

## Artigo

## A Importância do Estudo do Metabolismo nos Estágios Iniciais de Desenvolvimento de Fármacos

Nunes, I. K. C.\*

Rev. Virtual Quim., 2015, 7 (2), 649-662. Data de publicação na Web: 22 de fevereiro de 2015

<http://www.uff.br/rvq>

### The Importance of Metabolism Study in the Early Stages of Drugs Development

**Abstract:** The pharmacokinetic properties (ADME) of drug prototypes have been strategically evaluated in the early stages of development due to the fact that suboptimal pharmacokinetic properties are a major cause of the discontinuity in the development process of these compounds. This article focuses on a specific subset of ADME known as "metabolic stability", which contributes to a desirable pharmacokinetic profile, and how they can influence the drug design.

**Keywords:** Early ADME; metabolic stability; drugs development.

### Resumo

As propriedades farmacocinéticas (ADME) de compostos candidatos a fármacos, são estrategicamente avaliadas nos estágios iniciais de desenvolvimento, devido ao fato de que propriedades farmacocinéticas abaixo do ideal são uma das principais causas da descontinuidade no processo de desenvolvimento desses compostos. Este artigo centra-se em um subconjunto específico de estudos ADME, conhecidos como "estabilidade metabólica", que contribuem para um perfil farmacocinético desejável, e como eles podem influenciar o desenho de fármacos.

**Palavras-chave:** ADME; estabilidade metabólica; desenvolvimento de fármacos.

\* Universidade Federal do Rio de Janeiro, LASSBio, Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas, Instituto de Ciências Biomédicas - ICB, Centro de Ciências da Saúde-CCS, Caixa Postal 68023, 21941-902, Rio de Janeiro-RJ, Brasil. <http://www.farmacia.uff.br/lassbio/>

✉ [isabellekarinecn@yahoo.com.br](mailto:isabellekarinecn@yahoo.com.br)

DOI: [10.5935/1984-6835.20150028](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150028)

## A Importância do Estudo do Metabolismo nos Estágios Iniciais de Desenvolvimento de Fármacos

Isabelle Karine da Costa Nunes\*

Universidade Federal do Rio de Janeiro, LASSBio, Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas, Instituto de Ciências Biomédicas - ICB, Centro de Ciências da Saúde-CCS, Caixa Postal 68023, 21941-902, Rio de Janeiro-RJ, Brasil. <http://www.farmacia.ufrj.br/lassbio/>

\* [isabellekarinecn@yahoo.com.br](mailto:isabellekarinecn@yahoo.com.br)

*Recebido em 21 de fevereiro de 2015. Aceito para publicação em 21 de fevereiro de 2015*

1. Introdução
2. A importância do estudo do metabolismo
3. Métodos de estudos da estabilidade metabólica
  - 3.1. Abordagens *in vivo*
  - 3.2. Abordagens *in vitro*
4. A contribuição do LASSBio® no estudo do metabolismo de substâncias bioativas
  - 4.1. Estabilidade metabólica de LASSBio-294
  - 4.2. Estabilidade metabólica de LASSBio-579
  - 4.3. Estabilidade metabólica de LASSBio-448
5. Conclusões

### 1. Introdução

O planejamento de novos fármacos é um processo complexo, longo e de alto custo, que se desenrola em duas etapas, pesquisa e desenvolvimento (P&D), estando fortemente atrelada às inovações científicas e tecnológicas.<sup>1,2</sup> A descoberta de novas estruturas químicas com perfis terapêuticos diferenciados vem sendo guiada pelos avanços significativos da química biológica, pela melhor compreensão dos mecanismos bioquímicos e fisiológicos, e dos alvos moleculares envolvidos no processo de desenvolvimento de diversas patologias.<sup>3</sup>

Ademais, estes avanços estão associados ao crescimento expressivo do poder computacional e automação, ao surgimento da síntese combinatória e de testes farmacológicos de alto rendimento.<sup>1,3</sup>

Resumidamente, o processo de desenvolvimento de fármacos inicia-se com a descoberta de um *Hit*, um composto ligante de alta afinidade para o alvo terapêutico pretendido. Sequencialmente são feitos testes *in vitro* para avaliação das propriedades biológicas dessa molécula, e bioensaios *in vivo* visando à investigação de suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas em animais, etapa conhecida como estudos pré-clínicos.<sup>4,5</sup>

Apresentando resultados satisfatórios no que tange a eficácia terapêutica e perfil de toxicidade, a molécula será conduzida aos estudos clínicos em humanos, em diversas fases.

Assim, nota-se que todo o processo de P&D exige uma alta demanda de tempo, levando em média cerca de doze anos, com pequena probabilidade de sucesso.<sup>6</sup> Isto porque, apenas 66,7% de cada 30.000 moléculas sintéticas entram na fase de estudos pré-clínicos. Após esta primeira triagem, das 30.000 moléculas iniciais, apenas 200 (0,67%) chegarão à fase I dos estudos clínicos, e um percentual ainda menor (0,13% e 0,04%) conseguirá chegar as fase II e fase III, e finalmente, somente 0,027% dessas moléculas conseguirão aprovação dos órgãos regulatórios. Contudo, nem todas serão incluídas nos protocolos terapêuticos.<sup>7</sup>

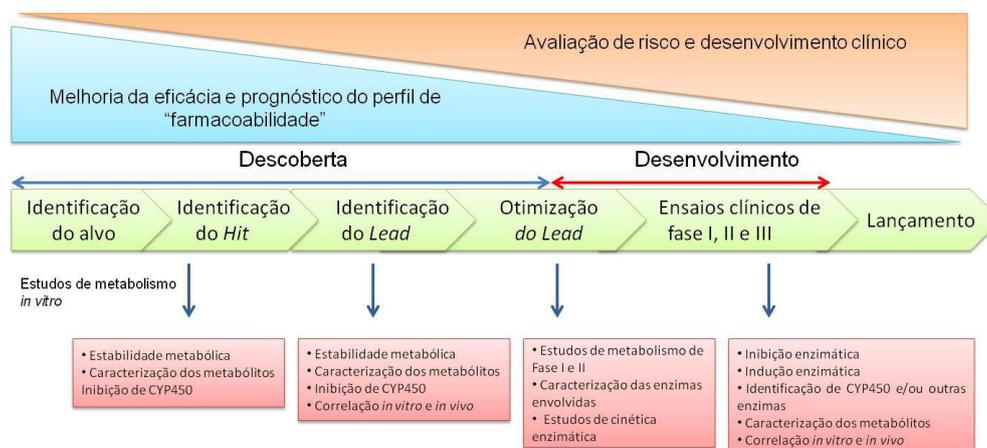
As razões dessa descontinuidade no processo de desenvolvimento de mais de 90% dos protótipos candidatos a fármacos (*leads*) são inúmeras, todavia, diversos estudos apontam a inadequação de propriedades farmacocinéticas (ADME - absorção, distribuição, metabolismo e excreção) como a causa mais proeminente dessas falhas,<sup>4,8,9</sup> sendo a instabilidade metabólica um dos fatores principais.<sup>8</sup>

