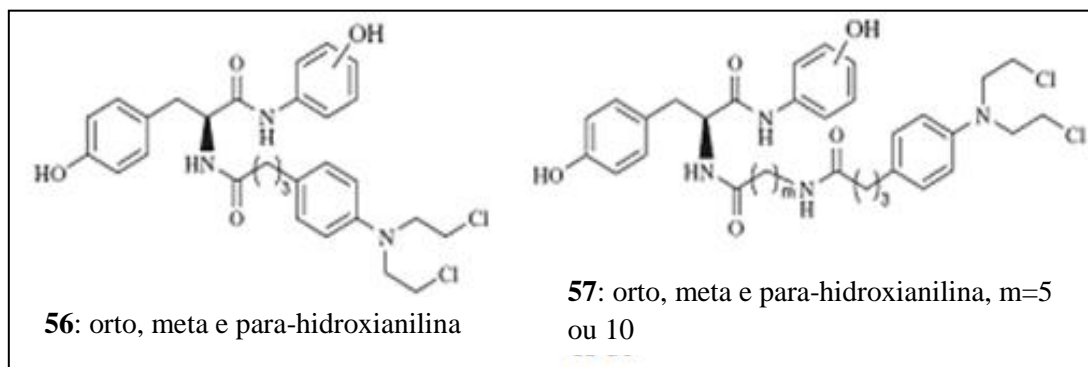


Figura 6.2 – Representação estrutural de híbridos compostos por tirosinamida e clorambucil, **56** e **57** (imagem adaptada de [55]).

Como mostra a figura 6.2, as estruturas otimizadas contêm mais um anel aromático de modo a aumentar a lipofilicidade.

A atividade biológica dos híbridos **56** e **57** foi avaliada nas linhas celulares MCF-7 (ER^+) e MDA-MB-231 (ER^-), do cancro da mama, tendo-se verificado que os derivados orto-, meta- e para- **56** e **57** (m=5) apresentam uma maior citotoxicidade que o clorambucil (controlo) com valores de IC_{50} menores que $130,36 \pm 2,92 \mu M$, para MCF-7, e que $136,85 \pm 6,79 \mu M$, para MDA-MB-231, correspondentes ao controlo. Importa ainda referir que o derivado meta- **56** mostrou ser o mais citotóxico de todos os regioisómeros com valores de IC_{50} de $31,25 \pm 2,29 \mu M$, para MCF-7, e de $48,61 \pm 6,28 \mu M$, para MDA-MB-231. [55]

Os híbridos **57** (m=5) foram também avaliados em várias células cancerígenas da mama, do ovário e do útero, tendo-se verificado uma vez mais uma maior atividade antineoplásica comparativamente ao clorambucil, tendo sido o regioisómero meta- **57** (m=5) o mais citotóxico. A entidade tirosínica é responsável pelo aumento da citotoxicidade, já que concentra maior quantidade de fármaco no recetor de estrogénio. [25,55]

É de salientar que todas as moléculas exibiram atividade, tanto em células hormonodependentes como hormonoindependentes. [55]

7 Fármacos antimaláricos com atividade antineoplásica

A classe das artemisininas (figura 7.1) é muito importante no tratamento da malária. Contudo, a utilização destes fármacos em regime de monoterapia comporta alguns problemas, como os curtos tempos de semivida, a absorção irregular, o aumento da frequência das tomas, entre outros. [56,57]

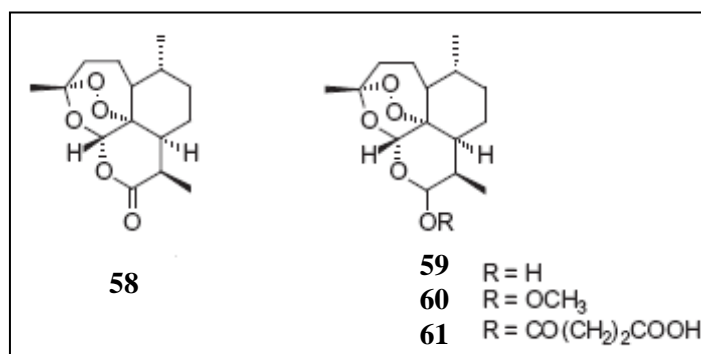


Figura 7.1 – Representação estrutural da artemisinina (**58**) e seus derivados dihidroartemisinina (**59**), artemeter (**60**), artesunato (**61**) (imagem adaptada de [56]).

As terapias combinadas à base de artemisininas foram consideradas como estratégia para ultrapassar as desvantagens referidas e são, por isso, efetivamente recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para tratamento de malária em zonas endémicas. Contudo, o aparecimento de casos de resistências por parte do parasita a estes fármacos, na fronteira entre a Tailândia e o Camboja, reforçou a necessidade de outras estratégias para combate à doença, entre as quais as que envolvem fármacos híbridos. [56]

Para além da sua importância no tratamento da malária, as artemisininas foram também testadas relativamente ao seu potencial antineoplásico. Alguns dos compostos desta classe atingiram a fase de ensaios clínicos, para tratamento do cancro da mama, do cancro do pulmão e do cancro colo-retal. As artemisininas demonstraram seletividade contra células de divisão rápida em que a concentração intracelular de Fe(II) é mais elevada. Estudos sobre a bioativação desta classe de fármacos demonstraram que o Fe(II), livre ou hémico, é essencial para a bioativação, sendo esta dependente da clivagem da ligação peróxido, o farmacóforo nas artemisininas, com formação de espécies radicalares. [57]

As células cancerígenas também exibem elevada capacidade de seleção de resistência, tornando relevante o desenvolvimento de compostos híbridos à base de

artemisinina para o tratamento de carcinomas. Porém, dado o conhecimento acumulado relativamente às características farmacológicas das artemisininas, a conceção de um híbrido que contenha um peróxido como um dos componentes ativos deve contemplar outras unidades que confirmam à molécula maior resistência metabólica e maior tempo de semivida.

Outra classe de moléculas relevante no tratamento de neoplasias é a dos compostos baseados em acridina. O mecanismo de ação desta classe está associado à intercalação entre as bases do *DNA*. Os anéis planares intercalam na dupla hélice, distorcendo-a, através de interações com as bases e, conseqüentemente, bloqueando a replicação, a inibição das topoisomerasas I e II, envolvidas nos processos de transcrição e replicação, e a inibição da acetilcolinesterase. [9,56]

Tendo em conta estes factos, criou-se uma biblioteca de compostos híbridos compostos por artemisinina e acridina, cuja estrutura base, **62**, se encontra representada na figura 7.2.

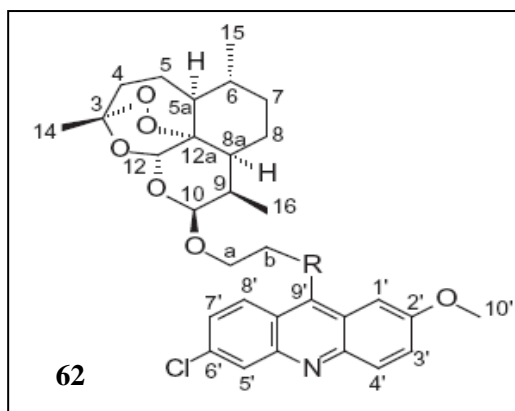


Figura 7.2 – Representação estrutural dos híbridos compostos por artemisinina e acridina, **62** (imagem adaptada de [56]).

Após análise estrutural e de atividade verificou-se que o híbrido **63** (figura 7.3), contendo o grupo de ligação alquílico etilenodiamina, apresenta uma elevada atividade antimalárica exibindo também uma citotoxicidade favorável contra a linha celular HeLa, obtida a partir de células cancerígenas cervicais (IC_{50} de $5,2 \pm 1,4 \mu M$). Já o híbrido com o grupo de ligação 2 – metilpiperazina, representado na figura 7.3 (**64**), apresenta somente uma citotoxicidade favorável, sendo mais potente que a cloroquina (IC_{50} de $17,7 \pm 1,3 \mu M$) e o melfalan (IC_{50} de $40 \pm 2,3 \mu M$), com um IC_{50} de $3,3 \mu M$. [56]

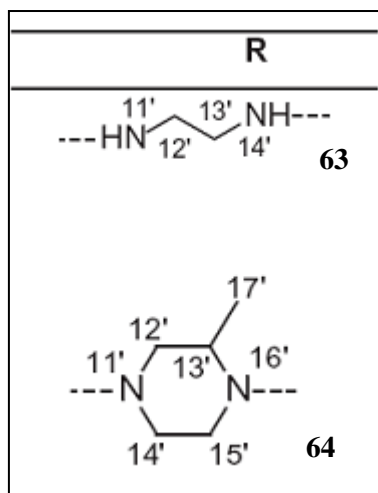


Figura 7.3 – Representação estrutural dos grupos de ligação etilendiamina (**63**) e 2-metilpiperazina (**64**) (imagem adaptada de ^[56]).

Importa referir que a existência de um grupo de ligação alquílico entre as duas unidades farmacologicamente ativas é importante pois confere uma maior flexibilidade à molécula e conseqüentemente aumenta a sua liberdade conformacional.

A inclusão de grupos de ligação alquílicos foi também considerada na conceção de uma biblioteca de compostos híbridos incluindo unidades de artemisinina e de polipirrole, com afinidade para a fenda menor do *DNA* (**65-71** figura 7.4).

