

Lucilia

**Patentes**

- Francês
- Inglês
- Português

- Encontrar técnica
- Debater esta aplicação



**Inibidores da interação p53-mdm2**  
**WO 2013105037 A1**

**RESUMO**

A presente invenção descreve composto de fórmula geral 1, (Fórmula 1), seus sais ou ésteres, no tratamento de doenças que são influenciadas positivamente pela inibição da interação p53-MDM2 ou p53-MDMX, em particular para o tratamento de neoplasias, de preferência no tratamento do cancro, nomeadamente do cancro da mama, colo-rectal, próstata, rim, pulmão, melanoma, osteossarcoma ou nefroma embrionário, entre outros.

<b>Número de publicação</b>	WO2013105037 A1
<b>Tipo de publicação</b>	Candidatura
<b>Número de candidatura</b>	PCT/IB2013/050193
<b>Data de publicação</b>	18 Jul 2013
<b>Data de apresentação</b>	9 Jan 2013
<b>Data de prioridade</b>	9 Jan 2012
<b>Inventores</b>	<a href="#">Alberto Inga, Mais 6 »</a>
<b>Requerente</b>	<a href="#">Universidade Do Porto, University Of Trento</a>
<b>Exportar citação</b>	<a href="#">BiBTeX</a> , <a href="#">EndNote</a> , <a href="#">RefMan</a>
<a href="#">Citações Não Provenientes de Patentes</a> (29), <a href="#">Classificações</a> (6), <a href="#">Eventos Legais</a> (3)	
<b>Links Externos:</b>	<a href="#">Patentscope</a> , <a href="#">Espacenet</a>

**DESCRIÇÃO**

DESCRIÇÃO INIBIDORES DA INTERAÇÃO P53-MDM2

Domínio técnico da invenção

A presente invenção refere-se a (tio) xantonas de formula geral 1 e seus análogos e à sua utilização como inibidores da interação p53-MDM2 e ao uso destas substâncias como medicamentos, em estudos laboratoriais de processos celulares nos quais esta interação p53-MDM2 esteja envolvida e no tratamento de cancros que expressam uma forma nativa da proteína p53. Com a presente invenção prevê-se uma melhoria das características dos agentes inibidores da interação p53-MDM2 existentes, no que diz respeito à sua eficácia e processo de síntese.

Esta invenção integra-se no sector técnico dos produtos da química fina e dos medicamentos oncológicos.

Antecedentes da Invenção

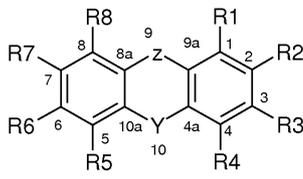
A proteína supressora tumoral p53 é um regulador celular chave responsável pela manutenção da integridade genómica após exposição a fatores de stress. Nas últimas trinta décadas foi demonstrada a efetividade da proteína p53 na supressão de tumores através da indução da paragem do ciclo celular e da morte celular apoptótica. Em alguns tumores humanos a atividade protetora desta proteína encontra-se suprimida por mutação. No caso de tumores com a forma nativa da proteína p53, a atividade desta proteína encontra-se suprimida através da sobreexpressão celular dos principais reguladores negativos, MDM2 e MDMX (também conhecido como MDM4) . A oncoproteína MDM2 é uma ligase E3 de ubiquitina inibe a atividade da proteína p53 através de duas vias: uma que envolve a interação direta com a proteína p53 mascarando o seu domínio de transativação e, conseqüentemente, a sua atividade transcripcional , e outra que envolve a ubiquitinação e conseqüente degradação proteossomal da proteína p53. A oncoproteína MDMX inibe sobretudo a atividade transcripcional da p53 (Di et al . Curr Câncer Drug Targets, 2011, DOI : 10.2174/156800911797264789) . A inibição da interação da proteína MDM2 com a proteína p53 tem sido considerada uma estratégia muito promissora de reativação da proteína p53 em cancros com uma forma nativa da p53, como é o caso dos cancros da mama, colo-rectal, próstata, rim, pulmão, melanoma, osteossarcoma e nefroma embrionário, entre outros. Conseqüentemente, os inibidores desta interação representam agentes anticancerígenos , tendo-se assistido, nos últimos anos, a uma procura exaustiva de moléculas inibidoras da interação p53-MDM2 (Di et al . Curr Câncer Drug Targets, 2011, 15: DOI : 10.2174/156800911797264789) .

No sentido de restaurar as funções do gene TP53, a terapêutica génica baseada na p53 já teve aprovação clínica na China. No entanto, devido à falta de eficácia demonstrada, não foi ainda aprovada nos Estados Unidos e na Europa. Outras limitações associadas a este tipo de terapêutica prendem-se com a dificuldade de desenvolver sistemas que permitam a libertação destes agentes no local- alvo (Check et al . Nat Rev Clin Oncol, 2011,8:25-37). Outra

**REIVINDICAÇÕES (1)**

1. REIVINDICAÇÕES

1. Composto de fórmula geral 1,



sais ou ésteres, em que:

Y representa oxigénio, enxofre, CH<sub>2</sub> ou N-H;

Z representa C=O, CH<sub>2</sub>, CH-OH, C=NOH, C=NOCH<sub>3</sub>, NO, NOH,

S=O ou SO<sub>2</sub>;

R1-R8

o independentemente uns dos outros representam hidrogénio, hidróxilo, aldeído, halogéneo, trifluormetilo, acetileno, carboxilo, ciano, nitro, SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, arilo ou heteroarilo substituído por halogéneo ou hidróxilo ou metoxilo, amina, aminoalcoxilo, aminoarilo, imina, alquilo, cicloalquilo, alquil-halogéneo, ou juntos um grupo aminoalquilo, alcoxilo, alquilenos (di) oxilo como pirano ou pirano substituído por alquilo, furano ou dioxano ou dioxano substituído por arilo, ou arilo substituído por halogéneo ou hidróxilo ou alcoxilo ou alquilenos (di) oxilo ;

o em que se um de R1-R8 representa um grupo amina e/ou aminoalquilo este contém contra-íões como HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, Cl<sup>-</sup>, NH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, I-CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>-3-OH-4 (CH<sub>3</sub>) -6-SC>3<sup>-</sup> que estão coordenados ou ligados ionicamente na amina;

em que pelo menos um de R1-R8 não é hidrogénio; para o tratamento de doenças que são influenciadas positivamente pela inibição da interação p53-MDM2 ou p53-MDMX .

2. Composto de acordo com as reivindicações 1, em que

• Y representa oxigénio, enxofre;

• Z representa C=O;

abordagem terapêutica corresponde à vacinação por imunização com péptidos derivados da p53. No entanto, os ensaios clínicos de vacinação têm revelado baixa eficácia em regime de monoterapia (Speetjens, et al. Clin Câncer Res, 2009, 15:1086-1095).

Pelo exposto, pequenas moléculas inibidoras de interação proteína-proteína apresentam vantagens como candidatos a fármacos, em relação às macromoléculas investigadas nas terapêuticas acima abordadas.

Várias pequenas moléculas descritas como inibidores da interação p53-MDM2 encontram-se em fase pré-clínica e são comercializadas como produtos de química fina, nomeadamente com aplicação em estudos laboratoriais de processos celulares, sendo as classes de maior importância as seguintes: as nutlinas, as isoquinolinonas, as benzodiazepinedionas e os espiroxindois (Dickens et al. Semin Câncer Biol, 2010, 20(1):10-8). Muitos destes derivados, inicialmente investigados em ensaios pré-clínicos, revelaram genotoxicidade e/ou citotoxicidade marcada e/ou baixa biodisponibilidade. Os derivados inibidores da interação p53-MDM2 que se encontram em ensaios pré-clínicos possuem um ou mais centros estereogénicos, levando à existência de misturas enantioméricas, nomeadamente racematos, como é o caso das nutlinas (cis-imidazolinonas), dos derivados isoquinolinonas PXN727 e PXN822, dos derivados benzodiazepinedionas TDP521252 e TDP665759, e do espiroxindol MI219. Esta característica limita a eficácia do processo de purificação destes derivados (Davis e Johnston Chem Sei, 2011, 2:1076-1079).

Existe pelo menos um inibidor da interação p53-MDM2 em ensaios clínicos de fase I não disponível comercialmente, o cis-imidazol da série das nutlinas, RG7112 ou RO5045337 (Khoury et al. Med Chem Commun, 2011, 2:246-260). Este derivado apresentou como limitação clínica uma redução da contagem de linfócitos em alguns pacientes (Wasserman, 2nd Annual CMOD Canadian Biomarkers and Surrogate Endpoints Meeting "Biomarkers and Personalized Medicine" Maio 17, 2010; Beryozkina et al. J Clin Oncol, 2011 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition), 2011, 29(15 suppl May 20 Supplement):3039). Adicionalmente, as nutlinas, para além de apresentarem vários centros estereogénicos, possuem limitações associadas à respetiva estrutura química nomeadamente, de estabilidade, assim como dificuldades inerentes à sua síntese, análise, e purificação. A síntese da nutlina-3A, um inibidor da interação p53-MDM2 comercialmente disponível e utilizado em estudos laboratoriais de processos celulares, compreende nove etapas para a obtenção do racemato, com a necessidade de posterior separação dos enantiómeros através de uma cromatografia quiral por fluido crítico. Uma síntese enantiosseletiva foi descrita por Davis e Johnston (Davis e Johnston, Chem Sei, 2011, 2:1076-1079), envolvendo 6 etapas e catalisadores dispendiosos. Adicionalmente, foram descritos problemas de resistência a derivados de nutlina (Cheok et al. Nat Rev Clin Oncol, 2011, 8:25-37; Bernal et al. Câncer Celi, 2010, 18: 411-422).

