



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Inês Maria Nunes da Silva

Relatórios de Estágio sob orientação de Dr. Bruno Sousa e da
Dra. Ana Rita Rodrigues e Monografia intitulada “Proteolysis-Targeting
Chimeras (PROTACs): A precision medicine strategy for cancer treatment”
sob orientação do Professor Doutor Alcino Jorge Leitão, referentes à
Unidade Curricular “Estágio”, apresentados à Faculdade de Farmácia da
Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas
de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2023



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Inês Maria Nunes da Silva

Relatórios de Estágio sob orientação de Dr. Bruno Sousa e da
Dra. Ana Rita Rodrigues e Monografia intitulada “Proteolysis-Targeting Chimeras (PROTACs): A
precision medicine strategy for cancer treatment” sob orientação do Professor Doutor Alcino Jorge
Leitão, referentes à Unidade Curricular “Estágio”, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade
de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências
Farmacêuticas

Setembro 2023

Declaração

Eu, Inês Maria Nunes da Silva, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº2017267315, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada "Proteolysis-Targeting Chimeras (PROTACs): A precision medicine strategy for cancer treatment" apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular "Estágio".

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 8 de setembro de 2023

Inês Maria Nunes da Silva

(Inês Maria Nunes da Silva)

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Alcino Leitão pela sua disponibilidade, apoio e paciência ao longo desta etapa desafiante.

A toda a equipa da Fresenius Kabi/Labesfal, pela integração, apoio e ensinamentos que recebi ao longo do estágio.

A toda a equipa da Farmácia Santa Isabel, por todas as aprendizagens e todo o carinho, que me concedeu oportunidade de crescer profissional e pessoalmente.

Aos amigos que Coimbra me deu e que se tornaram família, pelo constante apoio, companhia e amizade. À Beatriz, à Carolina, à Camila, à Jéssica e a tantos outros, que tornaram toda esta fase da minha vida muito mais completa e com sentido. Coimbra uniu-nos e eu levar-vos-ei para sempre no meu coração.

À minha Mãe, ao meu Pai, à minha Irmã e a toda a minha família por serem a minha base mais sólida. O vosso amor e confiança foram os alicerces que me permitiram enfrentar cada desafio. Por todos os vossos sacrifícios, que permitiram que tudo isto acontecesse, o meu imenso obrigada. Cada vitória que alcancei é também vossa.

Por fim, a Coimbra, a cidade que me acolheu nestes últimos anos, cidade onde sorri, chorei e acima de todo evoluí. Uma vez Coimbra, para sempre Saudade.

O meu muito obrigada!

“Capas traçadas ao vento,
Amigos e um momento
Que nunca esquecerei!

Promessas que levo de um tempo
No adeus um sentimento
Que sempre guardarei!”

Balada de Despedida 2022-2023
Grupo de Fado d'Anto

Índice

Parte I: Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

1.Introdução	8
2.Fresenius Kabi – Labesfal	8
3.Análise SWOT	10
3.1. Pontos Fortes (Strengths)	10
3.1.1. Acolhimento e Integração do Estagiário.....	10
3.1.2.Aposta na Formação Contínua	11
3.1.3.Diversidade de atividades realizadas no Departamento de Garantia de Qualidade. 11	
3.1.4.Perceção do Ciclo do Medicamento	13
3.1.5.Bom Ambiente de Trabalho.....	14
3.2. Pontos Fracos (Weaknesses)	14
3.2.1.Duração do Estágio Curricular	14
3.2.2.Inexistência de Plano de Estágio.....	14
3.3. Oportunidades (Opportunities)	15
3.3.1.Realização de Estágio em Indústria Farmacêutica.....	15
3.3.2.Variedade de Mercados	15
3.4. Ameaças (Threats)	15
3.4.1.Número de Farmacêuticos na Indústria.....	15
3.4.2.Contrafação de Medicamentos.....	16
4.Considerações Finais	16
5.Referências Bibliográficas	18

Parte II: Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

1.Introdução	20
2.Farmácia Santa Isabel	20
3.Análise SWOT	21
3.1. Pontos Fortes (Strengths)	22
3.1.1.Localização	22
3.1.2.Equipa.....	22
3.1.3.Planeamento de Estágio	22
3.1.4.Determinação de Parâmetros Bioquímicos e Fisiológicos	23
3.1.5.Medicamentos Manipulados	23
3.1.6.Área Veterinária	24
3.1.7.Formação Contínua.....	24
3.2. Pontos Fracos (Weaknesses)	25

3.2.1. Variedade de produtos	25
3.2.2. Sifarma2000®	25
3.2.3. Instalações	25
3.3. Oportunidades (Opportunities)	26
3.3.1. Campanhas sazonais	26
3.3.2. Informação Veterinária	26
3.3.3. Formação à Comunidade	26
3.4. Ameaças (Threats)	27
3.4.1. Medicamentos Esgotados	27
3.4.2. Redução do Poder de Compra	27
4. Considerações Finais	27
5. Referências Bibliográficas	29
Anexos	30

Parte III: Monografia intitulada "Proteolysis-Targeting Chimeras (PROTACs): A precision medicine strategy for cancer treatment"

Abstract	34
Resumo	36
Abbreviations	38
1. Introduction	40
2. Proteolysis and Ubiquitin-Proteasome System	41
3. Proteolysis targeting chimeras (PROTACs)	43
3.1. Structure and Mechanism	43
3.2. Design of PROTAs and ternary complex formation	44
3.3. Advantages of PROTACs	47
3.4. Disadvantages of PROTACs	48
4. PROTAC technology in cancer treatment	49
4.1. BRD4 targeting therapies	49
4.2. CRBN-dependent PROTACs	50
4.3. CRBN-dependent BRD4-targeting PROTAC	51
5. Clinical Trials	53
6. Future Prospects	55
7. Conclusion	55
8. References	57

PARTE I

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Fresenius Kabi / Labesfal, Santiago de Besteiros

Sob orientação de Dr. Bruno Sousa

I. Introdução

O farmacêutico é um agente de saúde pública com competências para executar todas as tarefas que respeitam ao medicamento, assim como outras tecnologias relacionadas, com vista à salvaguarda da saúde pública. Apresenta-se como um profissional de saúde multidisciplinar, podendo atuar em diversas áreas relacionadas com o medicamento, desde o seu desenvolvimento, produção, garantia da qualidade, dispensa, monitorização, entre outros¹. No que diz respeito à indústria farmacêutica, este deve fazer cumprir as Boas Práticas de Fabrico (em inglês *Good Manufacturing Practices*, GMP), de forma a garantir a produção de produtos com qualidade, eficácia e segurança².

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) é um curso que se destaca pela sua abrangência e multidisciplinariedade, sendo capaz de transmitir capacidades e competências aos seus estudantes, tanto de base teórica como prática, e deste modo preparar profissionais aptos e competentes e assim integrá-los em qualquer área do setor farmacêutico³.

O estágio curricular posiciona-se como uma oportunidade chave no percurso académico dos estudantes, inserindo-os em ambiente profissional, para aplicação dos conhecimentos adquiridos, assim como instigar uma nova forma de aprendizagem. Desta forma, a FFUC oferece aos seus estudantes a oportunidade de estágio curricular em indústria farmacêutica, assim como em outras áreas do setor, além do estágio obrigatório em farmácia comunitária e/ou hospitalar.

Neste contexto, realizei a primeira parte do meu estágio curricular na indústria farmacêutica Fresenius Kabi - Labesfal - Laboratórios Almiro, SA., no Departamento de Garantia de Qualidade (DGQ), que decorreu de 9 de janeiro a 31 de março de 2023, sob orientação do Dr. Bruno Sousa.

O presente relatório tem a finalidade de descrever, sob a forma de uma análise SWOT, a minha experiência como estagiária na Fresenius Kabi - Labesfal, apresentando de forma crítica os pontos fortes (Strengths), os pontos fracos (Weaknesses), as oportunidades (Opportunities) e as ameaças (Threats) do estágio realizado.

2. Fresenius Kabi – Labesfal

A Fresenius Kabi (FK) é uma empresa de cuidados de saúde, com presença em todo o globo. É especializada em medicamentos vitais e em tecnologias de perfusão, transfusão e

nutrição clínica. Os seus produtos e serviços são direcionados ao tratamento e cuidado de doentes críticos e crónicos⁴.

De entre a sua vasta gama de medicamentos genéricos, a FK disponibiliza medicamentos de administração intravenosa que incluem uma série de categorias terapêuticas, como oncologia, analgesia, infeciologia, anestesia e doença crítica; assim como uma gama própria de dispositivos médicos. É uma das poucas empresas a nível mundial que oferece produtos de nutrição parentérica e entérica. Possui também uma gama de produtos biossimilares direcionados a oncologia e doenças autoimunes⁵.

Fundada na Alemanha, pelo farmacêutico Dr. Eduard Fresenius, em início do séc. XVIII, a empresa farmacêutica Dr. E. Fresenius, detinha como principais produtos especialidades farmacêuticas entre as quais soluções de injeção e reagentes serológicos. A meados do séc. XX, inicia a comercialização de dispositivos médicos e o desenvolvimento de produtos de nutrição entérica e parentérica. Após a aquisição do negócio internacional de perfusão à Pharmacia & Upjohn (Kabi), em finais de séc. XX, passa a chamar-se Fresenius Kabi, tornando-se líder na Europa em terapêuticas de nutrição e perfusão, oferecendo um vasto portefólio de produtos e serviços para hospitais e ambulatório. Com o início do milénio, a Fresenius Kabi acelera a expansão do seu negócio a nível mundial entrando em novos mercados emergentes⁶.

Em 2005, deu-se a aquisição da empresa farmacêutica portuguesa Labesfal - Laboratórios Almiro, SA., a qual teve a sua génese no laboratório de uma farmácia fundada em Campo de Besteiros no início da década de 50. A primeira unidade fabril do complexo industrial (Unidade 1) inicia a atividade de produção de antibióticos no início do ano 2000, seguida pela Unidade 2, dedicada à produção de soluções estéreis; e a Unidade 3 destinada à produção de sólidos (comprimidos e cápsulas). Após a aquisição pela FK foi construída uma quarta unidade de produção, dedicada à produção de Cefalosporinas injetáveis. Em 2017, foi inaugurada a Unidade 5 dedicada à produção de Penicilinas injetáveis, a qual sofreu uma expansão em 2020, seguida pela construção de uma Unidade de Compounding, que se destina à produção de bolsas de nutrição parentérica individualizadas⁶.

Atualmente, a Fresenius Kabi tem mais de 40.000 colaboradores, em mais de 70 instalações fabris e comercializa mais de 100 grupos diferentes de produtos, em mais de 160 países. Continua a expandir a sua gama de produtos e a sua presença global, com uma rede de unidades de produção descentralizada, que operam como empresas independentes,

coordenadas por sedes regionais espalhadas pelo globo^{6,7}.

Através da sua filosofia “*Caring for life*”, a Fresenius Kabi compromete-se a disponibilizar a profissionais de saúde por todo o mundo, medicamentos e tecnologias essenciais para os melhores cuidados de saúde dos seus utentes⁷.

3. Análise SWOT



Figura 1 | Esquema resumo da análise SOWT. Criada em Canva

3.1. Pontos Fortes (*Strengths*)

3.1.1. Acolhimento e Integração do Estagiário

Desde o primeiro dia de estágio na FK – Labesfal que me senti muito bem recebida e integrada por todos os profissionais da empresa com quem tive oportunidade de contactar.

No primeiro dia, foi-me feita uma breve apresentação da empresa, a sua organização, funcionamento, objetivos e valores. Quando encaminhada ao Departamento da Garantia de Qualidade, fui recebida por uma equipa que se demonstrou disponível para me acompanhar durante os 3 meses de estágio.

Foi-me também cedido material de trabalho pelo Departamento Informático, assim como acesso às plataformas e *softwares* necessários para a realização das minhas tarefas.

3.1.2. Aposta na Formação Contínua

A formação contínua dos colaboradores garante a eficiência e sucesso operacional das diferentes equipas de trabalho.

Desde o início que participei em várias formações tendo a possibilidade de adquirir novos conhecimentos e competências, entre as quais o foco foi direccionado para a política de qualidade, ambiente, energia e segurança.

Nesse contexto, tive oportunidade de assistir a uma formação que teve como tema os princípios de integridade ALCOA+, referentes à integridade de dados. A sigla ALCOA+, representa as iniciais dos seguintes princípios: A – Atribuível (o dado deve ser atribuído a quem o realizou e quando); L – Legível (o dado deve ser registado de forma legível e permanente); C – Contemporâneo (o dado deve ser registado no momento exato em que a ação ocorre); O – Original (o dado deve ser anotado diretamente no *template* apropriado); A – Acurado (do Inglês *Acurate* – o dado deve estar livre de erros, completo e verdadeiro); e + representando a necessidade do dado ser completo, consistente, duradouro e disponível.