De entre os compostos sintetizados, a molécula **66** mostrou ser a mais ativa contra as linhas celulares HT-29 e HL-60 (linha celular humana da leucemia), com valores de IC_{50} de $6,26 \pm 0,45 \mu M$ e de $0,11 \pm 0,03 \mu M$, respetivamente, comparativamente aos valores de IC_{50} da dihidroartemisinina de $12,92 \pm 2,31 \mu M$ e de $0,50 \pm 0,10 \mu M$, respetivamente. ^[57]

Devido à existência de um grupo de ligação longo e flexível, o farmacóforo e o grupo de ligação têm maior liberdade conformacional, o que favorece uma ligação mais adequada à fenda menor do *DNA*. ^[57]

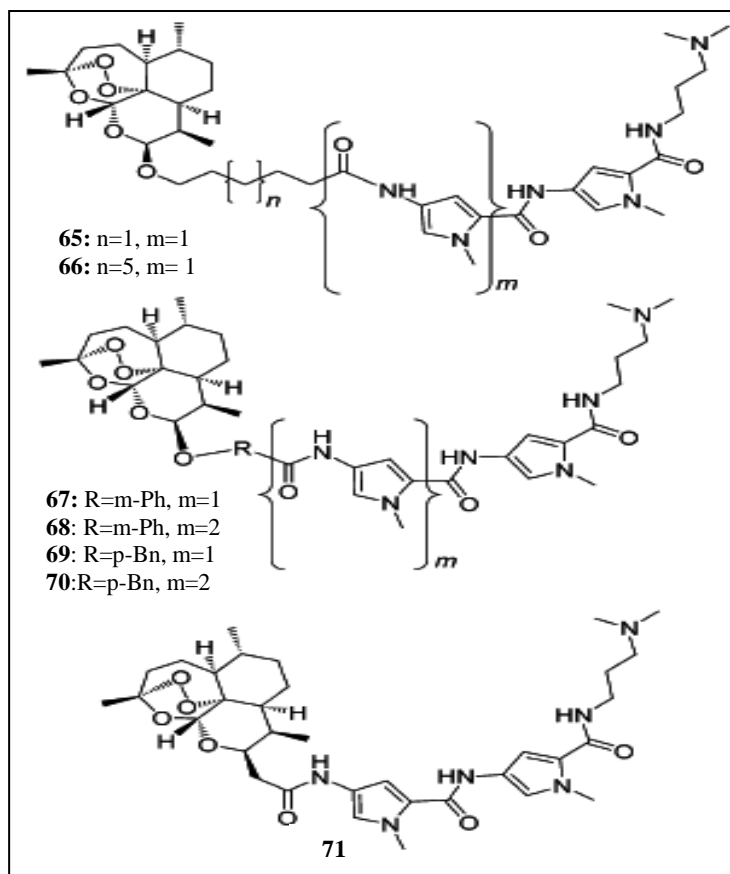


Figura 7.4 – Representação estrutural dos híbridos compostos por artemisinina e polipirrole, **65-71** (imagem adaptada de ^[57]).

Anteriormente falou-se nas limitações da artemisinina em situação de monoterapia. Além das opções já discutidas, pode-se referenciar uma outra que permite ultrapassar as limitações supracitadas e que consiste na conjugação de duas unidades de artemisinina (**58** – figura 7.1) através de um agente de ligação derivado da guanidina numa molécula híbrida (**72** – figura 7.4).

Foram desenvolvidas várias moléculas desta classe que foram testadas nas linhas celulares A549, HT-29 e MDA-MB-231, contudo os dímeros **72b** (Ar = 2,4-diclorofenil), **72d** (Ar = 4-trifluorometilfenil) e **72f** (Ar = 2-cloro-5-trifluorometilfenil) mostraram ser os mais ativos contra a linha celular HT-29, com valores de IC₅₀ de 0,05 μM, 0,06 μM e 0,02 μM, respetivamente, comparativamente ao valor de IC₅₀ do controlo dihidroartemisinina, para esta linha celular, de 12,0 μM. ^[58]

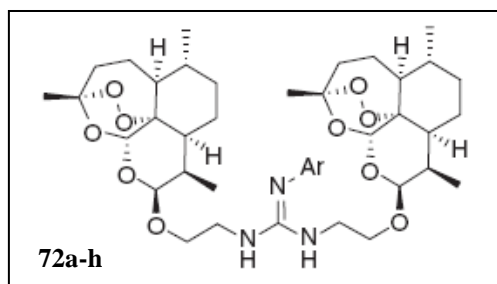


Figura 7.5 – Representação da estrutura base dos híbridos compostos por artemisinina e guanidina, **72a-h** (imagem adaptada de ^[58]).

Outra classe que importa referenciar é a das 4-aminoquinolinas, a qual inclui a cloroquina (**73** – figura 7.6), um fármaco bastante usado há várias décadas para o tratamento da malária, mas que se tornou inativo devido à seleção de resistência. A cloroquina tem vindo a ser estudada como potenciador da radioterapia e quimioterapia, bem como em terapia de combinação com outros fármacos. ^[21,59]

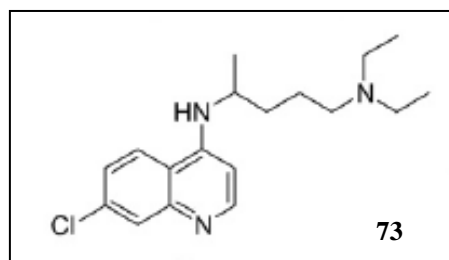


Figura 7.6 – Representação estrutural da cloroquina, **73** (imagem adaptada de ^[21]).

A cadeia lateral da cloroquina forma ligações por pontes de hidrogénio com as bases do *DNA*, e por interação iónica com o fosfato, pois a amina terciária protona facilmente. Estas interações contribuem para a intercalação do núcleo de quinolina entre as bases do *DNA*.

A cloroquina pode ser usada em combinação com o etopósido (**74** – figura 7.7), para o tratamento do cancro de pequenas células do pulmão, já que a quinolina diminui a toxicidade em células normais devida ao etopósido sem comprometer a atividade anticancerígena, aumentando assim a eficácia e especificidade. Estes fármacos acumulam-se preferencialmente em ambientes ácidos, comuns nos tumores sólidos, enquanto que as células em ambiente normal ficam protegidas. ^[21] Assim sendo, torna-se pertinente o desenho de uma molécula híbrida, incluindo os quimiotipos referidos anteriormente, num futuro próximo.

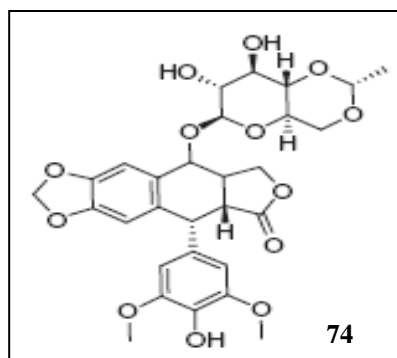


Figura 7.7 – Representação estrutural do etopósido, **74** (imagem adaptada de ^[25]).

A cloroquina por si só mostrou capacidade de inibição do crescimento celular e de indução de apoptose na linha celular A549. ^[60] Além disto, também diminui a viabilidade da linha celular humana do cancro da mama Bcap-37, de forma dependente da concentração, o que levou a considerar a sua eficácia como agente terapêutico contra o cancro da mama. ^[61]

Tendo em conta estes factos, afigura-se pertinente a utilização de cloroquina em fármacos híbridos, em conjugação com outras entidades farmacológicas de reconhecida atividade antitumoral, de modo a explorar a sua ação e propriedades. A avaliação deve basear-se na comparação da atividade do conjugado com as atividades, *de per si*, da cloroquina e do (s) outro (s) constituinte (s) da combinação.

Atualmente existem ensaios clínicos a decorrer com a cloroquina, sendo um deles de fase I e outro de fase II. O ensaio de fase I tem como objetivo perceber como a cloroquina faz com que as células tumorais sejam menos resistentes à quimio e radioterapia, sendo o objeto de estudo o cancro do pulmão de pequenas células. Já o ensaio de fase II tem como objetivo estudar a associação da cloroquina com taxanos ou agentes semelhantes, como sejam o paclitaxel e docetaxel, no cancro da mama avançado ou metastático. ^[62]

8 Inibidores da angiogénese

A angiogénese é um processo complexo de formação de vasos sanguíneos a partir de outros pré-existentes que envolve a produção e libertação de fatores angiogénicos, bem como a ligação destes fatores com os recetores celulares do endotélio vascular. ^[9,16,24]

Para que este processo ocorra, as metaloproteinases extracelulares degradam a matriz das células endoteliais, que conseqüentemente migram para o tecido tumoral, onde se organizam de modo a formar novos vasos sanguíneos. ^[24]

É importante referir que as células tumorais, devido ao maior fornecimento sanguíneo e à libertação de estimuladores da metastização, como por exemplo a interleucina 6, têm uma capacidade aumentada de metastizar. ^[9]

Existem várias moléculas endógenas envolvidas no controlo da angiogénese, como os fatores de crescimento do endotélio vascular (*vascular endothelial growth factors – VEGF's*), os fatores de crescimento de fibroblastos (*fibroblast growth factors – FGF's*), os fatores de crescimento derivados de plaquetas (*platelet-derived growth factors – PDGF's*), os fatores de crescimento epidérmicos (*epidermal growth factors – EGF's*), os seus correspondentes recetores de tirosina cinase e as metaloproteinases da matriz (*matrix metalloproteinases – MMP's*).

Em células não tumorais, a angiogénese é controlada por inibidores como a trombospondina-1, a angiostatina, a endostatina, a tumstatina e a constatina. Porém, este controlo não existe em células tumorais. ^[9,24]

A vasculatura tumoral é suscetível aos agentes perturbadores vasculares (*vascular disrupting agents – VDA's*), sendo a classe mais conhecida a dos agentes que atuam ao nível da tubulina, que combinam efeitos anti-vasculares e anti-mitóticos. ^[24]

A inibição da angiogénese é uma estratégia a ter em conta no combate ao cancro. A monoterapia não tem os benefícios pretendidos mas a combinação de tratamentos anti-angiogénicos com a quimioterapia convencional potencia os efeitos dos fármacos. Assim, a estratégia de conceção de fármacos híbridos deve ter em conta um potencial aumento da seletividade, retardar a seleção de resistência e melhorar as propriedades farmacocinéticas. ^[9,24]

Como exemplos de abordagem baseada em inibidores de angiogénese, podemos referir vários compostos, descritos em seguida.