Outros produtos comercialmente disponíveis e em ensaios pré-clínicos, como o RITA e o tenovin-6, atuam na forma nativa da p53 por outros mecanismos. O Rita liga-se diretamente à p53 bloqueando a sua capacidade para interagir com MDM2 mas não a sua capacidade de ativar a apoptose p53-dependente (Grinkevich, et al. Câncer Celi, 2009, 15:441-453). O tenovin-6 não inibe a interação p53-MDM2 mas sim a atividade desacetilase das proteínas SirTI e SirT2. Esta pequena molécula protege a degradação da p53 mediada por MDM2 sem ter praticamente efeito na síntese da p53 (Lain et al. Câncer Celi, 2008, 13:454-463). Outro inibidor da MDM2 em ensaios clínicos de fase I é o JNJ-26854165. O JNJ-26854165 ou Serdemetan, um derivado de triptamina (4-piridino)-1,4-diaminofenilo também comercializado como produto de química fina, é descrito como inibidor da interação MDM2-proteossoma.

Por todos os problemas técnicos expostos, a inibição da interação p53-MDM2 continua a carecer de moléculas que sejam eficazes, estáveis, com processos sintéticos viáveis e com aplicação terapêutica.

Verificou-se que os compostos descritos na presente invenção são capazes de inibir a interação p53-MDM2 de uma forma eficiente podendo ser úteis em estudos laboratoriais de processos celulares nos quais esta interação p53-MDM2 esteja envolvida e no tratamento de cânceros que expressam uma forma nativa da proteína p53. Recentemente demonstrou-se que RITA, um conhecido inibidor da interação p53-Mdm2, também era capaz de reativar

• R1-R8

o independentemente uns dos outros representam hidrogénio, hidroxilo, aldeído, halogénio, amina, aminoalcoxilo, alquilo, alquil-halogénio, ou juntos um grupo aminoalquilo, alcoxilo, alquilenos (di) oxilo como pirano ou pirano substituído por alquilo, ou dioxano ou dioxano substituído por arilo, ou arilo substituído por halogénio ou hidroxilo ou alcoxilo ou alquilenos (di) oxilo;

o em que se um de R1-R8 representa um grupo amina e/ou aminoalquilo este contém contra-íões como Cl<sup>-</sup>, que está ligado ionicamente na amina;

• em que pelo menos um de R1-R8 não é hidrogénio.

3. Composto de acordo com as reivindicações 1, em que

• Y representa oxigénio;

• Z representa C=O;

• R1-R8

o independentemente uns dos outros representam hidrogénio, hidroxilo, aldeído, halogénio, alquilo, alquil-halogénio, ou juntos um grupo aminoalquilo, alcoxilo, alquilenos (di) oxilo como pirano ou pirano substituído por alquilo, ou dioxano ou dioxano substituído por arilo, ou arilo substituído por halogénio ou hidroxilo ou alcoxilo ou alquilenos (di) oxilo ;

• em que pelo menos um de R1-R8 não é hidrogénio.

4. Composto de acordo com as reivindicações 1, em que

• Y representa enxofre;

• Z representa C=O;

• R1-R8

o independentemente uns dos outros representam hidrogénio, hidroxilo, halogénio, amina, aminoalcoxilo, alquilo, alquil-halogénio, ou juntos um grupo aminoalquilo, alcoxilo, alquilenos (di) oxilo como pirano ou pirano substituído por alquilo;

o em que se um de R1-R8 representa um grupo amina e/ou aminoalquilo este contém contra-íões como Cl<sup>-</sup>, que está ligado ionicamente na amina;

• em que pelo menos um de R1-R8 não é hidrogénio.

5. Composto de acordo com as reivindicações 1, em que

• Y representa oxigénio, enxofre;

• Z representa C=O;

• R1-R8, independentemente uns dos outros, representam hidrogénio, hidroxilo, aldeído, halogénio, alquilo, alquil-halogénio, amina, alcoxilo, ou juntos um grupo aminoalquilo, alcoxilo, alquilenos (di) oxilo como pirano ou pirano substituído por alquilo, ou dioxano ou dioxano substituído por arilo, ou arilo substituído por halogénio ou hidroxilo ou alcoxilo ou alquilenos (di) oxilo;

• R1 representa carbaldeído ou metil-halogénio ou alquilamina, e R3 e R4 representam alcoxilos; ou R2 e R3 representam 2, 2-dimetil-di-hidropirano, em que pelo menos um ou mais de R1, R4-R8 representa halogénio, metil-halogénio, hidrogénio ou alquilamina.

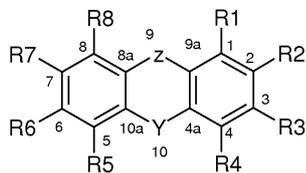
6. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações

formas mutadas da p53 (Zhao et al. Celi Cycle, 2010, 9:1847-55).

Adicionalmente demonstrou-se que nutlina-3A estabilizava a proteína p73 ativando a sua atividade transcricional em linhas tumorais sem p53 (Lau et al. , Oncogene, 2008, 27:997-1003). Verificou-se que, os compostos da presente invenção apresentam atividades inibidoras em formas mutadas da p53, assim como nas isoformas da p53 (p63 ou p73) .

Sumário da invenção

A presente invenção descreve composto de fórmula geral 1,



seus sais ou ésteres, em que:

- Y representa oxigénio, enxofre, CH<sub>2</sub> ou N-H;
- Z representa C=O, CH<sub>2</sub>, CH-OH, C=NOH, C=NOCH<sub>3</sub>, NO, NOH,

S=O ou SO<sub>2</sub>;

- R1-R8

independentemente uns dos outros representam hidrogénio, hidroxilo, aldeído, halogénio, trifluormetil, acetileno, carboxilo, ciano, nitro, SO<sub>2</sub> H<sub>2</sub>, arilo ou heteroarilo substituído por halogénio ou hidroxilo ou metoxilo, amina, aminoalcoxilo, aminoarilo, imina, alquilo, cicloalquilo, alquil-halogénio, ou juntos um grupo aminoalquilo, alcoxilo, alquilenos (di) oxilo como pirano ou pirano substituído por alquilo, furano ou dioxano ou dioxano substituído por arilo, ou arilo substituído por halogénio ou hidroxilo ou alcoxilo ou alquilenos (di) oxilo ;

em que se um de R1-R8 representa um grupo amina e/ou aminoalquilo este contém contra-íões como HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, Cl<sup>-</sup>, NH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> S O<sub>3</sub><sup>-</sup>, I-CH<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>-3-OH-4 ( CH<sub>3</sub> ) - 6-SC<sup>+</sup> que estão coordenados ou ligados ionicamente na amina;

- em que pelo menos um de R1-R8 não é hidrogénio;

no tratamento de doenças que são influenciadas positivamente pela inibição da interação p53-MDM2 ou p53- MDMX. Em particular no tratamento de neoplasias, de preferência no tratamento do cancro, nomeadamente cancro da mama, colo-rectal, próstata, rim, pulmão, melanoma, osteossarcoma ou nefroma embrionário, entre outros. realização do composto de fórmula geral 1 em que:

Y representa oxigénio, enxofre;

Z representa C=O;

R1-R8

independentemente uns dos outros representam hidrogénio, hidroxilo, aldeído, halogénio, amina, aminoalcoxilo, alquilo, alquil-halogénio, ou juntos um grupo aminoalquilo, alcoxilo, alquilenos (di) oxilo como pirano ou pirano substituído por alquilo, ou dioxano ou dioxano substituído por arilo, ou arilo substituído por halogénio ou hidroxilo ou alcoxilo ou alquilenos (di) oxilo;

em que se um de R1-R8 representa um grupo amina e/ou aminoalquilo este contém contra-íões como Cl<sup>-</sup>, que está ligado ionicamente na amina;

em que pelo menos um de R1-R8 não é hidrogénio.

Numa outra realização do composto de fórmula geral 1, em que :

- Y representa oxigénio;
- Z representa C=O;
- R1-R8

1-3, ser 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2 , 2-dimetil-2H, 6H- pirano [3,2-b]xanten-6-ona.

7. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações

1-3, ser a 1 , 2-di-hidroxixantona .

8. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações

1-2 ou 4, ser a 1- [(2- (dietilamino) etil ) amino ] -4-propoxixantona .

9. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações

1-2 ou 4, ser o cloridrato de l- [ 2- (dietilamino) etil ] amino } -4-propoxixantona.

10. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, ser (2R, 3R) -2- (hidroximetil) -3- (8-metoxi-2, 2-dimetilcroman-6-il) -2H-

[1, 4] dioxino [2, 3-c] xanten-7 (3H) -ona.

11. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, 5, ser l-aminoalquil-4-hidroxi- 2 , 2-dimetil-di-hidropiranoxantona .

12. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, 5, ser halogenio-4-hidroxi-2 , 2- dimetil-di-hidropiranoxantona .

13. Composto de acordo com a reivindicação anterior, ser l-bromo-4-hidroxi-2 , 2-dimetil-di-hidropiranoxantona .

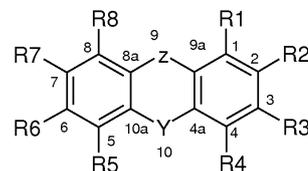
14. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, 5, ser carbaldeido-3, 4-dialcoxixantona .

15. Composto de acordo com a reivindicação anterior, ser l-carbaldeido-3, 4-dimetoxixantona .

16. Composto descrito na reivindicação anterior para no tratamento de neoplasias, de preferência no tratamento do cancro.

Composto descrito na reivindicação anterior para o tratamento do cancro da mama, colo-rectal, próstata, rim, pulmão, melanoma, osteossarcoma ou nefroma embrionário .

18. Composto de fórmula geral 1,



seus sais ou ésteres, em que

- Y representa oxigénio ou enxofre;

- Z representa C=O;

• R1-R8, independentemente uns dos outros, representam hidrogénio, hidroxilo, aldeído, halogénio, alquilo, alquil-halogénio, amina, alcoxilo, ou juntos um grupo aminoalquilo, alcoxilo, alquilenos (di) oxilo como pirano ou pirano substituído por alquilo, ou dioxano ou dioxano substituído por arilo, ou arilo substituído por halogénio ou hidroxilo ou alcoxilo ou alquilenos (di) oxilo;

independentemente uns dos outros representam hidrogénio, hidroxilo, aldeído, halogéneo, alquilo, alquil-halogéneo, ou juntos um grupo aminoalquilo, alcóxido, alquilenos (di) oxido como pirano ou pirano substituído por alquilo, ou dioxano ou dioxano substituído por arilo, ou arilo substituído por halogéneo ou hidroxilo ou alcóxido ou alquilenos (di) oxido;

• em que pelo menos um de R1-R8 não é hidrogénio.