3.1.3. Diversidade de atividades realizadas no Departamento de Garantia de Qualidade.

O DGQ integra diferentes equipas com diversas funções relacionadas com a garantia da qualidade. Durante o estágio fui colocada na equipa de gestão de reclamações, no entanto tive também oportunidade de contactar com a equipa responsável pelas validações.

A equipa de gestão reclamações é responsável pela análise de reclamações, transmitidas através de unidades de marketing (MU) da FK situadas em vários países. As reclamações recebidas são exclusivamente referentes a lotes produzidos pela unidade produtiva de Santiago de Besteiros (PU-SB).

Primeiramente é feita uma análise inicial onde é avaliada a origem do lote, assim como possíveis falhas de qualidade que poderão estar na origem da reclamação. Em seguida, é feita uma análise do processo de fabrico, embalagem e transporte de lote reclamado, de forma a confirmar a existência de alguma falha de qualidade. Essa análise é feita por avaliação de alguns fatores que possam estar relacionados com a não conformidade reclamada, como por exemplo revisão de documentação de lote, pesquisa de desvios aos longo da produção que possam estar relacionados com a não conformidade reclamada, reanálise laboratorial de amostras de

farmacoteca, entre outros. Por este motivo, torna-se necessário conhecimento de todos os processos referidos, o que me permitiu ter uma visão geral do funcionamento da PU, assim como contactar com diferentes colaboradores de diferentes departamentos e setores de produção. Em última fase, após confirmada ou não a falha de qualidade, é elaborado um relatório referente a toda a investigação, destinada aos clientes ou entidades reguladoras reclamantes.

Dentro das tarefas que me foram atribuídas, tive também a possibilidade de realizar análises semanais referentes ao rendimento interno de produção, onde eram descritos, analisados e justificados, os números de lotes produzidos, lotes libertados e lotes em quarentena, de cada uma das unidades produtivas em funcionamento, U2, U3, U4 e U5. Tive também a oportunidade de elaborar relatórios de análise direcionadas à monitorização da qualidade da água. Estas análises são realizadas mensalmente e têm como finalidade a avaliação de contaminações ou a presença de microrganismos nos circuitos de água.

Uma outra equipa com que tive oportunidade de contactar foi a equipa responsável pelas validações. Os processos de validação são de extrema importância para assegurar a qualificação dos processos e garantir a produção de produtos com qualidade, segundo as GMP (do inglês *Good Manufacturing Practices*, e tradução Boas Práticas de Fabrico). Esta equipa está então encarregue de assegurar a validação do processo de fabrico e de limpeza. No que diz respeito à validação do processo de fabrico, inicialmente, é feita a caracterização do processo (indicando o processo passo-a-passo, os equipamentos e os operacionais, assim como outros parâmetros influenciadores); os produtos produzidos (incluindo as suas propriedades químicas e físicas); e ainda os métodos de análise utilizados ao longo do processo. Desta caracterização, é feita uma seleção de quais os CPP (do inglês *Critical Process Parameters*, e tradução Parâmetros Críticos do Processo) e os CQA (do inglês *Critical Quality Attributes*, e tradução Atributos Críticos de Qualidade), seguida pela realização de uma análise de risco, onde são analisadas as variações dos CPP e CQA, o seu impacto sobre a qualidade e como controlar essas variações. De seguida é feita a qualificação do processo (em inglês, *Process Performance Qualification, PPQ*) onde são analisados lotes de amostragem selecionados, produzidos usando o processo em questão. São avaliados os pontos críticos e a sua necessidade de validação. Esta verificação é realizada de forma contínua, assegurando a qualidade e a reprodutibilidade do método.

Quanto à validação de limpeza, esta é essencial para garantir a segurança dos produtos e a inexistência de contaminações que possam pôr em causa a vida do utilizador final. É iniciada pela

caraterização do processo de limpeza, onde são descritos quais os tipos de limpeza (manual ou automática do sistema), detergentes e produtos; os critérios de aceitação quanto a substâncias, endotoxinas ou microrganismos; e o método de amostragem (por zaragatoa ou enxaguamento). Esta caraterização é feita consoante API (do inglês *Active Pharmaceutical Ingredient*, e tradução Substância Ativa), contacto com tipo de produto, material da peça e área. O limite de deteção do método utilizado para quantificação é ditado pela substância com menor valor de PDE (do inglês *Permitted Daily Exposure*, e tradução Exposição Diária Permitida) e pelo API. Por fim é elaborado um protocolo de limpeza, sendo verificado de forma contínua. Durante o estágio, tive oportunidade de assistir a uma amostragem de uma validação de limpeza, que decorreu no final de uma campanha de produção da U4, onde são produzidas Cefalosporinas injetáveis.

3.1.4. Perceção do Ciclo do Medicamento

Um dos pontos mais importantes que retive do meu estágio curricular foi a perceção do ciclo do medicamento.

Durante o estágio tive a oportunidade de acompanhar a realização de visitas operacionais independentes pelo DGQ, o que me permitiu visitar e explorar de uma forma completa e crítica as instalações da FK – Labesfal. No decorrer das visitas pude visitar as quatro unidades de produção, os laboratórios de microbiologia e química e física, os armazéns, os pisos técnicos e o piso da água. Ao longo dessas visitas, consegui acompanhar as várias fases de produção, controlo de qualidade e distribuição.

A U2 é dedicada à produção de soluções estéreis, acondicionados em ampolas ou frascos (de vidro ou PE (polietileno)). É composta por linhas de produção semi-automáticas, adaptadas às condições específicas de cada produto. A U3 dedica-se à produção de comprimidos e cápsulas, constituída por diferentes salas consecutivas, destinadas a diferentes fases de produção. A U4 e U5 dedicam-se à produção de beta-lactâmicos injetáveis, cefalosporinas e penicilinas respetivamente. Estas são compostas por linhas contínuas e automáticas. Em todas as unidades existe um rigoroso controlo ambiental, de modo a garantir a condição ideal de produção das respetivas formas farmacêuticas.

O controlo de qualidade da U2 e U3 é assegurado pelo laboratório físico-químico, situado no edifício partilhado pelas duas unidades, enquanto o controlo de qualidade da U4 e U5 é assegurado pelo laboratório físico-químico situado na U4. O controlo de qualidade microbiológico das quatro unidades é assegurado pelo laboratório centralizado de

microbiologia, situado na U4.

Com estas experiências consegui acompanhar as diferentes etapas de produção, incluindo pesagem de matérias-primas, mistura de reagentes, enchimento, esterilização, embalagem; identificar os métodos de organização documental ao longo da produção; observar os vários meios de controlo microbiológico ambiental das diversas áreas; entre outros. O estágio proporcionou a oportunidade de perceção do complexo ciclo do medicamento e a gestão organizacional associada à produção de medicamentos, controlo da qualidade dos mesmos e gestão documental rastreável.

3.1.5. Bom Ambiente de Trabalho

Desde o primeiro dia que a equipa da FK – Labesfal demonstrou uma enorme preocupação em proporcionar um estágio completo aos seus estagiários.

Como única estagiária do departamento, tive oportunidade de trabalhar com uma equipa qualificada, motivada e unida, que se mostrou sempre disponível para me ajudar e esclarecer, o que facilitou a minha integração e aprendizagem.

A comunicação era feita de forma prática e rápida, com todos os colaboradores da empresa, o que se tornou uma mais-valia para realização das tarefas.

3.2. Pontos Fracos (Weaknesses)

3.2.1. Duração do Estágio Curricular

O estágio curricular em indústria farmacêutica apresenta uma duração estabelecida de 3 meses.

Tendo em conta a diversidade de tarefas realizadas no departamento onde estive alocada, considero este período insuficiente para conhecimento e perceção completa do trabalho realizado por todas as equipas que dele fazem parte.

3.2.2. Inexistência de Plano de Estágio

Sendo a primeira estagiária do Departamento de Garantia de Qualidade da FK –Labesfal, o plano de atividades que me foi apresentado inicialmente, assentava num plano não definitivo e flexível.

Com o decorrer do estágio, a inexistência de um plano organizado, associado à

insuficiente duração do mesmo, tornou-se um fator limitante no meu contacto com as diversas equipas do departamento.

Teria sido importante, a existência de um planeamento que permitisse rotatividade entre as várias equipas, de modo a conhecer os diferentes modos de ação e executar tarefas diferenciadas.

No entanto, denoto que o facto de ter permanecido durante um maior período alocada a uma equipa, permitiu-me adquirir uma maior autonomia e conhecimentos sobre a área.

3.3. Oportunidades (*Opportunities*)

3.3.1. Realização de Estágio em Indústria Farmacêutica

Os estágios em indústria farmacêutica são uma excelente oportunidade de contacto com esta área do setor farmacêutico. Não sendo um estágio curricular obrigatório, é uma forma de apresentar esta área de crucial importância, a estudantes de ciências farmacêuticas, no que diz respeito ao desenvolvimento, produção e garantia de qualidade do medicamento, assim como outros procedimentos inerentes.

Tendo-me sido dada a oportunidade de realização deste estágio, tanto pela FFUC, como pela FK – Labesfal, achei esta experiência, assim como todas as competências que adquiri ao longo deste estágio, de extrema importância no meu desenvolvimento académico, podendo vir a ser um benefício em oportunidades futuras de integração profissional no setor.

3.3.2. Variedade de Mercados

Sendo a Fresenius Kabi uma empresa com uma grande distribuição global, está integrada em diversos mercados por todo o mundo, o que se torna uma vantagem competitiva, num setor tão dinâmico e em constante evolução como a indústria farmacêutica.

Esta experiência proporcionou a possibilidade de contactar com profissionais de diversos países e familiarizar com diferentes modos de ação de diversas equipas internacionais.

Tive oportunidade de desenvolver a língua inglesa, principalmente no que diz respeito a termos técnicos, uma vez que a comunicação e elaboração de documentos eram realizados dessa forma.

3.4. Ameaças (*Threats*)

3.4.1. Número de Farmacêuticos na Indústria

O acesso ao mercado de trabalho no que diz respeito ao setor da indústria farmacêutica, tem se tornado cada vez mais competitivo. A entrada de profissionais, ano após ano, para o mercado farmacêutico, aliado a um setor não exclusivo a farmacêuticos, dificulta o acesso a esta área por parte de recém-formados.

3.4.2. Contrafação de Medicamentos

A contrafação de medicamentos é uma prática ilegal extremamente perigosa, sendo uma ameaça à saúde pública mundial. Os medicamentos contrafeitos podem impactar a saúde do utente final, sendo por falta de eficácia ou de segurança, visto que não há qualquer evidência de controlo de qualidade sobre estes produtos.

Esta também prejudica a indústria farmacêutica legítima, podendo causar perda de receita e lucros, ao mesmo tempo que poderá impactar a confiança do público sobre os produtos farmacêuticos.

Tendo em conta a vasta variedade de produtos e o alargado leque de mercados em que a Fresenius Kabi se encontra posicionada, esta poderá ser vista como um alvo para contrafação, pondo em causa a imagem da empresa, a confiança do cliente para com os produtos, ou ainda, caso não seja detetado prontamente, pôr em risco a saúde do utente final.

De forma a minimizar este risco, a FK possui políticas e procedimentos definidos, como por exemplo a serialização dos seus produtos.

4. Considerações Finais

Como reflexão final sobre o meu estágio curricular no Departamento de Garantia de Qualidade da Fresenius Kabi - Labesfal, considero esta experiência com um balanço positivo, tendo sido extremamente enriquecedora e superado as minhas expectativas iniciais.

A equipa mostrou-se sempre disponível para apoiar e esclarecer todas as minhas dúvidas, proporcionando uma experiência completa e interativa. Durante os 3 meses, tive oportunidade de aplicar conhecimentos adquiridos durante a minha formação no MICEF em ambiente real de trabalho, assim como de adquirir novos conhecimentos, tanto teóricos como práticos. Esta experiência possibilitou um melhor conhecimento sobre o funcionamento e complexidade da indústria farmacêutica, assim como o papel vital do farmacêutico no que diz respeito à garantia de qualidade dos produtos. Além disso, destacou a relevância de determinados valores como o trabalho de equipa e as relações interpessoais para o sucesso de uma empresa como a

Fresenius Kabi.

Ao concluir mais uma etapa na minha formação acadêmica, acredito que esta experiência assumirá um papel crucial para o meu futuro perfil profissional, sendo uma área que sempre me despertou interesse, assim como contribuirá para o meu desenvolvimento no que toca a novas competências e capacidades.

5. Referências Bibliográficas

1. Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos. - Ordem dos Farmacêuticos, (2020).
2. Indústria Farmacêutica. [Consultado a 11 de agosto 2023]. Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/industria-farmaceutica/>
3. FACULDADE DE FARMÁCIA - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas - Estágio Curricular. [Consultado a 11 de agosto 2023] Disponível em: <https://apps.uc.pt/courses/pt/course/1172>
4. A empresa - Fresenius Kabi Portugal. [Consultado a 14 de agosto 2023]. Disponível em: <https://www.fresenius-kabi.com/pt/a-empresa>.
5. As Nossas Áreas de Negócio - Fresenius Kabi Portugal. [Consultado a 14 de agosto 2023]. Disponível em: <https://www.fresenius-kabi.com/pt/a-empresa/as-nossas-areas-de-negocio> l.
6. História - Fresenius Kabi Portugal. [Consultado a 14 de agosto 2023]. Disponível em: <https://www.fresenius-kabi.com/pt/a-empresa/historia>.
7. Um olhar sobre a Fresenius Kabi - Fresenius Kabi Portugal. [Consultado a 14 de agosto 2023]. Disponível em: <https://www.fresenius-kabi.com/pt/a-empresa/um-olhar-sobre-a-fresenius-kabi>.