O conjugado de paclitaxel e RGD encontra-se representado na figura 8.1 (75). O RGD é um péptido de arginina-glicina-ácido aspártico antagonista da α -integrina, presente nas células endoteliais durante a angiogénese que inibe a proliferação celular de forma específica o que por consequência reduz a sua toxicidade. Tal acontece, por exemplo, nas células tumorais da mama com expressão de $\alpha_v\beta_3$ -integrina. Aprofundando um pouco mais, a $\alpha_v\beta_3$ -integrina é uma molécula com uma sequência do péptido RGD exposta, presente em células endoteliais durante a angiogénese em tumores, com o intuito de promover a adesão celular à matriz extracelular. [24,63]

O conjugado de paclitaxel-RGD 75 foi testado na linha celular humana do cancro da mama MDA-MB-435 e apresentou um valor de IC_{50} de 134 ± 28 nM, sendo portanto menos potente que o paclitaxel (IC_{50} de 34 ± 5 nM). [64]

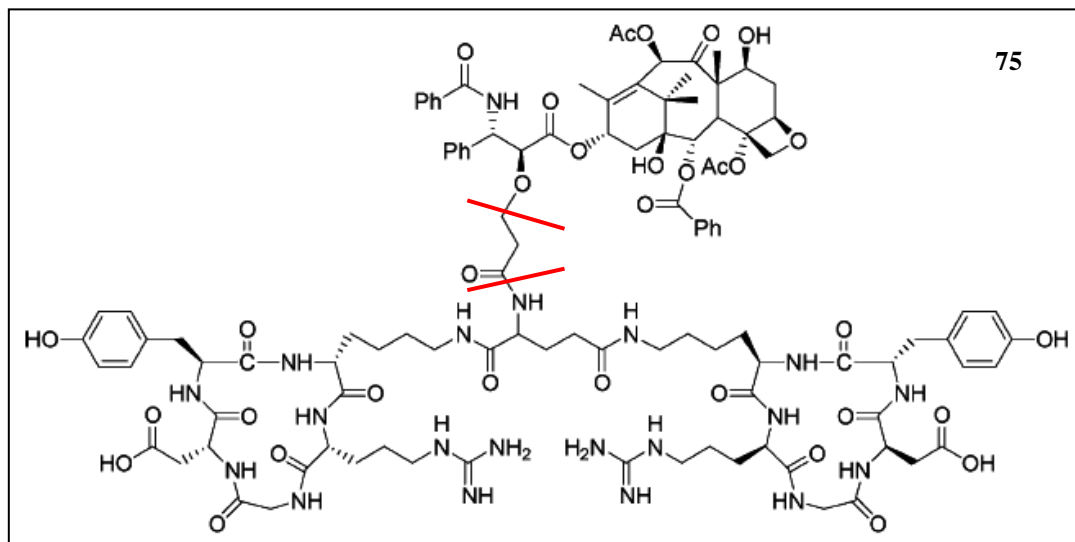


Figura 8.1 – Representação da estrutura do conjugado paclitaxel-RGD, 75 (imagem adaptada de [64]).

Outro exemplo é o híbrido MMAE-HSA-RGD, resultante da conjugação de monometil auristatina E (*monomethyl auristatin E – MMAE*), um agente com atuação ao nível da tubulina representado na figura 8.2 (76), com albumina do soro humana (*human serum albumin – HSA*) e com o péptido RGD. Este híbrido inibe a proliferação de células humanas endoteliais da veia umbilical, *HUVEC*'s, e induz a apoptose da linha celular MDA-MB-435 com expressão positiva para $\alpha_v\beta_3$ -integrina. [63,65]

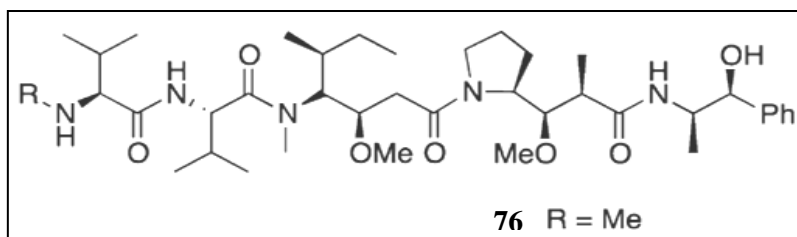


Figura 8.2 – Representação estrutural de monometil auristatina E, *MMAE*, **76** (imagem adaptada de ^[63]).

Foram também concebidos híbridos com ação ao nível da tubulina que exibem propriedades anti – angiogénicas, destacando-se os híbridos de paclitaxel (taxol) e camptotecina (figura 8.3, **77-79**), bem como de um mimético do taxol à base de adamantano e colquicina (figura 8.4, **80**).

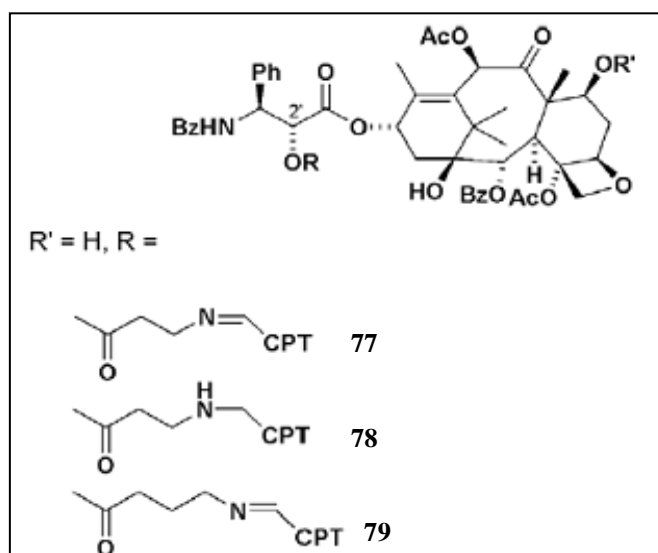


Figura 8.3 – Representação estrutural dos híbridos **77-79**, conjugados de camptotecina e paclitaxel (imagem adaptada de ^[41]).

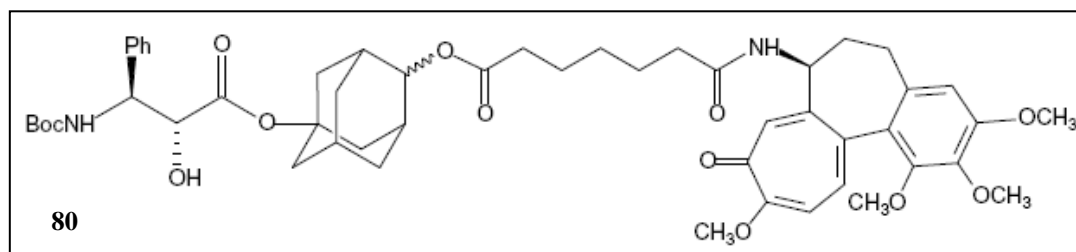


Figura 8.4 – Representação estrutural do híbrido **80**, que conjuga um mimético do taxol à base de adamantano e colquicina (imagem adaptada de ^[66]).

Os híbridos **77-79**, além das propriedades anti – angiogénicas exibem atividade inibitória reduzida contra fibroblastos humanos normais do pulmão e apresentam atividade aumentada contra as linhas celulares PC-3 e LN-CAP. ^[41] O composto **80** apresenta citotoxicidade aumentada na linha celular humana A549 com um valor de IC₅₀ de 0,0006 µM. ^[66]

Foram recentemente publicados alguns trabalhos sobre híbridos baseados em isoflaveno. Importa referir que o isoflaveno (**81** – figura 8.5) apresenta atividade anti-proliferativa e como tal tem vindo a ser considerado para o tratamento do cancro do ovário resistente e do cancro da próstata. Um dos conjugados desta classe associa isoflaveno e propanolol (**85** – figura 8.6), um β-bloqueador que demonstrou capacidade para potenciar propriedades anti-angiogénicas e anti-proliferativas de fármacos anticancerígenos como o 5-fluorouracilo e o paclitaxel. ^[16]

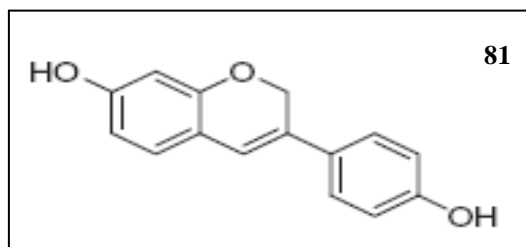


Figura 8.5 – Representação estrutural do isoflaveno, **81** (imagem adaptada de ^[16]).

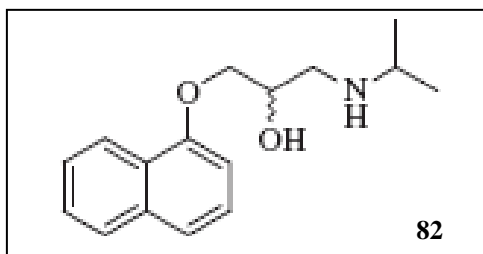


Figura 8.6 – Representação estrutural do propanolol, **82** (imagem adaptada de ^[16]).

Foi concebida e preparada uma biblioteca de compostos híbridos, incorporando o propanolol e o isoflaveno, cujas estruturas estão representadas na figura 8.7, **83a-j**.