A estabilidade metabólica refere-se à

susceptibilidade de compostos sofrerem biotransformação, e esta relacionada à medida intrínseca da depuração, a partir da qual outros parâmetros farmacocinéticos podem ser calculados, a exemplo da biodisponibilidade e do tempo de meia-vida.<sup>8,10</sup>

Dada a importância desses parâmetros na definição do perfil farmacológico e toxicológico de fármacos, a indústria farmacêutica mostrou nos últimos anos um interesse particular em realizar estudos de estabilidade metabólica ainda nos estágios iniciais do processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos, visando à otimização dessa propriedade (Figura 1). Porém, nas etapas iniciais de descoberta de fármacos, as novas estruturas químicas (NEQs) não podem ser administradas aos seres humanos. Desta forma, diversas abordagens podem ser utilizadas para prever estas propriedades, como o uso de métodos computacionais de predição de metabolismo, ensaios *in vitro* utilizando sistemas celulares / subcelulares, e *in vivo* utilizando animais.<sup>1,7,11</sup>

Assim, o estudo inicial de sua estabilidade metabólica é considerado essencial para minimizar as eventuais falhas no processo de desenvolvimento de fármacos e, portanto, tornou-se um componente crucial da descoberta de fármacos moderna.<sup>7,11,12</sup>



**Figura 1.** Esquema geral do processo de descoberta de fármacos apresentando tipos de estudos *in vitro* do metabolismo que podem ser realizadas nas várias fases do processo de descoberta e desenvolvimento. [adaptado das Refs. 5 e 11]

## 2. A importância do estudo do metabolismo

---

Assim como outros xenobióticos, os fármacos, ao serem absorvidos, sofrem uma série de biotransformações que resultam em produtos de metabolismo de maior polaridade, que por sua vez, serão mais facilmente excretados pela urina e por outros fluidos corpóreos. Este mecanismo desempenha importante papel na farmacocinética de medicamentos. Desta forma, durante o processo de desenvolvimento de um novo fármaco, os estudos de metabolismo possibilitam a identificação de sítios moleculares mais vulneráveis à metabolização, estabelecimento da identidade química dos principais metabólitos e sua toxicidade, além de identificar protótipos que apresentam maior atividade (processo de bioativação) do que o fármaco original, ou seja, os pró-fármacos.<sup>13,14</sup>

As reações metabólicas podem ser divididas em: reações de fase I, que são responsáveis por processos oxidativos, redutores e de hidrólise e reações de fase II, que conjugam grupos polares diretamente na molécula do fármaco, ou em um produto de uma reação de fase I. Ambas acarretam em aumento pronunciado da solubilidade da substância.<sup>14</sup> Estas reações podem levar a formação de metabólitos ativos ou inativos em relação ao fármaco original, em diferentes velocidades de formação, influenciadas pelas diferenças idiossincráticas dentro de uma população.

Por exemplo, a toxicidade pode ser citada como a razão para a descontinuidade de um dado composto em fase de desenvolvimento, mas a causa real pode ser a exposição prolongada e desnecessária ao candidato a fármaco ou ao seu metabólito tóxico/reactivo ou ao surgimento de interações medicamentosas devido à indução e/ou inibição de sistemas enzimáticos envolvidos no metabolismo.<sup>13-15</sup> Diversos medicamentos foram retirados do mercado devido à

hepatotoxicidade causada pela formação de metabólitos reativos, *e.g.* troglitazona e felbamato.<sup>15-18</sup> Fármacos como metotrexato, ciclosporina e paracetamol são considerados hepatotóxicos em doses elevadas devido a reações idiossincráticas.<sup>16</sup>

Resumidamente, a estabilidade metabólica constitui um processo essencialmente enzimático, com destaque para a superfamília de enzimas do sistema do citocromo P450 (CYP450), responsável pela biotransformação oxidativa de diversos xenobióticos, incluindo os fármacos.<sup>13</sup> Esse sistema enzimático participa expressivamente das reações metabólicas de fase I, sendo o fígado a principal fonte dessas isoenzimas.<sup>13,14</sup> Assim, o metabolismo, particularmente o hepático, devido ao efeito de primeira passagem sofrido pelos fármacos após sua administração oral, é reconhecido como um dos principais determinantes das concentrações plasmáticas destes fármacos, sendo amplamente utilizado na predição da biodisponibilidade e de parâmetros toxicocinéticos.<sup>10</sup>