PARTE II

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia Santa Isabel, Coimbra

Sob orientação da Dra. Ana Rita Rodrigues

I. Introdução

Farmacêutico é o profissional de saúde com competências para executar todas as tarefas que respeitam ao medicamento de modo a contribuir para a salvaguarda da saúde pública, bem como em todas as ações de educação dirigidas à comunidade no âmbito da promoção da saúde e prevenção da doença. Este apresenta um elevado grau de responsabilidade¹.

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) apresenta-se como um curso abrangente e multidisciplinar, capaz de preparar profissionais aptos e com competências para executar qualquer profissão no setor farmacêutico². O estágio curricular em farmácia comunitária apresenta-se como fase final na formação dos estudantes possibilitando o contato com o atendimento e aconselhamento farmacêutico.

O meu estágio curricular foi realizado na Farmácia Santa Isabel em Coimbra, sob a orientação da doutora Ana Rita Rodrigues, sob supervisão da diretora técnica Ana Sofia Baptista, com início a 3 de abril e final a 4 de agosto de 2023.

O presente relatório tem a finalidade de descrever, sob a forma de uma análise SWOT, a minha experiência como estagiária na Farmácia Santa Isabel, apresentando de forma crítica os pontos fortes (*Strengths*), os pontos fracos (*Weaknesses*), as oportunidades (*Opportunities*) e as ameaças (*Threats*) do estágio realizado.

2. Farmácia Santa Isabel

Situada na Avenida Sá da Bandeira, em Coimbra, a Farmácia Santa Isabel foi fundada em 1956, sob a direção técnica da Dra. Ana Margarida Pereira. Em 2012, a Dra. Ana Sofia Batista passa a assumir a diretoria técnica após trespasse da farmácia.

Com um alargado horário de funcionamento, que se estende das 8h às 20h em dias úteis, 8h às 13h aos sábados e ainda dias de serviço 24h rotativos; a Farmácia Santa Isabel oferece uma ampla variedade de serviços aos seus utentes, entre os quais preparação de medicamentos manipulados, preparação individual de medicação (PIM), determinação de pressão arterial e outros parâmetros bioquímicos (como glicémia, colesterol total e triglicéridos) e ainda, administração de injetáveis.

Oferece também de forma pontual, aconselhamento em podologia e nutrição clínica, dias de aconselhamento dermocosmético e rastreios vasculares.

Além disso, é reconhecida pela extensa e abrangente área veterinária, assim como o seu aconselhamento, o que leva a uma grande procura para esse fim.

A Farmácia Santa Isabel proporciona aos seus utentes atendimento não presencial, telefónico ou via e-mail, assim como entrega ao domicílio; serviço este fundamental para um grupo particular de utentes, mais idosos ou com problemas de mobilidade.

A farmácia encontra-se integrada no projeto de recolha de embalagens e medicamentos fora de uso, VALORMED®, atuando face à consciencialização dos seus utentes para a especificidade do medicamento enquanto resíduo³.

Associada ao projeto de 2018, PhArmaCIENTE®, projetado pelo CHUC - Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, a Farmácia Santa Isabel identifica-se como uma “Farmácia de Proximidade”, oferecendo aos seus utentes o serviço de dispensa de medicamentos hospitalares⁴. A julho do presente ano, deu-se a aprovação, pelo Governo, do diploma que regula a dispensa deste tipo de produtos, podendo levar ao alargamento por todo o país do serviço de dispensa em proximidade⁵.

3. Análise SWOT

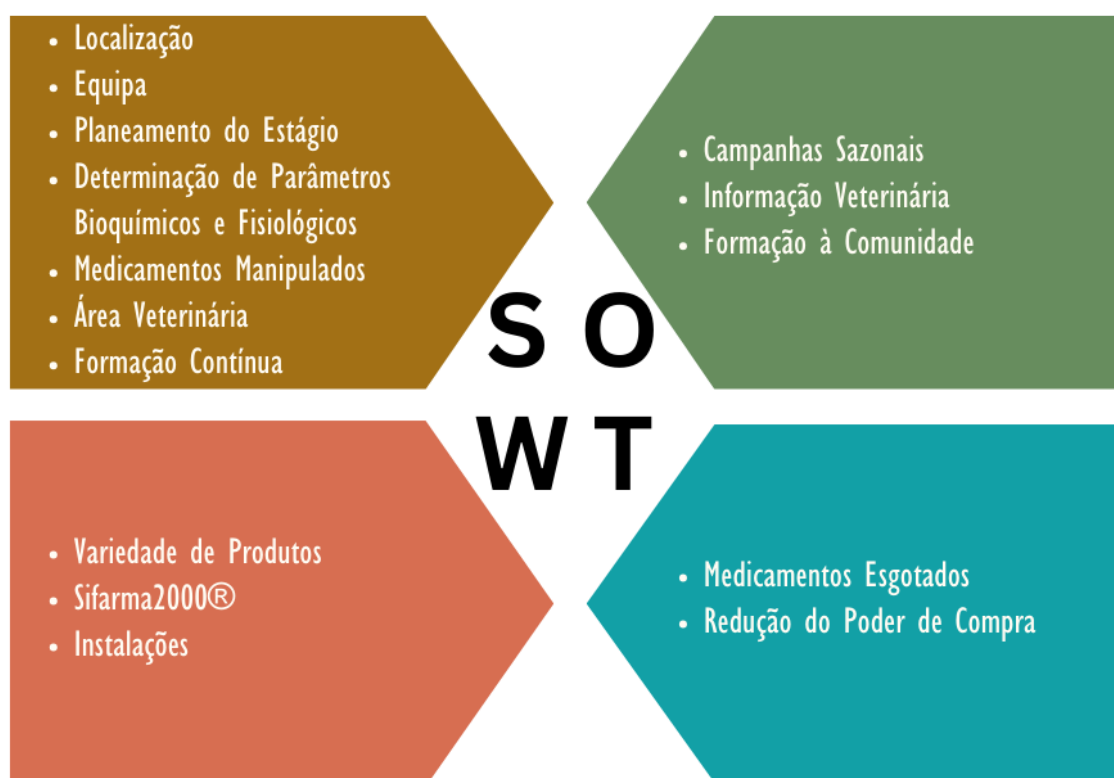


Figura 1 | Esquema resumo da análise SOWT. Criada em Canva

3.1. Pontos Fortes (Strengths)

3.1.1. Localização

Localizada na avenida Sá da Bandeira, no concelho de Coimbra, a Farmácia Santa Isabel, encontra-se situada na proximidade de determinados pontos históricos da cidade, entre os quais o Mercado Municipal D. Pedro V, a Praça da República, a baixa da cidade e o Pólo I da Universidade.

Por conseguinte, a farmácia é procurada por uma população vastamente diversificada e heterogénea. A diversidade de utentes permite o alargar de conhecimentos, o desenvolvimento das capacidades de aconselhamento e autonomia, uma vez que cada grupo de utentes apresenta necessidades específicas.

Durante o meu estágio, houve oportunidade de contactar com população mais idosa, requerente de uma atenção mais cuidada e um atendimento mais calmo e atento; assim como com população mais nova, com necessidade de soluções mais práticas e de um atendimento mais conciso.

Devido à localização na zona histórica da cidade, a farmácia é também muito procurada por turistas, o que me permitiu a realização de atendimentos em língua inglesa, sendo uma mais-valia para o desenvolvimento da comunicação no que diz respeito a termos técnicos.

3.1.2. Equipa

As farmácias desempenham um papel crucial na sociedade, na medida em que se apresentam como primeira linha no aconselhamento e promoção da saúde. Deste modo, é essencial que as farmácias disponham de equipas de profissionais com competências e capacidades, tanto de avaliação das situações com que são confrontados, mas também de aconselhamento e comunicação.

Desta forma, a equipa da Farmácia Santa Isabel apresenta-se como uma equipa competente, capaz de prestar serviços de qualidade e aconselhar os seus utentes de forma clara e adaptada a cada um. Demonstrando disponibilidade e amabilidade, estabelecem uma relação de confiança com os seus utentes, o que constitui um dos principais fatores de diferenciação.

3.1.3. Planeamento de Estágio

De forma a atingir as metas e objetivos do estágio curricular, é essencial um planeamento

cuidado, permitindo uma fácil adaptação e criando autonomia na realização de todas as atividades realizados diariamente na farmácia. Deste modo, durante o meu estágio fui apresentada às mais variadas atividades de uma forma gradual.

No primeiro mês de estágio, as minhas responsabilidades assentaram na receção de encomendas, organização e armazenamento dos produtos. Na Farmácia Santa Isabel, a estas tarefas incluem-se o controlo dos stocks, das validades e dos preços de todos os produtos. Com a realização destas tarefas, tive oportunidade de perceber a organização do *backoffice* da farmácia, que permitiu a familiarização com os vários produtos, maior facilidade na associação do nome comercial e o princípio ativo e a identificação da embalagem. Além disso, a percepção sobre a localização dos diversos produtos, permitiu a longo prazo uma maior autonomia e fluidez no atendimento. Permitiu também desenvolver as minhas capacidades sobre a utilização do sistema informático, Sifarma2000[®], visto que se trata da ferramenta essencial nas diversas atividades diárias.

Após ter adquirido total autonomia em *backoffice*, fui gradualmente apresentada ao serviço de atendimento. Inicialmente observando os atendimentos dos profissionais da equipa, passando depois a realizar os atendimentos supervisionada e acompanhada pelos mesmos, até adquirir autonomia no atendimento. Nesta fase, tive oportunidade de consolidar conhecimentos adquiridos ao longo do MICEF; assim como conhecer o funcionamento do sistema Sifarma2000[®] em âmbito de atendimento, gestão de utentes, entre outras funções.

3.1.4. Determinação de Parâmetros Bioquímicos e Fisiológicos

A Farmácia Santa Isabel dispõe também de serviços de monitorização à saúde, o que inclui determinação da pressão arterial, glicémia, colesterol total e triglicéridos. Este tipo de serviços proporciona aos utentes uma conveniência acessível e eficaz, permitindo a monitorização regular da saúde.

Durante o meu estágio, foi-me possível efetuar este tipo de determinações rotineiramente, permitindo-me acompanhar e aconselhar alguns utentes, aplicando os meus conhecimentos teóricos e práticos.

3.1.5. Medicamentos Manipulados

Um dos vários serviços que a Farmácia Santa Isabel oferece aos seus utentes é a preparação de medicamentos manipulados. A farmácia possui um laboratório onde é possível

preparar xaropes, cremes e pomadas.

Durante o estágio tive oportunidade de preparar alguns desses manipulados, como por exemplo uma pomada de vaselina salicilada a 6%, indicada para uma situação de psoríase. Paralelamente, efetuei a elaboração da ficha de produção, que pretende assegurar o cumprimento de todas as etapas do processo de preparação e garantir a qualidade do produto manipulado; e a folha de cálculo do preço do medicamento manipulado, onde são discriminados os parâmetros e fatores a ser considerados para a sua determinação.

3.1.6. Área Veterinária

Além da dispensa de produtos de saúde destinados a uso humano, a Farmácia Santa Isabel é reconhecida pela dispensa e aconselhamento de produtos para uso veterinário. Por este motivo, muitos utentes procuram a farmácia para esse fim.

Este reconhecimento é devido não só ao alargado stock e à existência de fornecedores de confiança que asseguram a rápida entrega de produtos sempre que necessário, mas também à existência de uma equipa de profissionais qualificados, detentores de vastos conhecimentos baseados em informações técnico-científicas e na experiência.

Ao longo do estágio, tive oportunidade de desenvolver e adquirir novos conhecimentos sobre o uso e aconselhamento de uma extensa variedade de produtos veterinários.

3.1.7. Formação Contínua

De forma a assegurar prestação completa de serviços e aconselhamento de qualidade, a Farmácia Santa Isabel aposta na formação contínua dos seus colaboradores, garantindo o acompanhamento das novas tendências neste setor em constante evolução.

Desta forma, durante o meu estágio tive oportunidade de participar em inúmeras formações, presenciais ou *online*, abrangendo os mais variados temas e direcionados tanto para aconselhamento farmacêutico como veterinário. Estas permitiram o desenvolvimento das minhas competências, assim como aquisição de novos conhecimentos pouco desenvolvidos no plano de estudos do MICEF, possibilitando uma maior confiança e mais rápida autonomia no aconselhamento no decorrer dos atendimentos.

Alguns dos temas que tive oportunidade de explorar foram contraceção de emergência, zona, infeções fúngicas vaginais, hemorróidas, suplementação alimentar, desparasitação interna e

externa de animais de companhia, entre outros.