Numa outra realização do composto de fórmula geral 1, em que :

• Y representa enxofre;

• Z representa C=O;

• R1-R8

independentemente uns dos outros representam hidrogénio, hidroxilo, halogéneo, amina, aminoalcóxido, alquilo, alquil-halogéneo, ou juntos um grupo aminoalquilo, alcóxido, alquilenos (di) oxido como pirano ou pirano substituído por alquilo;

em que se um de R1-R8 representa um grupo amina e/ou aminoalquilo este contém contra-íons como Cl<sup>-</sup>, que está ligado ionicamente na amina;

• em que pelo menos um de R1-R8 não é hidrogénio.

Numa outra realização do composto de fórmula geral 1, em que os compostos podem ser: 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2- dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona; 1, 2-di- hidroxixantona; 1- { [ 2- (dietilamino) etil ] amino } -4-propoxitioxantona; cloridrato de l-[(2-

(dietilamino) etil ] amino }-4-propoxitioxantona; (2R,3R)-2- (hidroximetil ) -3- (8-metoxi-2, 2-dimetilcroman-6-il) -2H- [1, 4] dioxino [2, 3-c] xanten-7 (3H) -ona; l-aminoalquil-4- hidroxi-2, 2-dimetil-di-hidropiranoxantona; halogenio-4- hidroxi-2, 2-dimetil-di-hidropiranoxantona; l-bromo-4- hidroxi-2, 2-dimetil-di-hidropiranoxantona; carbaldeído-3 , 4- dialcoxixantona; l-carbaldeído-3, 4 -dimetoxixantona, entre outros .

Outro aspecto da presente invenção é a descrição de composto de fórmula geral 1, seus sais ou ésteres, em que

• Y representa oxigénio ou enxofre;

• Z representa C=O;

• R1-R8 independentemente uns dos outros representam hidrogénio, hidroxilo, aldeído, halogéneo, alquilo, alquil-halogéneo , amina, alcóxido, ou juntos um grupo aminoalquilo, alcóxido, alquilenos (di) oxido como pirano ou pirano substituído por alquilo, ou dioxano ou dioxano substituído por arilo, ou arilo substituído por halogéneo ou hidroxilo ou alcóxido ou alquilenos (di) oxido;

• R1 representa carbaldeído ou metil-halogéneo ou alquilamina, e R3 e R4 representam alcóxidos; ou R2 e R3 representam 2 , 2-dimetil-di-hidropirano, em que pelo menos um ou mais de R1, R4-R8 representa halogéneo, metil-halogéneo, hidrogénio ou alquilamina

Numa outra realização do composto de fórmula geral 1, em que os compostos podem ser: l-aminoalquil-4-hidroxi-2 , 2- dimetil-di-hidropiranoxantona; halogéneo-4-hidroxi-2 , 2- dimetil-di-hidropiranoxantona; halogéneometil-4-hidroxi- 2, 2-dimetil-di-hidropiranoxantona; l-bromo-4-hidroxi-2 , 2- dimetil-di-hidropiranoxantona; carbaldeído-3 , 4- dialcoxixantona; halogéneometil-3, 4-dialcoxixantona; 1- carbaldeído-3 , 4 -dimetoxixantona . Numa realização preferencial, os novos compostos são usados em medicina ou em medicamentos.

Outro aspeto da presente invenção são composições farmacêutica que compreende um veículo farmacêuticamente aceitável e uma quantidade terapeuticamente ativa do composto livre, seus sais ou ésteres anteriormente descritos. Numa realização preferencial, a composição farmacêutica pode ser ministrada por via tópica, oral, parental ou injetável.

Numa outra realização a composição farmacêutica pode compreender ainda um agente quimioterápico, tal como o etoposídeo .

O termo "alquil" indica alcanos, alcenos e alcinos, incluindo ramificados, isómeros e estereoisómeros , de preferência C1-C20.

O termo "aril" indica aromáticos monovalentes ou bivalentes de preferência fenilo, naftilo, toluilo, xililo.

O termo "heteroarilo" indica sistemas anelares aromáticos heterocíclicos, de preferência um a três carbonos é substituído por um heteroátomo de nitrogénio, oxigénio ou enxofre .

• R1 representa carbaldeído ou metil-halogéneo ou alquilamina, e R3 e R4 representam alcóxidos; ou R2 e R3 representam 2, 2-dimetil-di-hidropirano, em que pelo menos um ou mais de R1, R4-R8 representa halogéneo, metil-halogéneo, hidrogénio ou alquilamina.

19. Composto de acordo com a reivindicação 18, ser 1-aminoalquil-4-hidroxi-2 , 2-dimetil-di- hidropiranoxantona .

20. Composto de acordo com a reivindicação 18, ser halogenio-4-hidroxi-2, 2-dimetil-di-hidropiranoxantona .

21. Composto de acordo com a reivindicação anterior, ser l-bromo-4-hidroxi-2 , 2-dimetil-di-hidropiranoxantona .

22. Composto de acordo com a reivindicação 18, ser carbaldeído-3,4-dialcoxixantona.

23. Composto de acordo com a reivindicação anterior, ser l-carbaldeído-3, 4-dimetoxixantona .

24. Compostos descritos em qualquer das reivindicações 18-23 para o uso em medicina ou em medicamentos.

25. Composição farmacêutica que compreende um veículo farmacêuticamente aceitável e uma quantidade terapeuticamente ativa do composto livre, seus sais ou ésteres descrito em qualquer uma das reivindicações 1-24.

26. Composição de acordo com a reivindicação anterior a qual é ministrada por via tópica, oral, parental ou injetável .

27. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 25-26 que compreende ainda um agente quimioterápico .

28. Composição de acordo com a reivindicação anterior em que o agente quimioterápico é etoposídeo.

O termo "alcoxilo" indica qualquer alquilo ligado a um átomo de oxigênio de preferência C1-C20, ainda mais de preferência metoxilo, etoxilo, propoxilo ou isopropoxilo, butiloxilo, incluindo cadeias múltiplas como etoxilo etoxilo e cadeias alcoxilo substituídas como dietilaminoetoxilo. O termo "halogéneo" indica flúor, cloro, bromo ou iodo.

O termo "aldeído" indica aldeídos, de preferência C1-C3, nomeadamente carbaldeído, acetaldeído, propaldeído.

O termo "veículo farmacologicamente aceitável" indica um diluente, solvente, agente adjuvante ou excipiente farmacologicamente aceitável e substancialmente não tóxico no indivíduo para o qual vai ser administrado.

Adicionalmente, os compostos descritos na presente invenção apresentam atividades elevadas na interação p53-MDMX, em formas mutadas da p53 assim como nas isoformas da p53 (p63 e p73).

Os compostos descritos na presente invenção apresentam também vantagens em relação a inibidores descritos anteriormente no que concerne ao método de obtenção e à estabilidade. Os compostos descritos são obtidos por um processo sintético mais eficiente comparativamente à dos inibidores derivados de nutlina, isto é, a sua síntese processa-se através de um número de etapas mais reduzido (em alguns exemplos, efetuada em apenas duas etapas a partir das respetivas matérias-primas comercialmente disponíveis), sendo alguns isolados na forma de sais por um processo de purificação em condições ambientais favoráveis e com rendimentos que podem atingir os 85-6.

Pelo exposto, as substâncias da presente invenção são consideradas potenciais agentes farmacológicos para estudos de processos celulares nos quais esta interação p53-MDM2 esteja envolvida e agentes terapêuticos na área oncológica.

Descrição da invenção

A presente invenção refere-se a (tio) xantonas e seus análogos como inibidores da interação p53-MDM2, e ao uso destas substâncias em estudos laboratoriais de processos celulares nos quais esta interação p53-MDM2 esteja envolvida. Estes compostos ativam a forma nativa da proteína supressora tumoral p53 através da inibição da sua interação com o inibidor endógeno MDM2. Estas substâncias, representam ainda potenciais agentes terapêuticos no tratamento do cancro, uma vez que através da ativação da proteína p53, induzem a paragem do ciclo celular e a apoptose em células tumorais, podendo ser utilizadas isoladas ou em combinação com outras terapêuticas, em particular com agentes quimioterápicos, como o etoposídeo. Com a presente invenção prevê-se uma melhoria em relação aos agentes inibidores da interação p53-MDM2 existentes, no que diz respeito à eficácia e obtenção, uma vez que o seu processo sintético, que decorre em apenas quatro etapas e com rendimentos elevados, é apropriado a uma escala industrial. Esta invenção também se refere ao uso destas novas substâncias no tratamento de cânceros que expressam: uma forma nativa da proteína p53 e sobreexpressam o inibidor endógeno MDMX; as isoformas da p53 (p63 e p73); ou formas mutadas da p53.

Esta invenção integra-se no sector técnico dos produtos da química fina e dos medicamentos oncológicos.

Descrição das Figuras Fig. 1 - Fórmula geral 1 dos derivados (tio) xantônicos e seus análogos.

Fig. 2 - Esquema ilustrativo do ensaio de transativação da proteína p53 em leveduras que co-expressam as proteínas humanas p53 (forma nativa) e MDM2. Este sistema artificial utiliza uma estirpe repórter diploide de levedura co-transformada com os vetores que codificam para a cada uma das proteínas humanas p53 e MDM2, sob o controlo de um promotor induzível (GAL1-10). Adicionalmente, contém uma sequência de ADN integrada no cromossoma XV da levedura contendo o elemento resposta (ER; Ex.: gene PUMA); um promotor mínimo (Pcyc1) e um gene repórter (Luciferase). A atividade transcricional da proteína p53 foi avaliada quantificando-se a atividade da luciferase utilizada como gene repórter, a qual, por sua vez, é diretamente proporcional à quantidade de luz emitida. A luminescência, expressa como unidades relativas de luz (URL), foi medida utilizando-se um luminómetro.

