

Artigo

Doenças Multifatoriais e os Desafios no Planejamento de Fármacos Multialvos: A Contribuição do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas - LASSBio®**Barbosa, M. L. C.****Rev. Virtual Quim.*, 2015, 7 (2), 576-593. Data de publicação na Web: 30 de dezembro de 2014<http://www.uff.br/rvq>**Multifactorial Diseases and the Challenges in the Design of Multi-target Drugs: The Contribution of the Laboratory of Evaluation and Synthesis of Bioactive Substances - LASSBio®**

Abstract: The ability of small molecules to interact with multiple bioreceptors is commonly termed *polypharmacology*. Polypharmacology represents a new paradigm in drug discovery, and its benefits have been progressively recognized and appreciated, especially for the treatment of multifactorial diseases, offering significant increments in efficacy and safety. The present review describes the contribution of the Laboratory of Evaluation and Synthesis of Bioactive Substances - LASSBio®, over its 20 years of history, for the identification of novel multi-target prototypes, designed as drug candidates for treatment of diseases showing high socioeconomic impact and high prevalence in the world population.

Keywords: Polypharmacology; multitarget drugs; multifactorial diseases; drug design.

Resumo

A habilidade de micromoléculas em interagir com múltiplos biorreceptores é comumente designada pelo termo *polifarmacologia*. A polifarmacologia representa um novo paradigma no desenvolvimento de fármacos, cujos benefícios têm sido progressivamente reconhecidos e apreciados, principalmente no que se refere ao tratamento de doenças de natureza multifatorial, garantindo incrementos significativos na eficácia e segurança. A presente revisão descreve a contribuição do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas - LASSBio®, ao longo de seus 20 anos de história, na identificação de novos protótipos multialvos, planejados como candidatos a fármacos para o tratamento de doenças de alto impacto socioeconômico e elevada prevalência na população mundial.

Palavras-chave: Polifarmacologia; fármacos multialvos; doenças multifatoriais; planejamento de fármacos.

* Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Farmácia, Av. Carlos Chagas Filho, 373, Centro de Ciências da Saúde, Bloco L subsolo, sala 23, Cidade Universitária, CEP: 21.941-902, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

✉ marialeticia@pharma.ufrj.br

DOI: [10.5935/1984-6835.20150025](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150025)

Doenças Multifatoriais e os Desafios no Planejamento de Fármacos Multialvos: A Contribuição do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas - LASSBio®

Maria Letícia de Castro Barbosa*

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Farmácia, Av. Carlos Chagas Filho, 373, Centro de Ciências da Saúde, Bloco L subsolo, sala 23, Cidade Universitária, CEP: 21.941-902, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

* marialeticia@pharma.ufrj.br

Recebido em 1 de dezembro de 2014. Aceito para publicação em 2 de dezembro de 2014

- 1. Estratégias de identificação de protótipos de fármacos: A evolução da Química Medicinal**
- 2. Fármacos multialvos: Um novo paradigma no desenvolvimento de alternativas terapêuticas inovadoras para o tratamento de doenças multifatoriais**
- 3. Principais estratégias de planejamento e identificação de fármacos multialvos**
- 4. A contribuição do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas - LASSBio®**
 - 4.1.** Novos protótipos de fármacos anti-inflamatórios inibidores duais das enzimas 5-LOX e PGHS-2
 - 4.2.** Novos protótipos de fármacos antitrombóticos simbióticos planejados por hibridação molecular
 - 4.3.** Novos protótipos de fármacos antiasmáticos simbióticos: LASSBio-468 e LASSBio-596
 - 4.4.** Novos inibidores duais de tirosina cinases receptoras como candidatos a fármacos antitumorais
- 5. Considerações finais**

1. Estratégias de identificação de protótipos de fármacos: A evolução da Química Medicinal

Ao longo de sua história e por muitos séculos, a humanidade tratou suas dores, males e desconfortos, e as mais diversas

enfermidades e sintomas, com preparações médicas obtidas a partir de fontes naturais (vegetais, animais e minerais), acumulando o conhecimento designado como *Medicina Tradicional*, a qual se baseia na observação empírica dos benefícios terapêuticos destas preparações.^{1,2,3}

As primeiras indústrias farmacêuticas, ao

surgirem no final do século XIX, utilizaram este conhecimento empírico visando à identificação e isolamento dos princípios ativos responsáveis pelos efeitos biológicos descritos. Avanços subsequentes nas químicas sintética e analítica forneceram ferramentas para elucidação estrutural e para a obtenção dos primeiros análogos sintéticos e semissintéticos de produtos naturais bioativos.³

Os químicos medicinais passaram, então, a empregar ensaios *in vivo* em modelos animais para a realização de triagens fenotípicas de substâncias de origem natural ou sintética, visando à identificação de candidatos a fármacos.^{4,5} Esta triagem permitia encontrar, em um único ensaio farmacológico, compostos com propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas compatíveis com a indução do efeito terapêutico almejado.⁴

No ano de 1984, o químico alemão Hermann Emil Fischer (1852-1919), ganhador do Prêmio Nobel de Química em 1902, introduziu o conceito de complementariedade molecular na Química Medicinal, o qual foi ilustrado pelo seu pioneiro modelo “chave-fechadura” (do inglês, *lock-key*), postulando que o efeito biológico de uma substância era fruto da interação complementar com seu biorreceptor, em analogia ao reconhecimento de uma chave pela respectiva fechadura.⁶

O pesquisador alemão Paul Ehrlich (1854-1915), contemporâneo de Fischer e Prêmio Nobel de Medicina em 1908, combinou com maestria conceitos básicos da Química com a Biologia e a Medicina. Ehrlich criou a teoria dos “receptores específicos” para descrever a interação entre anticorpos e antígenos na imunologia, a qual foi posteriormente extrapolada para a interação entre fármacos e biorreceptores. Adicionalmente, Ehrlich introduziu a expressão “balas mágicas” (do inglês, *magic bullets*) para designar compostos capazes de atuar de forma seletiva no combate a patógenos causadores de infecções, sendo, porém, inócuos para a célula saudável do paciente. Paul Ehrlich foi

chamado “pai da quimioterapia” pela contribuição científica realizada em seu grupo de pesquisa, resultando na descoberta da arsfenamina (Salvarsan®) para o tratamento da sífilis, através da realização da síntese racional e triagem de compostos químicos, representando o primeiro programa de desenvolvimento de fármacos nos moldes da pesquisa farmacêutica moderna.^{2,7}

O paradigma da Química Medicinal de Fischer & Ehrlich vigorou desde o início do século XX, combinando os conceitos de complementariedade de Fischer e de seletividade de Ehrlich nos processos de identificação, planejamento e desenvolvimento de novos fármacos, fato que culminou nas transformações que se seguiram ao longo das décadas subsequentes, sendo observado um gradual redirecionado da tradicional estratégia de triagem biológica fenotípica *in vivo* para um método de investigação mais linear e direcionado pela premissa do alvo terapêutico.^{3,8,9}

Progressos na farmacologia *in vivo* e *in vitro* durante o decorrer do século culminaram na identificação gradativa de proteínas associadas ao surgimento e avanço das doenças-alvo, as quais foram sendo assinaladas como os alvos biológicos responsáveis pelos efeitos terapêuticos descritos para as substâncias bioativas conhecidas até aquele momento.³

Entre as décadas de 50 e 80, foram introduzidas as estratégias clássicas de modificação estrutural e otimização do composto protótipo. Ainda nas décadas de 60 e 70, ocorreram progressos tecnológicos na determinação da estrutura de proteínas (através da difração de raios-X), na química computacional e na modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de fármacos, além da criação do banco de dados de estruturas cristalográficas PDB (do inglês, *Protein Data Bank*). Já na década de 80, avanços na biologia molecular permitiram a compreensão de aspectos bioquímicos envolvidos no estabelecimento e progresso de diversas doenças de interesse,

fortalecendo o planejamento de fármacos baseado no mecanismo de ação pretendido, conhecido como abordagem fisiológica.^{10,11}