3.2. Pontos Fracos (Weaknesses)

3.2.1. Variedade de produtos

Tendo em conta o público diversificado que procura a Farmácia Santa Isabel, torna-se de extrema importância disponibilizar variedade de produtos, de forma conseguir satisfazer as necessidades de quem a procura.

No entanto, a Farmácia Santa Isabel apresenta alguma carência no que toca a produtos específicos, como por exemplo produtos de puericultura, dermocosmética ou suplementação. Desta forma, torna-se por vezes impossível a imediata dispensa de produtos, sendo um inconveniente para o utente.

3.2.2. Sifarma2000®

O sistema Sifarma®, da Glintt®, é uma ferramenta informática utilizada nas mais variadas atividades diárias em farmácia comunitária, auxiliando o seu normal funcionamento. Permite atuar sobre a gestão de stocks, receção e transmissão de encomendas, controlo de prazos de validade, atualização de preços, obtenção de informação técnica e científica sobre os medicamentos, atendimento com ou sem receita médica, gestão administrativa, entre outros. A sua utilização garante uma maior segurança e cuidado na prestação dos serviços e na dispensa de medicamentos. Atualmente, o sistema apresenta duas versões disponíveis, o Sifarm2000® e o novo módulo de atendimento, tratando-se a última da versão mais recente.

Na Farmácia Santa Isabel, a versão mais utilizada é o Sifarma2000®. Tratando-se este da versão mais antiga, não apresenta um funcionamento tão interativo como a versão mais recente, assim como limita o processamento de algumas atividades. Consequentemente, durante o meu estágio, não tive grande oportunidade de utilizar e criar autonomia sobre o novo módulo de atendimento.

3.2.3. Instalações

Situada na zona turística da cidade, a Farmácia Santa Isabel é estabelecida num edifício histórico. Dividida entre dois andares, apresenta no piso térreo, a zona de atendimento ao público e *backoffice*; e no segundo piso, por acesso a escadas, o laboratório e gabinete de apoio ao utente.

Esta organização torna-se uma desvantagem, visto que alguns utentes, especialmente os mais idosos e com problemas de mobilidade, apresentam dificuldade no acesso ao gabinete, por vezes impossibilitando o aconselhamento.

Do mesmo modo, tanto a fachada exterior como o interior, mostram-se pouco convidativas ou até passam despercebidas aos cidadãos.

3.3. Oportunidades (*Opportunities*)

3.3.1. Campanhas sazonais

As campanhas sazonais apresentam-se como oportunidades de atrair novos clientes e de incentivar a compra de certos produtos. Relacionadas com a altura do ano ou fazendo proveito de datas festivas, estas campanhas constituem excelentes oportunidades de melhorar a rotatividade de alguns produtos.

Na Farmácia Santa Isabel, estas campanhas são bastante comuns e a promoção dos produtos é feita através de montras ou das redes sociais.

Além disso, incentiva a procura por parte de novos clientes, que a logo prazo, poderão se fidelizar à farmácia.

3.3.2. Informação Veterinária

Associado ao Espaço Animal existente na Farmácia Santa Isabel, esta possui um serviço especializado no que diz respeito a veterinária. Tratando-se de uma farmácia tão procurada para esse fim, o serviço de aconselhamento 24h por médicos veterinários torna-se uma mais-valia em casos mais complexos.

Desta forma, é possível um atendimento mais completo, procurando a satisfação do cliente e podendo levar à fidelização do mesmo.

3.3.3. Formação à Comunidade

Sendo a farmácia um local de promoção à saúde, é essencial a transmissão de informação e educação da comunidade.

A Farmácia Santa Isabel aposta ativamente em ações educacionais à população, sendo através do aconselhamento farmacêutico, formações ou interação com o público através das redes sociais.

No decorrer do meu estágio, além do aconselhamento farmacêutico, tive oportunidade de realizar uma formação, direcionada a alunos de uma escola primária, sobre o tema “Piolhos”. Nesta formação foram abordados os principais sintomas, prevenção e tratamentos.

3.4. Ameaças (*Threats*)

3.4.1. Medicamentos Esgotados

Os utentes que se deslocam a uma qualquer farmácia esperam um serviço completo e de qualidade, assim como a dispensa de todos e quaisquer produtos que procuram ou necessitam.

No entanto, atualmente, as farmácias deparam-se diariamente com uma enorme quantidade de medicamentos esgotados, impossibilitando a dispensa dos mesmos. Desta forma, não só é posta em causa a saúde dos utentes, como os serviços farmacêuticos.

Durante o meu estágio curricular, deparei-me diariamente com esta problemática, o que não só dificultou o ritmo de atendimento, como também prejudicou a relação farmacêutico – utente, visto que alguns utentes se mostravam recetivos na troca dos medicamentos habituais por outros equivalentes.

3.4.2. Redução do Poder de Compra

Consequentemente ao aumento do custo de vida sentido neste período de 2023, foi notório o impacto sobre o poder de compra da comunidade, afetando todas as atividades comerciais, incluindo as farmácias.

Desta forma, a substituição de medicamentos de marca por genéricos de preço inferior ou maior contenção na compra de produtos não essenciais como suplementação ou cosmética, são práticas comuns no contexto diário das farmácias, podendo impactar o seu volume global de faturação.

Em último caso, a redução do poder de compra poderá limitar o acesso dos utentes a medicamentos essenciais, podendo em risco a saúde dos mesmos. Neste contexto é importante as farmácias disporem de produtos diversificados e adaptados, tanto às necessidades dos utentes como aos seus orçamentos.

4. Considerações Finais

Sendo a farmácia comunitária a primeira linha de aconselhamento e promoção à saúde da comunidade, o farmacêutico apresenta um elevado grau de responsabilidade, na medida que é

essencial ser detentor de conhecimentos e capacidades necessárias para prestar serviços de qualidades, assim como acompanhar a evolução de um setor tão dinâmico como o setor farmacêutico.

O estágio curricular foi então uma oportunidade de colocar em prática os conhecimentos teóricos e práticos adquiridos ao longo do MICEF. Esta oportunidade permitiu contactar com uma extensa variedade de situações clínicas, fortalecendo a minha capacidade de adaptação perante as situações com que fui deparada. Do mesmo modo, evidenciou a necessidade de uma formação contínua de forma a garantir o melhor aconselhamento e serviços ao utente.

Ao longo destes meses, evoluí não só a nível profissional, na medida em que consegui tornar-me autónoma em território inicialmente desconhecido; como também a nível pessoal, fruto da convivência com uma equipa que além de dinâmica e altamente qualificada, coloca a satisfação do utente em primeiro lugar, transmitindo confiança e amabilidade.

Com o final do estágio curricular, demonstro a minha satisfação, tendo sido uma experiência extremamente enriquecedora e que marcará o meu futuro percurso profissional.

5. Referências Bibliográficas

1. Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos. - Ordem dos Farmacêuticos, (2020).
2. FACULDADE DE FARMÁCIA - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas - Estágio Curricular. [Consultado a 11 de agosto 2023] Disponível em: <https://apps.uc.pt/courses/pt/course/1172>
3. Valormed, LDA. [Consultado a 26 de agosto 2023]. Disponível em: <https://www.ambienteportugal.pt/company/valormed-lda>.
4. Projetos Co-Financiados pela UE - Farmaciente [Consultado a 26 de agosto 2023]. Disponível em: <https://www.chuc.min-saude.pt/paginas/centro-hospitalar/projetos-co-financiados-pela-ue/sama2020-operacao-nordm-000131nbsp-pharmaciente.php>
5. Governo aprovou diploma que regula dispensa de medicamentos hospitalares em proximidade [Consultado a 26 de agosto 2023]. Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/noticias/governo-aprovou-diploma-que-regula-dispensa-de-medicamentos-hospitalares-em-proximidade/>

Anexos

Caso Prático nº1:

Um senhor dirige-se à farmácia indicando que o seu cão apresentava falta de apetite e lhe parecia com pouco energia havia já uns dias. Uma das primeiras perguntas que lhe coloquei foi se o animal estava desparasitado, interna e externamente, pelo que o senhor respondeu que o teria desparasitado havia já um ano, em uma visita ao veterinário. Perguntei, de seguida, qual seria a idade e o peso do animal, visto que estes parâmetros são bastante importantes para o aconselhamento de um tratamento adequado. Tendo o senhor respondido que se tratava de um cão de 4 anos, com cerca de 10 kg.

Desta forma, informei o utente que a causa mais provável poderia assentar numa infeção por parasitas internos, tendo em conta os sintomas descritos, pelo que se deveria deslocar a um veterinário para uma avaliação profissional. Tendo em conta que as desparasitações internas deverão ser realizadas trimestralmente, o animal estaria desprotegido havia já um período considerável.

Aconselhei também a desparasitação externa, apresentando-lhe um produto sob a forma de comprimidos, o Frontpro[®], e indicando que deveria ser administrado 1 comprimido de quatro em quatro semanas. O senhor mostrou-se preocupado, visto que o animal era resistente à toma de comprimidos, pelo que indiquei que estes se aparentavam com um biscoito saboroso, o que tornaria mais fácil a administração.

Por fim, recomendei um complexo multivitamínico Patta[®] em forma de pasta, de forma a responder às necessidades nutricionais do animal, que tinham sido comprometidas.

Caso Prático nº2:

Uma utente, com cerca de 30 anos, dirige-se à farmácia com queixa de câibras musculares recorrentes. Descreve que estas não aparentam ser em resposta a nenhum esforço físico específico, mas que normalmente ocorrem de manhã ao acordar, afetando a zona da perna e pé.

Tendo em conta os sintomas descritos, indico à utente que estas poderão estar associadas à tensão criada sobre os músculos da perna durante o sono, assim como à desidratação prolongada ao longo da noite. Informo de igual forma, que estas poderão também estar relacionados a baixas concentrações de eletrólitos no sangue, pelo que lhe recomendo o

suplemento Magnesium-K Active[®], sob a forma de comprimidos efervescentes, uma vez que apresenta na sua composição uma associação de magnésio e potássio que contribuem para o normal funcionamento muscular. Por fim, aponto que deverá tomar 1 comprimido por dia após uma das refeições, e aconselho o prolongamento da terapêutica pelo período mínimo de três meses, para resultados mais efetivos.

Caso Prático nº3:

Uma senhora dirige-se à farmácia acompanhada pelo filho de 7 anos, indicando que o menino teria apanhado piolhos na escola, pelo que pediu um tratamento adequado.

Dito isto, aconselhei um champô de tratamento completo (Hedrin[®]). Indiquei, de seguida, o modo de utilização, que se iniciava por aplicação do champô no cabelo seco desde a raiz até às pontas, deixando atuar durante 5 minutos. Após esse intervalo, deviria molhar o cabelo até fazer espuma, seguindo-se o enxaguamento, evitando o contato do produto com os olhos. Numa segunda fase, pentear o cabelo por secções com o pente apropriado, de modo a remover os piolhos e as lêndeas. O movimento do pente deveria ser feito da raiz do cabelo até às pontas, fazendo-o passar pela base dos dentes do pente.

Por fim, recomendei a repetição do tratamento após 7 e 14 dias, assim como a inclusão do mesmo a toda a família, de modo a garantir a eliminação completa de todos os piolhos.

Caso Prático nº4:

Uma jovem, com cerca de 20 anos, dirige-se à farmácia e solicita a pílula de dia seguinte.

Comecei por perguntar se a relação teria ocorrido num período inferior a 72 horas, obtendo uma resposta positiva. De seguida, questionei, se fazia algum método contraceptivo regular, pelo que a jovem respondeu que tomava a pílula Minigeste[®]. Completou ainda, com preocupação, que teria tomado a pílula como faz normalmente, mas que na mesma noite teria vomitado, e tendo tido relações sexuais desprotegidas nesse mesmo período, teria receio de uma falha de eficácia.

Tendo em conta a informação que me foi dada, questionei se o vómito teria ocorrido num período inferior ou superior a quatro horas após a toma da pílula, de modo a avaliar se poderia ou não ter ocorrido comprometimento na absorção. A esta questão, a jovem indicou que teria sido num período inferior a quatro horas.

Deste modo, esclareci que tendo ocorrido num período inferior poderia ter comprometido a absorção, no entanto caso ainda não tivessem passado doze horas desde a hora da toma anterior, poderia repetir a toma de uma pílula equivalente ao mesmo dia, de um outro blister. No entanto a jovem, indicou que já teriam passado mais de doze horas.

Desta forma, e por exclusão de outras alternativas, aconselhei a toma de contraceção oral de emergência. Recomendei então uma pílula de levonorgestrel, Postinor® Odis, que assumindo a forma de um comprimido orodispersível, apresenta a vantagem de uma absorção mais rápida.

Durante atendimentos deste tipo, é importante mostrar compreensão e amabilidade com as utentes (ou com os companheiros) que se deslocam à farmácia, visto que se trata de um assunto que poderá causar algum constrangimento. É também importante mostrar disponibilidade para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir.