Fig. 3 - Um composto da presente invenção, a 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1), reduz o efeito inibitório da proteína MDM2 a nível da atividade transcricional da proteína p53 em ensaios de transativação da p53 em levedura. O inibidor comercial da interação p53-MDM2 (nutlina-3A) foi usado como controlo positivo; os compostos foram testados na concentração de 10 µM. O efeito dos compostos foi avaliado após 16 horas de tratamento. A atividade transcricional da proteína p53 foi avaliada a nível do gene PUMA e considerada de 100% para as leveduras incubadas apenas na presença do solvente, dimetilsulfóxido (DMSO). Os resultados apresentados correspondem à média ± erro padrão da média de quatro experiências independentes.

Fig. 4 - Um composto da presente invenção, a 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1), reduz o efeito inibitório da proteína MDM2 a nível da atividade transcricional da proteína p53 em ensaios de transativação da p53 em linhas celulares de adenocarcinoma da mama (MCF7). O inibidor disponível comercialmente da interação p53-MDM2 nutlina-3A e o ativador da atividade transcricional da p53 doxorubicina (DOXO) foram usados como controlos positivos; DOXO foi testada na concentração de 1,5 µM; nutlina-3A e 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1) foram testados na concentração de 10 µM; as leveduras incubadas apenas na presença dos solventes (água ou DMSO) foram usadas como controlos negativos. As linhas celulares utilizadas expressam a forma nativa da proteína p53 e sobreexpressam a proteína MDM2 tendo sido transfetadas com o gene artificial pG13. O efeito dos compostos foi avaliado após 16 horas de tratamento. A atividade transcricional da proteína p53 foi avaliada quantificando-se a atividade da luciferase utilizada como gene repórter, a qual, por sua vez, é diretamente proporcional à quantidade de luz emitida. A luminescência, expressa como unidades relativas de luz

(URL), foi medida utilizando-se um luminómetro. Os resultados correspondem à média ± erro padrão da média de duas experiências independentes.

Fig. 5 - Um composto da presente invenção, a 3, 4-di-hidro- 12-hidroxi-2 , 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1), reduz o efeito inibitório da proteína MDM2 a nível da atividade transcricional da proteína p53 em ensaios de transativação da p53 em linhas celulares de carcinoma de cólon (HCT116 p53<sup>+</sup> ). O inibidor disponível comercialmente da interação p53-MDM2 nutlina-3A e o ativador da atividade transcricional da p53 doxorubicina (DOXO) foram usados como controlos positivos; DOXO foi testada na concentração de 1,5 µM; nutlina-3A e 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2- dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1) foram testados na concentração de 10 µM; as leveduras incubadas apenas na presença dos solventes (água ou DMSO) foram usadas como controlos negativos. As linhas celulares utilizadas expressam a forma nativa da proteína p53 e sobrexpressam a proteína MDM2 tendo sido transfetadas com o gene artificial pG13. As linhas celulares que não expressam a proteína p53 (HCT116 p53<sup>-</sup>) foram usadas como controlo negativo. O efeito dos compostos foi avaliado após 16 horas de tratamento. A atividade transcricional da proteína p53 foi avaliada quantificando-se a atividade da luciferase utilizada como gene repórter, a qual, por sua vez, é diretamente proporcional à quantidade de luz emitida. A luminescência, expressa em unidades relativas de luz (URL), foi medida utilizando-se um luminómetro. Os resultados correspondem à média ± erro padrão da média de duas experiências independentes.

Fig. 6 - Um composto da presente invenção, a 3, 4-di-hidro- 12-hidroxi-2 , 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1), conduziu a um aumento dos níveis de expressão das proteínas (A) p21 e ( B ) Bax, em linhas celulares de carcinoma de cólon (HCT116 p53<sup>+</sup> ). Os resultados apresentados foram obtidos após 8 horas de tratamento com 10 µM da 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H- pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1) . Para a deteção das proteínas p21 e Bax utilizaram-se os anticorpos policlonal anti-p21 e monoclonal anti-Bax, respetivamente . A proteína actina foi utilizada como controlo de carga. As células tratadas apenas na presença do solvente (DMSO) foram usadas como controlo negativo. Os imunoblots foram revelados utilizando-se um kit amplificador de quimioluminescência .

Fig. 7 - Um composto da presente invenção, a 3, 4-di-hidro- 12-hidroxi-2 , 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1), conduziu a um aumento dos níveis proteicos de p53, em linhas celulares de carcinoma de cólon (HCT116 p53<sup>+</sup> ). Os resultados apresentados correspondem a tratamentos de 8 e 16 horas com 10 µM da 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2- dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1). Para a deteção da proteína p53 utilizou-se um anticorpo monoclonal anti-p53. A actina foi utilizada como controlo de carga. As células tratadas apenas na presença do solvente (DMSO) foram usadas como controlo negativo. Os imunoblots foram revelados utilizando-se um kit amplificador de quimioluminescência .

Seguidamente apresentamos na tabela 1 o efeito de outros compostos de formula geral 1 na inibição da interação p53-MDM2, utilizando o modelo da levedura. O composto nutlina- 3A (comercialmente disponível) foi utilizado como controlo positivo. O efeito obtido com as leveduras que expressam apenas a proteína p53 foi considerado como 100%. Os resultados correspondem à média ± erro padrão da média de cinco experiências independentes. Tabela 1: Avaliação do efeito de outros compostos de formula geral 1 na inibição da interação p53-MDM2, utilizando o modelo da levedura.

Compostos % de efeito da p53

DMSO 0.2 ± 4.2

Nutlina-3A™ 67.8 ± 3.3

3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2 , 2-dimetil-

55.8 ± 5.5 2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona

l-carbaldeido-3, 4-dimetoxixantona 100 ± 7.1

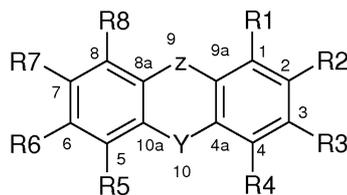
1, 2-di-hidroxixantona 100 ± 2.7

(2R, 3R) -2- (hidroximetil ) -3- (8-metoxi- 2, 2-dimetilcroman-6-il) -2H- 82.8 ± 6.6 [1, 4] dioxino [2, 3-c] xanten-7 (3H) -ona

Neste ensaio, considerou-se como 100% de efeito a atividade transcricional obtida com leveduras que expressam apenas a forma nativa da p53 incubadas apenas na presença do solvente (DMSO) . A atividade transcricional (-0%) obtida com as leveduras que co-expressam as proteínas p53 e MDM2 incubadas apenas na presença do solvente (indicada na tabela como DMSO) indica que ocorreu uma reversão total da atividade transcricional da p53 pela proteína MDM2. Inibidores da interação p53-MDM2 caracterizam-se por reestabelecerem a atividade transcricional da p53 em pelo menos 50%. Com base nisto, os compostos l-carbaldeido-3, 4- dimetoxixantona e 1 , 2-di-hidroxixantona reestabeleceram totalmente a atividade transcricional da p53 (100% de efeito), verificando que são compostos muito potentes.

Nesta invenção são descritas ( tio ) xantonas inibidoras da interação p53-MDM2 com aplicação em estudos laboratoriais de processos celulares nos quais esta interação p53-MDM2 esteja envolvida e no tratamento de cancros que expressam uma forma nativa da proteína p53, prevendo-se uma melhoria das características dos inibidores da interação p53-MDM2 disponíveis comercialmente, no que diz respeito à sua eficácia e/ou obtenção e/ou estabilidade.

Estas moléculas possuem um núcleo dibenzo-γ- ( tio ) pirónico ou ( tio ) xantónico ou derivado, de acordo com a fórmula geral 1



sais ou ésteres farmacologicamente aceitáveis, em

- Y representa oxigénio, enxofre, C<sup>+</sup> ou N-H;
- Z representa C=O, CH<sub>2</sub>, CH-OH, C=NOH, C=NOCH<sub>3</sub>, NO, NOH, S=O ou SO<sub>2</sub>;

• R1-R8

independentemente uns dos outros representam hidrogénio, hidroxilo, aldeído, halogénio, trifluormetilo, acetileno, carboxilo, ciano, nitro, SO<sub>2</sub> H<sub>2</sub>, arilo ou heteroarilo substituído por halogénio ou hidroxilo ou metoxilo, amina, aminoalcoxilo, aminoarilo, imina, alquilo, cicloalquilo, alquil-halogénio, ou juntos um grupo aminoalquilo, alcoxilo, alquileno (di) oxilo como pirano ou pirano substituído por alquilo, furano ou dioxano ou dioxano substituído por arilo, ou arilo substituído por halogénio ou hidroxilo ou alcoxilo ou alquileno (di) oxilo ;

em que se um de R1-R8 representa um grupo amina e/ou aminoalquilo este contém contra-íões como HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, Cl<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, I-CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>-3-OH- 4 (CH<sub>3</sub>) - 6-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> que estão coordenados ou ligados ionicamente na amina;

em que pelo menos um de R1-R8 não é hidrogénio.

Numa realização do composto de fórmula geral 1 em que:

- Y representa oxigénio, enxofre;

• Z representa C=O;

• R1-R8

independentemente uns dos outros representam hidrogénio, hidroxilo, aldeído, halogénio, amina, aminoalcoxilo, alquilo, alquil-halogénio, ou juntos um grupo aminoalquilo, alcoxilo, alquileno (di) oxilo como pirano ou pirano substituído por alquilo, ou dioxano ou dioxano substituído por arilo, ou arilo substituído por halogénio ou hidroxilo ou alcoxilo ou alquileno (di) oxilo;

em que se um de R1-R8 representa um grupo amina e/ou aminoalquilo este contém contra-íões como Cl<sup>-</sup>, que está ligado ionicamente na amina;

• em que pelo menos um de R1-R8 não é hidrogénio.