A partir do início da era genômica, entre as décadas de 80 e 90, tornou-se possível a identificação de diferentes genes e proteínas envolvidos na patogênese de doenças de grande relevância clínica.⁷ Novas conquistas tecnológicas na química computacional, acompanhadas pelo surgimento da química combinatória e da triagem robotizada de alto rendimento (do inglês, *high-throughput screening* - HTS), permitiram um aumento substancial no número de novas entidades químicas testadas em sistemas de triagem *in silico* e *in vitro* em um reduzido espaço de tempo, popularizando-se amplamente, neste período, o paradigma “uma doença - um fármaco - um alvo” no ramo industrial farmacêutico.^{1,3,5,9}

Desde então, as abordagens de desenvolvimento de novos fármacos empregadas pela indústria farmacêutica focaram na identificação de moléculas potentes e seletivas, capazes de exercer seu efeito em um alvo terapêutico específico, diretamente relacionado à patogênese da doença a ser tratada, garantindo, assim, um provável incremento na segurança e uma redução no surgimento de efeitos adversos indesejáveis associados a alvos biológicos secundários.^{5,12,13}

Entretanto, esta abordagem vem sendo continuamente desafiada nos últimos anos por seus resultados insatisfatórios,¹³ principalmente no que se refere à busca por novas alternativas terapêuticas para o tratamento de enfermidades de gênese multifatorial, *i.e.* que envolvam a participação de múltiplos mediadores derivados de uma ou mais vias de sinalização celular,¹² e por isso vem sendo reconsiderada durante a última década.¹⁴

No período de 1999 a 2008, no qual a estratégia de desenvolvimento de fármacos baseada no alvo terapêutico era a abordagem mais popular nas indústrias do ramo, apenas 23% das novas entidades

químicas aprovadas para uso clínico pela agência regulatória americana FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) foram resultantes de triagens *in vitro* diretamente no alvo, enquanto outras 37% foram resultantes da tradicional estratégia de triagem biológica fenotípica.⁵

Ademais, estudos mais aprofundados têm demonstrado claramente que a eficácia terapêutica de muitos fármacos conhecidos e clinicamente utilizados é proveniente da sua ação em mais de um biorreceptor,^{4,9} mesmo para aqueles que foram planejados para atuarem seletivamente em um único alvo biológico. De fato, a média de alvos terapêuticos atribuída para os fármacos atualmente em uso é de aproximadamente 4,3, enquanto para os fármacos utilizados como antitumorais no tratamento do câncer totaliza-se uma média de alvos de 7,82.⁵ Atualmente já se reconhece que a alta seletividade em fármacos é mais uma exceção do que uma regra, já que a extensa maioria das substâncias terapêuticamente úteis tende a interagir com múltiplos biorreceptores. Dentre o total de fármacos disponíveis no mercado farmacêutico, apenas 15% possui um único alvo biológico conhecido, enquanto mais de 50% interage com mais de cinco alvos biológicos.³

Além disso, o paradigma “uma doença - um fármaco - um alvo” vem sendo associado ao decréscimo observado na produtividade da indústria farmacêutica a partir da década de 90. Apesar de o investimento financeiro em Pesquisa & Desenvolvimento (P&D) ter crescido exponencialmente nos últimos 20 anos, a produtividade do ramo não tem respondido à altura no que se refere ao número de novas entidades químicas bioativas introduzidas no mercado farmacêutico neste mesmo período. Diversas razões de cunho empresarial e regulatório têm sido apontadas como importantes para este insucesso, no entanto, a observação mais notável e intrigante é a de que o marcante decréscimo de produtividade coincide com o estabelecimento e a popularização deste paradigma no processo

de desenvolvimento de fármacos.^{5,8}

Por este motivo, empresas e institutos de pesquisa estão revisitando a triagem fenotípica em seus projetos, uma vez que esta estratégia apresentou grande sucesso durante a chamada *época de ouro* da Química Medicinal, resultando na identificação de inúmeros compostos bioativos, dentre os quais a grande maioria demonstrou sua ação multialvo após a elucidação dos seus respectivos mecanismos de ação.¹³

2. Fármacos multialvos: Um novo paradigma no desenvolvimento de alternativas terapêuticas inovadoras para o tratamento de doenças multifatoriais

Processos fisiopatológicos complexos tendem a ser resistentes à perturbação quando da modulação seletiva de um único alvo biológico, resultando em pouca ou nenhuma eficácia terapêutica como consequência de efeitos compensatórios induzidos pela ativação de vias de sinalização alternativas, caracterizando o fenômeno de *redundância*.^{5,13,14,15}

Na verdade, com exceção daquelas doenças causadas por mutação ou eliminação de genes específicos, a grande maioria das enfermidades de interesse possui uma patogênese multifatorial,⁵ incluindo àquelas de maior incidência na população mundial e de maior impacto socioeconômico, a exemplo das doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e inflamatórias, além do câncer, da obesidade, da ansiedade e da depressão.⁸

Ademais, a modulação seletiva de um único alvo terapêutico pode resultar no aparecimento de *resistência* induzida por mecanismos como o surgimento de mutações ou o aumento da expressão da proteína-alvo, além da ativação de vias de sinalização alternativas.¹³

Para vencer as limitações acima mencionadas, a modulação simultânea de mais de um alvo terapêutico passou a ser empregada como alternativa clínica, seja através de um esquema de coadministração de fármacos seletivos para cada um dos alvos de interesse, ou através do desenvolvimento de formulações farmacêuticas que combinassem mais de um princípio ativo em um único comprimido.^{5,12}

As associações de fármacos são uma prática corriqueira na terapia de doenças multifatoriais, destacando-se a hipertensão, as desordens metabólicas e o câncer, além de serem utilizadas também no combate às infecções, principalmente a SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) e a tuberculose. No entanto, o uso concomitante de diferentes medicações está associado ao surgimento de interações medicamentosas perigosas, de potencial sobrecarga hepática e renal, além da adesão reduzida e do abandono do tratamento pelo paciente.^{13,15}

Nestes casos, um perfil polifarmacológico adequadamente direcionado pode fornecer fármacos mais seguros e eficazes quando comparados às associações medicamentosas atualmente empregadas. Fármacos multialvos podem apresentar efeitos aditivos ou sinérgicos em consequência da modulação de mais de um biorreceptor, resultando em uma dose terapêutica reduzida, que representa um incremento adicional em sua segurança.¹⁵ A habilidade de micromoléculas em interagir com múltiplos biorreceptores é comumente designada pelo termo *polifarmacologia*.³

A polifarmacologia representa um novo paradigma no desenvolvimento de fármacos.^{9,15} Os benefícios da polifarmacologia têm sido progressivamente reconhecidos e apreciados, principalmente no que se refere ao tratamento de doenças de natureza multifatorial,¹³ e esta estratégia tem sido apontada como alternativa capaz de vencer o decréscimo significativo de produtividade no setor farmacêutico nas últimas décadas, a despeito dos maciços investimentos financeiros aplicados.^{15,16} Mais do que isso, a atividade em múltiplos alvos

terapêuticos já é considerada como responsável por comprovados incrementos na eficácia e segurança. Desta feita, enquanto a promiscuidade frente a alvos biológicos não planejados deve ser evitada, a polifarmacologia adequadamente direcionada oferece excelentes oportunidades para o desenvolvimento de soluções terapêuticas inovadoras.^{13,17}

Diversos fármacos multialvos têm apresentado resultados surpreendentemente positivos, a exemplo dos inibidores multicinases (Figura 1), que foram introduzidos na clínica a partir do início dos anos 2000, e desde então representam uma nova esperança para pacientes acometidos por diversos tipos de cânceres previamente refratários aos tratamentos disponíveis. A eficácia destes fármacos é atribuída ao controle de diversos processos envolvidos no crescimento tumoral, como a proliferação e

sobrevivência celular e a angiogênese.¹³

A polifarmacologia também tem demonstrado expressivos benefícios no tratamento de doenças psiquiátricas, a exemplo dos fármacos antipsicóticos (Figura 2) clinicamente disponíveis, os quais revolucionaram o tratamento da esquizofrenia.¹⁸ Além do câncer, esquizofrenia e infecções, a polifarmacologia é atualmente considerada promissora para o tratamento de diversas enfermidades de natureza multifatorial, incluindo as doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, pulmonares, inflamatórias e autoimunes, arritmia, epilepsia, e no alívio da dor.^{13,15,18}