Caso Prático nº5:

Um utente, com cerca de 40 anos, dirige-se à farmácia com queixas de dificuldade em adormecer e despertares noturnos. Descreve que a situação já se prolonga há algumas semanas e tem impacto na sua vida diária.

Desta forma, início o meu aconselhamento promovendo medidas não farmacológicas como por exemplo, o recurso a chás calmantes como camomila, a prática de exercício físico diariamente ou evitar exposição ou uso de ecrãs antes de deitar.

Recomendo ainda, como medida farmacológica, a toma de um suplemento há base de melatonina, visto que ajuda a adormecer e auxilia na manutenção do ciclo de sono. Aconselho a toma de 1 cápsula de Valdispert® Noite Total, 30 minutos antes de deitar, pois além de melatonina, possui na sua constituição óleo essencial de lavanda, que promove o relaxamento, e papoila da califórnia, que atua na diminuição dos despertares noturnos.

PARTE III

Monografia intitulada

“Proteolysis-Targeting Chimeras (PROTACs): A precision medicine strategy for cancer treatment”

Sob orientação do Professor Doutor Alcino Jorge Leitão

Abstract

In the field of cancer research and therapeutic development, a groundbreaking technology known as proteolysis-targeting chimeras, or PROTACs, has emerged as a promising strategy to combat the complex and diverse possibilities in cancer diseases. This innovative approach represents a paradigm shift, offering the potential to target previously undruggable proteins implicated in cancer and significantly improving treatment outcomes.

PROTACs are a class of small molecules designed to selectively degrade specific proteins within the cell, ultimately leading to their elimination. Unlike traditional inhibitors that merely block the activity of a target protein, PROTACs trigger the degradation of the target itself. This unique mechanism of action holds immense therapeutic potential, especially in the context of cancer. Their mechanism of action expands the target landscape and has provided researchers with new avenues to explore and develop more effective treatments for various cancer types.

This technology also enhanced precision and selectivity. One of the key advantages of PROTACs is their exquisite selectivity due to the capacity of degrading the target protein directly, minimizing off-target effects and reducing the potential for side effects often associated with traditional chemotherapies. This precision is a game-changer in cancer treatment, allowing for therapies that are not only more effective but also better tolerated by patients.

Moreover, this technology is capable of combating resistance. Cancer cells are notorious for developing resistance to treatments over time. PROTACs offer a fresh approach to combat resistance by targeting multiple proteins within interconnected signalling pathways simultaneously. This multifaceted attack on cancer cells can slow down or even reverse the development of resistance, improving the long-term efficacy of treatments.

Ultimately, we already have promising preclinical and clinical data. PROTAC-based drug candidates have shown remarkable promise in preclinical studies and early-phase clinical trials. Several PROTACs are currently in development for a variety of cancer indications, including prostate cancer, leukemia, and solid tumors. These early results indicate that PROTACs have the potential to become a vital part of the oncologist's toolkit. The development of PROTACs has fostered collaborations between researchers, pharmaceutical companies, and academic institutions. This interdisciplinary approach to drug discovery and development has accelerated the translation of PROTAC technology from the laboratory to the clinic, bringing new hope to cancer patients.

Keywords: PROTAC, cancer, ubiquitin, ubiquitinases, proteasome, degradation, precision, selectivity.

Resumo

No campo da investigação e desenvolvimento terapêutico sobre o cancro, uma tecnologia inovadora conhecida como *proteolysis targeting chimeras*, ou PROTACs, emergiu como uma estratégia promissora para combater complexas e diversas manifestações das doenças cancerígenas. Esta abordagem inovadora representa uma mudança de paradigma.

As PROTACs são uma classe de pequenas moléculas projetadas para degradar seletivamente proteínas específicas dentro da célula, levando à sua eliminação. Ao contrário dos inibidores tradicionais que apenas bloqueiam a atividade de uma proteína-alvo, as PROTACs desencadeiam a degradação do próprio alvo. Este mecanismo de ação único detém um enorme potencial terapêutico, especialmente no contexto do cancro. O seu mecanismo de ação expande o leque de alvos e proporciona à ciência novas vias para explorar tratamentos mais eficazes para vários tipos de cancro.

Esta tecnologia também aumentou a precisão e a seletividade. Uma das principais vantagens das PROTACs é a sua seletividade devida à capacidade de degradar diretamente a proteína-alvo, minimizando eventuais efeitos secundários frequentemente associados à quimioterapia tradicional. Esta precisão representa uma mudança revolucionária no tratamento do cancro, permitindo terapias não apenas mais eficazes, mas também mais bem toleradas pelos pacientes.

Para além disso, esta tecnologia é capaz de ultrapassar resistências. As células cancerígenas são conhecidas por desenvolver resistência aos tratamentos ao longo do tempo. As PROTACs oferecem uma abordagem inovadora para combater a resistência, direcionando múltiplas proteínas dentro de vias de sinalização interligadas simultaneamente. Esta abordagem multifacetada às células cancerígenas pode abrandar ou até reverter o desenvolvimento de resistências, melhorando a eficácia a longo prazo dos tratamentos.

Por fim, a importância de dados promissores em estudos pré-clínicos e ensaios clínicos já existem. Vários candidatos tratados com a tecnologia PROTAC mostraram resultados notáveis em estudos pré-clínicos e ensaios clínicos. Várias PROTACs estão atualmente em desenvolvimento para uma variedade de indicações cancerígenas, incluindo cancro da próstata, leucemia e tumores sólidos. Estes resultados iniciais indicam que as PROTACs têm potencial para se tornar uma tecnologia imprescindível no ramo da oncologista. O desenvolvimento das PROTACs tem fomentado colaborações entre investigadores, empresas farmacêuticas e

instituições académicas. Esta abordagem interdisciplinar à descoberta e desenvolvimento de medicamentos acelerou a transposição da tecnologia PROTAC do laboratório para a clínica, trazendo esperança a doentes com cancro.

Palavras-chave: PROTAC, cancro, ubiquitina, ubiquitinases, proteassoma, degradação, precisão, seletividade.

Abbreviations

AR - androgen receptor

BET - bromodomain and extra-terminal

BL - Burkitt's lymphoma

CRBN - cereblon

DUB – deubiquitinases

ER - estrogen receptor

HECT - homologous to e6-ap carboxyl terminus

IMiD - immunomodulatory imide drug

JAMMs - JAB1/MPN/MOV34 proteases

MINDYs - motif interacting with ub-containing dub family

MOA - mode of action

MJDs - Machado–Joseph disease domain superfamily

OTUs - otubain/ovarian-tumor-domain

PEG - polyethylene glycol

POI - protein of interest

PPI - protein-protein interactions

PROTAC - proteolysis-targeting chimeras

RBR - RING-between-RING

RING - really interesting new gene

UBDs - ubiquitin binding domains

Ub – ubiquitin

UCH - ub carboxyl-terminal hydrolases

UPS - ubiquitin-proteasome system

USP - ub-specific proteases

VHL – von Hippel-Lindau

ZUPI - zinc finger containing peptidase

I. Introduction

The balance between ubiquitination and deubiquitination is essential for preserving protein homeostasis. Dysregulation of the ubiquitin-proteasome system (UPS) has been linked to the progression of numerous diseases, including cancer, where it plays a critical role in tumorigenesis, tumor metabolism, and tumor survival¹. Given UPS involvement in several essential regulatory processes their components are regarded as highly promising targets in the development of cancer therapeutics².

Considering that cancer cells have high levels of protein turnover, its high dependence on UPS makes it an attractive target for inhibitory therapies. To date, the proteasome, E1, E2, E3 enzymes and deubiquitinases (DUBs) have all been targeted for inhibition by small-molecule inhibitors. The classical pharmacological model of small molecules binding to protein targets limits the druggable protein space and requires high drug concentrations for inhibition, leading to unwanted toxicities and off-target effects¹.

An increasingly promising approach revolves around the targeting of natural protein-protein interactions (PPIs) rather than traditional ligand-binding sites. This novel strategy significantly expands the range of druggable targets and opens the door to the selective degradation of specific proteins through the use of proteolysis-targeting chimeras (PROTACs), offering a potential advance for cancer treatment. Due to E3 ligase target selectivity, this new approach hijacks UPS machinery, by promoting ubiquitination of proteins of interest (POI) leading to its proteasomal degradation¹. PROTACs show advantages over small-molecule-based protein inhibition, including rapid and sustained depletion of target proteins, high selectivity, and the ability to overcome drug resistance. They can also use a variety of adaptable binding domains and are effective at low concentrations².

In this dissertation, through a review of the scientific literature, the main goal is to achieve a comprehensive understanding of the PROTACs approach. By doing so, it aspires to uncover the main advantages that this innovative methodology holds in the context of today's medical and scientific challenges. Furthermore, the aim of this review is to comprehend the future prospects of PROTACs and their potential in cancer therapies. Through research and analysis, this review aims to make a valuable contribution to the ongoing discourse on this approach and its effectiveness in addressing one of the most important diseases of our era.

2. Proteolysis and Ubiquitin-Proteasome System

Proteolysis is a biological process where a protein is either partially broken down into peptides or completely into individual amino acids (figure 1). This process is facilitated by proteolytic enzymes, which are found in bacteria, plants, and are most abundant in animals. Within cells, proteolytic degradation serves as an essential part of cellular maintenance, helping to remove old or damaged proteins.³

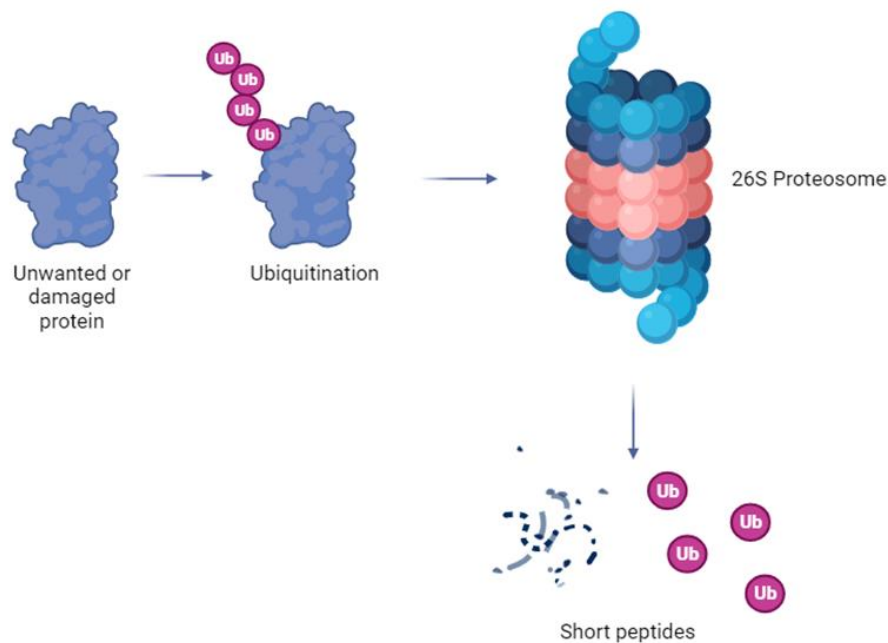


Figure 1 | Schematic representation of protein ubiquitination. Created in Biorender.com.

UPS stands as the primary intracellular mechanism responsible for disposing of damaged or unnecessary proteins. This process involves a 76-residue protein called ubiquitin (Ub), which attaches to target proteins through a lysine isopeptide bond as a post-translational modification (PTM). This attachment occurs through a sequence of three enzymes: an E1 activating enzyme, an E2 conjugating enzyme, and an E3 ligase^{4,5}.

As represented in figure 2, initially, free Ub undergoes activation by an E1 enzyme in an ATP-dependent process, leading to its conversion into a C-terminal thioester. Trans-thioesterification transfers Ub from the E1 enzyme to an E2 enzyme. Ultimately, an E3 complex facilitates the transfer of Ub, either directly or indirectly, onto a lysine residue or an N-terminal amino acid of the target protein⁶. This reversible conjugation can result in the binding of a single polypeptide (mono-ubiquitination) or a polymer of at least four (poly-ubiquitination).

Ub itself can undergo ubiquitination on one or more of its seven surface lysine residues. These PTMs serve numerous biological functions that are still under investigation. However, one well-established role of K48 polyubiquitin is to serve as a signal for protein degradation through the 26S proteasome⁴. Once a protein is tagged with poly-K48 ubiquitination and recognized by the proteasome, the Ub chains are cleaved by the 19S regulatory subunit of the 26S proteasome, followed by unfolding and degradation of the protein substrate by the 20S catalytic core of the protein complex^{1,4}.

Other less well-studied lysine linkages (K6, K11, K27, K29, K33 and K63) have shown crucial roles in other non-proteolytic functions, such as DNA damage response pathways (K6 and K63), cell cycle regulation (K11), innate immune response (K27), cell signalling in neurodegenerative diseases (K29) or protein trafficking (K33 and K63)¹.