## 3. Métodos de estudos da estabilidade metabólica

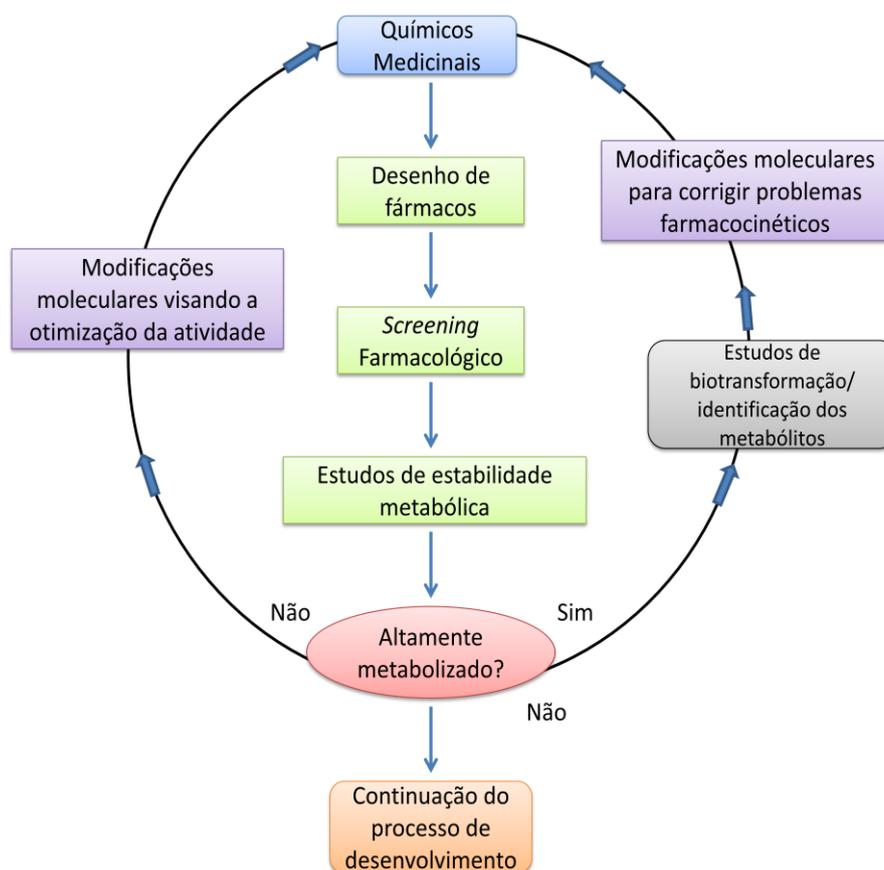
---

O número crescente de NEQs sob avaliação nas últimas décadas requer o uso de técnicas de *screening* que apresentem rapidez e bom rendimento, associados a resultados confiáveis. Estas técnicas quando empregadas nos estágios iniciais de desenvolvimento de fármacos podem auxiliar nos processos de otimização estrutural de moléculas promissoras e descartar moléculas com perfis farmacocinéticos inadequados.<sup>19</sup>

É fato que estudos farmacocinéticos abrangentes *in vivo* no homem seriam a condição ideal de se obter dados relativos às propriedades ADME, incluindo metabolismo, biodisponibilidade e a depuração. Contudo, tais experimentos não estão disponíveis até a fase de ensaios clínicos, o que leva a uma resposta tardia de questões que podem ser

cruciais no processo de descoberta de fármacos, tais como: o quão lábil ao metabolismo é o candidato a fármaco? Quais são as estruturas dos metabólitos formados? Os produtos do metabolismo apresentam atividade e/ou toxicidade? Quais enzimas

estão atuando no metabolismo? Informações que são relevantes para avaliar se um composto apresenta um perfil farmacocinético aceitável e se há interações medicamentosas indesejáveis *in vivo* (Figura 2).<sup>1,11</sup>



**Figura 2.** Estratégia para o uso de dados de estabilidade metabólica como parte do processo de otimização de compostos protótipos [adaptado da Ref. 1]

Atualmente existem diversas abordagens metodológicas *in vivo* e *in vitro* para determinar a estabilidade metabólica, e assim, auxiliar na solução do problema.<sup>11</sup>

### 3.1. Abordagens *in vivo*

As abordagens *in vivo* envolvem basicamente a análise de metabólitos presentes no sangue, urina e nas fezes de animais.<sup>20</sup> Nos últimos anos vários métodos de *screening* farmacocinético *in vivo* foram desenvolvidos e aplicados como predição de

estabilidade metabólica; tais como dosagem do tipo *cassete*, também conhecida como “N doses em uma”<sup>21-23</sup> e *Rapid Rat Oral PK screen*, mais conhecido como *Rapid Rat*.<sup>24</sup> Essas abordagens são amplamente utilizadas pelas indústrias farmacêuticas nas triagens farmacocinéticas iniciais.

A dosagem do tipo *cassete* é um método de *HTS* (do inglês *High Throughput Screening*) *in vivo* que permite a avaliação de parâmetros farmacocinéticos de diversos compostos ao mesmo tempo, e traz como vantagem o uso reduzido de animais. Contudo, o fato de se utilizar diversos

compostos ao mesmo tempo nas análises implica numa desvantagem do método, se houver entre eles interações medicamentosas, resultando em falsos positivos e ou negativos. Além disso, apresenta uma maior dificuldade na execução dos procedimentos analíticos.<sup>21-23</sup>

O método de triagem farmacocinética rápida ou *Rapid Rat* baseia-se na administração de um mesmo composto em dois ou mais animais diferentes, onde são realizadas coletas de sangue destes animais em volumes e intervalos de tempos iguais e as análises são conduzidas por métodos analíticos. Diferentemente da dosagem do tipo *cassete*, neste tipo de ensaio não se observam interações medicamentosas. A limitação neste caso está nos valores obtidos para os parâmetros de AUC (área sob a curva) e meia-vida, que não são valores reais, apenas estimativas. Todavia, o alto rendimento obtido com o uso desta abordagem levou a sua implementação em diversas indústrias farmacêuticas.<sup>11,24</sup>

Os modelos animais são úteis para prever os vários aspectos dos problemas de metabolismo e de parâmetros farmacocinéticos diversos, além de apresentarem resultados mais fidedignos em relação ao homem. No entanto, possuem desvantagens como o baixo rendimento dos metabólitos formados, maior tempo de avaliação, e exigem um custo considerável quando comparados aos ensaios *in vitro*, condição esta que não é favorável ainda numa etapa preliminar de desenvolvimento.<sup>25</sup>

### 3.2. Abordagens *in vitro*

As abordagens *in vitro* podem ser agrupadas em três categorias diferentes: i) as técnicas que fazem o uso de cortes de tecido hepático e preparações celulares de hepatócitos; ii) o uso de frações subcelulares, microssomais e/ou citosólicas, e fração S9,<sup>13,14,25</sup> iii) o uso de micro-organismos, tais

como espécies de fungos capazes de realizar reações metabólicas similares às obtidas por processos celulares.<sup>26,27</sup>

A cultura de hepatócitos por sua vez, tem a vantagem de poder ser utilizada para análise de fármacos diversos, permanecendo viável por até 4 semanas após seu isolamento e podendo ser criopreservada. Contudo, estudos apontam que essas culturas celulares apresentam uma perda gradual de suas funções, incluindo uma diminuição não uniforme da expressão das isoenzimas do sistema do citocromo P450 (CYPs), principal sistema enzimático envolvido no metabolismo de fármacos.<sup>28</sup> No entanto, o uso de cortes de tecido hepático não apresenta esta limitação, porém, possivelmente devido à menor oferta de oxigênio e nutrientes no fragmento do tecido, a duração da atividade enzimática é curta.