A agência americana FDA aprovou nos últimos anos inúmeros fármacos multialvos para o tratamento de doenças multifatoriais, destacando-se os antitumorais (Figura 1), antipsicóticos (Figura 2) e antidepressivos (Figura 3).¹³

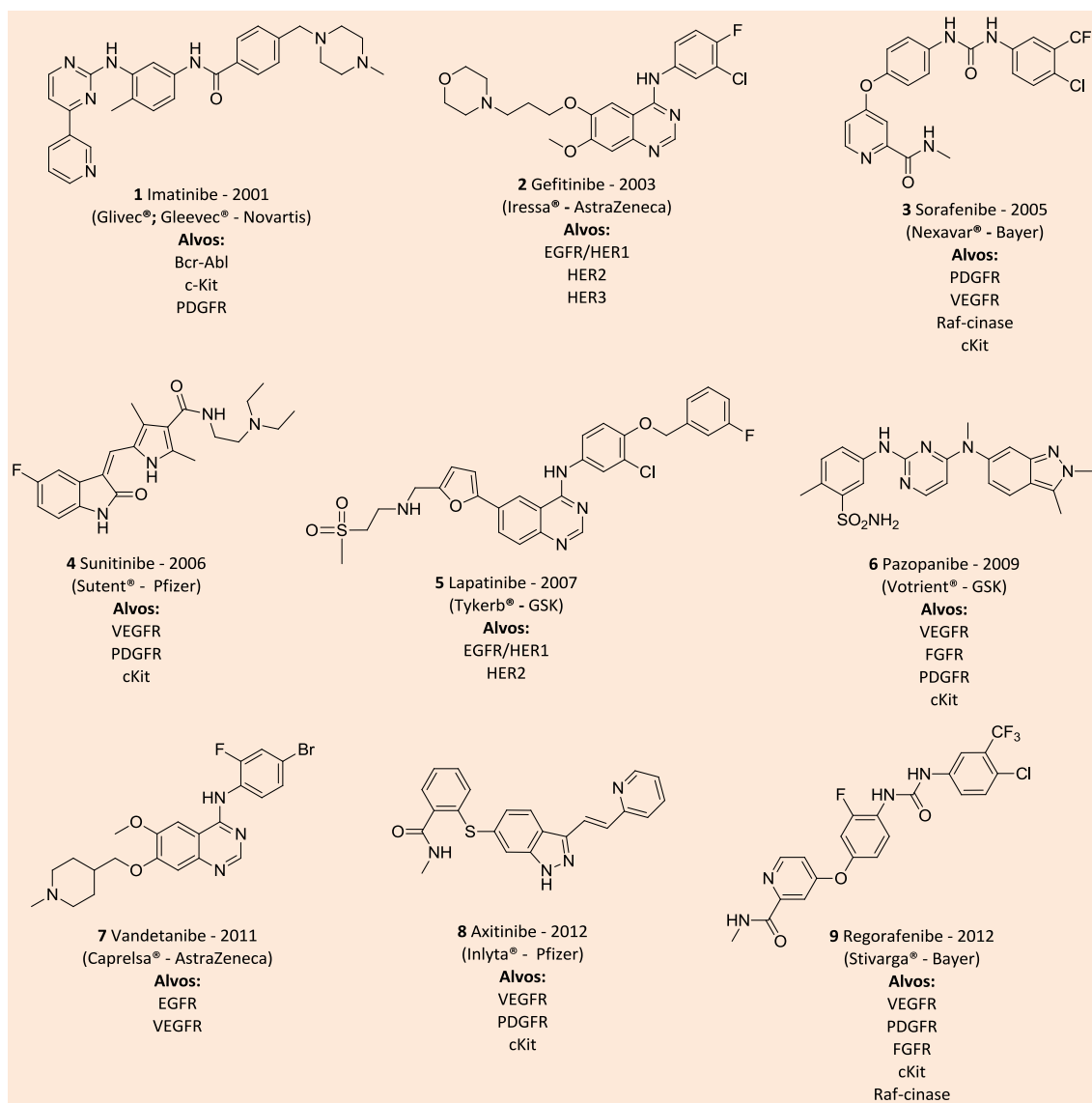


Figura 1. Inibidores multicinases disponíveis no mercado farmacêutico para o tratamento do câncer. **Bcr-Abl:** tirosina cinase codificada pelo cromossomo Philadelphia, é uma proteína oncogênica responsável pela patogênese da leucemia mieloide crônica; **c-Kit:** tirosina cinase receptora oncogênica constitutivamente ativada em tumores estromais gástricos; **PDGFR:** Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas; **EGFR:** Receptor do fator de crescimento epidérmico; **HER:** Receptores do fator de crescimento epidermal humano; **VEGFR:** Receptor do fator de crescimento do endotélio vascular; **Raf-cinases:** família de serina-treonina cinases relacionadas à oncogênese retroviral; **FGFR:** Receptor do fator de crescimento de fibroblastos

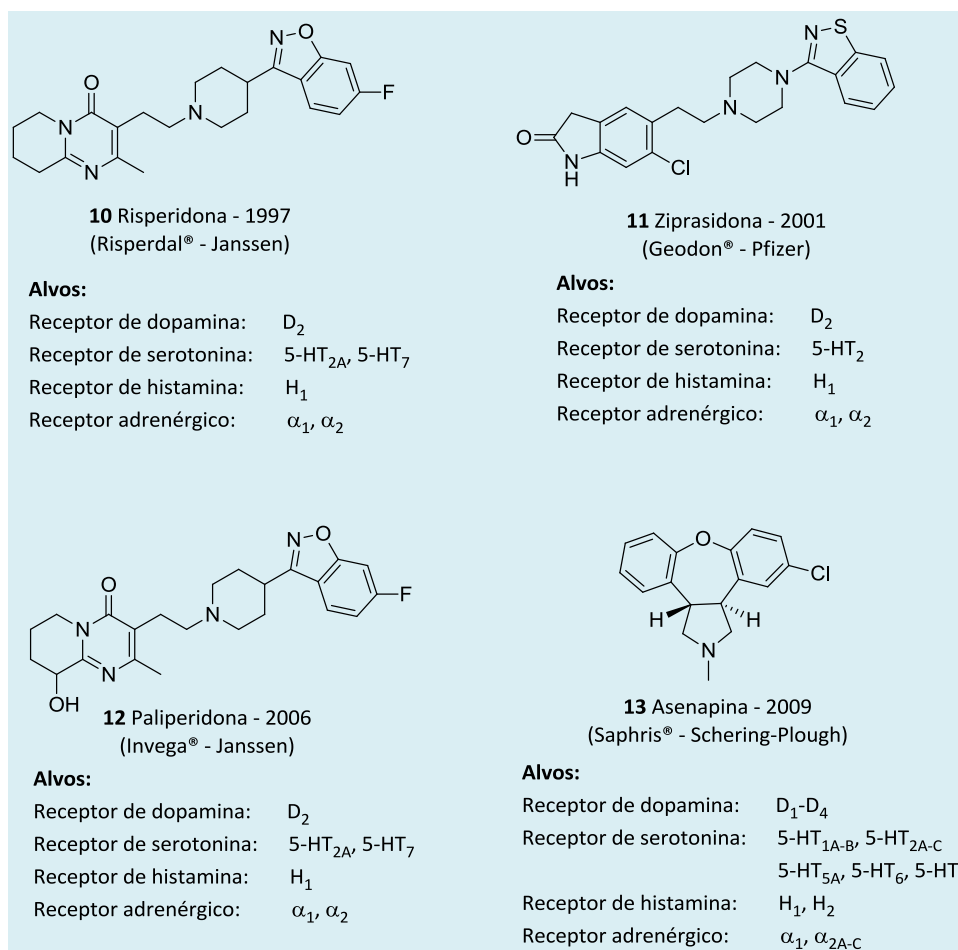


Figura 2. Fármacos antipsicóticos utilizados no tratamento da esquizofrenia, cuja eficácia terapêutica é atribuída ao seu perfil multialvo