Numa outra realização do composto de fórmula geral 1, em que :

- Y representa oxigénio;

• Z representa C=O; • R1-R8

independentemente uns dos outros representam hidrogénio, hidroxilo, aldeído, halogénio, alquilo, alquil-halogénio, ou juntos um grupo aminoalquilo, alcoxilo, alquileno (di) oxilo como pirano ou pirano substituído por alquilo, ou dioxano ou dioxano substituído por arilo, ou arilo substituído por halogénio ou hidroxilo ou alcoxilo ou alquileno (di) oxilo;

• em que pelo menos um de R1-R8 não é hidrogénio.

Numa outra realização do composto de fórmula geral 1, em que :

- Y representa enxofre;

• Z representa C=O;

• R1-R8

independentemente uns dos outros representam hidrogénio, hidroxilo, halogénio, amina, aminoalcoxilo, alquilo, alquil-halogénio, ou juntos um grupo aminoalquilo, alcoxilo, alquileno (di) oxilo como pirano ou pirano substituído por alquilo;

em que se um de R1-R8 representa um grupo amina e/ou aminoalquilo este contém contra-íões como Cl<sup>-</sup>, que está ligado ionicamente na amina;

• em que pelo menos um de R1-R8 não é hidrogénio.

Numa outra realização do composto de fórmula geral 1, em que os compostos podem ser: 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona; 1, 2-di- hidroxixantona; 1- { [ 2- (dietilamino) etil ] amino } -4-propoxitioxantona; cloridrato de 1-[[2- (dietilamino) etil ] amino ]-4-propoxitioxantona; (2R, 3R) -2-

(hidroximetil) -3- (8-metoxi-2, 2-dimetilcroman-6-il) -2H- [1, 4] dioxino [2, 3-c] xanten-7 (3H) -ona; l-aminoalquil-4-hidroxi-2, 2-dimetil-di-hidropiranoxantona; halogenio-4- hidroxi-2, 2-dimetil-di-hidropiranoxantona; l-bromo-4- hidroxi-2, 2-dimetil-di-hidropiranoxantona; carbaldeido-3 , 4- dialcoxixantona; l-carbaldeido-3, 4 -dimetoxixantona, entre outros .

Ainda outro aspeto da invenção diz respeito ao uso destas substâncias, de fórmula geral 1 indicada na Fig. 1, em estudos laboratoriais de processos celulares nos quais a interação p53-MDM2 esteja envolvida.

A síntese de compostos de núcleo (tio) xantónico pode ser conseguida por métodos que se encontram descritos por Sousa e Pinto (Sousa, ME e Pinto MMM, Curr Med Chem, 2005, 12:2447-2479; Azevedo, C. M., Afonso, C. M. and Pinto, M. M. (2012), Current Organic Chemistry, 16 (23): 2818-2867. Andreia et al . Biochem Pharmacol, 2012, 83 (1):57-68).

Outro aspecto da presente invenção é a descrição de composto de fórmula geral 1, seus sais ou ésteres, em que

- Y representa oxigénio ou enxofre;
- Z representa C=O;
- R1-R8 independentemente uns dos outros representam hidrogénio, hidroxilo, aldeído, halogéneo, alquilo, alquil-halogéneo , amina, alcoxilo, ou juntos um grupo aminoalquilo, alcoxilo, alquilenos (di) oxilo como pirano ou pirano substituído por alquilo, ou dioxano ou dioxano substituído por arilo, ou arilo substituído por halogéneo ou hidroxilo ou alcoxilo ou alquilenos (di) oxilo; • R1 representa carbaldeído ou metil-halogéneo ou alquilamina, e R3 e R4 representam alcoxilos; ou R2 e R3 representam 2, 2-dimetil-di-hidropirano, em que pelo menos um ou mais de R1, R4-R8 representa halogéneo, metil-halogéneo, hidrogénio ou alquilamina

Numa outra realização do composto de fórmula geral 1, em que os compostos podem ser:

l-aminoalquil-4-hidroxi-2 , 2-dimetil-di-hidropiranoxantona; halogéneo-4-hidroxi-2, 2-dimetil-di-hidropiranoxantona;

halogéneometil-4-hidroxi-2 , 2-dimetil-di-hidropiranoxantona; l-bromo-4-hidroxi-2 , 2-dimetil-di-hidropiranoxantona;

carbaldeido-3 , 4-dialcoxixantona; halogéneometil-3 , 4- dialcoxixantona; l-carbaldeido-3, 4-dimetoxixantona .

Outro aspecto da invenção diz respeito à preparação de compostos de fórmula geral 1, seus sais ou ésteres, em que

- Y representa oxigénio ou enxofre;
- Z representa C=O;
- R1-R8 independentemente uns dos outros representam hidrogénio, hidroxilo, aldeído, halogéneo, alquilo, alquil-halogéneo , amina, alcoxilo, ou juntos um grupo aminoalquilo, alcoxilo, alquilenos (di) oxilo como pirano ou pirano substituído por alquilo, ou dioxano ou dioxano substituído por arilo, ou arilo substituído por halogéneo ou hidroxilo ou alcoxilo ou alquilenos (di) oxilo;
- R1 representa carbaldeído ou metil-halogéneo ou alquilamina, e R3 e R4 representam alcoxilos; ou R2 e R3 representam 2 , 2-dimetil-di-hidropirano, em que pelo menos um ou mais de R1, R4-R8 representa halogéneo, metil-halogéneo, hidrogénio ou alquilamina.

por introdução de carbaldeídos ou metil-halogéneos em 3,4- dialcoxil (tio) xantonas ou halogéneos ou metil-halogéneos ou aminas em pirano ou dioxano (tio) xantonas . Numa realização preferencial, os novos compostos são usados em medicina ou em medicamentos.

Os compostos de fórmula geral 1 em que R1 representa carbaldeído, e R3 e R4 representam alcoxilos podem ser obtidos por alquilação de l-carbaldeído-3-alcoxi-4- hidroxi (tio) xantonas que podem ser obtidos de 3-alcoxi-4- hidroxi (tio) xantonas com a adição de um agente formilante, como por exemplo hexametilenoetramina num solvente como ácido (trifluoro) acético . A reação deve ser efectuada a refluxo por 18 horas, arrefecida e após adição de uma solução aquosa de ácido clorídrico ser aquecida a refluxo por 15 minutos. A mistura reacional deve ser filtrada e o sólido assim obtido pode ser sujeito a alquilação usando um agente alquilante, como por exemplo sulfato de metilo, na presença de uma base, como por exemplo carbonato de potássio. A reação deve ser efectuada à temperatura de refluxo. 3-Alcooxi-4-hidroxi (tio) xantonas deverão ser obtidas por desmetilação selectiva de 3,4- dialcooxil (tio) xantona, usando com agente desalquilante o cloreto de alumínio, num solvente como o tolueno anidro, por um período de 30 minutos, a refluxo. A mistura reaccional deverá ser vertida sobre gelo picado e proceder-se à sua extracção com clorofórmio, seguida de carbonato de sódio e novamente clorofórmio. As fases orgânicas devem ser reunidas, secas com sulfato de sódio anidro e evaporadas à secura. Por cristalização do clorofórmio deverá obter-se 3- alcooxi-4-hidroxi (tio) xantonas.

Os compostos de fórmula geral 1 em que R1 representa um metil-halogénio podem, por exemplo, ser obtidos por reacção de 4-hidroxi (tio) xantonas com ácido clorídrico ou ácido bromídrico, na presença de um excesso de formaldeído. A mistura reaccional é mantida em agitação, durante uma noite, à temperatura ambiente. O composto que insolubiliza no meio reaccional é filtrado, lavado com água e cristalizado do acetato de etilo.

Os compostos de fórmula geral 1 em que R2 e R3 representam 2 , 2-dimetil-di-hidropirano e em que pelo menos um ou mais de R1, R4-R8 representa halogéneo podem ser obtidos por reação de uma pirano (tio) xantona com um dador de halogéneo, como por exemplo N-bromosuccinimida, devendo este estar em excesso, em acetato de amónio e num solvente inerte como por exemplo metanol. A reação deve ser efectuada à temperatura ambiente. Os compostos são extraídos com solvente orgânico apolar, preferencialmente com o éter dietílico. A solução orgânica obtida é lavada com água, seca com sulfato de sódio anidro e filtrada. O solvente é evaporado e se necessário, o produto assim obtido pode

ser sujeito a métodos de purificação como por exemplo usando placas cromatográficas de sílica, sendo os compostos da presente invenção eluídos com diferentes gradientes de n-hexano : acetato de etilo.

Os compostos de fórmula geral 1 podem ser obtidos por reação de uma pirano (tio) xantona com uma amina substituída, primária ou secundária, devendo a amina estar em excesso, juntamente com um agente basificante, por exemplo, carbonato de potássio em proporções estequiométricas, e um catalizador em quantidade catalítica, como o iodeto de cobre. Os compostos devem ser dissolvidos ou suspensos em solvente inerte, preferencialmente a N-metil-pirrolidona (NMP). A reação deve ser efetuada num vaso reator aberto de microondas. A mistura reacional sob agitação é irradiada a 400 W por 50 min a temperaturas finais de 200-205°C. A mistura reacional é filtrada e os compostos extraídos com solvente orgânico apolar, preferencialmente com o éter dietílico. A solução de NMP poderá ser basificada previamente à extração para compostos preferidos da fórmula 1. A solução orgânica obtida é lavada com água, seca com sulfato de sódio anidro e filtrada. O solvente é evaporado e se necessário, o produto assim obtido pode ser sujeito a métodos de purificação como por exemplo usando colunas cromatográficas de sílica (GraceResolv), sendo os compostos da presente invenção eluídos com diferentes gradientes de n-hexano : acetato de etilo. Os sais dos compostos preferidos da fórmula geral 1 são obtidos por adição de um ácido, preferencialmente ácido clorídrico, a uma solução orgânica dos compostos isolados, preferencialmente de éter dietílico O sal formado é filtrado, lavado com solvente orgânico e seco.