A segunda categoria compreende os estudos de estabilidade metabólica utilizando frações celulares, que são comumente preferidas devido a maior facilidade de preparo e disponibilidade, não necessitando obtê-las a cada experimento, podendo ser armazenadas por meses sem prejuízo da atividade das enzimas presentes nestes sistemas.<sup>29-31</sup> Estes podem ainda proporcionar uma visão acerca das diferenças interespecies, uma vez que, diferenças estruturais mínimas, podem modificar dramaticamente a especificidade das enzimas que os constituem por seus substratos.<sup>12</sup> No entanto, algumas enzimas se mostram lábeis, devido à diminuição da integridade celular, o que acarreta na perda de cofatores necessários para o seu perfeito funcionamento, requerendo assim, a reposição destes.<sup>25,29</sup>

A princípio, o que seria uma desvantagem pode auxiliar no estudo da capacidade de biotransformação das enzimas envolvidas no metabolismo de fármacos, devido à adição ou não destes cofatores. Estes modelos abrangem as reações metabólicas de fase I (fração microssomal) e Fase II (fração citosólica) e ambas simultaneamente (fração

S9).<sup>12,25,28</sup> A principal desvantagem é que estes sistemas não representam o ambiente fisiológico, sendo uma simplificação do organismo animal, o qual é muito mais complexo.

Já a terceira categoria utiliza espécies selecionadas de micro-organismos, e.g. *Streptomyces sp.* (SP-WISC 1158), *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009, *Beauveria bassiana* ATCC 7149, *Chaetomium indicum* LCP 984200, e *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245, capazes de mimetizar reações metabólicas específicas. O uso de sistemas de biotransformação microbianos como modelo para o estudo da estabilidade metabólica foi introduzido no início dos anos 70<sup>26,27</sup> e representa uma ferramenta muito útil para a produção de metabólitos em larga escala. Outra vantagem da aplicação de sistemas de biotransformação utilizando micro-organismos está na seletividade com que tais biotransformações são realizadas, visto que substâncias bioativas são substratos polifuncionalizados. Contudo, é improvável que um único micro-organismo seja capaz de mimetizar todas as reações metabólicas observadas em mamíferos.<sup>27</sup>

Assim, para obter um melhor desempenho desses estudos, a condição ideal é aquela em que os modelos *in vitro* são empregados em conjunto com os modelos *in vivo*, onde deve haver uma correlação entre os metabólitos formados em ambos os sistemas biológicos. Caso não haja essa correlação, os resultados da avaliação *in vivo* deverão ser priorizados.

#### 4. A contribuição do LASSBio® no estudo do metabolismo de substâncias bioativas

O LASSBio®, Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, fundado e coordenado pelo Professor Titular Eliezer J. Barreiro constitui um laboratório de pesquisa multidisciplinar na área da Química

Medicinal, sendo o pioneiro a difundir o estudo da Química Medicinal no estado do Rio de Janeiro. Ao longo dos anos, tornou-se reconhecido por sua excelência e contribuição na construção de conhecimento na área. Diversos projetos de pesquisa objetivando a descoberta e desenvolvimento de novos protótipos candidatos a fármacos para o tratamento de diversas doenças crônico-degenerativas (eg. asma, artrite, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), câncer, esquizofrenia e Alzheimer) foram desenvolvidos no contexto do LASSBio®, aplicando-se estratégias de planejamento molecular baseado no mecanismo de ação pretendido, também conhecido como abordagem fisiológica.<sup>32</sup>

Como anteriormente citado, o processo de desenvolvimento de fármacos requer grande investimento de tempo do pesquisador, e uma vez identificado um composto protótipo, não obstante, este necessitará de etapas de otimização molecular. Durante anos, os químicos medicinais preocuparam-se com a otimização das propriedades farmacodinâmicas dos compostos protótipos nos primeiros estágios do desenvolvimento. Entretanto, após diversos trabalhos apontarem que os problemas farmacocinéticos são umas das principais causas da descontinuidade no desenvolvimento de compostos protótipos candidatos a fármacos, o olhar dos químicos medicinais têm se voltado cada vez mais para a avaliação dessas propriedades e possíveis ajustes estruturais para contornar essa problemática.<sup>5</sup>

Novamente, o LASSBio® segue seu impulso pioneiro nato, e insere no âmbito de suas linhas de pesquisa estudos farmacocinéticos para os mais diversos compostos protótipos desenvolvidos no laboratório, dentre eles os estudos de estabilidade metabólica.

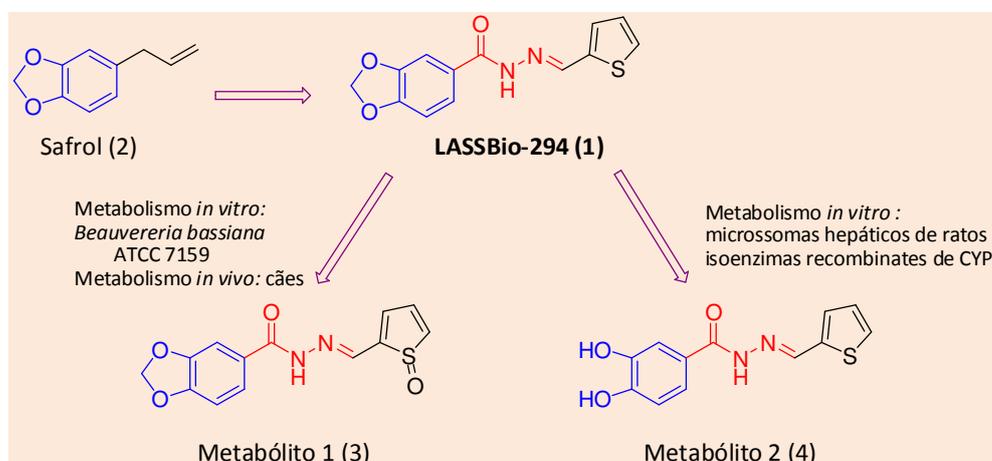
#### 4.1. Estabilidade metabólica de LASSBio-294

O potente agente inotrópico positivo LASSBio-294 (1) (Esquema 1) foi o primeiro composto protótipo a ter seus estudos de metabolismo realizados no LASSBio®. Este protótipo deriva de uma série de novos compostos bioativos da classe das *N*-acilhidrazonas (NAH) sintetizadas a partir do biofóforo natural safrol (2) (Esquema 1).<sup>33</sup> Sua importância nos estudos para o desenvolvimento de novos agentes cardiotônicos, se deve ao seu perfil de atividade diferenciado, atuando também como vasodilatador, por mecanismos de ação diferentes daqueles apresentados pelos fármacos  $\beta$ -adrenérgicos e glicosídeos digitálicos, não demonstrando assim, a toxicidade mecanismo de ação-dependente associada a estas classes de fármacos.<sup>34-36</sup> Após a caracterização farmacológica deste composto, o próximo passo no processo de P&D foi a realização dos estudos farmacocinéticos preliminares, dentre eles a estabilidade metabólica.