The enzymes involved in protein ubiquitination are encoded in the human genome and increase in number as they progress from E1 (only 2 variants) to E3, with over 600 postulated E3 family members. E3 ligases play a crucial role in recruiting substrates and facilitating the transfer of Ub from an E2 conjugating enzyme to the target protein. Depending on their structural domains or mechanism of action, E3 ligases can be classified into three major families, termed homologous to E6-AP carboxyl terminus (HECT), really interesting new gene (RING), and RING-between-RING (RBR) families⁷.

With the opposite mode of action of E3 ligases, DUBs are a class of enzymes capable of trimming, editing and removing ubiquitin chains from the target proteins, preventing their degradation or altering cell signalling. Close to 100 DUB enzymes are encoded in the human genome and they can be classified in seven families, the Ub-specific proteases (USPs), Ub carboxyl-terminal hydrolases (UCHs), the otubain/ovarian-tumor-domain containing proteins (OTUs), the Machado–Joseph disease domain superfamily (MJDs), the JAB1/MPN/MOV34 proteases (JAMMs), the motif interacting with Ub-containing DUB family (MINDYs), and the zinc finger containing peptidase (ZUP1) family^{2,5}.

Ub-interacting proteins, which includes both E3 ligases and DUBs enzymes, contain, in the human genome, arrays of Ub binding domains (UBDs) that can confer linkage specificity to a Ub receptor.⁵

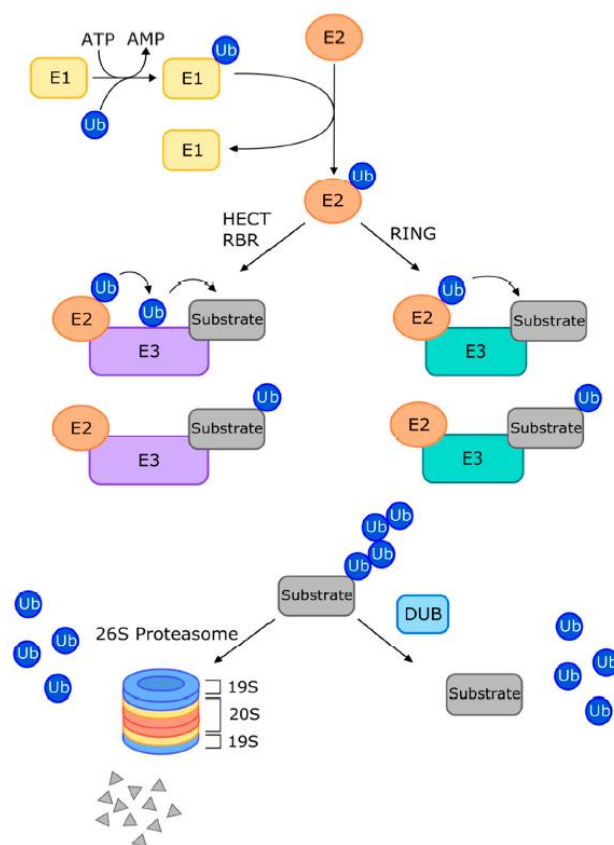


Figure 2| Schematic representation of protein ubiquitination mechanism. Adapted from [1].

3. Proteolysis targeting chimeras (PROTACs)

3.1. Structure and Mechanism

PROTACs have emerged as a promising modality that utilizes an event-driven mode of action (MOA), contrarily to the traditional occupancy-driven mechanisms, in which the protein function is modulated via temporary inhibition. In new approaches, the target protein levels are modulated by hijacking the UPS to induce degradation of the target².

This technology has shown successful results when used in cell lysates, cultured cells, and *in vivo*⁸.

A PROTAC is a heterobifunctional molecule that consists of a protein of interest (POI) ligand and an E3 Ub ligase (E3) recruiting ligand connected by a linker. (Figure 3) It initiates a degradation cascade by forming a ternary complex with a POI and an E3, which promotes the ubiquitination of the POI, and its consequent recognition and degradation by UPS (26S proteasome)(Figure 4) (Pettersson e Crews, 2019).

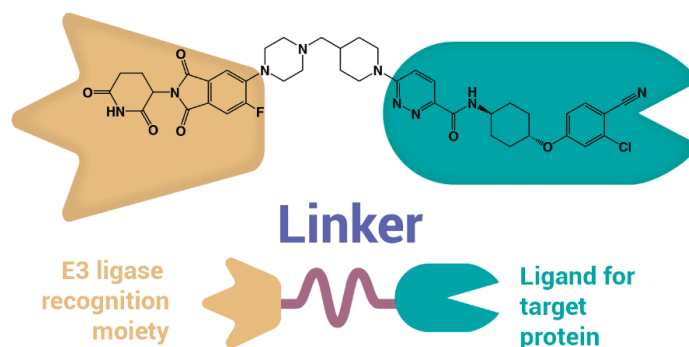


Figure 3| Schematic representation of PROTAC structure (ARV-110). Adapted from [9]

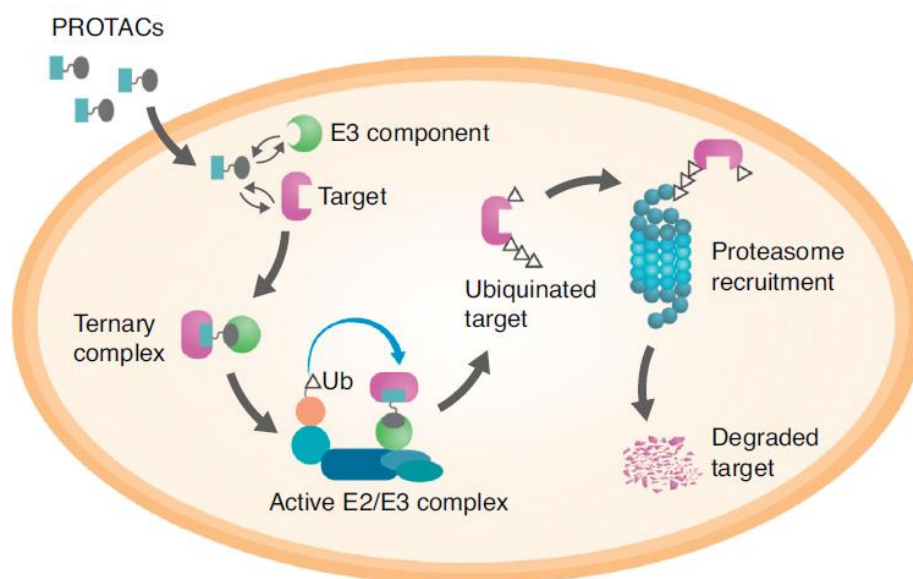


Figure 4| Schematic representation of PROTAC mechanism. Adapted from [10]

The success of this strategy depends on several factors, including the accessibility of lysine residues to the E3 ligase function in the ternary complex, the substrate's ability to undergo polyubiquitination and subsequent steps in the down-stream UPS, and the balance of E3 ligase activity against competing DUB enzymes. ¹¹

3.2. Design of PROTAs and ternary complex formation

Heterobifunctional inducers of degradation have been seen as an attractive technology

due to their capability of adaptable binding domains. This characteristic grant the strategic design of molecules to target different substrates to a given E3 ligase or to recruit different E3 ligases to the same protein target¹¹.

Heterobifunctional inducers of degradation are molecules that have two different binding sites, one for the target protein and one for an E3 ligase, which is responsible for tagging the target protein for degradation. The effectiveness of these molecules depends on the points of attachment of the linker to the E3 binding and target protein binding domains. If the linker is attached in the wrong place, it could interfere with the ability of the molecule to interact with either the target protein or the E3 ligase, reducing its effectiveness. Therefore, it is critical to ensure that each binding site remains capable of interacting with its primary binding site. This means that the linker must be attached in a way that does not disrupt the binding sites or prevent them from functioning properly. By carefully selecting the points of attachment, researchers can optimize the effectiveness of heterobifunctional inducers of degradation and increase their potential as a tool for drug discovery. The selection of linker attachment points can be made empirically, guided by suitable biochemical or biophysical affinity assays. Structural biology insights into the structure of the E3 ligase and target proteins greatly aid in the selection of linker attachment points. For the most widely used E3 ligases, such as von Hippel-Lindau (VHL) and cereblon (CRBN), known potent binding motifs are available with well-characterized attachment points and chemical routes for synthesis of the heterobifunctional molecules^{8,10,11}.

The choice of linker group itself is also crucial for the effectiveness of the degrader¹¹. The linker length of the PROTAC can affect the ternary complex conformation and the interaction between the POI and the E3 ligase enzyme². The linker must be long and flexible enough to allow binding of both protein components in a productive orientation for Ub transfer. Molecular modeling based on the separate structures of the E3 and target protein binding sites has been used to suggest minimal linker lengths for fruitful interactions. Optimum linker length was associated with relief of steric clashes between the proteins¹¹.

The formation of the ternary complex (POI – PROTAC – E3) is shown to be the determining phase of the mechanism. However, the binary affinity between the POI and the PROTAC is not sufficient, by itself, for effective degradation². The formation of the ternary complex may involve cooperative effects, due to the formation of a “sandwich structure” in which interactions of the linker with the proteins or direct PPIs contribute to the binding affinity¹¹. Positive cooperativity was shown to result in higher PROTAC potency and selectivity

for induced degradation. The formation of the ternary complex can be described by a mathematical model that predicts a bell-shaped dependency on PROTAC concentration. (Figure 5a) High PROTAC concentration can lead to an unproductive phenomenon referred to as the “hook effect”. An interaction with positive cooperativity ($\alpha > 1$) leads to the formation of a ternary complex with stable PPIs, in contrast with negative cooperativity ($\alpha < 1$) that annuls the formation of the ternary complex (Figure 5b). Positive cooperativity is also shown to minimize the extent of the “hook effect”². However, cooperativity can differ between different E3 ligases and POIs, making it difficult to determine general principles for this interaction². Both cooperative and uncooperative mechanisms are possible, depending on the E3 and target protein involved and the surface complementarity between them, as well as the length, rigidity, and functionality of the linker in the heterobifunctional molecule¹¹.

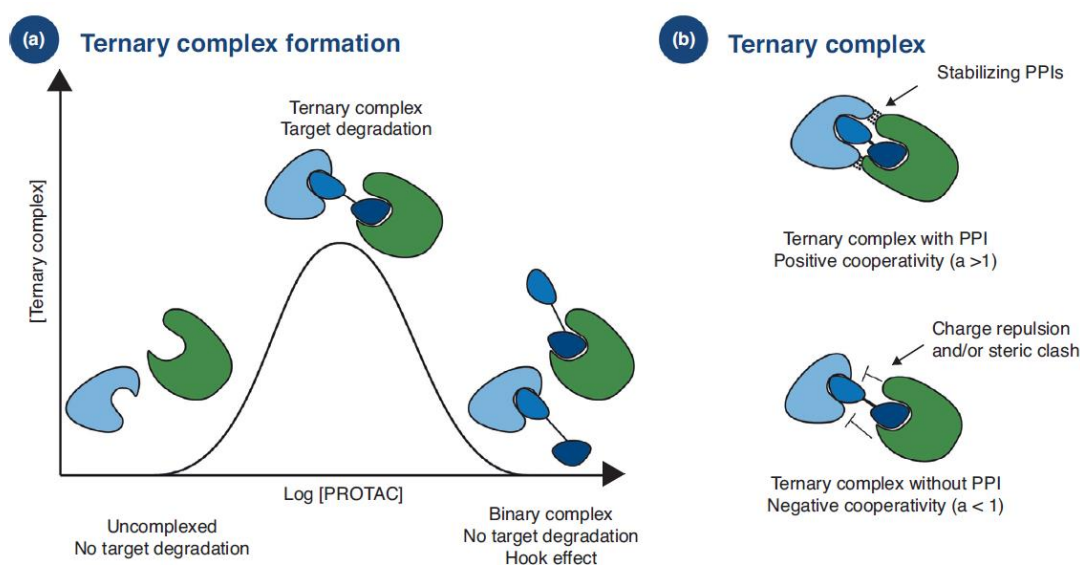


Figure 5 | a) Schematic representation of bell-shaped dependency on PROTAC concentration for the formation of productive ternary complex, “Hook Effect”; b) Schematic representation of influence of cooperativity in ternary complex PPIs. Adapted from [2]

Having all these determining factors in consideration, PROTAC design should aim to obtain a productive ternary complex for efficient degradation of the POI.² These molecules have a high molecular weight and a high polar surface area, which can make them difficult to optimize for *in vivo* and clinical use. One of the challenges in optimizing these molecules is to maintain their solubility and membrane permeability, which can be reduced during the initial linking of the two binding groups. However, the same rational approaches used to increase solubility and permeability in smaller molecules can be applied to heterobifunctional molecules, such as varying the linker lengths and functional group composition^{10,11}.

3.3. Advantages of PROTACs

PROTAC technology has revolutionized drug development with its remarkable degradation mechanism, surpassing established technologies in the field. This pioneering approach not only enhances target specificity but also holds vast potential across therapeutic applications, marking a significant leap in drug development⁴.