Os compostos de fórmula geral 1 em que RI representa uma alquilamina podem, por exemplo, ser obtidos por aminação redutiva de 1-carbaldeído (tio) xantonas utilizando como solvente metanol, por adição de uma alquilamina, ácido acético e um agente redutor como o cianoborohidreto em suporte sólido, deve ficar em agitação à temperatura ambiente durante uma noite. A mistura reacional deverá ser filtrada, e submetida a uma purificação por cromatografia de troca iônica catiônica (cartuchos Discovery® DSC-SCX SPE). Os compostos de fórmula geral 1 em que RI representa uma alquilamina podem também ser obtidos por reação de 4-hidroxi (tio) xantonas, com formaldeído e uma alquilamina, na presença de um solvente como o metanol, em refluxo por 10 horas. A suspensão final deverá ser filtrada e o sólido lavado com metanol. O composto será obtido por cristalização do acetato de etilo.

Os novos derivados de fórmula geral 1 da Fig. 1 podem ser também ser obtidos por reações de substituição nucleofílica aromática no núcleo da (tio)xantona por métodos que se encontram descritos (Shargui et al., J Iran Chem Soc, 2008, 5, S33-S39, Xu e Wolf. Chem Comm Chem Commun, 2009, 1715- 1717).

Ainda outro aspeto da invenção diz respeito ao emprego de compostos de fórmula geral 1 indicada na Fig. 1 como inibidores da interação p53-MDM2.

Em trabalhos que se encontram descritos, foi analisado o efeito antiproliferativo de uma biblioteca de derivados xantônicos a nível de diversas linhas tumorais, nomeadamente das linhas celulares de adenocarcinoma da mama MCF7 e MDA-MB-231. Os resultados obtidos revelaram que compostos preferidos da fórmula geral 1 indicada na Fig. 1, nomeadamente a 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H- pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1), são inibidores potentes da proliferação da linha MCF7, apresentando um efeito muito inferior na linha MDA-MB-231 (Paiva et al., Med. Chem. Res. 2011, DOI 10.1007/s00044-011-9562-z; Castanheiro et al. Bioorg Med. Chem., 2007, 15:6080-6088). Com base nas principais diferenças celulares entre estes dois tipos de adenocarcinomas da mama, estes resultados mostraram que a 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1) era mais potente em linhas tumorais com uma forma nativa de p53 e com sobreexpressão da proteína MDM2 (MCF7) do que em linhas tumorais com uma forma mutada de p53 (MDA-MB-231). Com o intuito de se elucidar o mecanismo molecular de ação de compostos de fórmula geral 1 indicada na Fig. 1, procedeu-se à avaliação do efeito destes compostos a nível da interação p53-MDM2. Com este objetivo, realizou-se um ensaio de transativação com células de levedura que co-expressavam as proteínas humanas p53 (forma nativa) e MDM2, implementados para a pesquisa em larga escala de inibidores da interação p53-MDM2 conforme descrito (Andreotti et al., Plos One 2011, 6: e20643). Neste ensaio, a proteína MDM2, tal como o observado em células de mamíferos, inibe a atividade transcricional da proteína p53 (Fig. 2). Um inibidor da interação p53-MDM2 caracteriza-se por ser um composto capaz de inibir o efeito da proteína MDM2, reestabelecendo a atividade transcricional da proteína p53. Neste ensaio, tal como o inibidor da interação p53-MDM2 comercial, nutlina-3A, compostos preferidos da fórmula geral 1 indicada na Fig. 1 que incluem a 3, 4-di-hidro-12- hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1), a 1-carbaldeído-3, 4-dimetoxixantona, a 1,2-di- hidroxixantona, a 1- { [ 2- (dietilamino) etil ] amino } -4-propoxitioxantona, a (2R, 3R) -2- (hidroximetil) -3- (8-metoxi- 2, 2-dimetilcroman- 6-il) -2H- [1, 4] dioxino [2, 3-c] xanten-7 (3H) - ona, a 1-cloro-4-propoxi-9H-tioxanten-9-ona, a 1- (isobutilamino) -4-propoxi-9H-tioxanten-9-ona e a 1- (isopropilamino) -4-propoxi-9H-tioxanten-9-ona e seus sais de cloridrato, nomeadamente, foram capazes de reverter o efeito inibitório da proteína MDM2 a nível da atividade da proteína p53. Os resultados obtidos nestes ensaios indicaram, assim, que a 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2- dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1) era um potencial inibidor da interação p53-MDM2 de potência semelhante à do composto nutlina-3A. Com o intuito de se confirmar os resultados obtidos no ensaio de pesquisa com células de levedura, procedeu-se, numa segunda fase, à análise da atividade em células tumorais humanas. Com este objetivo, realizaram-se ensaios de transativação da proteína p53 em linhas celulares de tumores humanos que expressam a forma nativa da proteína p53 e sobreexpressam a proteína MDM2, nomeadamente em linhas celulares de adenocarcinoma da mama (MCF7) e em linhas celulares de carcinoma de cólon (HCT116 p53<sup>+</sup>). Os resultados obtidos na linha MCF7 confirmaram que a 3,4-di- hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1) reduzia, de forma semelhante ao inibidor nutlina-3A e ao ativador da atividade transcricional da p53 doxorubicina (DOXO), o efeito da proteína MDM2 a nível da atividade transcricional da p53. A nível da linha HCT116 p53<sup>+</sup> verificou-se que o aumento da atividade transcricional da proteína p53 obtido com a 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1) era muito superior ao obtido com o inibidor comercial nutlina-3A. Estes resultados confirmaram que compostos de fórmula geral 1 indicada na Fig. 1, nomeadamente a 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H- pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1) era capaz de inibir a atividade da proteína MDM2 aumentando a atividade transcricional da proteína p53 em células tumorais humanas. O efeito ativador a nível da

atividade transcricional da proteína p53 foi ainda confirmado através da análise dos níveis de expressão celular de proteínas codificadas por genes cuja transcrição é regulada pela proteína p53, como é o caso das proteínas p21 (proteína envolvida no ciclo celular) e Bax (proteína pro-apoptótica), em linhas HCT116 p53<sup>+/+</sup>. Os resultados obtidos mostraram que a 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1) conduzia a um aumento dos níveis celulares destas proteínas, confirmando os resultados dos ensaios de transativação da p53 nesta linha tumoral.

Por último, uma vez que a proteína MDM2 não só inibe a atividade transcricional da proteína p53, como também conduz à sua degradação proteossomal, um inibidor da interação p53-MDM2 deverá conduzir ainda a um aumento dos níveis celulares da proteína p53. Desta forma, analisou-se o efeito da 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1) nos níveis de expressão de p53 em linhas HCT116 p53<sup>+/+</sup>. A 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1) conduziu a um aumento dos níveis proteicos de p53, tal como seria de esperar.

No seu conjunto, os resultados experimentais descritos nesta patente confirmam que compostos de fórmula geral 1 indicada na Fig. 1, que incluem preferencialmente a 3,4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1), a 1-carbaldeído-3, 4-dimetoxixantona, a 1,2-di-hidroxi-xantona, a 1-{ [2-(dietilamino) etil] amino }-4-propoxitioxantona, a (2R, 3R)-2-(hidroximetil)-3-(8-metoxi-2, 2-dimetilcroman-6-il)-2H-[1, 4] dioxino [2, 3-c] xanten-7(3H)-ona, a 1-cloro-4-propoxi-9H-tioxanten-9-ona, a 1-(isobutilamino)-4-propoxi-9H-tioxanten-9-ona e a 1-(isopropilamino)-4-propoxi-9H-tioxanten-9-ona e seus sais de cloridrato, nomeadamente, o cloridrato de 1-(2-(dietilamino) etil) amino)-4-propoxi-9H-tioxanten-9-ona, são inibidores da interação p53-MDM2 tendo a potência da 1-carbaldeído-3, 4-dimetoxixantona e da 1, 2-di-hidroxi-xantona ter sido superior à da nutlina-3A no ensaio da levedura. Apesar de, no geral, a potência da 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1) se ter revelado semelhante à do inibidor comercial nutlina-3A em linhas celulares de carcinoma de cólon (HCT116 p53<sup>+/+</sup>), o composto LEM1 revelou uma potência muito superior à do composto nutlina-3A. Estes resultados indicam que, para alguns tipos de tumores humanos, a 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1), a 1-carbaldeído-3, 4-dimetoxixantona e a 1, 2-di-hidroxi-xantona poderão representar alternativas farmacológicas vantajosas relativamente ao composto nutlina-3A.

Com base no referido, as substâncias da presente invenção apresentam aplicações farmacológicas quer em estudos laboratoriais de processos celulares nos quais a interação p53-MDM2 esteja envolvida, quer como agentes terapêuticos no tratamento de câncros que expressam uma forma nativa da proteína p53.

As substâncias da presente invenção apresentam também vantagens em relação aos inibidores comerciais descritos anteriormente no que concerne ao método de obtenção. As substâncias da presente invenção são obtidas por um processo sintético mais eficiente comparativamente à dos inibidores descritos, como nutlina-3A e RITA, isto é, a sua síntese processa-se num número menor de etapas (em alguns exemplos, efetuada em apenas duas etapas a partir das respetivas matérias-primas comercialmente disponíveis). Adicionalmente, algumas substâncias da presente invenção são isoladas na forma de sais por um processo de purificação em condições ambientais favoráveis, com rendimentos que chegam aos 85-6.

Desta forma, um outro aspeto da invenção diz respeito ao processo para a preparação de uma composição farmacêutica consistindo na combinação de pelo menos um composto de fórmula geral 1 indicada na Fig. 1 com um veículo ou excipiente inerte. A composição farmacêutica pode consistir na combinação de pelo menos um composto de fórmula geral 1 indicada na Fig. 1 com um agente anticancerígeno e um veículo ou excipiente inerte.

A composição farmacêutica pode ser apresentada sob a forma de injetáveis, comprimidos, cápsulas, cremes com um veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável. Os adjuvantes podem corresponder a uma ou mais substâncias que atuam como diluentes, aromatizantes, edulcorantes, solubilizantes, lubrificantes, agentes suspensores, ligantes ou agentes desagregantes e pode ainda corresponder a um agente incapsulante.