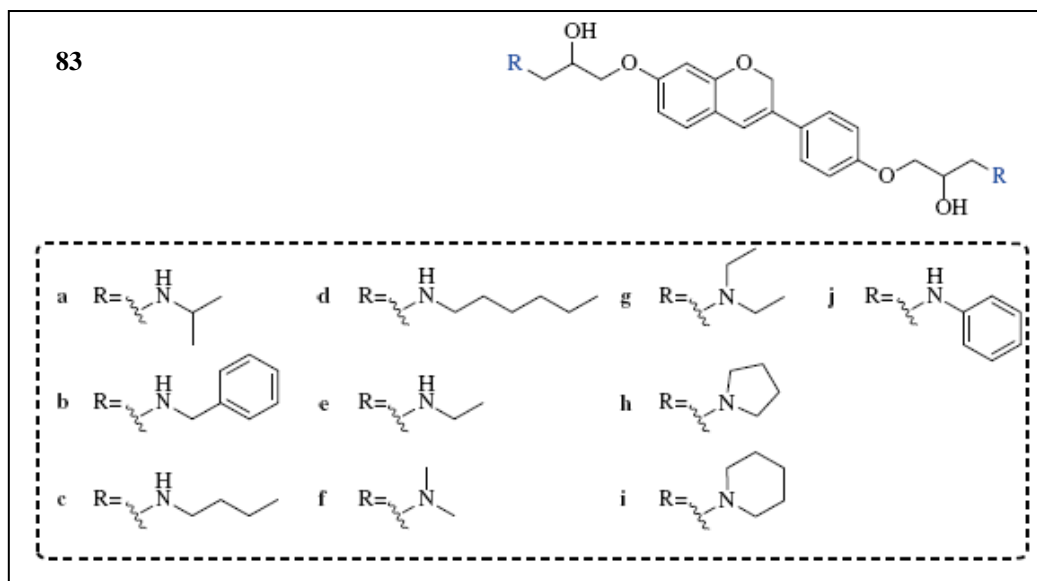


Figura 8.7 – Representação estrutural dos híbridos compostos por isoflaveno e propanolol, **83a-j** (imagem adaptada de [16]).

A atividade anti-proliferativa destes compostos foi estudada usando a linha celular MDA-MB-231, a linha celular humana do neuroblastoma SHEP, a linha celular humana do endotélio microvascular HMEC-1 e a linha celular MRC-5. A atividade anti-angiogénica foi estudada usando a linha celular HMEC-1.

Todas as moléculas apresentaram atividade anti-proliferativa e potencial anti-angiogénico elevados, comparativamente aos compostos de referência isoflaveno e propanolol. Porém os compostos **83d** e **83e** foram considerados os mais promissores, sendo os valores de GI_{50} correspondentes apresentados na tabela 8.1. O aumento de atividade observado foi acompanhado por uma maior toxicidade na linha celular MRC-5. [16]

Tabela 8.1 – Representação dos híbridos mais promissores, **83d** e **83e**, bem como dos compostos de referência isoflaveno e propanolol (tabela adaptada de [16]).

Compostos	GI_{50} (μ M)			
	HMEC-1	MDA-MB-231	SHEP	MRC-5
Isoflaveno	4,1	62,9	8,0	109
Propanolol	149	205	109	150
83d	0,7	2,9	3,0	28,3
83e	2,7	2,0	2,8	22,3

9 Fármacos com atuação direta no DNA

O benzotiazol (figura 9.1, **84**) é um composto heterocíclico cuja aromaticidade contribui para a sua estabilidade, contendo na sua estrutura locais reativos que permitem a sua funcionalização. Este liga-se ao recetor de hidrocarboneto arílico (*aryl hydrocarbon receptor – AhR*) em células tumorais sensíveis, levando à destruição do DNA, em consequência da formação de intermediários reativos. Encontram-se na literatura derivados de benzotiazol com propriedades anticancerígenas, antimicrobianas, anti-inflamatórias, antivirais e antidiabéticas. [67,68]

O composto pirrolobenzodiazepina (figura 9.2, **85**) é um antibiótico natural com efeitos citotóxicos e antitumorais, atuando por alquilação do DNA e também por inibição da síntese de ácidos nucleicos. Este composto tem potencial de ligação à fenda menor (*minor groove*) do DNA. [25,68]

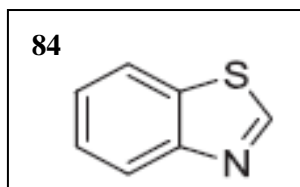


Figura 9.1 – Representação estrutural do benzotiazol, **84** (imagem adaptada de [68]).

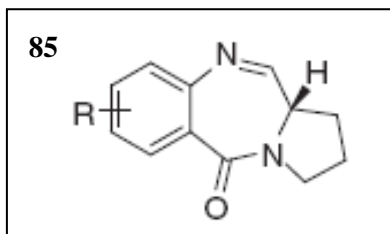


Figura 9.2 – Representação estrutural dos compostos derivados da pirrolobenzodiazepina, **85** (imagem adaptada de [25]).

Tendo em conta a relevância das propriedades destes compostos foi criada uma biblioteca de compostos híbridos, associando benzotiazol e pirrolobenzodiazepina e de derivados benzotiazol, cujas estruturas estão representadas na figura 9.3 (**86a-c**). Contudo, nesta monografia o foco são os compostos híbridos.

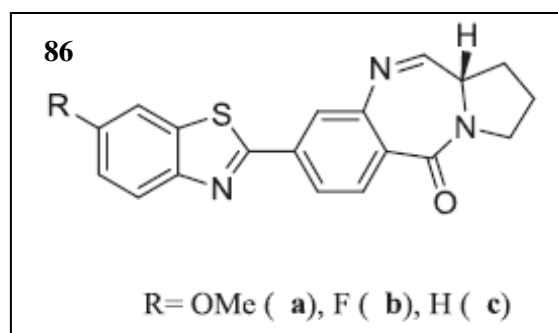


Figura 9.3 – Representação estrutural de híbridos de benzotiazol e pirrolobenzodiazepina, **86a-c** (imagem adaptada de ^[68]).

Estes compostos foram testados na linha celular humana da leucemia monocítica aguda THP-1, na linha celular humana do linfoma histiocítico U-937, na linha celular HL-60, na linha celular A549 e na linha celular humana da leucemia de células T *Jurkat*. Estas linhas celulares foram expostas a diferentes concentrações dos compostos, sendo as suas citotoxicidades comparadas com a atividade da camptotecina e do etopósido, consideradas como referência.

De entre os híbridos testados o **86b**, com o flúor como substituinte, exibiu maior atividade, como se pode constatar na tabela 9.1, sendo mais potente na linha celular THP-1. Tal deve-se possivelmente ao facto de a permeabilidade celular ser maior relativamente a compostos com flúor. Além disso, o flúor está geralmente associado a um aumento da estabilidade metabólica, pois mimica o hidrogénio mas impede a hidroxilação na mesma posição. ^[68]

Tabela 9.1 – Valores de IC₅₀ obtidos para os híbridos **86a-c** nas linhas celulares THP-1, A-549, HL-60, *Jurkat* e U-937 (tabela adaptada de ^[68]).

Composto	IC ₅₀ (µM)				
	THP-1	A-549	HL-60	<i>Jurkat</i>	U-937
86^a	2,14 ± 0,18	NT	6,39 ± 2,12	11,27 ± 1,40	6,03 ± 0,51
86^b	0,49 ± 0,11	NT	4,13 ± 1,57	6,58 ± 1,05	3,44 ± 0,29
86^c	3,09 ± 0,26	NT	7,27 ± 3,15	9,43 ± 1,56	5,41 ± 0,44
Etopósido	2,16 ± 0,15	9,51 ± 1,33	1,83 ± 0,20	5,35 ± 0,63	17,94 ± 1,19
Camptotecina	0,071±0,0053	0,008±0,006	0,60 ± 0,03	0,026 ± 0,002	1,98 ± 0,11

NT = não testado.

10 Híbridos que incluem fármacos inorgânicos

Os complexos de platina, de que são exemplos a cisplatina (**87**), a carboplatina (**88**) e a oxaliplatina (**89**), representados na figura 10.1, são usados na terapia de vários tipos de cancro como o carcinoma do ovário, o cancro do pulmão e o cancro da cabeça e pescoço. Estes complexos geram espécies reativas de platina que formam reticulações (*crosslinks*) com o *DNA* e inibem mecanismos de reparação celular. [25,69]

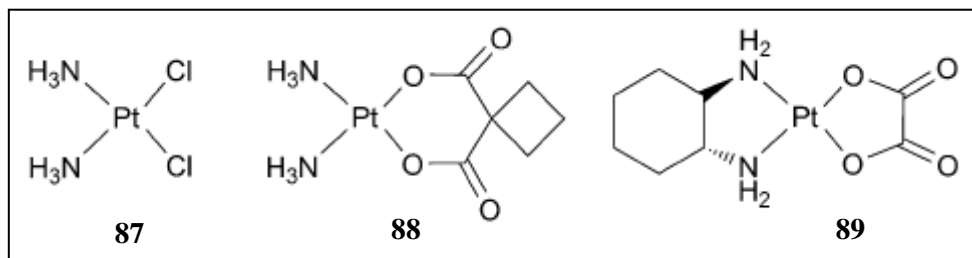


Figura 10.1 – Representação estrutural da cisplatina, **87**, da carboplatina, **88**, e da oxaliplatina, **89** (imagem adaptada de [69]).

Falando mais em detalhe da cisplatina, esta molécula tem uma acumulação celular lenta e forma reticulações intracadeia no *DNA*. A cisplatina tem de sofrer bioativação por reação com água, de modo a reagir com centros nucleofílicos ricos em guanina. Após ligação ao *DNA* abranda a replicação deste, induzindo uma paragem do ciclo celular na interfase G2/M. Importa referir que há um rápido desenvolvimento de resistências a este fármaco, que possui um perfil de toxicidade algo desfavorável.

No desenvolvimento de novos antineoplásicos baseados em complexos de platina importa ter em consideração o carácter policatiónico das moléculas, pois este induz uma forte associação eletrostática com o *DNA* e favorece a entrada da molécula em células cancerígenas. [69]

A acridina (**90**), representada na figura 10.2, é um fármaco cujo mecanismo de ação principal se baseia na intercalação no *DNA*, já que o seu sistema aromático, extenso e planar, permite estabelecer interações pi (π) com as bases do *DNA*. Este composto tem ainda a capacidade de inibir a topoisomerase. [25,36]

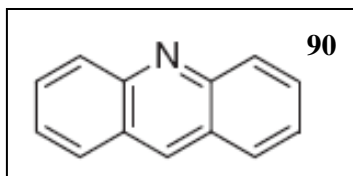


Figura 10.2 – Representação estrutural da acridina, **90** (imagem adaptada de ^[25]).