Unlike traditional inhibitors, PROTACs don't rely on target binding at the active site or specific PPIs. Instead, this technology directly induces target protein degradation, even without high-affinity binding. This precision arises from well-designed ligands for the POI and the use of E3 ligases specifically expressed in certain cells or tissues, creating a dual targeting mechanism that sets PROTACs apart.^{4,12}

Furthermore, PROTACs demonstrate efficacy at low doses, reducing the risk of toxicity associated with high-dose drugs. Their catalytic-like mechanism ensures target protein degradation without consumption, allowing for small doses. PROTACs act as catalysts for selective protein degradation, mimicking a catalytic mechanism similar to RNAi. They induce ubiquitination with minimal occupancy, as low as 10% of E3 ligase, efficiently leading to target degradation. This contrasts with traditional reversible inhibitors, where high occupancy is generally required for potency. This technology can function at sub-stoichiometric binding concentrations, allowing a single PROTAC to cycle through, degrading multiple copies of a target, leading to greater efficacy at lower doses compared to inhibitors. Even limited occupancy on the targeting ligand side is sufficient, either through low-affinity ligands or co-treatment with a competitive agonist. The unmodified E3 ligase complex can continue functioning alongside the hijacked enzyme, potentially causing less perturbation of endogenous substrate binding, and widening the therapeutic window.^{4,12}

Unlike gene editing, which operates as a digital on/off switch, PROTACs provide analog-like control over protein levels from 0% to 100%. This enables the modulation of overexpressed disease-related proteins while preserving normal levels in a healthy state. Conducting dose-response experiments allows sub-maximal degradation, potentially restoring overexpressed protein levels to normal. This quantitative control is not achievable with RNAi or gene editing, making PROTACs invaluable in fine-tuning protein expression levels, especially in drug discovery.^{4,12}

Additionally, PROTACs offer precise temporal control over protein degradation,

observable in as little as one hour. This temporal precision facilitates the study of acute protein loss, a challenge with other techniques. PROTACs can rapidly deplete a protein in a cellular population, enabling accurate examination of protein function in a native context. ^{4,12}

These features make PROTACs a promising approach for tackling challenging drug targets and advancing drug discovery efforts.

3.4. Disadvantages of PROTACs

It is important to recognize that PROTAC technology does come with limitations, such as off-target effects, which refer to unintended consequences of drugs or treatments on other proteins. Proteomics emerged as a crucial tool in this context, facilitating the quantification of proteins and the assessment of off-target effects induced by PROTACs⁴.

Even when the selectivity of the recruiting element within a PROTAC is well understood, proteomics can unveil surprising new substrates influenced by complex PPIs between the target protein and the E3 ligase. Notably, the binding of a ligand to an E3 ligase may disrupt the interaction with endogenous substrates, potentially leading to off-target effects. Given these considerations, it becomes imperative to ensure safety and efficacy before application as therapeutic or tool for biological discovery. ^{4,12}

Another phenomenon termed the "Hook Effect" presents itself when utilizing these heterobifunctional molecules. This phenomenon raises questions as it contradicts the expectation that higher concentrations of the molecule would yield more effective protein degradation. The Hook Effect arises from the formation of unproductive dimers at elevated concentrations of the molecule. These dimers disrupt the formation of the productive trimeric complexes essential for protein degradation. Yet, it is noteworthy that favorable PPIs between the E3 ligase and the target protein can extend the maximum usable concentration of the molecule before the Hook Effect manifests. Studies have demonstrated that the Hook Effect can be ameliorated through strategic optimization of the PROTAC molecule's design, involving adjustments to the linker length or modifications to the E3 ligase binding domain. ^{4,12}

Further on, factors such as high molecular weight, labile peptide bonds, and poor cell penetration can pose challenges. While PROTACs have exhibited effectiveness in degrading cytosolic and nuclear proteins, their applicability is not universal across all protein classes or subcellular compartments. For instance, while there have been documented instances of

successful receptor tyrosine kinase degradation using PROTACs, no examples exist for the degradation of more complex, multi-pass transmembrane proteins.^{4,12}

While PROTACs offer great promise in modulating protein concentrations, it is essential to acknowledge and address their limitations through ongoing research due to the necessity of development of tailored ligands.

4. PROTAC technology in cancer treatment

4.1. BRD4 targeting therapies

Protein-targeting therapies are considered as the next generation of cancer treatment, opening a promising phase of new possibilities. The inefficiency of current treatment methods highlights the urgency to explore alternative approaches, such as bromodomain and extra-terminal (BET) protein targeting, to develop novel therapeutic agents for cancer^{8,13}.

BET family proteins, particularly BRD4, have emerged as valuable targets in developing potential cancer therapies. BRD4, as well as BRD2 and BRD3, are epigenetic readers, which are able to recognize and bind to specific chemical modifications on histone proteins, associated with gene activation. BET proteins can have multiple effects on cancer cells, including promoting cell growth, preventing cell death, and enhancing the ability of cancer cells to invade and metastasize^{13,14}.

BRD4 activity can be reduced by BRD4 inhibitors, as well as degraders. Inhibitors work by binding to BRD4 and preventing it from interacting with other proteins, while degraders work by inducing the degradation of BRD4¹³.

Recent studies have observed significant adverse effects of BET inhibition. The adverse effects include reversible cytostatic activity, which means that inhibition approach can stop the growth of cancer cells but do not eliminate them. Another adverse effect of BET inhibition is increased compensatory BET protein feedback, which means that the inhibition can lead to an increase in the production of BET proteins, which can counteract the effects of the inhibition and limit its efficacy. These factors can lead to accumulation of BRD4 protein in tumors when treated with BRD4 inhibitors. This accumulation of protein has been linked to drug resistance, becoming less responsive to the inhibitors. All these factors contribute to the limited efficacy of BRD4 inhibitors in cancer treatment¹³.

In comparison, BRD4 degraders are chimeric molecules that can induce BRD4 complete

degradation from the cell, based on PROTAC technology. This strategy can be a more effective way to treat cancer, as it eliminates the source of the protein rather than just blocking its activity.

As this technology allows for specific design, many therapeutic small molecules based on PROTACs have been developed, being the CRBN E3 ligase the most well-studied.^{11,13,15} The use of CRBN E3 ligase in PROTAC-based therapies has been shown to be effective in preclinical studies for a variety of diseases, including cancer.

4.2. CRBN-dependent PROTACs

In 2010, thalidomide, an immunomodulatory imide drug (IMiD) previously known for its teratogenic effects, was discovered to be a ligand for the CRBN E3 ligase, which opened up new possibilities for developing PROTACs that could target a wider range of proteins^{1,16-18}. IMiDs, including thalidomide, lenalidomide and pomalidomide, have improved the treatment of specific cancers and have potent anticancer and anti-inflammatory actions. These drugs are known as "molecular glues" that are able to bring the CRBN E3 ligase complex together with substrates to mediate target degradation^{1,18}.

The use of CRBN ligands in PROTACs is advantageous due to several reasons. Firstly, CRBN ligands have a specific and strong binding affinity for their target E3 ligases. Secondly, CRBN ligands have acceptable physicochemical characteristics such as molecular weight, solubility, and lipophilicity, characteristics that are important for the effectiveness of the PROTACs as they can affect the ability of the molecule to reach its target and bind to it. Additionally, CRBN ligands lack metabolic hot spots, which are regions of the molecule that are prone to being metabolized by the body, making them less likely to be broken down before they can reach their target. Finally, the binding modes of CRBN ligands are well characterized, which means that their interactions with their target E3 ligases are well understood, facilitating the design of more effective PROTACs using CRBN ligands¹⁵.

Due to these properties, CRBN-based PROTACs have been successfully used to degrade a wide range of target proteins, including protein kinases, transcriptional regulators, regulatory proteins, nuclear receptors, that are associated with various diseases, such as cancer, cardiovascular diseases, immune disorders, neurodegenerative diseases, and viral infections.¹⁵

IMiDs have been employed as ligands for CRBN to generate PROTACs that reduce

BRD4 and other BET proteins in cancer cells.^{1,18}

4.3. CRBN-dependent BRD4-targeting PROTAC

BRD4 is a protein that plays a crucial role in regulating gene expression. Recent studies have shown that BRD4 is primarily located at super-enhancer regions, which are regulating regions that are upstream of important oncogenes such as c-MYC. Due to its pivotal role in modulating the expression of essential oncogenes, BRD4 has emerged as a promising therapeutic target in multiple cancer types, including midline carcinoma, acute myeloid leukemia, multiple myeloma, Burkitt's lymphoma (BL), and prostate cancer¹⁴.

Small-molecule inhibitors have been used in drug development for oncology, however they show some limitations that can influence efficacy. These molecules are able to bind to the target reversibly, which means that large systemic drug concentrations and continuous exposures are often required to ensure sufficient functional inhibition. BRD4 inhibitors, such as JQ1 and OTX015, have shown limitations in effectively suppressing downstream c-MYC levels and inhibiting cell proliferation in Burkitt's lymphoma (BL) cell lines. The reversible nature of inhibitor binding and necessity of high drug concentrations, leads to incomplete suppression and accumulation of BRD4 protein over time in BL cell lines, which can be a significant issue for this approach¹⁴.

To overcome these limitations, an hetero-bifunctional molecule called ARV-825 using PROTAC technology has been developed. ARV-825 connects a small-molecule BRD4 ligand (OTX015) to a CRBN E3 ligase ligand (pomalidomide), through a flexible polyethylene glycol (PEG) linker. OTX015 is a drug that is currently undergoing phase I clinical trials as a small-molecule BRD4 inhibitor; and pomalidomide is a third generation IMiD drug that functions through interacting with the CRBN E3 ligase. This design allows the recruitment of BRD4 protein to the CRBN E3 ubiquitin ligase, leading to fast, efficient, and prolonged degradation of BRD4 in BL cell lines¹⁴.

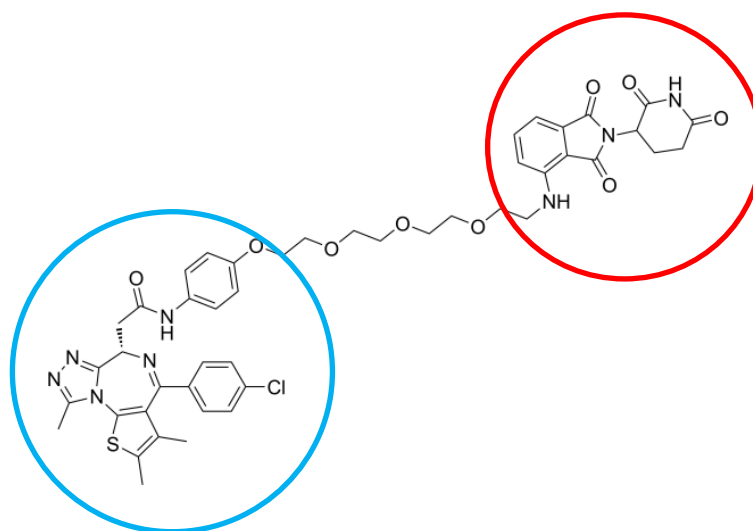


Figure 6| Schematic representation of chemical structure of ARV-825. In blue, BRD4 ligand (OTX015); In red, CRBN E3 ligase ligand (pomalidomide); and connecting both domains, flexible PEG linker. Adapted from [12]

Results showed that the PROTAC under study, was able to suppress c-MYC levels and downstream signalling more effectively than small-molecule BRD4 inhibitors, resulting in more effective cell proliferation inhibition and apoptosis induction in BL. ARV-825 treatment resulted in almost complete degradation of BRD4 protein in BL cell lines, with a DC50 (50% of maximum degradation) below 1 nM. As the binding ligands in ARV-825 for BRD4 and CRBN present values of 28-90 nM and 3 μ M, respectively, these results suggest that ARV-825 acts in a substoichiometric way in mediating BRD4 degradation, been able to engage in multiple cycles of protein degradation.¹⁴

It was also observed a bell-shaped dose dependence of BRD4 degradation by ARV-825 treatment, suggesting the occurrence of the Hook Effect. As the concentrations of ARV-825 increased above 1 nM, BRD4 degradations decreased, indicating that BRD4 – ARV-825 – CRBN ternary complex is the active species in driving efficient BRD4 degradation. Higher concentrations of ARV-825 leads to the formation of non-functional BRD4 – ARV-825 and ARV-825 – CRBN dimers that compete with formation of the active complex, resulting in lower BRD4 degradation¹⁴

Additionally, the degradation of BRD4 induced by ARV-825 occurred rapidly, with more than 50% of protein being lost within 2 hours of compound treatment¹⁴.

Comparing the effects of OTX015 and ARC-825 on Burkitt lymphoma (BL) cells, the results indicated that ARV-825 had a more significant effect on c-MYC and downstream cell proliferation^{14,15}.