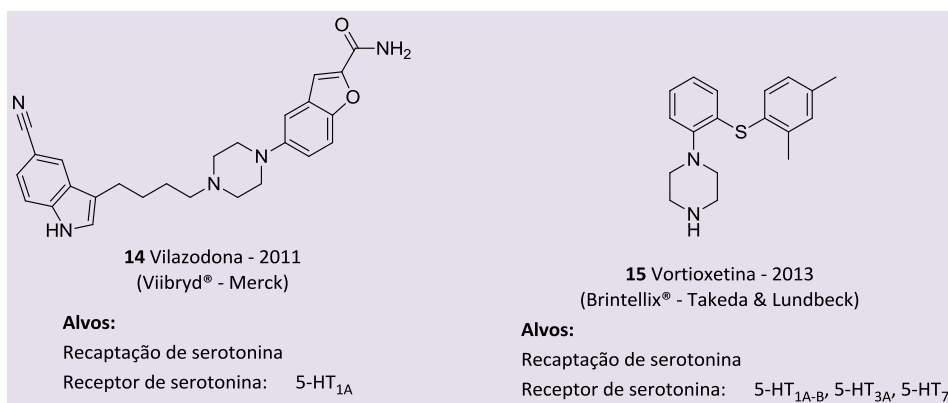


Figura 3. Fármacos multialvos recentemente aprovados pelo FDA para o tratamento clínico da depressão

3. Principais estratégias de planejamento e identificação de fármacos multialvos

Conforme previamente exposto, existe uma demanda iminente por novos fármacos multialvos que representem alternativas terapêuticas eficazes e seguras para o tratamento de doenças de caráter multifatorial. Para atender a esta demanda, algumas estratégias de identificação de protótipos vêm sendo empregadas, incluindo a triagem robotizada de alto desempenho (HTS) frente a múltiplos alvos, a triagem fenotípica e/ou o planejamento estrutural direcionado à obtenção de fármacos multialvos.¹³

Tradicionalmente, os químicos medicinais empregaram a triagem fenotípica, através de ensaios *in vivo* em modelos animais, para a identificação de protótipos bioativos, cuja elucidação do mecanismo de ação *a posteriori* na maior parte das vezes demonstrou o perfil multialvo dos fármacos desenvolvidos a partir da aplicação desta estratégia.^{5,17}

No entanto, as principais desvantagens atribuídas à triagem fenotípica *in vivo* estão associadas ao uso experimental de um grande número de animais, além de sua deficiência em discriminar se um composto é inativo por sua incapacidade em interagir efetivamente com o alvo terapêutico, ou por sua ineficiência em alcançá-lo no meio biológico, devido a limitações farmacocinéticas.⁴

Por outro lado, o planejamento estrutural de fármacos multialvos pode ser também executado racionalmente, através da montagem de farmacóforos híbridos a partir de novas ferramentas de modelagem molecular e química computacional,⁵ ou ainda através do emprego da estratégia de hibridação molecular da Química Medicinal.^{17,19} A hibridação molecular é uma ferramenta de planejamento de fármacos a partir de substâncias bioativas já conhecidas, baseada na combinação dos seus

grupos farmacofóricos, visando à obtenção de um novo híbrido com melhor eficácia terapêutica que os protótipos originais.¹⁹

4. A contribuição do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas - LASSBio®

Ao longo de seus 20 anos de história e existência, o Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas - LASSBio®, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, têm dado sua contínua contribuição na busca por novos candidatos a fármacos multialvos, duais ou simbióticos, úteis no tratamento de doenças multifatoriais com elevado impacto socioeconômico. Os compostos bioativos denominados moduladores *duais* atuam em alvos terapêuticos pertencentes a uma mesma via de sinalização bioquímica, enquanto os compostos denominados *simbióticos* são aqueles capazes de atuar em alvos moleculares envolvidos em cascatas de sinalização celular distintas, porém com papéis relevantes no desenvolvimento de uma mesma doença.¹²

4.1. Novos protótipos de fármacos anti-inflamatórios inibidores duais das enzimas 5-LOX e PGHS-2

Os fármacos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) são amplamente empregados no tratamento de distúrbios de natureza inflamatória aguda e/ou crônica, representando uma das classes terapêuticas mundialmente mais populares. Estes fármacos atuam através da inibição da atividade catalítica da enzima prostaglandina-endoperóxido sintase (do inglês, *prostaglandin-endoperoxide synthase* - PGHS), prevenindo a síntese de eicosanoides na via metabólica da cascata do ácido araquidônico, os quais são caracterizados como importantes mediadores inflamatórios.^{20,21}

Durante a década de 90 foi descrita a existência de duas isoformas da enzima PGHS. Naquela época sugeriu-se que a isoforma PGHS-1 seria constitutiva e importante para os efeitos homeostáticos relacionados à proteção gástrica, homeostasia renal e função plaquetária; enquanto a isoforma PGHS-2 seria induzida por estímulos inflamatórios em células inflamatórias, *e.g.* macrófagos e monócitos. Neste contexto, foi proposto que a inibição seletiva frente à isoforma PGHS-2 forneceria um atributo adicional de segurança.^{20,21}

Por outro lado, a inibição da enzima 5-lipo-oxigenase (5-LOX), responsável por catalisar a síntese de leucotrienos a partir do ácido araquidônico, resultaria em redução do efeito quimiotático induzido por estes mediadores. Desta feita, a inibição dual das enzimas PGHS-2 e 5-LOX, ambas

pertencentes à cascata do ácido araquidônico, representaria uma estratégia promissora no planejamento de novos protótipos de fármacos com perfil anti-inflamatório.^{20,21}

Com este intuito, Barreiro e colaboradores planejaram, sintetizaram e bioensaiaram uma nova série congênere de derivados (**16a-h** e **17a-h**) com potente efeito anti-inflamatório em modelos animais *in vivo*, idealizados como inibidores duais de PGHS-2 e 5-LOX. Estes compostos foram propostos através da aplicação da estratégia de hibridação molecular da Química Medicinal, conforme ilustrado na Figura 4, a partir do fármaco da classe dos oxicams, o meloxicam (**18**), descrito como um AINE com maior seletividade para a isoforma PGHS-2; e do protótipo BF-389 (**19**), anteriormente descrito como um inibidor de 5-LOX.²⁰

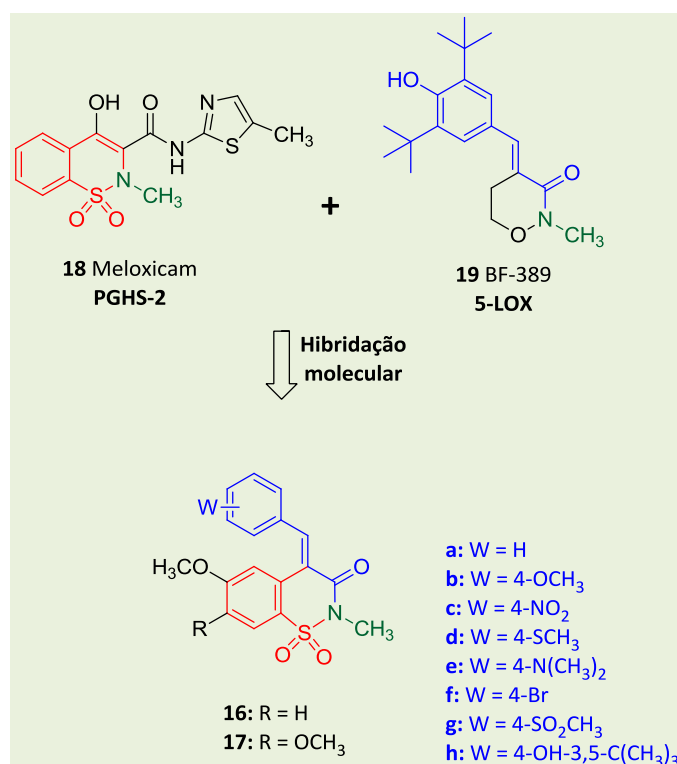


Figura 4. Gênese dos compostos idealizados como inibidores duais de PGHS-2 e 5-LOX