Tendo em conta as propriedades farmacológicas dos dois quimiotipos, foi criada uma molécula híbrida contendo platina e acridina, o PT-ACRAMTU (**91**), cuja estrutura está representada na figura 10.3.

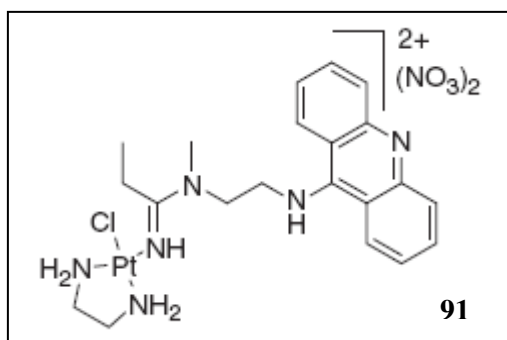


Figura 10.3 – Representação estrutural do híbrido PT-ACRAMTU, **91** (imagem adaptada de ^[25]).

Estruturalmente, o composto tem apenas um cloro ligado à platina, que origina o grupo abandonante cloreto, e apresenta um grupo de ligação semi-rígido, com alguma liberdade conformacional, de modo a favorecer a ligação com o *DNA*. O PT-ACRAMTU acumula-se rapidamente na célula, intercala-se de forma monofuncional no *DNA*, estabilizando-o, e induz a paragem do ciclo celular na fase S. ^[25,69]

Este híbrido tem atividade em vários tipos de tumores sólidos, como o do ovário, incluindo linhas celulares sensíveis e resistentes à cisplatina, em células não pequenas do pulmão (*non-small-cell lung carcinoma – NSCLC*), do cólon, da mama, do pâncreas e do cérebro. ^[69,70]

O PT-ACRAMTU é aproximadamente 100 vezes mais citotóxico que a cisplatina no *NSCLC* quimio-resistente, mais especificamente nas linhas celulares NCI-H460 e NCI-H522. Contudo, exibe uma grande toxicidade sistémica já que não é seletivo. ^[25,69]

Tendo em consideração que o glioblastoma multiforme é a forma mais agressiva de cancro ao nível cerebral, foram levados a cabo estudos de modo a verificar o possível efeito do híbrido PT-ACRAMTU neste tipo de cancro. Assim, o PT-ACRAMTU foi

testado nas linhas celulares humanas do glioblastoma multiforme SNB19 e U87MG, tendo mostrado citotoxicidade em ambas as linhas celulares, com um IC_{50} de $0,37 \pm 0,06 \mu\text{M}$ e $0,75 \pm 0,04 \mu\text{M}$, respetivamente. Estes valores foram comparados com os valores de IC_{50} da cisplatina para as mesmas linhas celulares, tendo-se obtido $0,81 \pm 0,03 \mu\text{M}$ e $0,49 \pm 0,09 \mu\text{M}$, respetivamente.

Pode-se também afirmar que a ligação de platina monofuncional a ACRAMTU (figura 10.4, **92**) aumenta significativamente a citotoxicidade, já que o valor de IC_{50} do ACRAMTU para a linha celular SNB19 é de $2,46 \pm 0,01 \mu\text{M}$ e para a linha celular U87MG é de $1,83 \pm 0,04 \mu\text{M}$.^[70]

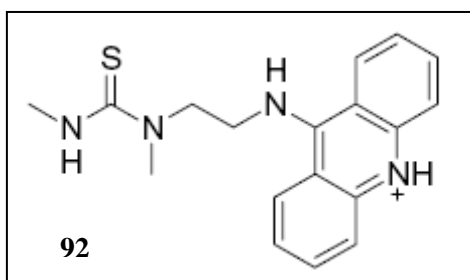


Figura 10.4 – Representação estrutural do ACRAMTU, **92** (imagem adaptada de^[70]).

O PT-ACRAMTU tem a capacidade de ativar a caspase-3 em ambas as linhas celulares, induzindo a apoptose. Importa explicitar que as caspases catalisam a hidrólise de proteínas celulares envolvidas em processos inflamatórios, reparação do *DNA*, regulação do ciclo celular e apoptose.^[9,70]

11 Inibidores de Vias de Sinalização

11.1 Isatina – Chalcona

As chalconas (figura 4.8.1, **35**) têm aplicação no tratamento da malária, do cancro, de infeções e de inflamações, sendo de salientar que também exibem atividade ao nível do cancro da mama.

A isatina (figura 11.1.1, **93**) tem potencial como agente farmacológico, evidenciando atividade anticancerígena, antiangiogénica, antiviral, antibacteriana, antituberculostática, antifúngica, anticonvulsivante e antimalárica. ^[71]

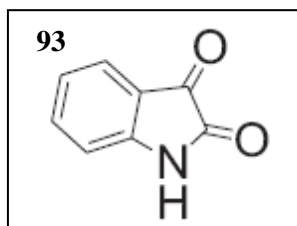


Figura 11.1.1 – Representação estrutural da isatina, **93** (imagem adaptada de ^[71]).

As isatinas atuam através de vários mecanismos moleculares que incluem a inibição das *CDK* através da ligação à bolsa de trifosfato de adenosina (*adenosine triphosphate – ATP*) e a inibição da caspase, pois fazem parte da estrutura química dos inibidores da tirosina cinase. ^[71,72]

Assim, considerou-se o acoplamento de isatina e chalcona na conceção de híbridos, para possível aplicação no tratamento do cancro da mama. As estruturas dos híbridos considerados estão representadas na figura 11.1.2 (**94a-j**, **95a-c**, **96**) e os respetivos substituintes encontram-se indicados na tabela 11.1.1.

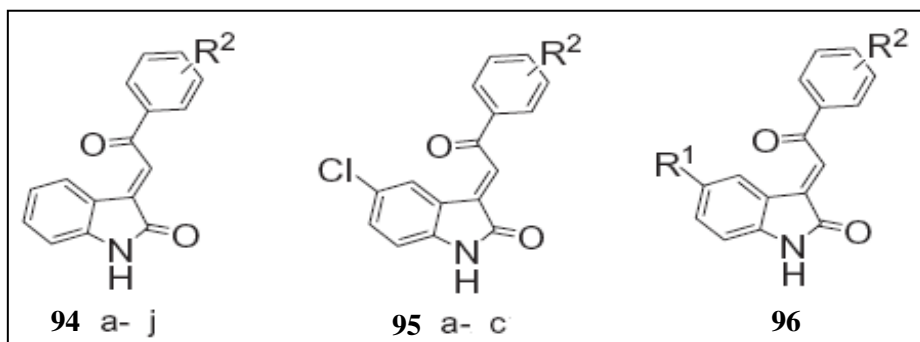


Figura 11.1.2 – Representação estrutural dos híbridos resultantes da conjugação da isatina e chalcona, **94a-j**, **95a-c**, **96** (com bromo como substituinte R¹) (imagem adaptada de ^[71]).

Tabela 11.1.1 – Substituintes R2 nos híbridos resultantes da conjugação da isatina e chalcona **94a-j**, **95a-c**, **96** (tabela adaptada de ^[71]).

Composto	R2	Composto	R2
94^a	H	94h	2-OCH ₃
94b	4-F	94i	3,4-OCH ₃
94c	4-Cl	94j	4-CH ₃
94d	4-Br	95a	H
94e	4-NO ₂	95b	4-F
94f	3-NO ₂	95c	3,4-OCH ₃
94g	4-OCH ₃	96	H

Os compostos **94-96** foram testados nas linhas celulares MDA-MB-468, MDA-MB-231 e MCF-7.

O composto **95c**, com substituintes 3,4-dimetoxi no anel fenílico, exibiu a atividade mais elevada nas linhas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-468 (cancro da mama) e MCF-7, com valores de GI₅₀ de 8,54 μM, 4,76 μM e 3,59 μM, respetivamente, em comparação com o controlo cisplatina que exibiu valores de GI₅₀ de 23,65 μM, 31,02 μM e 25,77 μM, respetivamente, naquelas linhas celulares. É de salientar que não se observou efeito inibitório destes compostos em proteínas cinase. ^[71]

11.2 Pirazol – Quinolina – Piridina

O recetor do fator de crescimento epidérmico (*epidermal growth factor receptor* – *EGFR*) encontra-se nas membranas celulares do epitélio dos mamíferos, estando relacionado com a proliferação e diferenciação celular bem como com a apoptose. Tem um papel relevante no desenvolvimento de tumores sólidos como o cancro do pulmão de não pequenas células, o cancro da cabeça e pescoço bem como os glioblastomas. ^[73,74]

Foram identificados derivados de pirazol com atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antituberculostática e anticancerígena. Por sua vez, os farmacóforos quinolina e piridina têm atividade inibitória do *EGFR*.

Tendo por base as propriedades elencadas, foram concebidos e desenvolvidos compostos híbridos contendo os quimiotipos referidos, cujas estruturas estão representadas na figura 11.2.1, **97a-l**. ^[73]

Todos os compostos foram testados na cinase *EGFR*, na linha celular A549 e na linha celular humana do cancro do fígado HepG2, e os resultados foram comparados com os exibidos pelo controlo positivo erlotinib (inibidor do *EGFR*).^[9,73]

Na linha celular A549 os compostos que revelaram maior eficácia foram o **97h** ($IC_{50} = 0,25 \pm 0,13 \mu\text{M}$), o **97k** ($IC_{50} = 0,18 \pm 0,09 \mu\text{M}$) e o **97l** ($IC_{50} = 0,21 \pm 0,16 \mu\text{M}$), comparativamente ao controlo, cujo valor de IC_{50} é de $0,13 \pm 0,01 \mu\text{M}$. Na linha celular HepG2 o composto que demonstrou maior eficácia foi o **97h** com um IC_{50} de $1,30 \pm 0,05 \mu\text{M}$ (IC_{50} de $0,12 \mu\text{M}$ para o controlo).