Os compostos da presente invenção podem ser administrados internamente, por exemplo, oralmente, parenteralmente, intraperitonealmente, ou extracorporalmente, por exemplo, topicamente.

A presente invenção descreve (tio) xantonas de fórmula geral 1 e seus análogos com atividade inibidora da interação p53-MDM2 e/ou na interação p53-MDMX.

O efeito antiproliferativo de uma biblioteca de derivados (tio) xantônicos foi analisado a nível de diversas linhas tumorais, nomeadamente das linhas celulares de adenocarcinoma da mama MCF7 e MDA-MB-231, pelo ensaio de determinação do crescimento celular com sulforodamina-B. Os resultados obtidos revelaram que compostos preferidos da fórmula geral 1 indicada na Fig. 1, nomeadamente a 3,4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1), a 1-carbaldeído-3, 4-dimetoxixantona, a 1,2-di-hidroxi-xantona, a 1-{ [2-(dietilamino) etil] amino }-4-propoxitioxantona e a (2R, 3R)-2-(hidroximetil)-3-(8-metoxi-2, 2-dimetilcroman-6-il)-2H-[1, 4] dioxino [2, 3-c] xanten-7(3H)-ona são inibidores potentes da proliferação das linhas MCF7, apresentando nomeadamente a 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1) um valor de IC<sub>50</sub> (concentração necessária para produzir 50% de inibição do crescimento celular) de 5,3 ± 0,7 µM após 48 horas de tratamento; em oposição, a 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1) apresentou um efeito muito inferior na linha MDA-MB-231 com um valor de IC<sub>50</sub> de 29,0 ± 3,6 µM, após 48 horas de tratamento, cerca de seis vezes superior ao obtido nas linhas MCF7.

(Paiva et al., Med. Chem. Res. 2011, DOI 10.1007/s00044-011-9562-z). Apesar de no trabalho de Paiva et al. (2011) se tentar explicar esta diferença de efeitos da 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona

(LEM1) através da presença e ausência de recetores de estrogénio nas linhas MCF7 e MDA-MB-231 respetivamente, verifica-se que ao contrário da linha MCF7 que apresenta uma forma nativa da proteína p53 e uma sobreexpressão da proteína MDM2, a linha MDA-MB-231 apresenta uma forma mutada da proteína p53. Desta forma, na presente invenção considera-se que uma explicação possível para esta diferença de efeitos da 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1) poderá assentar numa possível ativação da proteína p53 pela 3,4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1), através da inibição da sua interação com o inibidor endógeno MDM2 sobreexpresso nas linhas MCF7.

Com o objetivo de se elucidar o mecanismo molecular de ação da 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1), procedeu-se à avaliação do efeito deste composto a nível da interação p53-MDM2. Numa primeira fase, realizaram-se ensaios de transativação com células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* que co-expressavam as proteínas humanas p53 (forma nativa) e MDM2, implementados para a pesquisa em larga escala de inibidores da interação p53-MDM2 (Andreotti et al. , Plos One 2011, 6: e20643) (Fig. 2) . Neste ensaio, a proteína MDM2, tal como observado em células de mamíferos, inibe a atividade transcripcional da proteína p53.

Neste ensaio de transativação da proteína p53 em levedura foi confirmado que a 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1), de forma semelhante ao inibidor comercial nutlina-3A, na concentração de 10  $\mu$ M, reduzia o efeito inibidor da proteína MDM2 a nível da atividade transcripcional da proteína p53 (Fig. 3) .

No seu conjunto, os resultados obtidos com os ensaios de pesquisa em levedura indicaram que a 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1) era um potencial inibidor da interação p53-MDM2 de potência semelhante à do composto comercial nutlina-3A.

Numa segunda fase, procedeu-se à confirmação da atividade da 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1) como inibidor da interação p53-MDM2 em linhas celulares tumorais humanas. Com este objetivo realizaram-se ensaios de transativação da proteína p53 em linhas celulares de tumores humanos que expressavam a forma nativa da proteína p53 e sobreexpressavam a proteína MDM2, nomeadamente de adenocarcinoma da mama (MCF7) e em linhas celulares de carcinoma de cólon (HCT116 p53<sup>+</sup>), transfetadas com o gene artificial pG13 (utilizado como elemento resposta) . O efeito dos compostos 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1) e nutlina-3A, na concentração de 10  $\mu$ M, a nível da atividade transcripcional da proteína p53 em linhas MCF7 e HCT116 (p53<sup>+</sup> e p53<sup>-</sup>) foi avaliado após 48 horas de tratamento. Os resultados obtidos na linha MCF7 confirmaram que a 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1) reduzia, de forma semelhante ao observado com o composto nutlina-3A e o ativador da atividade transcripcional da p53 doxorubicina (DOXO) , o efeito inibidor da proteína MDM2 a nível da atividade transcripcional da proteína p53 (Fig. 4) .

Com a linha HCT116 p53<sup>+</sup>, verificou-se que o aumento da atividade transcripcional da proteína p53 obtido com a 3,4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1) foi muito ao obtido com o inibidor comercial nutlina-3A (Fig. 5) . A especificidade do efeito da 3,4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1) a nível da interação p53-MDM2 em linhas HCT116 p53<sup>+</sup> foi confirmada testando-se o composto numa linha celular sem p53 HCT116 p53<sup>-</sup>. Nestas linhas, o aumento da atividade transcripcional da proteína p53 foi completamente anulado (Fig. 5) .

O aumento da atividade transcripcional da proteína p53 pela 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1) foi ainda confirmado através da análise dos níveis de expressão celular de proteínas codificadas por genes cuja transcrição é regulada pela proteína p53, como é o caso das proteínas p21 e Bax, em linhas HCT116 p53<sup>+/+</sup> tratadas com 10  $\mu$ M da 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1) . Os resultados obtidos demonstraram que após 8 horas de tratamento, a 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1) induzia um aumento dos níveis celulares das proteínas p21 (Fig. 6A) e Bax (Fig. 6B) , confirmando os resultados dos ensaios de transativação da p53 em linhas HCT116 p53<sup>+/+</sup>.

Uma vez que a proteína MDM2 não só bloqueia a atividade transcripcional da proteína p53 como também conduz à sua degradação proteossomal , um inibidor da interação p53-MDM2 deverá também causar um aumento dos níveis celulares da proteína p53. Desta forma, analisou-se o efeito da 3,4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1) nos níveis proteicos de p53 em linhas tumorais HCT116 p53<sup>+/+</sup>. Os resultados descritos mostram que a 3,4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1), na concentração de 10  $\mu$ M, conduz a um aumento acentuado dos níveis proteicos de p53 após 16 horas de tratamento (Fig. 7) .

No seu conjunto, os resultados experimentais apresentados na presente invenção comprovam que a 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1) é um potente inibidor da interação p53-MDM2 com aplicações farmacológicas em estudos laboratoriais de processos celulares nos quais a interação p53-MDM2 esteja envolvida, ou como agente terapêutico no tratamento de cancro que expressam uma forma nativa da proteína p53. Os resultados obtidos indicam ainda que apesar dos compostos 3,4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1) e nutlina-3A serem inibidores da interação p53-MDM2 com potências semelhantes em alguns tipos de cancro (como o da mama) , as suas actividades podem diferir noutros tipos de cancro, como acontece no caso do tumor do cólon. A maior potência da 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1) no tumor do cólon indica que, neste tipo de tumor, a 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1) pode representar uma alternativa farmacológica vantajosa ao composto nutlina-3A.

As experiências apresentadas na presente invenção serão descritas abaixo de forma mais detalhada.

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o programa SigmaStat 3.5. As diferenças entre médias foram testadas utilizando o teste t de Student desemparelhado ( $P < 0.05$ ).

#### Exemplos

Para uma mais fácil compreensão da invenção descrevem-se de seguida exemplos de realizações preferenciais do invento, as quais, contudo, não pretendem, limitar o objecto da presente invenção.

Exemplo 1: Síntese da 1-carbaldeído-3, 4-dimetoxixantona. A uma solução de l-carbaldeído-4-hidroxi-3-metoxixantona

(0,67 mmol) em acetona (10 mL) foi adicionado carbonato de potássio (1,2 mmol) e seguidamente sulfato de metilo (0,12 mL). Aqueceu-se a refluxo, com agitação magnética, durante 6 horas. Após reação, filtrou-se a suspensão, lavou-se o resíduo com acetona e evaporou-se o solvente. O resíduo obtido foi dissolvido em éter etílico (20 mL), e lavado sucessivamente com hidróxido de sódio a 5% (3x15 mL) e água

(2x15 mL). Após desidratação com sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente obtendo-se um resíduo oleoso castanho. O resíduo foi cristalizado do acetato de etilo-n-hexano, obtendo-se cristais branco-acastanhados de 1-carbaldeído-3, 4-dimetoxixantona (80%).

IV umax(cm<sup>-1</sup>) (KBr): 3433, 2927, 1684, 1649, 1580, 1464, 1320, 1132, 758; IH RMN (CDC13): 511,20 (s, IH, CHO), 8,

,30 (dd, IH, J= 8,0Hz e J= 1,6Hz, H-8), 7,76 (ddd, IH, J= 8,5Hz, J= 7,5Hz e J= 1,6Hz, H-6), 7,59 (d, IH, J= 8,5Hz, H-5), 7,54 (s, IH, H-2), 7,42 (dd, IH, J= 7,5Hz e J= 7,5Hz, H-7), 4,10 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4,04 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>)ppm; 13C RMN (CDC13): δ 192,7 (CHO); 177,8 (C-9), 156,3 (C-3), 155,4 (C-4b), 150,8 (C-4a), 140,6 (C-4), 134,7 (C-6), 133,5 (C-1), 126,7

(C-8), 124,4 (C-7), 122,0 (C-8b), 117,8 (C-5), 116,1 (C-8a),

108,4 (C-2)ppm; EM (EI): 284 (100), 299 (45), 342 (35)m/z; Espectrometria de massa de alta resolução (ESI): 388,394452 m/z.