4.2. Novos protótipos de fármacos antitrombóticos simbióticos planejados por hibridação molecular

Alguns anos mais tarde, Lima e colaboradores aplicaram a estratégia da hibridação molecular para a obtenção de novos compostos simbióticos desenhados como candidatos a fármacos antitrombóticos. Os novos compostos foram planejados a partir de anticoagulantes conhecidos, inibidores de trombina, *i.e.* ximelagatran (**20**) e arilsulfonato (**21**), em combinação com o protótipo *N*-acilidrazônico LASSBio-294 (**22**), com propriedades antiplaquetárias mediadas pela modulação da produção de autacoides da cascata do ácido araquidônico.²²

A nova série de derivados arilsulfonatos-

N-acilidrazônicos (**23a-e**) foi construída mantendo-se as subunidades farmacofóricas para as atividades propostas, representadas pelo fragmento arilsulfonato **A**, pela subunidade polar **B** e pela função *N*-acilidrazona **C**. Modificações subsequentes na subunidade **B**, incluindo funcionalidades com valores de pKa variados, demonstraram que o derivado ácido carboxílico **23e** foi o mais promissor, apresentando elevada potência na inibição da agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas, induzida por trombina e por ácido araquidônico, atuando através de um mecanismo duplo de ação, conforme antecipado no planejamento estrutural. Os três regioisômeros, LASSBio-693 (**23e**), LASSBio-743 (**24**) e LASSBio-752 (**25**), foram ativos *in vivo*, por via oral, em modelo murino de tromboembolismo induzido por trombina.²²

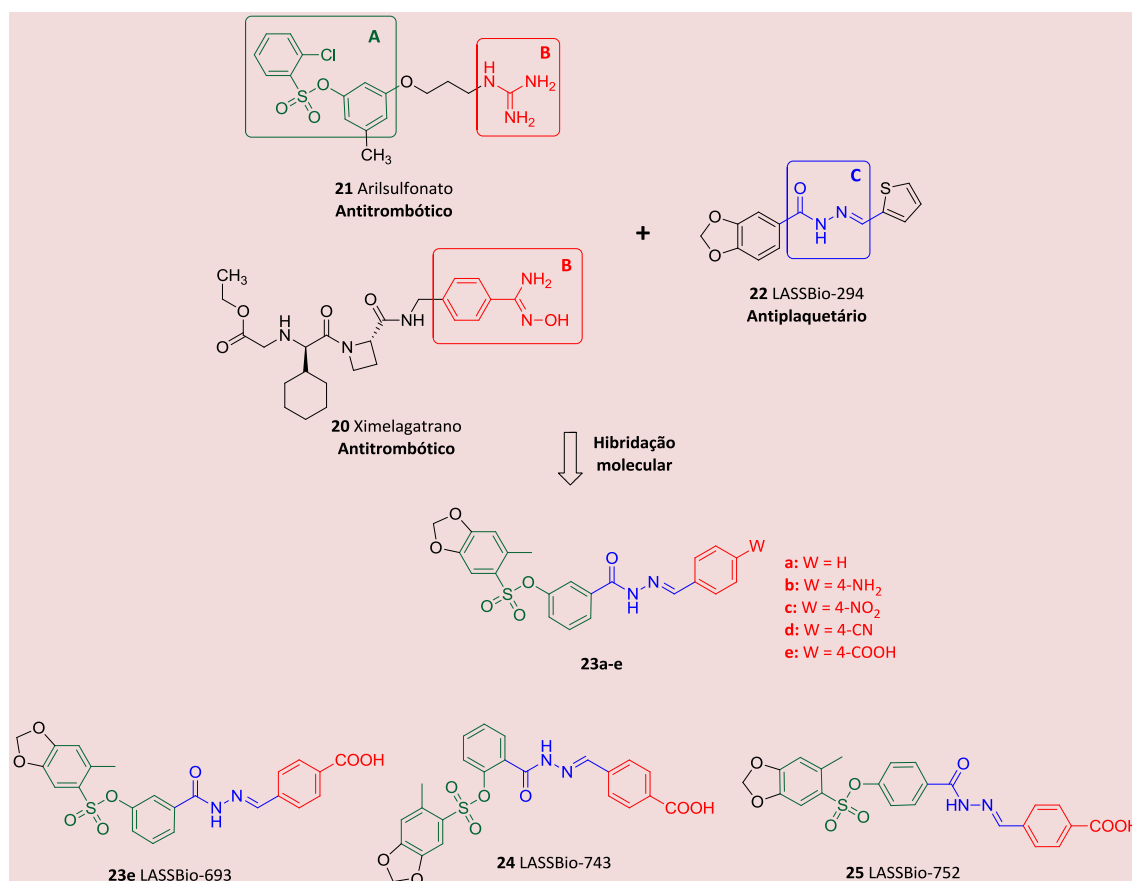


Figura 5. Gênese dos derivados antitrombóticos simbióticos com atividade anticoagulante e antiplaquetária

4.3. Novos protótipos de fármacos antiasmáticos simbióticos: LASSBio-468 e LASSBio-596

No contexto da linha de pesquisa desenvolvida no LASSBio® para a identificação de novos candidatos a fármacos antiasmáticos, a aplicação da abordagem fisiológica como estratégia de planejamento racional permitiu a identificação da citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e das enzimas fosfodiesterase 4 (PDE-4) e fosfodiesterase 5 (PDE-5) como alvos promissores para o desenho de novos protótipos antiasmáticos simbióticos (Figura 6).²³

A inibição dupla proposta buscava uma abordagem inovadora para a terapia antiasmática, pautada nos benefícios terapêuticos proporcionados por uma redução na biossíntese e liberação da citocina TNF- α e por uma elevação simultânea dos níveis intracelulares de nucleotídeos cíclicos.²⁴

A relevância dos níveis intracelulares de GMPc (monofosfato de 3',5'-guanosina cíclico) no controle da hiperreatividade das vias aéreas, característica ímpar da asma brônquica,^{25,26} indicava que inibidores seletivos da isoforma enzimática PDE-5, GMPc específica,^{27,28} seriam terapeuticamente úteis no controle dos eventos celulares associados ao desenvolvimento do processo asmático.^{26,29}

Visando a redução na produção e liberação da citocina TNF- α , foi explorada a capacidade da talidomida (**26**) e derivados em modular diretamente sua biossíntese,

associada à estratégia de modulação indireta, fundamentada no aumento da concentração intracelular de AMPc (monofosfato de 3',5'-adenosina cíclico). A elevação nos níveis de AMPc, tanto pelo estímulo de sua formação quanto pela prevenção de sua degradação, inibe a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , interleucina 1 β e interferon γ , além de reduzir o recrutamento e a ativação de células inflamatórias, resultando em efeito imunossupressor.^{30,31} O bloqueio seletivo da PDE-4 induz a elevação dos níveis de AMPc em células pró-inflamatórias e imunocompetentes, nas quais esta isoforma é a mais abundante.^{31,32}

O novo padrão híbrido foi planejado mantendo-se a subunidade imídica aquiral (**A**) da talidomida (**26**) e fundindo-a a um sistema fenil-sulfonamídico (**B**), oriundo dos protótipos **27** e sildenafil (**28**), através do átomo de nitrogênio imídico remanescente, construindo-se o fragmento ftalimídico *N*-fenil-sulfonamídico (**AB**). Optou-se inicialmente pela manutenção do anel *N*-metil-piperazínico (**29a**) presente na estrutura da sildenafil (**28**) (Figura 6).³²

Posteriormente, considerando-se a possível contribuição da subunidade *N*-metil-piperazínica, presente no protótipo **28**, para a ação inibitória sobre as fosfodiesterases, foram eleitos os substituintes isostéricos piperazina (**29b**), fenil-piperazina (**29c**), morfolina (**29d**) e tiomorfolina (**29e**). Esta variação estrutural permitiria a avaliação de eventuais contribuições de caráter eletrônico, hidrofóbico e conformacional para a atividade desejada.³²