Inicialmente, Carneiro e colaboradores, utilizando um sistema de biossíntese biomimético, ou seja, o uso de fungos capazes de reproduzir reações específicas de oxidação miméticas às realizadas pelo CYP450, associado aos métodos bioanalíticos (HPLC/MS), identificaram a formação do

composto tiofeno sulfóxido (3) (Esquema 1) como metabólito majoritário para LASSBio-294 (1), produzido por cepas do fungo *Beauveria bassiana* ATCC 7159.<sup>37</sup> Em um segundo momento, os pesquisadores fizeram a correlação dos metabólitos encontrados *in vitro* com estudos *in vivo* realizados em cães da raça Beagle, identificando a formação do mesmo produto (Esquema 1).<sup>37</sup>

Os estudos acerca do metabolismo de LASSBio-294 (1), mostraram as diferenças metabólicas interespecies, quando Fraga e colaboradores descreveram em seu trabalho a identificação e caracterização de um metabólito majoritário diferente do composto tiofeno sulfóxido (3). Os estudos *in vitro* realizados em microsomas hepáticos de ratos *Wistar* mostraram a presença de um único metabólito formado pela cisão oxidativa da subunidade metilenodioxila do anel 3,4-benzodioxola de LASSBio-294 (1), levando a formação de um composto catecólico (4) (Esquema 1). Os autores observaram ainda a correlação destes resultados com os obtidos em ensaios com enzimas recombinantes humanas de CYPs, identificando a CYP1A2 como a principal isoenzima envolvida no metabolismo de LASSBio-294 (1).<sup>40</sup> De fato, é descrito na literatura, a labilidade da subunidade metilenodioxila frente às enzimas do sistema do CYP450 em humanos, a exemplo do que ocorre com fármacos como a paroxetina<sup>38</sup> e tadalafila.<sup>39</sup>



Esquema 1. Metabólitos identificados para o protótipo LASSBio-294

#### 4.2. Estabilidade metabólica de LASSBio-579

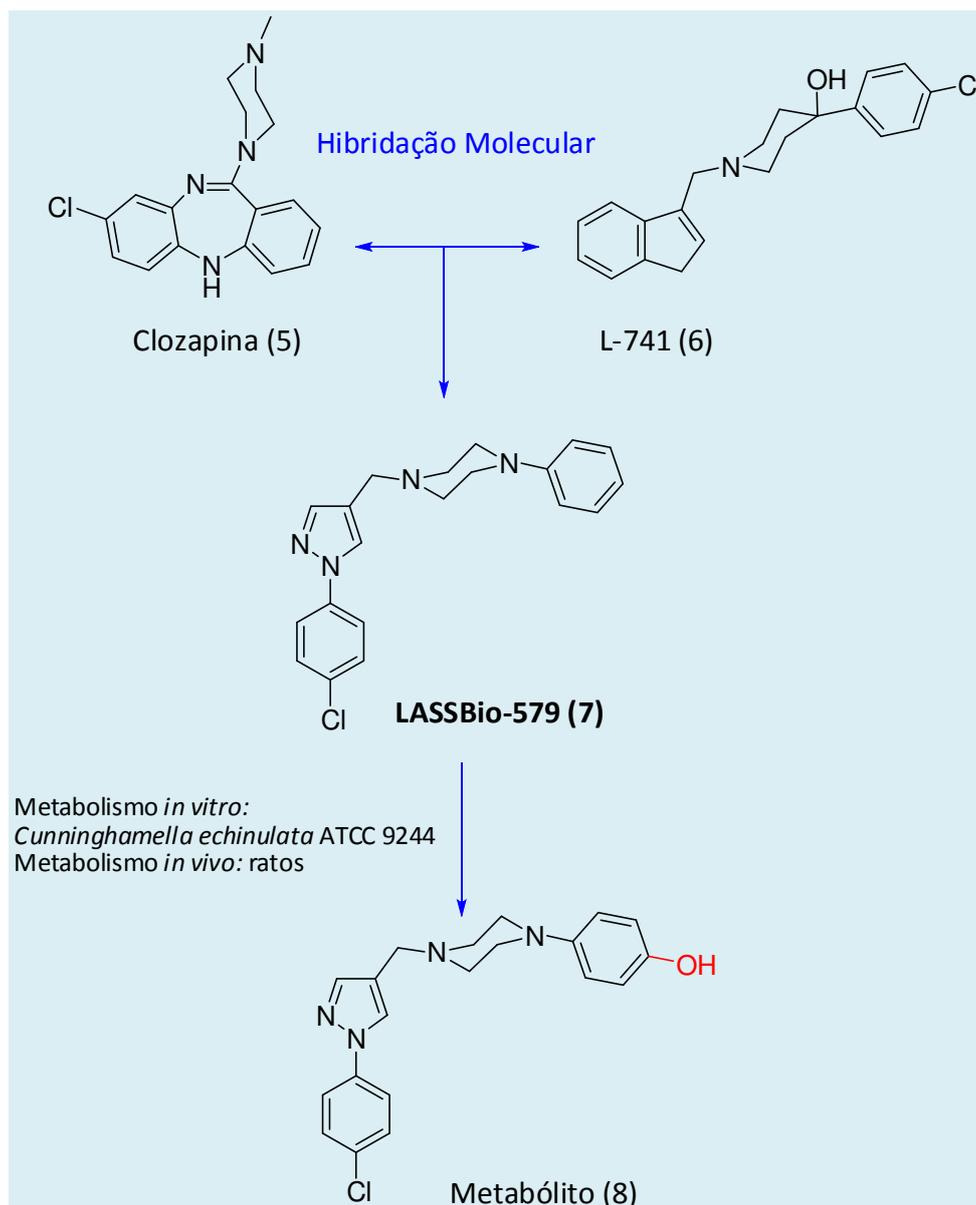
Planejado através de hibridação molecular entre o fármaco clozapina (5) e o protótipo L-741 (6), LASSBio-579 (7) pertence a uma série de derivados heterociclos *N*-fenilpiperazínicos desenhados como protótipos para o tratamento da esquizofrenia (Esquema 2).<sup>41</sup> Uma vez que a esquizofrenia é uma doença psiquiátrica crônica que afeta aproximadamente 1% da população mundial, e os fármacos atualmente disponíveis no mercado não são capazes de atuar no tratamento das diversas manifestações clínicas dessa doença, a exemplo dos antipsicóticos típicos como o haloperidol, e mesmo os fármacos antipsicóticos atípicos introduzidos como uma alternativa para o tratamento de pacientes resistentes ao primeiro grupo, e.g. clozapina, não são eficazes para muitos pacientes que se mostram refratários ao tratamento com estes fármacos.<sup>42,43</sup> Esta observação caracteriza a importância da busca por novos fármacos antipsicóticos mais eficazes e seguros.