Relativamente à inibição do *EGFR*, os compostos que exibiram maior potência são o **97h** ($IC_{50} = 0,91 \pm 0,02 \mu\text{M}$), o **97k** ($IC_{50} = 0,51 \pm 0,05 \mu\text{M}$) e o **97l** ($IC_{50} = 1,03 \pm 0,02 \mu\text{M}$) (IC_{50} de $0,032 \pm 0,002 \mu\text{M}$ para o controlo).^[73]

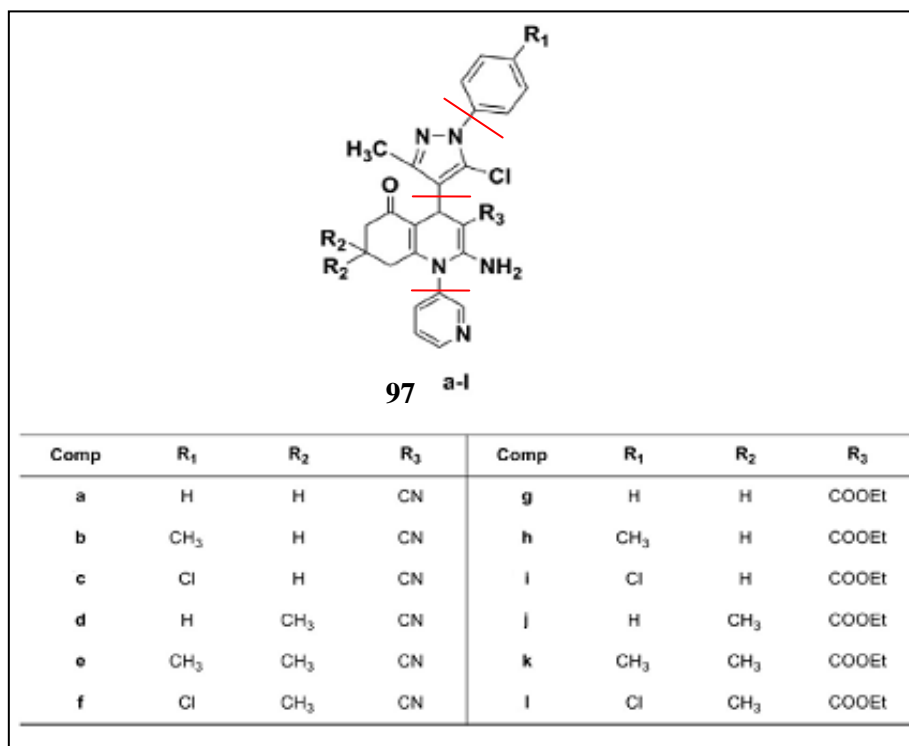


Figura 11.2.1 – Representação estrutural dos compostos híbridos resultantes da conjugação do pirazol, quinolina e piridina, **97a-l** (imagem adaptada de^[73]).

Os resultados dos estudos de relação estrutura-atividade permitiram inferir que os compostos com um grupo metilo como substituinte R1 têm energias de ligação mais baixas e uma atividade anticancerígena mais potente, relativamente aos restantes compostos.^[73]

12 Conclusão

Os fármacos híbridos permitem contornar problemas associados às interações entre fármacos distintos, inerentes a terapias de combinação. Espera-se que o desenvolvimento de moléculas híbridas para tratamento de neoplasias conduza a soluções quimioterapêuticas com menor toxicidade e efeitos adversos, mais amplo espetro de ação, maior seletividade para os tecidos alvo e, um ponto muito importante, retardem a seleção de resistências. Tendo em conta as características elencadas, os fármacos híbridos têm particular importância em doenças com um grande impacto social e económico, como é o caso do cancro.

Além das razões enumeradas, o desenho racional de um fármaco para aplicação no tratamento do cancro que não se baseie num quimiotipo já conhecido implica gastos mais avultados, associando-se também a maior demora na resposta a um problema que afeta um número crescente de pessoas.

Assim, é muito pertinente o uso de moléculas já conhecidas, e com atividade anticancerígena comprovada, na conceção dos híbridos, de modo a propiciar o controlo dos gastos implicados e do tempo de resposta, no desenvolvimento, licenciamento e comercialização das moléculas selecionadas.

Com base na pesquisa bibliográfica que suporta a presente dissertação, e tendo em atenção a sumarização na tabela 12.1, podem-se referir como quimiotipos promissores as moléculas **52** e **53**, resultantes da conjugação de 1,2,3-triazole, ditiocarbamato e ureia, para as linhas celulares MCG-803 e MCF-7, relativas ao cancro gástrico e ao cancro da mama, respetivamente. Estes cancros apresentam um elevado grau de incidência e mortalidade a nível europeu. As moléculas referidas exibiram uma maior atividade antineoplásica que a exibida pelo fluorouracilo, um fármaco bastante usado em vários tipos de neoplasias.

As moléculas **72b**, **72d** e **72f**, resultantes da conjugação de artemisinina e guanidina, são também alvo de atenção, já que se revelam promissoras para a linha celular HT-29 relativa ao cancro colo-retal, a segunda causa de morte ao nível da Europa.

Tabela 12.1 – Sumarização dos compostos híbridos retratados na dissertação bem como das linhas celulares/modelos e neoplasias alvos de estudo.

Entidade química	Tipos de neoplasias	Linhas celulares/modelos
Paclitaxel – Daunorrubicina	-----	-----
Paclitaxel – Clorambucil	Cancro do cólon	HCT-116
	Carcinoma do pulmão	Murino M109
Paclitaxel – Camptotecina	Cancro da mama	MCF-7
	Cancro da próstata	PC-3
	Epidermoide da nasofaringe	KB
		KB-CPT
	Carcinoma do ovário	1A9
		1A9-PTX10
Adenocarcinoma do cólon	HCT-8	
Paclitaxel – Epipodofilotoxina/ Ácido glicirretínico/ Camptotecina	Carcinoma do ovário	1A9
	Cancro do pulmão	A549
	Cancro da mama	MCF-7
	Epidermoide da nasofaringe	KB
		KB-VIN
	Cancro da próstata	LN-CAP
PC-3 DU-145		
Derivados da combretastatina A-4	Neuroblastoma	SH-SY5Y
Colquicina – Paclitaxel	Carcinoma do ovário	1A9
	Cancro do pulmão	A549
	Cancro da mama	MCF-7
	Cancro da próstata	LN-CAP
		PC-3 DU-145
	Epidermoide da nasofaringe	KB
KB-VIN		
Combretastatina A-4 – Lamelarina T	-----	-----
Combretastatina A-4 – Chalcona	Cancro do cólon	HCT-116
	Melanoma	Murino B16
	Carcinoma epidermoide	A431
Discodermólido – Dictioestatina	Cancro da mama	MDA-MB-231
	Cancro do ovário	OV2008
		NCI/ADR-Res
	Cancro do pulmão	A549
	Adenocarcinoma do cólon	HT-29
		DLD-1
Cancro do pâncreas	PANC-1	
	AsPC-1	
Taltobulina – Dolastina	Epidermoide da nasofaringe	KB-3-1
		KB-8-5
		KB-V1
1,2,3-triazole – Ditiocarbamato – Ureia	Cancro gástrico	MGC-803
	Carcinoma hepatocelular	SMMC-7721
	Cancro esofágico	EC-9706

	Cancro da mama	MCF-7
Tirosinamida – Clorambucil	Cancro da mama	MCF-7 MDA-MB-231
Artemisinina – Acridina	Cancro cervical	HeLa
Artemisinina – Polipirrole	Leucemia	HL-60
	Adenocarcinoma do cólon	HT-29
Artemisinina – Guanidina	Cancro do pulmão	A549
	Adenocarcinoma do cólon	HT-29
Paclitaxel – RGD	Cancro da mama	MDA-MB-231
MMAE-HSA-RGD	Cancro da mama	MDA-MB-435
Mimético do taxol à base de Adamantano – Colquicina	Cancro do pulmão	A549
Isoflaveno – Propanolol	Cancro da mama	MDA-MB-231
	Neuroblastoma	SHEP
Benzotiazol – Pirrolobenzodiazepina	Leucemia monocítica aguda	THP-1
	Linfoma histiocítico	U-937
	Leucemia	HL-60
	Cancro do pulmão	A549
	Leucemia de células T	<i>Jurkat</i>
Platina – Acridina (PT-ACRAMTU)	Cancro do pulmão de células não pequenas	NCI-H460 NCI-H522
	Glioblastoma multiforme	SNB19 U87MG
Isatina – Chalcona	Cancro da mama	MDA-MB-231 MDA-MB-468 MCF-7
Pirazol – Quinolina – Piridina	Cancro do pulmão	A549
	Cancro do fígado	HepG2

As entidades químicas híbridas referidas neste manuscrito e outras que se encontram em desenvolvimento são uma mais-valia, pois podem servir de base ao desenvolvimento de formulações que constituam uma resposta relativamente rápida para neoplasias específicas.

Porém, a investigação de base já realizada requer um investimento contínuo, incluindo ensaios clínicos, para comprovar a eficácia das moléculas selecionadas e avaliar a viabilidade do desenvolvimento de formulações, sendo necessária também uma uniformização ao nível dos ensaios *in vitro* em termos das concentrações de fármaco a que as linhas celulares são expostas, bem como ao nível dos tempos de exposição.

Como é sabido, o desenvolvimento de fármacos requer parcerias ou protocolos entre universidades ou centros de investigação, que seguem o processo desde a vertente de desenvolvimento inicial, vulgarmente designada por *early development*, hospitais e parceiros da indústria farmacêutica, que proporcionam valências e meios para

Fármacos Híbridos com Atividade Antineoplásica

Dissertação do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Algarve

desenvolvimento avançado, *late development*. São envolvidos no processo cientistas com valências multidisciplinares, que abrangem, essencialmente mas não exclusivamente, as ciências físicas e as ciências da saúde.