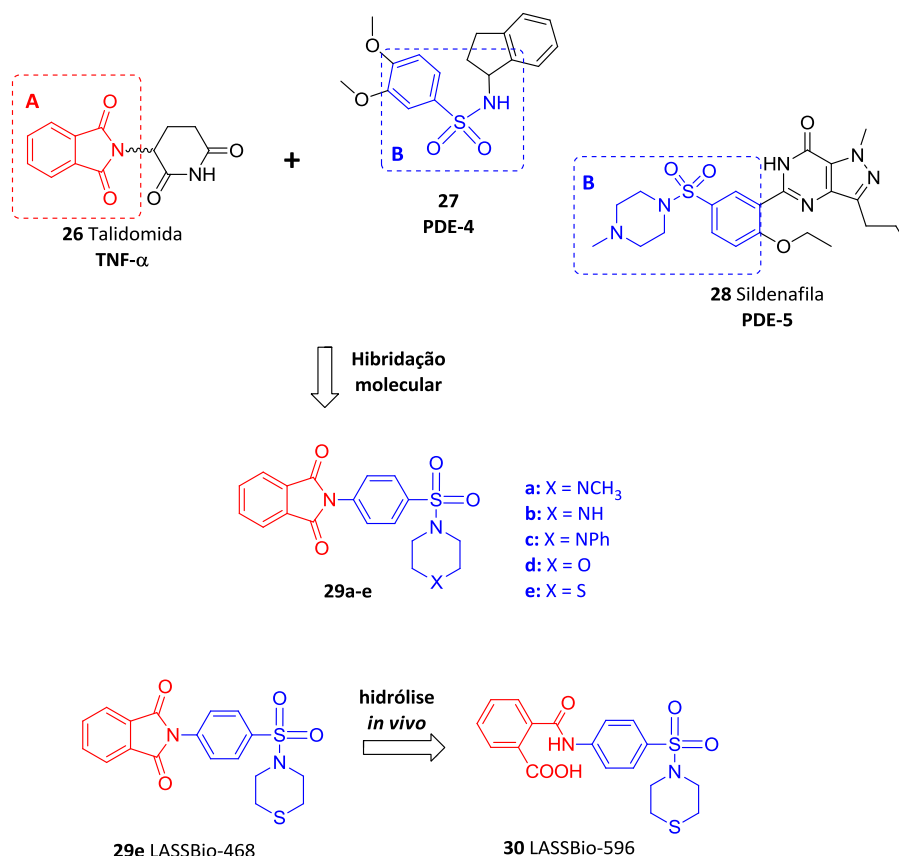


Figura 6. Gênese dos derivados antiasmáticos simbióticos inibidores de TNF- α e PDEs

Os resultados farmacológicos obtidos para a série congênere proposta revelaram a capacidade destes derivados em inibir o processo de migração celular e diminuir os níveis de TNF- α no lavado broncoalveolar em modelo murino de inflamação pulmonar induzida por lipopolissacarídeo (LPS), destacando-se o derivado tiomorfolínico LASSBio-468 (**29e**), o qual apresentou a maior potência anti-inflamatória, com DE₅₀ = 2,5 mg/kg. Em seguida, foi determinado o efeito inibitório de LASSBio-468 (**29e**) frente às isoformas de fosfodiesterase PDE-4 e PDE-5, demonstrando-se uma suave inibição, com valores de CI₅₀ iguais a 82 μ M e 152 μ M, respectivamente. A atividade anti-inflamatória e imunomoduladora do protótipo LASSBio-468 (**29e**) foi confirmada em diversos modelos animais dependentes da produção do TNF- α e do aumento de nucleotídeos cíclicos, comprovando-se o seu perfil simbiótico.^{23,32,33}

Tendo em vista a conhecida labilidade

química, pH dependente, do núcleo ftalimídico, previamente descrita para o fármaco talidomida (**26**), foi ponderada a hipótese de bioconversão de LASSBio-468 (**29e**) em seu derivado carboxi-amídico corresponde LASSBio-596 (**30**, Figura 6). Por este motivo, LASSBio-596 (**30**) foi sintetizado e testado em modelo de injúria pulmonar aguda, apresentando-se eficaz na modulação do processo inflamatório pulmonar, induzindo a reversão das alterações mecânicas, o bloqueio da fibroproliferação, a inibição do recrutamento de neutrófilos e o controle da produção de TNF- α . Ademais, LASSBio-596 (**30**) preveniu as alterações morfológicas e mecânicas do pulmão em modelo de asma crônica em murinos, bloqueou o processo de fibroproliferação e reduziu a resistência das vias aéreas, confirmando-se como um legítimo protótipo antiasmático simbiótico.²³

4.4. Novos inibidores duais de tirosina cinases receptoras como candidatos a fármacos antitumorais

Diferentes vias de sinalização celular estão associadas à evolução, à agressividade e ao potencial metastático de tumores malignos. Esta diversidade de mecanismos resulta em heterogeneidade, redundância e na possibilidade de o tumor driblar o bloqueio de apenas uma via de sinalização, resultando em resistência primária ou adquirida.³⁴ Deste modo, a natureza multifatorial do câncer determina a necessidade de abordagens terapêuticas múltiplas ou multifuncionais, e.g. um único composto capaz de modular diferentes vias de sinalização envolvidas na patogênese da doença.³⁵

As proteínas cinases exercem papel de destaque na regulação de diversos processos celulares envolvidos no estabelecimento e progressão do câncer, incluindo a proliferação, diferenciação e sobrevivência da célula.³⁶ A correlação entre estas enzimas e o câncer já é bem estabelecida na literatura, sendo a desregulação de diversas proteínas cinases um achado clínico recorrente.^{37,38} Desta feita, a modulação de múltiplas proteínas cinases é considerada uma abordagem terapêutica promissora para o incremento da eficácia antitumoral e para a prevenção do desenvolvimento de resistência à medicação (Figura 1).^{34,39,40}

Particularmente, algumas tirosina cinases receptoras de fatores de crescimento exercem papel crucial no desenvolvimento de tumores malignos, apresentando-se constitutivamente ativadas em células tumorais, a exemplo do receptor do fator de crescimento epidérmico (do inglês, *epidermal growth factor receptor*, EGFR); e do receptor do fator de crescimento do endotélio

vascular (do inglês, *vascular endothelial growth factor receptor*, VEGFR)^{37,41}.

As tirosina cinases receptoras EGFR e VEGFR-2 são alvos terapêuticos validados no tratamento do câncer e diversos inibidores já estão aprovados para uso clínico em tumores sólidos (Figura 1).^{35,42,43} A relação entre estas tirosina cinases no tratamento do câncer também é conhecida: a inibição da sinalização celular mediada pelo VEGFR-2 potencializa os efeitos antitumorais dos inibidores de EGFR; enquanto que a superexpressão do fator de crescimento VEGF mediada por vias independentes do receptor EGFR é considerada um dos possíveis mecanismos de indução de resistência à terapia anti-EGFR.³⁴ Desta maneira, a inibição dual das tirosina cinases EGFR e VEGFR-2 representa uma abordagem promissora para o tratamento de tumores sólidos malignos devido à ocorrência de um efeito sinérgico.⁴⁴

Resultados recentemente divulgados por Barbosa e colaboradores descreveram a obtenção de uma nova série congênere de inibidores duais 4-amino-quinazolinícos (**32a-p**) das tirosina cinases receptoras EGFR e VEGFR-2 como candidatos a fármacos úteis no tratamento do câncer, a partir da combinação de grupamentos farmacofóricos presentes em inibidores conhecidos de ambas as proteínas-alvo. Um ensaio radiométrico foi empregado para medir a capacidade de inibição da atividade enzimática de VEGFR-2 e EGFR pelos derivados **32a-p** sintetizados, destacando-se os análogos LASSBio-1814 (**32a**), LASSBio-1816 (**32b**) e LASSBio-1819 (**32c**), os quais apresentaram um perfil de inibição mais pronunciado, além de se mostrarem equipotentes frente a ambas as tirosina cinases selecionadas (Figura 7).⁴⁵