Os ensaios farmacológicos *in vitro* e em modelos comportamentais realizados com LASSBio-579 (7) mostraram que este composto atua sobre os receptores dopaminérgicos, com maior afinidade para os receptores D<sub>2</sub> e D<sub>4</sub> e serotoninérgicos, alvos moleculares envolvidos na patogênese da esquizofrenia.<sup>44,45</sup> LASSBio-579 (7) mostrou, ainda, uma menor afinidade para os receptores muscarínicos e  $\alpha$ 1<sub>B</sub> envolvidos no desenvolvimento dos efeitos adversos atribuídos aos antipsicóticos como a clozapina, e um melhor perfil farmacológico dentre todos os derivados da série.<sup>45</sup>

A despeito dos resultados farmacológicos promissores, estudos farmacocinéticos evidenciaram a baixa biodisponibilidade oral de LASSBio-579 (7),<sup>46</sup> o que suscitou a hipótese de que parte dos efeitos observados após a administração oral deste composto em animais poderia ser dependente de um produto proveniente de seu metabolismo.<sup>47</sup> Desta forma, Gomes e colaboradores realizaram estudos de estabilidade metabólica visando esclarecer a baixa biodisponibilidade oral de LASSBio-579.<sup>47</sup>

Inicialmente os estudos foram conduzidos utilizando-se cepas de *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, cujo produto do metabolismo observado foi um composto hidroxilado na posição *para* do anel fenila (8) (Esquema 2), com uma taxa de formação de cerca de 90% do metabólito. A utilização de micro-organismos permitiu o isolamento do metabólito em escala preparativa. Os autores realizaram estudos *in vivo* em ratos e observaram a formação do mesmo produto do metabolismo (8) formado *in vitro*, 30 minutos após a administração intraperitoneal de LASSBio-579 (7) (Esquema 2).<sup>47</sup>

O metabólito *p*-hidroxilado (8) apresentou efeitos farmacológicos similares ao protótipo original (579), com maior afinidade para os receptores D<sub>2</sub> e D<sub>4</sub> e baixa afinidade para os receptores muscarínicos e  $\alpha$ 1<sub>B</sub>, relacionados à manifestação dos efeitos adversos. Contudo, o metabólito (8) apresentou um melhor perfil de biodisponibilidade e maior tempo de meia-vida em relação à LASSBio-579 (7), sendo detectado na sua forma inalterada até 24h após sua administração.<sup>47</sup> Juntos, estes resultados corroboram a hipótese de que este metabólito atua na ação antipsicótica observada para LASSBio-579, e apresenta um melhor perfil farmacocinético do que a molécula original.



**Esquema 2.** Planejamento de LASSBio-579 e identificação do metabólitos *p*-hidroxilado

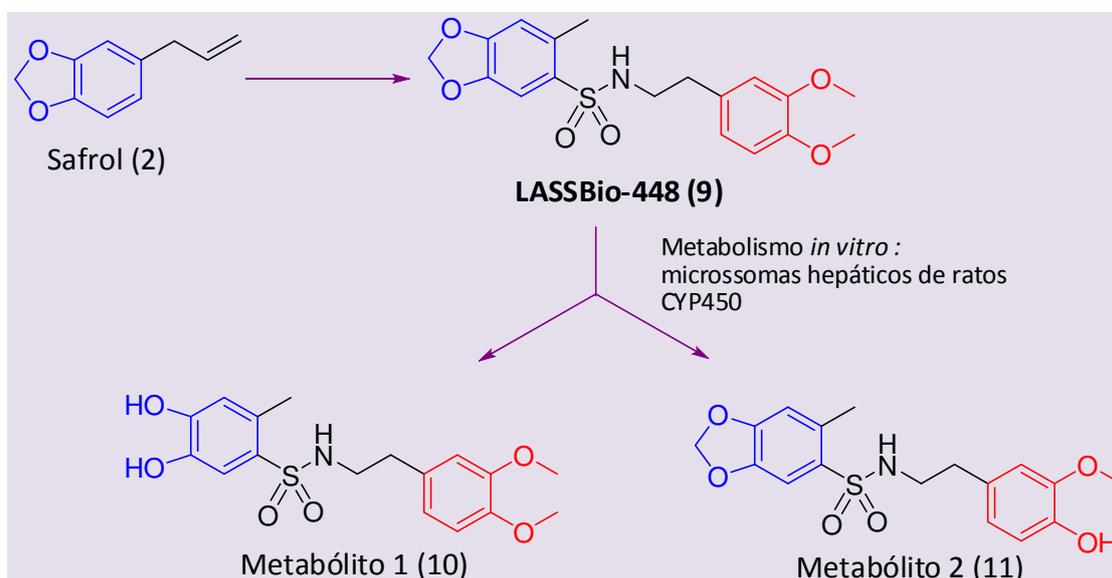
#### 4.3. Estabilidade metabólica de LASSBio-448

O protótipo antiasmático LASSBio-448 (9), (Esquema 3) concebido como inibidor da enzima fosfodiesterase 4 (PDE-4), de modo similar a LASSBio-294 (1), foi planejado e sintetizado explorando o produto natural safrol (2) (Esquema 1). Este protótipo mostrou-se capaz de inibir a atividade de diferentes isoenzimas de PDE-4, bem como em reduzir a liberação tecidual de histamina

*in vitro*. Os estudos *in vivo* realizados com este protótipo evidenciaram que o mesmo apresenta ação anti-inflamatória e capacidade de relaxar a musculatura lisa das vias aéreas após administração oral em camundongos. A vantagem da ação terapêutica de LASSBio-448 (9) para o tratamento da asma está na sua capacidade de atuar nas duas fases da doença, aguda e crônica.<sup>48</sup> Porém, esta molécula apresenta em sua estrutura química um sítio lábil ao metabolismo hepático já descrito na literatura, a subunidade 3,4-benzodioxila.<sup>40</sup>

Desta forma, visando identificar quais produtos de metabolismo hepático poderiam ser formados a partir de LASSBio-448 (9), Nunes e colaboradores descreveram o metabolismo microsomal hepático *in vitro* deste protótipo. Conforme esperado, o estudo do metabolismo de fase I mostrou a formação do metabólito catecólico (10) pela cisão oxidativa da ponte metilendioxila, 30 minutos após a incubação com microsomas hepáticos de ratos *Wistar* (Esquema 3). Entretanto, o metabólito majoritário observado foi produto de uma reação de *O*-demetilação de uma das metoxilas da subunidade 3,4-dimetoxifenila, formando o

produto *p*-hidroxilado (11) (Esquema 3). Estes estudos permitiram a identificação do sistema do CYP450 como determinante para o metabolismo desta molécula, bem como das principais isoenzimas de CYP envolvidas no processo,<sup>49</sup> o que auxilia a prevenir possíveis interações medicamentosas. A determinação do tempo de meia vida hepático, de aproximadamente 15 minutos para LASSBio-448 (9), suscitou a hipótese de um ou ambos os metabólitos formados serem ativos, visto que a ação do composto original (9) persiste por mais de 1h após sua administração oral.<sup>48,49</sup>



**Esquema 3.** Metabólitos identificados para LASSBio-448

## 5. Conclusões

O metabolismo é um grande gargalo no processo de P&D de novos fármacos, por ser um dos principais determinantes tanto das propriedades farmacocinéticas como das farmacodinâmicas da maioria dos compostos candidatos a fármacos. Em face disto, um grande esforço tem sido direcionado para avaliar parâmetros metabólicos nos estágios iniciais de desenvolvimento de fármacos.