13 Bibliografia

- [1] Thanki, K.; Gangwal, R. P.; Sangamwar, A. T.; Jain, S. Oral delivery of anticancer drugs : Challenges and opportunities. *J Control Release*, **2013**, 170, 15–40.
- [2] Tsogoeva, S. B. Recent Progress in the Development of Synthetic Hybrids of Natural or Unnatural Bioactive Compounds for Medicinal Chemistry. *Mini Rev Med Chem*, **2010**, 10, 773–793.
- [3] Chari, R. V. J. Targeted Cancer Therapy : Conferring Specificity to Cytotoxic Drugs. *Acc Chem Res*, **2008**, 41(1), 98-107.
- [4] Adsule, S.; Banerjee, S.; Ahmed, F.; Padhye, S.; Sarkar, F. H. Hybrid anticancer agents : Isothiocyanate – progesterone conjugates as chemotherapeutic agents and insights into their cytotoxicities. *Bioorg Med Chem Lett*, **2010**, 20, 1247–1251.
- [5] Braunwald, E.; Fauci, A. S.; Kasper, D. L.; Hauser, S. L.; Longo, D. L.; Jameson, J. L. *Harrison Medicina Interna*, 15ª ed.; McGraw Hill: Rio de Janeiro, **2002**.
- [6] Patrick, G. L. *An Introduction to Medicinal Chemistry*, 3th ed.; Oxford University Press: New York, **2005**.
- [7] Campbell, N. A.; Reece, J. B. *Biology*, 6th ed.; World Student Series Addison Wesley: San Francisco, **2002**.
- [8] Pinto, A. M. *Fisiopatologia, Fundamentos e Aplicações*; LIDEL - Edições Técnicas, Lda, **2007**.
- [9] Patrick, G. L. *An Introduction to Medicinal Chemistry*, 4th ed.; Oxford University Press: New York, **2009**.
- [10] Cardoso, S. M. *Notas e Técnicas Epidemiológicas*, 2ª ed.; Imprensa de Coimbra,Lda: Coimbra, **2002**.
- [11] Ferlay, J.; Foucher, E.S.; Tieulent, J.L.; Rosso, S.; Coebergh, J.W.W.; Comber, H.; Forman, D.; Bray, F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*, **2013**, 49, 1374–1403.
- [12] Arnold, M.; Kos, H.E.K.; Coebergh, J.W.; Byrnes, G.; Antilla, A.; Ferlay, J.; Renehan, A.G.; Forman, D.; Soerjomataram, I. Recent trends in incidence of five common cancers in 26 European countries since 1988: Analysis of the European Cancer Observatory. *Eur J Cancer*, **2013**.
- [13] Cancer Research UK. Cancer stats: cancer incidence. http://publications.cancerresearchuk.org/downloads/Product/CS_INFOG_WORLD_INC.PDF (acesso a 28 de fevereiro, **2014**)
- [14] Cancer Research UK. Cancer stats: cancer mortality. http://publications.cancerresearchuk.org/downloads/Product/CS_INFOG_WORLD_MORT.PDF (acesso a 28 de fevereiro, **2014**)

Fármacos Híbridos com Atividade Antineoplásica

Dissertação do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Algarve

- [15] Goldman, L.; Schafer, A. I. *Cecil Medicine*, 24th ed.; Elsevier Saunders:Philadelphia, **2012**.
- [16] Yee, E. M. H.; Pasquier, E.; Iskander, G.; Wood, K.; Black, D.S.; Kumar, N. Synthesis of novel isoflavene-propranolol hybrids as anti-tumor agents. *Bioorg Med Chem*, **2013**, 21, 1652–1660.
- [17] Calabrò, F.; Sternberg, C. N. Neoadjuvant and adjuvant chemotherapy in muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol*, **2009**, 55, 348–358.
- [18] Costa, C.; Magalhães, H.; Félix, R.; Costa, A.; Cordeiro, S. *O Cancro e a Qualidade de Vida, A Quimioterapia e outros Fármacos no Combate ao Cancro*, 1^a ed.; Ponticor - Realizações Gráficas, **2005**.
- [19] Rauf, S.; Gooding, J.J.; Ghauri, M.A.; Rahman, M.; Anwar, M.A.; Khalid, A.M. Electrochemical approach of anticancer drugs-DNA interaction. *J Pharm Biomed Anal*, **2005**, 37, 205–217.
- [20] Breen, E. C.; Walsh, J. J. Tubulin-targeting agents in hybrid drugs. *Curr Med Chem*, **2010**, 17, 609–639.
- [21] Solomon, V. R.; Lee, H. Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *Eur J Pharmacol*, **2009**, 625, 220–233.
- [22] Seo, S.Y. Multi-targeted hybrids based on HDAC inhibitors for anti-cancer drug discovery. *Arch Pharm Res*, **2012**, 35(2), 197–200.
- [23] Saadeh, H. A.; Mosleh, I. M.; Mubarak, M. S. Synthesis of novel hybrid molecules from precursors with known antiparasitic activity. *Molecules*, **2009**, 14, 1483–1494.
- [24] Prokopiou, E. M.; Ryder, S. A.; Walsh, J. J. Tumour vasculature targeting agents in hybrid/conjugate drugs. *Angiogenesis*, **2013**, 16, 503–524.
- [25] Fortin, S.; Bérubé, G. Advances in the development of hybrid anticancer drugs. *Expert Opin Drug Discov*, **2013**, 8(8), 1029–1047.
- [26] PubChem. Compound: lomustine.
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=3950> (acesso a 7 de março, **2014**)
- [27] PubChem. Compound: carmustine.
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=2578> (acesso a 7 de março, **2014**)
- [28] Viegas-Junior, C.; Danuello, A.; Bolzani, V. S.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes. *Curr Med Chem*, **2007**, 14, 1829–1852.
- [29] Kuduk, S. D.; Zheng, F. F.; Lorenzino, L. S.; Rosen, N.; Danishefsky, S. J. Synthesis and Evaluation of Geldanamycin-Estradiol Hybrids. *Bioorg Med Chem Lett*, **1999**, 9, 1233–1238.

- [30] Lazar, C.; Kluczyk, A.; Kiyota, T.; Konishi, Y. Drug evolution concept in drug design: 1. Hybridization method. *J Med Chem*, **2004**, 47, 6973–6982.
- [31] Kamal, A.; Reddy, B. S. N.; Reddy, G. S. K.; Ramesh, G. Design and synthesis of C-8 linked pyrrolobenzodiazepine-naphthalimide hybrids as anti-tumour agents. *Bioorg Med Chem Lett*, **2002**, 12, 1933–1935.
- [32] Baraldi, P. G.; Romagnoli, R.; Guadix, A.E.; Infantas, M.J.P.; Gallo, M.A.; Espinosa, A.; Martinez, A.; Bingham, J.P.; Hartley, J.A. Design, synthesis, and biological activity of hybrid compounds between uramustine and DNA minor groove binder distamycin A. *J Med Chem*, **2002**, 45, 3630–3638.
- [33] Zask, A.; Kaplan, J.; Musto, S.; Loganzo, F. Hybrids of the hemiasterlin analogue taltobulin and the dolastatins are potent antimicrotubule agents. *J Am Chem Soc*, **2005**, 127, 17667–17671.
- [34] Su, T. L.; Lee, T. C.; Kakadiya, R. The development of bis(hydroxymethyl)pyrrole analogs as bifunctional DNA cross-linking agents and their chemotherapeutic potential. *Eur J Med Chem*, **2013**, 69, 609–621.
- [35] Perez, E. A. Microtubule inhibitors: Differentiating tubulin-inhibiting agents based on mechanisms of action, clinical activity, and resistance. *Mol Cancer Ther*, **2009**, 8(8), 2086–2095.
- [36] Patrick, G. L. *An Introduction to Medicinal Chemistry*, 2nd ed.; Oxford University Press: New York, 2001.
- [37] Lu, Y.; Chen, J.; Xiao, M.; Li, W.; Miller, D. D. An overview of tubulin inhibitors that interact with the colchicine binding site. *Pharm Res*, **2012**, 29, 2943–2971.
- [38] Kar, A. K.; Braun, P. D.; Wandless, T. J. Synthesis and evaluation of daunorubicin-paclitaxel dimers. *Bioorg Med Chem Lett*, **2000**, 10, 261–264.
- [39] Wittman, M. D.; Kadow, J.F.; Vyas, D.M.; Lee, F.L.; Rose, W.C.; Long, B.H.; Fairchild, C.; Johnston, K. Synthesis and antitumor activity of novel paclitaxel-chlorambucil hybrids. *Bioorg Med Chem Lett*, **2001**, 11, 811–814.
- [40] Ohtsu, H.; Nakanishi, Y.; Bastow, K. F.; Lee, F. Y.; Lee, K. H. Antitumor agents 216. Synthesis and evaluation of paclitaxel–camptothecin conjugates as novel cytotoxic agents. *Bioorg Med Chem*, **2003**, 11, 1851–1857.
- [41] Nakagawa-Goto, K.; Nakamura, S.; Bastow, K.F.; Nyarko, A.; Peng, C.Y.; Lee, F.Y.; Lee, F.C.; Lee, K.H. Antitumor agents. 256. Conjugation of paclitaxel with other antitumor agents: evaluation of novel conjugates as cytotoxic agents. *Bioorg Med Chem Lett*, **2007**, 17, 2894–2898.
- [42] Coggiola, B.; Pagliai, F.; Allegrone, G.; Genazzani, A. A.; Tron, G. C. Synthesis and biological activity of mustard derivatives of combretastatins. *Bioorg Med Chem Lett*, **2005**, 15, 3551–3554.
- [43] Bombuwala, K.; Kinstle, T.; Popik, V.; Uppal, S.O.; Olesen, J.B.; Viña, J.; Heckman, C.A. Colchitaxel, a coupled compound made from microtubule inhibitors colchicine and paclitaxel. *Beilstein J Org Chem*, **2006**, 13(2).