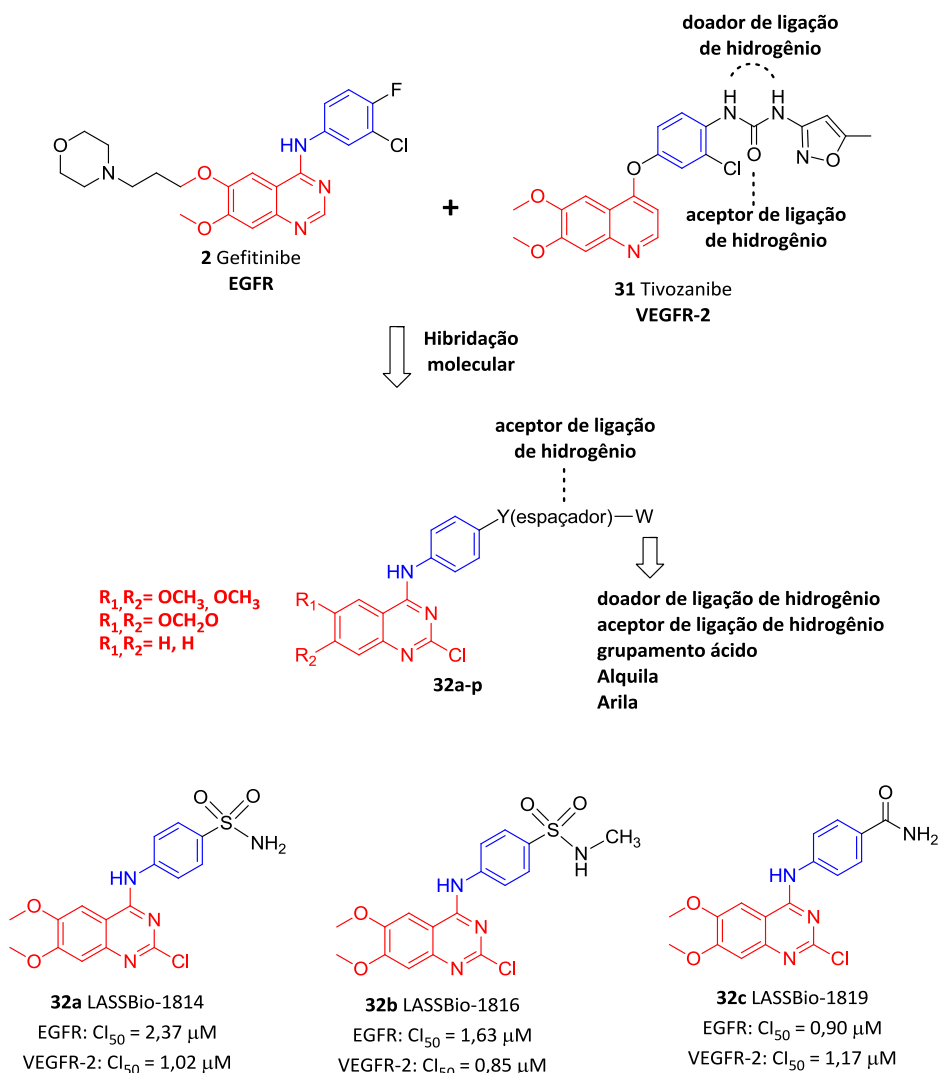


Figura 7. Planejamento estrutural dos novos derivados 4-amino-quinazolínicos (**32a-p**) inibidores duais das tirosinas cinases receptoras EGFR e VEGFR-2

5. Considerações finais

A habilidade de micromoléculas em interagir com múltiplos biorreceptores é comumente designada pelo termo *polifarmacologia*. A polifarmacologia representa um novo paradigma no desenvolvimento de fármacos, cujos benefícios têm sido progressivamente reconhecidos e apreciados, principalmente no que se refere ao tratamento de doenças de natureza multifatorial. A grande maioria das enfermidades de interesse clínico possui uma patogênese multifatorial, incluindo àquelas de maior incidência na população

mundial e de maior impacto socioeconômico, a exemplo das doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e inflamatórias, além do câncer, da obesidade, da ansiedade e da depressão. Neste contexto, a identificação de novos fármacos multialvos apresenta-se como um desafio a ser vencido na busca por alternativas clínicas inovadoras, mais eficazes e seguras, para o tratamento destas doenças. Ao longo de seus 20 anos de história, o Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas - LASSBio[®], da Universidade Federal do Rio de Janeiro, descreveu diversos protótipos de fármacos multialvos com perfil anti-inflamatório, antitrombótico, antiasmático, antitumoral, entre outras aplicações, oferecendo sua

contínua e valiosa contribuição para o avanço e êxito deste novo paradigma da Química Medicinal.

Agradecimentos

A autora agradece ao coordenador do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio[®]), Professor Eliezer J. Barreiro, aos professores Lídia Moreira Lima, Carlos Alberto Manssour Fraga e Carlos Maurício Rabello de Sant'Anna, pertencentes ao corpo docente do LASSBio[®], e às agências de fomento CNPq, FAPERJ e INCT-INOVAR (Projeto CNPq nº 573.564/2008-6; FAPERJ nº E-26/170.020/2008).

Referências Bibliográficas

- ¹ Viegas Jr, C.; Bolzani, V. S.; Barreiro, E. J. Os produtos naturais e a Química Medicinal moderna. *Química Nova* **2006**, *29*, 326. [CrossRef]
- ² Calixto, J. B.; Siqueira Jr, J. M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: Desafios. *Gazeta Médica da Bahia* **2008**, *78*, 98.
- ³ Jalenca, X.; Mestres, J. On the origins of drug polypharmacology. *Medicinal Chemistry Communications* **2013**, *4*, 80. [CrossRef]
- ⁴ Morphy, R. & Rankovic, Z. Em *The practice of Medicinal Chemistry*; Wermuth, C. G.; 3a. ed., Elsevier: Burlington, 2008, cap. 27.
- ⁵ Costantino, L.; Barlocco, D. Challenges in the design of multitarget drugs against multifactorial pathologies: a new life for medicinal chemistry? *Future Medicinal Chemistry* **2013**, *5*, 5. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶ Verli, H.; Barreiro, E. J. Um paradigma da Química Medicinal: A flexibilidade dos ligantes e receptores. *Química Nova* **2005**, *28*, 95. [CrossRef]
- ⁷ Strebhardt, K.; Ullrich, A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nature Reviews* **2008**, *8*, 473. [CrossRef]
- ⁸ Sams-Dodd, F. Target-based drug discovery: is something wrong? *Drug Discovery Today: Targets* **2005**, *10*, 139. [CrossRef]
- ⁹ Medina-Franco, J. L.; Giulianotti, M. A.; Welmaker, G. S.; Houghten, R. A. Shifting from the single to the multitarget paradigm in drug discovery. *Drug Discovery Today* **2013**, *18*, 495. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁰ Lima, L. M. Química Medicinal moderna: Desafios e contribuição brasileira. *Química Nova* **2007**, *30*, 1456. [CrossRef]
- ¹¹ Silva, T. F. Abordagens da Química Medicinal para o planejamento de protótipos de fármacos. *Revista Virtual de Química* **2013**, *5*, 921. [CrossRef]
- ¹² Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. New insights for multifactorial disease therapy: The challenge of the symbiotic drugs. *Current Drug Therapy* **2008**, *3*, 1. [CrossRef]
- ¹³ Peters, J.-U. Polypharmacology: Foe or friend. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *56*, 8955. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁴ Achenbach, J.; Klingler, F.-M.; Blöcher, R.; Moser, D.; Häfner, A.-K.; Rödl, C. B.; Kretschmer, S.; Krüger, B.; Löhr, F.; Stark, H.; Hofmann, B.; Steinhilber, D.; Proschak, E. Exploring the chemical space of multitarget ligands using aligned self-organizing maps. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *4*, 1169. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁵ Bottegoni, G.; Favia, A. D.; Recanatini, M.; Cavalli, A. The role of fragment-based and computational methods in polypharmacology. *Drug Discovery Today* **2012**, *17*, 23. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁶ Masouidi-Nejad, A.; Mousavian, Z.; Bozorgmehr, J. H. Drug-target and disease networks: polypharmacology in the post-genomic era. *In Silico Pharmacology* **2013**, *1*, 1. [CrossRef]
- ¹⁷ Morphy, R.; Kay, C.; Rankovic, Z. From magic bullets to designed multiple ligands. *Drug Discovery Today* **2004**, *9*, 641. [CrossRef]
- ¹⁸ Mestres, J.; Gregori-Puigjané, E. Conciliating binding efficiency and polypharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences* **2009**, *30*, 470. [CrossRef] [PubMed]