Diversas abordagens para a determinação das características metabólicas estão agora

disponíveis. Atualmente, as abordagens *in vitro* na maioria das vezes produzem dados eficientes na previsão do comportamento *in vivo* das moléculas em estudo. Os esforços crescentes para melhorar essa correlação *in vitro* vs. *in vivo* promoverão o uso ótimo dos dados obtidos *in vitro*, resultando numa melhor tomada de decisão sobre os próximos passos para um dado protótipo nas demais etapas do seu desenvolvimento.

## Referências Bibliográficas

- <sup>1</sup> Thompson, T. N. Early ADME in support of drug discovery: The role of metabolic stability studies. *Current Drug Metabolism* **2000**, *1*, 215. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>2</sup> Ferreira, F. G.; Polli, M. C.; Oshima Franco, Y.; Fraceto, L. F. Fármacos: do desenvolvimento à retirada do mercado. *Revista Eletrônica de Farmácia* **2009**, *30*, 14. [Link]
- <sup>3</sup> Guido, R. V. C.; Andricopolo, A. D.; Oliva, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Revista Estudos Avançados* **2010**, *24*, 81. [CrossRef]
- <sup>4</sup> Kennedy, T. Managing the drug discovery/development interface. *Drug Discovery Today* **1997**, *2*, 436. [CrossRef]
- <sup>5</sup> Wang, J.; Urban, L. The impact of early ADME profiling on drug discovery and development strategy. *Drug Discovery World Fall* **2004**, 73. [Link]
- <sup>6</sup> Lima, L. M. Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira. *Química Nova* **2007**, *30*, 1456. [CrossRef]
- <sup>7</sup> Calixto, J. B.; Siqueira Júnior, J. M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. *Gazeta Médica da Bahia* **2008**, *78*, 98. [Link]
- <sup>8</sup> Davis, A. M.; Riley, R. J. Predictive ADMET studies, the challenges and the opportunities. *Current Opinion in Chemical Biology* **2004**, *8*, 378. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>9</sup> Prentis, R. A.; Lis, Y.; Walker, S. R. Pharmaceutical innovation by the seven UK-owned pharmaceutical companies (1964-1985). *British Journal of Clinical Pharmacology* **1988**, *25*, 387. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>10</sup> Obach, R. S. The prediction of human clearance from hepatic microsomal metabolism data. *Current Opinion in Drug Discovery and Development* **2001**, *4*, 36. [PubMed]
- <sup>11</sup> Masimirembwa, C. M.; Thompson, R.; Andersson, T. B. *In vitro* high throughput screening of compounds for favorable metabolic properties in drug discovery. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **2001**, *4*, 245. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>12</sup> Singh, S. S. Preclinical pharmacokinetics: an approach towards safer and efficacious drugs. *Current Drug Metabolism* **2006**, *7*, 165. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>13</sup> Pearson, P. G.; Wienkers, L. C. *Handbook of Drug Metabolism*, 2a. ed., Informa Healthy Care: New York, 2008.
- <sup>14</sup> Coleman, M. D. *Methods in drug metabolism in human drug metabolism: An Introduction*, John Wiley & Sons: England, 2005.
- <sup>15</sup> Park, K. B.; Kitteringham, N. R.; Maggs, J. L.; Pirmohamed, M.; Williams, D. P. The role of metabolic activation in drug induced hepatotoxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2005**, *45*, 177. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>16</sup> Lee, W.M. Drug-induced hepatotoxicity. *New England Journal of Medicine* **2003**, *349*, 474. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>17</sup> Smith, K. S.; Smith, P. L.; Heady, T. N.; Trugman, J. M.; Harman, W. D.; Macdonald, T. L. *In vitro* metabolism of tolcapone to reactive intermediates: relevance to tolcapone liver toxicity. *Chemical Research in Toxicology* **2003**, *16*, 123. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>18</sup> Dieckhaus, C. M.; Thompson, C. D.; Roller, S. G. and Macdonald, T. L. Mechanisms of idiosyncratic drug reactions: the case of felbamate. *Chemico-Biological Interactions* **2002**, *142*, 99. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>19</sup> Lohmann, W.; Karst, U. Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism: Strategies, advantages and limitations. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *391*, 79. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>20</sup> Lim, C.; Lorde, G. Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis. *Biological*