- [44] Banwell, M. G.; Hamel, E.; Hockless, D.C.R.; Pinard, P.V.; Willis, A.C.; Wong, D.J. 4,5-Diaryl-1*H*-pyrrole-2-carboxylates as combretastatin A-4/lamellarin T hybrids: synthesis and evaluation as anti-mitotic and cytotoxic agents. *Bioorg Med Chem*, **2006**, *14*, 4627–4638.
- [45] Cruz, P. F.; Rodriguez, S.V.; Matos, M.J.; Morales, A.H.; Villamena, F.A.; Das, A.; Gopalakrishnan, B.; Azar, C. O.; Santana, L.; Uriarte, E. Synthesis and electrochemical and biological studies of novel coumarin-chalcone hybrid compounds. *J Med Chem*, **2013**, *56*, 6136–6145.
- [46] Sashidhara, K. V.; Kumar, A.; Kumar, M.; Sarkar, J.; Sinha, S. Synthesis and in vitro evaluation of novel coumarin-chalcone hybrids as potential anticancer agents. *Bioorg Med Chem Lett*, **2010**, *20*, 7205–7211.
- [47] Kamal, A.; Ramakrishna, G.; Raju, P.; Viswanath, A.; Ramaiah, M. J.; Balakishan, G.; Bhadra, M.P. Synthesis and anti-cancer activity of chalcone linked imidazolones. *Bioorg Med Chem Lett*, **2010**, *20*, 4865–4869.
- [48] Paterson, I.; Gardner, N. M. Design, synthesis and biological evaluation of a macrocyclic discodermolide/dictyostatin hybrid. *Chem Commun*, **2007**, *8*, 49–51.
- [49] Shin, Y.; Choy, N.; Balachandran, R.; Madiraju, C.; Day, B.W.; Curran, D.P. Discodermolide/Dictyostatin hybrids: synthesis and biological evaluation. *Org Lett*, **2002**, *4*(25), 4443–4446.
- [50] Paterson, I.; Naylor, G. J.; Wright, A. E. Total synthesis of a potent hybrid of the anticancer natural products dictyostatin and discodermolide. *Chem Comm*, **2008**, 4628–4630.
- [51] Kumar, K.; Sagar, S.; Esau, L.; Kaur, M.; Kumar, V. Synthesis of novel 1*H*-1,2,3-triazole tethered C-5 substituted uracil-isatin conjugates and their cytotoxic evaluation. *Eur J Med Chem*, **2012**, *58*, 153–159.
- [52] Duan, Y. C.; Zheng, Y. C.; Li, X.C.; Wang, M. M.; Ye, X.W.; Guan, Y. Y.; Liu, G.Z.; Zheng, J. X.; Liu, H. M. Design, synthesis and antiproliferative activity studies of novel 1,2,3-triazole-dithiocarbamate-urea hybrids. *Eur J Med Chem*, **2013**, *64*, 99–110.
- [53] Denoyelle, S.; Chen, T.; Chen, L.; Wang, Y.; Klosi, E.; Halperin, J. A.; Aktas, B.H.; Chorev, M. In vitro inhibition of translation initiation by *N,N'*-diarylureas—potential anti-cancer agents. *Bioorg Med Chem Lett*, **2012**, *22*, 402–409.
- [54] Kimball, S. R. Eukaryotic initiation factor eIF2. *Int J Biochem Cell Biol*, **1999**, *31*, 25–29.
- [55] Descôteaux, C.; Brasseur, K.; Leblanc, V.; Parent, S.; Asselin, E.; Bérubé, G. Design of novel tyrosine-nitrogen mustard hybrid molecules active against uterine, ovarian and breast cancer cell lines. *Steroids*, **2012**, *77*, 403–412.
- [56] Joubert, J. P.; Smit, F. J.; Plessis, L.; Smith, P. J.; N'da, D. D. Synthesis and in vitro biological evaluation of aminoacridines and artemisinin-acridine hybrids. *Eur J Pharm Sci*, **2014**, *56*, 16–27.

- [57] La Pensée, L.; Sabbani, S.; Sharma, R.; Bhamra, I.; Shore, E.; Chadwick, A. E.; Berry, N. G.; Firman, J.; Araujo, N. C.; Cabral, L.; Cristiano, M. L. S.; Baterman, C.; Janneh, O.; Gavrilla, A.; Wu, Y. H.; Hussain, A.; Ward, S. A.; Stocks, P. A.; Cosstick, R.; O'Neill, P. M. Artemisinin-polypyrrole conjugates: synthesis, DNA binding studies and preliminary antiproliferative evaluation. *Chem Med Chem*, **2013**, 8, 709–718.
- [58] Xie, L.; Zhao, Y.; Zhai, X.; Li, P.; Liu, C.; Li, Y.; Gong, P. The application of tandem aza-wittig reaction to synthesize artemisinin-guanidine hybrids and their anti-tumor activity. *Arch Pharm Chem Life Sci*, **2011**, 344, 631–638.
- [59] Hu, C.; Solomon, V. R.; Ulibarri, G.; Lee, H. The efficacy and selectivity of tumor cell killing by Akt inhibitors are substantially increased by chloroquine. *Bioorg Med Chem*, **2008**, 16, 7888–7893.
- [60] Fan, C.; Wang, W.; Zhao, B.; Zhang, S.; Miao, J. Chloroquine inhibits cell growth and induces cell death in A549 lung cancer cells. *Bioorg Med Chem*, **2006**, 14, 3218–3222.
- [61] Jiang, P.; Zhao, Y. I.; Shi, W.; Deng, X. Q.; Xie, G.; Mao, Y. Q.; Li, Z. G.; Zheng, Y. Z.; Yang, S. Y.; Wei, Y. Q. Cell Growth Inhibition, G2/M Cell Cycle Arrest, and Apoptosis Induced by Chloroquine in Human Breast Cancer Cell Line Bcap-37. *Cell Physiol Biochem*, **2008**, 22, 431–440.
- [62] ClinicalTrials.gov. Search: chloroquine. By topic: carcinoma. [http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=chloroquine&no_unk=Y&cond="Carcinoma"](http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=chloroquine&no_unk=Y&cond=) (acesso a 27 de agosto, **2014**)
- [63] Liu, Y.; Bajjuri, K. M.; Liu, C.; Sinha, S. C. Targeting cell surface alpha(v)beta(3) integrin increases therapeutic efficacies of a legumain protease-activated auristatin prodrug. *Mol Pharm*, **2012**, 9, 168–175.
- [64] Chen, X.; Plasencia, C.; Hou, Y.; Neamati, N. Synthesis and biological evaluation of dimeric RGD peptide-paclitaxel conjugate as a model for integrin-targeted drug delivery. *J Med Chem*, **2005**, 48, 1098–1106.
- [65] Temming, K.; Meyer, D. L.; Zabinski, R.; Dijkers, E. C. F.; Poelstra, K.; Mlema, G.; Kok, R. J. Evaluation of RGD-targeted albumin carriers for specific delivery of auristatin E to tumor blood vessels. *Bioconjugate Chem*, **2006**, 17, 1385–1394.
- [66] Zefirova, O. N.; Nurieva, E. V.; Lemcke, H.; Ivanov, A. A.; Shishov, D. V.; Weiss, D. G.; Kuznetsov, S. A.; Zefirov, N. S. Design, synthesis, and bioactivity of putative tubulin ligands with adamantane core. *Bioorg Med Chem Lett*, **2008**, 18, 5091–5094.
- [67] Ali, R.; Siddiqui, N. Biological Aspects of Emerging Benzothiazoles: A Short Review. *J Chem*, **2013**, 2013, 1–12.
- [68] Bose, D. S.; Idrees, M.; Todewale, I. K.; Jakka, N. M.; Rao, J. V. Hybrids of privileged structures benzothiazoles and pyrrolo[2,1-c] [1,4]benzodiazepin-5-one, and diversity-oriented synthesis of benzothiazoles. *Eur J Med Chem*, **2012**, 50, 27–38.
- [69] Suryadi, J.; Bierbach, U. DNA metalating-intercalating hybrid agents for the treatment of chemoresistant cancers. *Chem Eur J*, **2012**, 18, 12926–12934.

- [70] Hess, S. M.; Anderson, J. G.; Bierbach, U. A non-crosslinking platinum-acridine hybrid agent shows enhanced cytotoxicity compared to clinical BCNU and cisplatin in glioblastoma cells. *Bioorg Med Chem Lett*, **2005**, 15, 443–446.
- [71] Karthikeyan, C.; Solomon, V. R.; Lee, H.; Trivedi, P. Design, synthesis and biological evaluation of some isatin-linked chalcones as novel anti-breast cancer agents: A molecular hybridization approach. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, **2013**, 3, 325–330.
- [72] Solomon, V. R.; Hu, C.; Lee, H. Hybrid pharmacophore design and synthesis of isatin – benzothiazole analogs for their anti-breast cancer activity. *Bioorg Med Chem*, **2009**, 17, 7585–7592.
- [73] Sangani, C. B.; Makawana, J. A.; Zhang, X.; Teraiya, S. B.; Lin, L.; Zhu, H. L. Design, synthesis and molecular modeling of pyrazole-quinoline-pyridine hybrids as a new class of antimicrobial and anticancer agents. *Eur J Med Chem*, **2014**, 76, 549–557.
- [74] Han, C.; Huang, Z.; Zheng, C.; Wan, L.; Zhang, L.; Peng, S.; Ding, K.; Ji, H.; Tian, J.; Zhang, Y. Novel hybrids of (phenylsulfonyl)furoxan and anilinopyrimidine as potent and selective epidermal growth factor receptor inhibitors for intervention of non-small-cell lung cancer. *J Med Chem*, **2013**, 56, 4738–4748.