5. Clinical Trials

By the end of 2022, there were at least 20 PROTACs being tested in clinical trials (Table I). The multiple PROTACs in clinical trials are a sign of active exploration of the potential of this technology and significant interest in developing PROTAC-based drugs for a variety of diseases¹²

Drug	Target	Sponsor	Disease	Phase
ARV-110	AR	Arvinas	Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer	Phase 2
ARV-766	AR	Arvinas	Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer	Phase 1
CC-94676	AR	Celgene	Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer	Phase 1
GT-20029	AR	Kintor	Prostate Cancer	Phase 1
HP518	AR	Hinova	Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer	Phase 1
ARV-471	ER	Arvinas	ER+ /HER2- Locally Advanced or Metastatic Breast Cancer	Phase 2
AC682	ER	Accutar Biotech	Locally Advanced or Metastatic ER+ Breast Cancer	Phase 1
DT-2216	BCR-xL	Dialectic	Solid tumor/Hematologic malignancy	Phase 1
KT-474	IRAK4	Kymera	Atopic Dermatitis (AD) or Hidradenitis Suppurativa (HS)	Phase 1
KT-413	IRAK4	Kymera	Diffuse Large B Cell Lymphoma	Phase 1
KT-333	STAT3	Kymera	Solid Tumor, Hematologic Malignancies	Phase 1
NX-2127	BTK	Nurix	B-cell malignancies	Phase 1
NX-5948	BTK	Nurix	B-cell malignancies/ Autoimmune diseases	Phase 1
BGB-16673	BTK	BeiGene	B-Cell malignancies	Phase 1
HSK-29116	BTK	Haisco	Relapsed/Refractory B-cell malignancies	Phase 1
CFT8634	BRD9	C4 Therapeutics	Synovial Sarcoma	Phase 1/2
FHD-609	BRD9	Foghorn Therapeutics	Advanced Synovial Sarcoma	Phase 1
CFT8919	EGFR L858R	C4 Therapeutics	Non-small-cell Lung Cancer	IND
LNK-01002	Ras GTPase	Lynk	Primary (PMF) or Secondary Myelofibrosis (PV-MF, ET-MF) or Acute Myeloid Leukemia	IND
CG001419	TRK	Cullgen	Cancer and other indications	IND

Table I | The summary of PROTACs in and approaching the clinical. Adapted from [12]

The most advanced PROTAC drugs in clinical research, that had entered the clinical phase II study, were ARV-110 and ARV-471 (figure 7), developed by Arvinas. Early clinical data has shown safety and effectiveness for patients, with meaningful clinical efficacy. The success of ARV-110 and ARV-471 in clinical trials is a promising sign for the future of PROTAC technology and its potential to revolutionize drug discovery and development.¹²

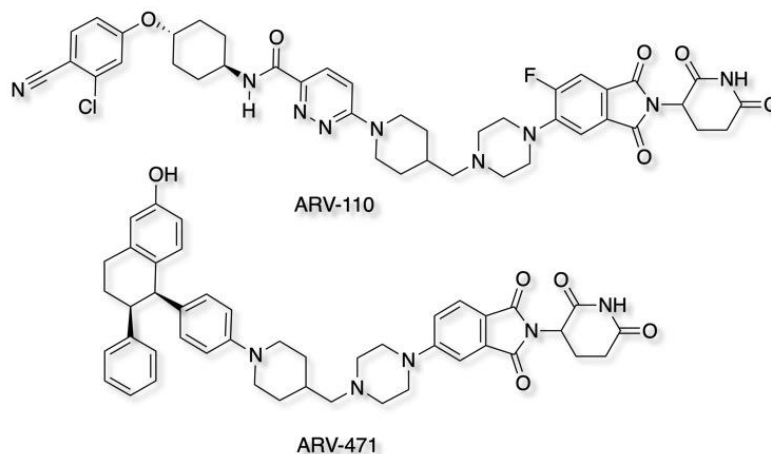


Figure 7 | Schematic representation of chemical structure of ARV-110 and ARV-471. Adapted from [12]

ARV-110 is an oral protein degrader that selectively targets the androgen receptor (AR) in metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) patients. It is designed to degrade the AR protein, which plays a crucial role in the growth and progression of prostate cancer. Phase I studies showed it as being effective in reducing prostate-specific antigen (PSA) levels in patients with mCRPC, in more than 50% in 40% of patients with mCRPC who had a specific gene mutation. As PSA levels are often used as a marker for prostate cancer progression, reducing PSA levels can indicate response to treatment.¹⁹

ARV-471 is an orally bioavailable degrader, designed to selectively target and degrade both wild-type and mutant forms of estrogen receptor alpha (ER α), which are known to play a critical role in estrogen receptor-positive (ER+) breast cancer. Phase I clinical studies showed that ARV-471 could significantly reduce the expression level of ER in tumor tissue, by 62%, and up to 90% in some cases. ARV-471 exhibited certain degradation effects on both wild type ER and ER mutants. Currently, ARV-471 is undergoing a phase II dose expansion clinical trial to evaluate its efficacy in the treatment of ER+ /HER2- patients with locally advanced or metastatic breast cancer.²⁰

However, there are still many questions about the clinical transformation of PROTAC drugs, which need to be addressed. PROTACs are heterobifunctional molecules that have a complex structure, which makes it difficult to predict their pharmacokinetic properties and potential side effects. These challenges are unavoidable in clinical trials, and it is essential to find ways to overcome them to ensure the safety and efficacy of PROTAC drugs. ARV-471 and ARV-110 are the first two PROTAC drugs to enter phase II clinical trials, as they have shown

strong clinical performance in the early trials. However, more research is needed to fully understand the potential benefits and limitations of PROTAC technology, and to develop efficient and orally effective PROTAC drugs. If the results of subsequent phase II and phase III clinical trials meet the expected goals, PROTAC may soon be used in clinical practice, bringing significant benefits to patients with various diseases, including metastatic castration-resistant prostate cancer, breast cancer, atopic dermatitis, and lymphoma.¹²

6. Future Prospects

PROTACs are a relatively new technology that has shown great potential in the field of drug discovery. Despite the challenges and obstacles that need to be overcome, the unique advantages of PROTACs make them a promising therapeutic option. The design and optimization of PROTACs focus on the stability of the ternary complex and the importance of linker composition, as well as expanding the repertoire of PROTAC binding domains, which will allow for the degradation of more protein targets, including low affinity molecules and failed clinical trial binders. Further investigation into the efficacy, specificity, and pharmacological properties of newly developed PROTACs, along with in vivo data and pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis, is necessary for clinical application. As technology continues to develop and research becomes more in-depth, the design and synthesis of PROTACs will likely become more optimized, leading to better treatment options for various diseases. The potential clinical benefits of PROTACs are expected to be realized in the near future, providing hope for patients and researchers alike.

New PROTAC technology developments continue to emerge, due to the continuous and active research. A new and recent strategy aims to induce targeted protein degradation in a H₂O₂-dependent manner, improving PROTAC selectivity. The development of H₂O₂-inducible PROTAC precursors provides a promising approach for targeted protein degradation in cancer cells. By utilizing endogenous H₂O₂, these precursors can be activated to release active PROTACs, leading to an effective degradation of targeted proteins, as well as intended cytotoxicity towards cancer cells, without damaging normal cells.²¹

7. Conclusion

Considering the literature revision, it becomes evident that the development and application of PROTAC technology have the potential to revolutionize drug discovery, particularly in the context of cancer treatment. The innovative approach, based on an event-

driven mechanism of action, offers several advantages over traditional occupancy-driven approaches.

One of the main strengths of PROTACs is their ability to selectively target the degradation of proteins, including those belonging to related protein families. Furthermore, PROTACs have demonstrated the capability to circumvent common resistance mechanisms associated with traditional inhibitors. This means that they have the potential to target proteins that were previously considered inaccessible or insensitive to modulation by inhibitors.

The emergence of development platforms for PROTACs, including early target validation methods and in-cell characterization systems, holds the promise of further accelerating the advancement of this technology. Efforts to expand the range of E3 ligases that can be utilized in PROTACs and the characterization of tissue- or disease-specific E3 ligases are significant steps towards improving the selectivity of PROTACs.

However, for PROTACs to become widely accepted therapeutic agents, further studies are needed to assess their *in vivo* efficacy. As the first PROTACs move into clinical trials, we anticipate obtaining more concrete data regarding their clinical performance.

In the field of cancer, PROTACs show tremendous potential, offering a novel approach to modify the UPS and degrade disease-related proteins. The variety of bifunctional PROTACs and their ability to target ligands make this approach particularly promising for enhancing tumor selectivity and overcoming drug resistance.

In summary, the prospects of PROTACs as a cancer therapy are promising, and ongoing research continues to optimize their properties and explore their extensive therapeutic potential. This technology represents a significant shift in how we approach cancer treatment and provides hope for future advancements in this critical field of medicine.

8. References

1. Laplante G, Zhang W. Targeting the Ubiquitin-Proteasome System for Cancer Therapeutics by Small-Molecule Inhibitors. *Cancers (Basel)*; 13. Epub ahead of print 2 June 2021. DOI: 10.3390/CANCERS13123079.
2. Pettersson M, Crews CM. PROteolysis TArgeting Chimeras (PROTACs) - Past, present and future. *Drug Discov Today Technol* 2019; 31: 15–27.
3. Proteolysis | Protein Degradation, Enzymes & Peptides | Britannica, <https://www.britannica.com/science/proteolysis> (accessed 8 September 2023).
4. Leestemaker Y, Ovaa H. Tools to investigate the ubiquitin proteasome system. *Drug Discov Today Technol* 2017; 26: 25–31.
5. Mennerich D, Kubaichuk K, Kietzmann T. DUBs, Hypoxia, and Cancer. *Trends Cancer* 2019; 5: 632–653.
6. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: Destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 2002; 82: 373–428.
7. Lin H, Li S, Shu HB. The Membrane-Associated MARCH E3 Ligase Family: Emerging Roles in Immune Regulation. *Front Immunol* 2019; 10: 1751.
8. Burslem GM, Crews CM. Proteolysis-Targeting Chimeras as Therapeutics and Tools for Biological Discovery. *Cell* 2020; 181: 102–114.
9. Protacs | Cambridge MedChem Consulting, https://www.cambridgemedchemconsulting.com/resources/lead_identification/protacs/protacs.html (accessed 8 September 2023).
10. Daniels DL, Riching KM, Urh M. Monitoring and deciphering protein degradation pathways inside cells. *Drug Discov Today Technol* 2019; 31: 61–68.
11. Chopra R, Sadok A, Collins I. A critical evaluation of the approaches to targeted protein degradation for drug discovery. *Drug Discov Today Technol* 2019; 31: 5–13.
12. Liu Z, Hu M, Yang Y, et al. An overview of PROTACs: a promising drug discovery paradigm. *Molecular biomedicine*; 3. Epub ahead of print 1 December 2022. DOI: 10.1186/S43556-022-00112-0.
13. Duan W, Yu M, Chen J. BRD4: New hope in the battle against glioblastoma. *Pharmacol Res*; 191. Epub ahead of print 1 May 2023. DOI: 10.1016/J.PHRS.2023.106767.
14. Lu J, Qian Y, Altieri M, et al. Hijacking the E3 Ubiquitin Ligase Cereblon to Efficiently Target BRD4. *Chem Biol* 2015; 22: 755–763.

15. Wang C, Zhang Y, Wu Y, et al. Developments of CRBN-based PROTACs as potential therapeutic agents. *Eur J Med Chem*; 225. Epub ahead of print 5 December 2021. DOI: 10.1016/J.EJMECH.2021.113749.
16. Edmondson SD, Yang B, Fallan C. Proteolysis targeting chimeras (PROTACs) in 'beyond rule-of-five' chemical space: Recent progress and future challenges. *Bioorg Med Chem Lett* 2019; 29: 1555–1564.
17. Wang C, Zhang Y, Wang J, et al. VHL-based PROTACs as potential therapeutic agents: Recent progress and perspectives. *Eur J Med Chem*; 227. Epub ahead of print 5 January 2022. DOI: 10.1016/J.EJMECH.2021.113906.
18. Kopp KO, Greer ME, Glotfelty EJ, et al. A New Generation of IMiDs as Treatments for Neuroinflammatory and Neurodegenerative Disorders. *Biomolecules*; 13. Epub ahead of print 1 May 2023. DOI: 10.3390/BIOM13050747.
19. Gao X, III HAB, Vuky J, et al. Phase 1/2 study of ARV-110, an androgen receptor (AR) PROTAC degrader, in metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC). https://doi.org/10.1200/JCO2022406_suppl017 2022; 40: 17–17.
20. First-in-human safety and activity of ARV-471, a novel PROTAC® estrogen receptor degrader, in ER+/HER2-locally advanced or metastatic breast cancer - Arvinas, <https://www.arvinas.com/publications/first-in-human-safety-and-activity-of-arv-471-a-novel-protac-estrogen-receptor-degrader-in-er-her2-locally-advanced-or-metastatic-breast-cancer/> (accessed 8 September 2023).
21. Yu D, Fan H, Zhou Z, et al. Hydrogen Peroxide-Inducible PROTACs for Targeted Protein Degradation in Cancer Cells. *Chembiochem*; 24. Epub ahead of print 1 September 2023. DOI: 10.1002/CBIC.202300422.