- and *Pharmaceutical Bulletin* **2002**, *24*, 547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>21</sup> Manitpisitkul, P.; White, R. E. Whatever happened to cassette-dosing pharmacokinetics? *Drug Discovery Today* **2004**, *9*, 652. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>22</sup> White, R. E.; Manitpisitkul, P. Pharmacokinetic Theory of cassette dosing in drug discovery screening. *Drug Metabolism and Disposition* **2001**, *29*, 957. [[PubMed](#)]
- <sup>23</sup> a) Christ, D. D. Cassette dosing pharmacokinetics: Valuable tool or flawed science? *Drug Metabolism and Disposition* **2001**, *29*, 935; [[PubMed](#)] b) He, K.; Qian, M.; Wong, H.; Bai, S.A.; He, B.; Brogdon, B.; Christ, D. D.; Grossman, S. J. N-in-1 dosing pharmacokinetics in drug discovery: Experience, theoretical and practical considerations. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2008**, *97*, 2568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>24</sup> Cox, K. A.; Dunn-Meynell, K.; Korfmacher, W.A.; Broske, L.; Nomeir, A. A.; Chin-Chung L.; Cayen, M. N.; Barr, W. H. Novel *in vivo* procedure for rapid pharmacokinetic screening of discovery compounds in rats. *Drug Discovery Today* **1999**, *4*, 232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>25</sup> Ekins, S.; Maenpaa, J.; Wrighton, S. A. *In vitro* metabolism: subcellular fractions. Em *Handbook of drug metabolism*; Wolf, T. F., ed.; Marcel Vekker: New York, 1999. [[CrossRef](#)]
- <sup>26</sup> Rosazza, J. P.; Smith, R. V.; Stocklinski, A. W.; Gustafson, M. A.; Adrian, J. Microbial models of mammalian metabolism. *O*-Dealkylation of 10,11-dimethoxyaporphine. *Journal of Medicinal Chemistry* **1975**, *18*, 791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>27</sup> Smith, R. V.; Rosazza, J. P. Microbial systems for study of the biotransformations of drugs. *Biotechnology and Bioengineering* **1975**, *XVII*, 785. [[CrossRef](#)]
- <sup>28</sup> Brandon, E. F.; Raap, C. D.; Meijerman, I.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M. An update on *in vitro* test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2003**, *189*, 233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>29</sup> Kerns, E. H.; Di, L. Pharmaceutical profiling in drug discovery. *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>30</sup> Jenkins, K. M.; Angeles, R.; Quintos, M. T.; Xu, R.; Kassel, D. B.; Rourick, R. A. J. Automated high throughput ADME assays for metabolic stability and cytochrome P450 inhibition profiling of combinatorial libraries. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2004**, *34*, 989. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>31</sup> Li, A. P. Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery. *Drug Discovery Today* **2001**, *6*, 357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>32</sup> Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M.; *Química Medicinal: As Bases Moleculares da ação dos Fármacos*, 2a. ed., ArtMed: Porto Alegre, 2008.
- <sup>33</sup> Lima, P. C.; Silva, K. C. M.; Leda, P. H. O.; Miranda, A. L. P.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. Synthesis and analgesic activity of novel *N*-acylarylhydrazones and isosters, derived from natural safrole. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, *35*, 187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>34</sup> González-Serratos, H.; Chang, R.; Pereira, E. F. R.; Castro, N. G.; Aracava, Y.; Melo, P. A.; Lima, P. C.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J.; Albuquerque, E. X. A novel thienylhydrazone,(2-thienylidene) 3, 4-methylenedioxybenzoylhydrazine, increases inotropism and decreases fatigue of skeletal muscle. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2001**, *299*, 558. [[PubMed](#)]
- <sup>35</sup> Sudo, R. T.; Zapata-Sudo, G.; Barreiro, E. J. The new compound, LASSBio 294, increases the contractility of intact and saponin-skinned cardiac muscle from *Wistar* rats. *British Journal of Pharmacology* **2001**, *134*, 603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>36</sup> Silva, C. L. M.; Noel, F.; Barreiro, E. J. Cyclic GMP-dependent vasodilatory properties of LASSBio 294 in rat aorta. *British Journal of Pharmacology* **2002**, *135*, 293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>37</sup> Carneiro, E. O.; Andrade, C. H.; Braga, R. C.; Tôrres, A. C. B.; Alves, R. O.; Lião, L. M.; Fraga,

- C. A. M.; Barreiro, E. J.; Oliveira, V. Structure-based prediction and biosynthesis of the major mammalian metabolite of the cardioactive prototype LASSBio-294. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *20*, 3734. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>38</sup> Zhao, S. X.; Dalvie, D. K.; Kelly, J. M.; Soglia, J. R.; Frederick, K. S.; Smith, E. B.; Obach, R. S.; Kalgutkar, A. S. NADPH-dependent covalent binding of [<sup>3</sup>H]paroxetine to human liver microsomes and S-9 fractions: Identifications of an electrophilic quinone metabolite of paroxetine. *Chemical Research in Toxicology* **2007**, *20*, 1649. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>39</sup> Coward, R. M.; Carson, C. C. Tadalafil in the treatment of erectile dysfunction. *Therapeutics and Clinical Risk Management* **2008**, *4*, 1315. [PubMed]
- <sup>40</sup> Fraga, A. G. M.; Silva, L. L.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. CYP1A2-mediated biotransformation of cardioactive 2-thienylidene-3,4-methylenedioxybenzoylhydrazine (LASSBio-294) by rat liver microsomes and human recombinant CYP enzymes. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *46*, 349. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>41</sup> Conrado, D. J.; Verli, H.; Neves, G.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J.; Rates, S. M. K.; Dalla Costa, T. Pharmacokinetic evaluation of LASSBio-579: an N phenylpiperazine antipsychotic prototype. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics* **2008**, *60*, 699. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>42</sup> Menegatti, R.; Cunha, A. C.; Ferreira, V. F.; Perreira, E. F. R.; El-Nabawi, A.; Eldefrawi, A. T.; Albuquerque, E. X.; Neves, G.; Rates, S. M. K.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. Design, synthesis and pharmacological profile of novel dopamine D2 receptor ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2003**, *11*, 4807. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>43</sup> Owens, D. G. C. Adverse effects of antipsychotic agents – do newer agents offer advantages? *Drugs* **1996**, *51*, 895. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>44</sup> Carneiro, E. O.; Oliveira, V.; Menegatti, R.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. Microbial models of animal metabolism: application to a study of the metabolism of LASSBio-873. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2005**, *41*, 392.
- <sup>45</sup> Dias, L. E. S.; Andrade, C. H.; Pazini, F.; De Oliveira, V. Preparation of new metabolites from lamivudine by filamentous fungi bioconversion. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2005**, *41*, 133.
- <sup>46</sup> Costa, E. M. M. B.; Pimenta, F. C.; Luz, W. C.; de Oliveira, V. Selection of filamentous fungi of the *Beauveria* genus able to metabolize quercetin like mammalian cells. *Brazilian Journal of Microbiology* **2008**, *39*, 405. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>47</sup> Gomes, T. F.; Rodrigues, D. A.; Noel, F.; Andrade, C. H.; Menegatti, R.; Sabino, J. R.; Gil, E. S.; Dalla-Costa, T.; Rates, S. M. K.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J.; Oliveira, V. Biotransformation of LASSBio-579 and pharmacological evaluation of *p*-hydroxylated metabolite a *N*-phenylpiperazine antipsychotic lead compound. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *62*, 214 [CrossRef] [PubMed]
- <sup>48</sup> Nunes, I. K. da C.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013. [Link]
- <sup>49</sup> Nunes, I. K. C.; Tinoco, L. W.; Martins-Junior, H.; Rezende, C. M.; Barreiro, E. J.; Lima, L. M. *In vitro* microsomal hepatic metabolism of antiasthmatic prototype LASSBio-448. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2014**, *14*, 1388. [CrossRef] [PubMed]