- ¹⁹ 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. *Current Medicinal Chemistry* **2007**, *14*, 1829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁰ Teixeira, L. H. P.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. Synthesis of new 1,2-benzothiazin-3-one derivatives designed as dual cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase inhibitors. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **1998**, *9*, 119. [[CrossRef](#)]
- ²¹ Lages, A. S.; Romeiro, N. C.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. Inibidores seletivos de prostaglandina endoperóxido sintase-2 (PGHS-2): Nova estratégia para o tratamento da inflamação. *Química Nova* **1998**, *21*, 761. [[CrossRef](#)]
- ²² Lima, L. M.; Frattani, F. S.; dos Santos, J. L.; Castro, H. C.; Fraga, C. A. M.; Zingali, R. B.; Barreiro, E. J. Synthesis and anti-platelet activity of novel arylsulfonate-acylhydrazone derivatives, designed as antithrombotic candidates. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *43*, 348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²³ Lima, L. M.; de Lima, N. M. Contribuição do LASSBio no desenvolvimento de novos candidatos a protótipos de fármacos antiasmáticos. *Revista Virtual de Química* **2009**, *1*, 35. [[CrossRef](#)]
- ²⁴ Lima, L. M.; Fraga, C.A.M.; Barreiro, E.J. O renascimento de um fármaco: Talidomida. *Química Nova* **2001**, *24*, 683. [[CrossRef](#)]
- ²⁵ Sadeghi-Hashjin, G.; Folkerts, G.; Henricks, P. A. J.; Van De Loo, P. G. F.; Van Der Linde, H. J.; Dik, I. E. M.; Nijkamp, F. P. Induction of guinea pig airway hyperresponsiveness by inactivation of guanylate cyclase. *European Journal of Pharmacology* **1996**, *302*, 109. [[CrossRef](#)]
- ²⁶ Bernareggi, M. M.; Berlvisi, M. G.; Patel, H.; Barnes, P. J.; Giembycz, M. A. Anti-spasmogenic activity of isoenzyme-selective phosphodiesterase inhibitors in guinea-pig trachealis. *British Journal of Pharmacology* **1999**, *128*, 327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁷ Loughney, K.; Hill, T. R.; Florio, V. A.; Uher, L.; Rosman, G. J.; Wolda, S. L.; Jones, B. A.; Howard, M. L.; McAllister-Lucas L. M.; Sonnenburg, W. K.; Francis, S. H.; Corbin, J. D.; Beavo, J. A.; Ferguson, K. Isolation and characterization of cDNAs encoding PDE5A, a human cGMP-binding, cGMP-specific 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene* **1998**, *216*, 139. [[CrossRef](#)]
- ²⁸ Turko, I. V.; Francis, S. H.; Corbin, J. D. Studies of the molecular mechanism of discrimination between cGMP and cAMP in allosteric sites of the cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE-5). *Journal Biological Chemistry* **1999**, *274*, 29038. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁹ Lagente, V.; Pruniaux, M-P.; Junien, J-L.; Moodley, I. Modulation of cytokine-induced eosinophil infiltration by phosphodiesterase inhibitors. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine* **1995**, *151*, 1720. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁰ Marriott, J. B.; Westby, M.; Dalgleish, A. G. Therapeutic potential of TNF- α inhibitors old and new. *Drug Discovery Today* **1997**, *2*, 273. [[CrossRef](#)]
- ³¹ Gallant, M.; Chauret, N.; Claveau, D.; Day, S.; Deschênes, D.; Dubé, D.; Huang, Z.; Lacombe, P.; Laliberté, F.; Lévesque, J.-F.; Liu, S.; MacDonald, D.; Mancini, J.; Masson, P.; Mastracchio, A.; Nicholson, D.; Nicoll-Griffith, D.A.; Perrier, H.; Salem, M.; Styhler, A.; Young, R. N.; Girard, Y. Design, synthesis and biological evaluation of 8-biarylquinolines: a novel class of PDE4 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2008**, *18*, 1407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³² Lima, L. M.; Castro, P.; Machado, A. L.; Fraga, C. M. A.; Lugnier, C.; Moraes, V. L. G.; Barreiro, E. J. Synthesis and anti-inflammatory activity of phthalimide derivatives, designed as new thalidomide analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2002**, *10*, 3067. [[CrossRef](#)]
- ³³ Lima, L. M.; Fraga, C. A. M.; Koatz, V. L. G.; Barreiro, E. J. Thalidomide and analogs as anti-inflammatory and immunomodulator drug candidates. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry* **2006**, *5*, 79. [[CrossRef](#)]
- ³⁴ Tabernero, J. The role of VEGF and EGFR inhibition: Implications for combining anti-VEGF and anti-EGFR agents. *Molecular Cancer Research* **2007**, *5*, 203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- ³⁵ Antonello, A.; Tarozzi, A.; Morroni, F.; Cavalli, A.; Rosini, M.; Hrelia, P.; Bolognesi, M. L.; Melchiorre, C. Multitarget-directed drug design strategy: A novel molecule designed to block epidermal growth factor receptor (EGFR) and to exert proapoptotic effects. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49*, 6642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁶ Ishikawa, T.; Seto, M.; Banno, H.; Kawakita, Y.; Oorui, M.; Taniguchi, T.; Ohta, Y.; Tamura, T.; Nakayama, A.; Miki, H.; Kamiguchi, H.; Tanaka, T.; Habuka, N.; Sogabe, S.; Yano, J.; Aertgeerts, K.; Kamiyama, K. Design and synthesis of novel human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)/epidermal growth factor receptor (EGFR) dual inhibitors bearing a pyrrolo[3,2-d]pyrimidine scaffold. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54*, 8030. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁷ Traxler, P.; Bold, G.; Buchdunger, E.; Caravatti, G.; Furet, P.; Manley, P.; O'Reilly T.; Wood, J.; Zimmermann, J. Tyrosine kinase inhibitors: From rational design to clinical trials. *Medicinal Research Reviews* **2001**, *21*, 499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁸ Avila, C. M.; Romeiro, N. C. Proteínas tirosinas quinases: Desafios do desenvolvimento de fármacos para a terapia do câncer. *Revista Virtual de Química* **2010**, *2*, 59. [[CrossRef](#)]
- ³⁹ Naumov, G. N.; Nilsson, M. B.; Cascone, T.; Briggs, A.; Straume, O.; Akhlen, L. A.; Lifshits, E.; Byers L. A.; Xu, L.; Wu, H.-K.; Jänne, P.; Kobayashi, S.; Halmos, B.; Tenen, S.; Tang, X. M.; Engelman, J.; Yeap, B.; Folkman, J.; Johnson, B. E.; Heymach, J. V. Combined vascular endothelial growth factor receptor and epidermal growth factor receptor (EGFR) blockade inhibits tumor growth in xenographic models of EGFR inhibitor resistance. *Clinical Cancer Research* **2009**, *15*, 3484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁰ Pal, H. C., Sharma, S.; Strickland, L. R.; Agarwala, J.; Athar, M.; Elmets C.; Afaq, F. Delphinidin reduces cell proliferation and induces apoptosis of non-small-cell lung cancer cells by targeting EGFR-VEGFR-2 signaling pathways. *Plos One* **2013**, *8*, 77270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴¹ Levitzki, A. Tyrosine kinase inhibitors: Views of selectivity, sensitivity and clinical performance. *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology* **2010**, *53*, 161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴² Arora, A.; Scholar, E. M. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics* **2005**, *315*, 971. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴³ McTigue, M.; Murray, B. W.; Chen, J. H.; Deng, Y.-L., Solowiej, J.; Kania, R. S. Molecular conformations, interactions, and properties associated with drug efficiency and clinical performance among VEGFR TK inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, *109*, 18281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁴ Garofalo, A.; Farce, A.; Ravez, S.; Lemoine A.; Six, P.; Chavatte, P.; Goossens, L.; Depreux, P. Synthesis and structure-activity relationships of (aryloxy)quinazoline ureas as novel, potent, and selective vascular endothelial growth factor receptor-2 inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55*, 1189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁵ Barbosa, M. L. C.; Lima, L. M.; Tesch, R.; Sant'Anna, C. M. R.; Totzke, F.; Kubbutat, M. H. G.; Schächtele, C.; Laufer, S. A.; Barreiro, E. J. Novel 2-chloro-4-anilino-quinazoline derivatives as EGFR and VEGFR-2 dual inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *71*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]