Exemplo 2 : Síntese da 5-bromo-12-hidroxi-2, 2-dimetil-3, 4- di-hidropirano [3, 2-b] xant- 6 (2H) -ona .

Uma mistura de 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H- pirano [3, 2-b] xant-6-ona (0,132 mmol), N-bromosuccinimida (0,276 mmol) e acetato de amónio (0,013 mmol) em metanol (10 mL), foi submetida a agitação, à temperatura ambiente por um período de 5 horas. O produto bruto da reação foi purificado por cromatografia preparativa (SiO<sub>2</sub>; hexano/acetato de etilo, 5:5). Por cristalização com acetona foram obtidos cristais brancos referentes ao composto (10%, 5mg): IH RMN (CDC13): δ 8,28 (IH, dd, J = 7,97 e 1,57 Hz, H-7), 7,78 (IH, ddd, J = 7,75, 6,98 e 1,67 Hz, H-9), 7,70 (IH, dd, J = 8,3 e 0,96 Hz, H-10), 7,50 (IH, ddd, J = 7,50, 7,02 e 1,24 Hz, H-8), 2,59 (2H, t, J = 6,57, H-4), 1,82 (2H, t, J = 6,60, H-3), 1,43 (6H, s, H-la e H-lb) ppm; 13C RMN (CDC13): 155,0 (C-10a), 154,4 (C-12a),

151,5 (C-11a), 135,1 (C-9), 126,7 (C-7), 126,4 (C-8), 119,8 (C-5a), 119,1 (C-6a), 117,2 (C-5), 78,8 (C-2), 31,3 (C-3), 26,7 (C-4), 16,6 (C-la e C-lb) ppm.

Exemplo 3: Análise da atividade transcricional da proteína p53: ensaio da luciferase na levedura.

Para as experiências de transativação utilizou-se uma estirpe diploide contendo os genes repórter yLFM-PUMA

(Firefly luciferase associada ao gene PUMA, induzido pela proteína p53) e RFM-M2 (Renilla luciferase, controlo) integrados cromossómicamente como descrito em (Andreotti et al., PLoS ONE 2011, 6:e20643). Esta levedura foi transformada pelo método do acetato de lítio com os plasmídeos que codificam para as proteínas humanas p53

(forma nativa) e MDM2 e a seleção das leveduras co-transformadas realizou-se através do crescimento das células em meio mínimo seletivo, como acima descrito.

Para os ensaios de luciferase, as células de levedura foram cultivadas em meio seletivo de indução e incubadas em placas de 96 poços, na presença de 10 µM dos compostos 3,4- di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xant- 6-ona (LEM1) ou nutlina-3A, ou apenas na presença do solvente (0,1% DMSO). A atividade transcricional da proteína p53 foi determinada medindo a luminescência das culturas na presença de um substrato luminescente da luciferase

(Firefly luciferase Bright Glo; Promega). A atividade da luciferase controlo (Renilla) foi determinada utilizando o substrato Luciferase Assay Reagent (Promega) seguida da adição do tampão Stop&Glow (Promega). A luminescência, expressa em unidades relativas de luz (URL), foi medida utilizando-se um leitor de placas.

Exemplo 4 : Análise da atividade transcricional da proteína p53: ensaio da luciferase em linhas celulares. A análise da atividade transcricional da proteína p53 através do ensaio da luciferase realizou-se em linhas celulares de adenocarcinoma da mama MCF7 ( InterLab Celi Line Collection, ICLC, Génova, Itália) e nas linhas celulares de carcinoma do cólon HCT116 (p53<sup>+/+</sup>) e nas suas derivadas HCT116 (p53<sup>-/-</sup>) oferecidas por B. Vogelstein (The Johns Hopkins Kimmel Câncer Center, Baltimore, Maryland, USA). As células foram transfetadas com um plasmídeo yLFM-pG13 (Firefly luciferase associada ao gene artificial pG13, induzido pela proteína p53) e RFM-M2

(Renilla luciferase, controlo) com aproximadamente 80% de confluência utilizando os reagentes de transfeção do Myrus LT-1 (Tema Ricerca, Milão, Itália). Após transfeção, as linhas celulares foram incubadas na presença de 1,5 µM de doxorubicina (DOXO), 10 µM de nutlina-3A ou 3, 4-di-hidro- 12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xant-6-ona

(LEM1), ou apenas do solvente (água ou DMSO) durante 16 horas. As células foram recolhidas e procedeu-se ao ensaio de luciferase de forma semelhante ao descrito em células de levedura .

Exemplo 5: Avaliação dos níveis celulares das proteínas p53, p21 e Bax em linhas tumorais humanas

Após incubação das linhas celulares de carcinoma de cólon (HCT116 p53<sup>+/+</sup>) com 10 µM de 3, 4-di-hidro-12-hidroxi-2, 2-dimetil-2H, 6H-pirano [3, 2-b] xanten-6-ona (LEM1) ou apenas na presença do solvente (DMSO) durante 8 e 16 horas, procedeu-se à extração proteica. A deteção das proteínas realizou-se pela técnica de Western blot utilizando os anticorpos monoclonais de rato anti-p53 (DO-1), policlonal de coelho anti-p21 (C19) e monoclonal de coelho anti-Bax. Os anticorpos secundários encontravam-se conjugados a uma peroxidase de rábano que após adição de um substrato quimioluminescente permitiu a deteção das proteínas por exposição a um filme fotográfico. A intensidade das bandas foi quantificada utilizando o programa Bio-Profil Bio-ID++ e normalizada em relação a uma proteína padrão (actina) .

Exemplo 6: Avaliação do efeito de outros compostos de formula geral 1 na inibição da interação p53-MDM2, utilizando o modelo da levedura. O composto nutlina-3A foi utilizado como controlo positivo. O efeito obtido com as leveduras que expressam apenas a proteína p53 foi considerado como 100%. Os resultados correspondem à média ± erro padrão da média de cinco experiências independentes.

A presente invenção não é, naturalmente, de modo algum restrito às realizações descritas neste documento e uma pessoa com conhecimentos médios da área poderá prever muitas possibilidades de modificação da mesma sem se afastar da ideia geral da invenção, tal como definido nas reivindicações .

As realizações preferenciais acima descritas são obviamente combináveis entre si. As seguintes reivindicações definem adicionalmente realizações preferenciais da presente invenção .

## CITAÇÕES NÃO PROVENIENTES DE PATENTES

	Referência
1	ANDREIA ET AL. BIOCHEM PHARMACOL vol. 83, no. 1, 2012, pages 57 - 68
2	* ANDREIA PALMEIRA ET AL: " <i>Insights into the In Vitro Antitumor Mechanism of Action of a New Pyranoxanthone</i> ", CHEMICAL BIOLOGY & DRUG DESIGN, vol. 76, no. 1, 4 July 2010 (2010-07-04), pages 43-58, XP055062309, ISSN: 1747-0277, DOI: 10.1111/j.1747-0285.2010.00978.x
3	ANDREOTTI ET AL. PLOS ONE vol. 6, 2011, page E20643
4	AZEVEDO, C. M.; AFONSO, C. M.; PINTO, M. M. CURRENT ORGANIC CHEMISTRY vol. 16, no. 23, 2012, pages 2818 - 2867
5	BERNAL ET AL. CANCER CELL vol. 18, 2010, pages 411 - 422
6	BERYOZKINA ET AL.: ' <i>J Clinical Oncology</i> ' 2011 ASCO ANNUAL MEETING PROCEEDINGS (POST-MEETING EDITION vol. 29, 15 May 2011, page 3039
7	CASTANHEIRO ET AL. BIOORG MED. CHEM. vol. 15, 2007, pages 6080 - 6088
8	CHEOK ET AL. NAT REV CLIN ONCOL vol. 8, 2011, pages 25 - 37
9	DI ET AL. CURR CANCER DRUG TARGETS 2011,
10	DI ET AL. CURR CANCER DRUG TARGETS vol. 15, 2011,
11	DICKENS ET AL. SEMIN CANCER BIOL vol. 20, no. 1, 2010, pages 10 - 8
12	* EDUARDA G. R. FERNANDES ET AL: " <i><sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR Spectroscopy of mono-, di-, tri- and tetrasubstituted xanthenes</i> ", MAGNETIC RESONANCE IN CHEMISTRY, vol. 36, no. 4, 1 April 1998 (1998-04-01), pages 305-309, XP055062007, ISSN: 0749-1581, DOI: 10.1002/(SICI)1097-458X(199804)36:4<305::A ID-OMR193>3.0.CO;2-N
13	GRINKEVICH ET AL. CANCER CELL vol. 15, 2009, pages 441 - 453
14	* IOANNIS K. KOSTAKIS ET AL: " <i>Synthesis, cytotoxic activity, NMR study and stereochemical effects of some new pyrano[3,2-b]thioxanthen-6-ones and Pyrano[2,3-c]thioxanthen-7-ones</i> ", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 9, no. 11, 1 November 2001 (2001-11-01), pages 2793-2802, XP055062310, ISSN: 0968-0896, DOI: 10.1016/S0968-0896(01)00130-4
15	JOHNSTON; DAVIS CHEM SCI vol. 2, 2011, pages 1076 - 1079
16	KHOURY ET AL. MED CHEM COMMUN vol. 2, 2011, pages 246 - 260
17	* KONSTANTINOS GHIRTIS ET AL: " <i>Design and synthesis of some new pyranoxanthenones with cytotoxic activity</i> ", JOURNAL OF HETEROCYCLIC CHEMISTRY, vol. 38, no. 1, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 147-152, XP055062312, ISSN: 0022-152X, DOI: 10.1002/jhet.5570380121
18	LAIN ET AL. CANCER CELL vol. 13, 2008, pages 454 - 463
19	LAU ET AL. ONCOGENE vol. 27, 2008, pages 997 - 1003
20	PAIVA ET AL. MED. CHEM. RES. 2011,
21	SHARGUI ET AL. J IRAN CHEM SOC vol. 5, 2008, pages S33 - S39
22	SOUSA, ME; PINTO MMM CURR MED CHEM vol. 12, 2005, pages 2447 - 2479
23	SPEETJENS ET AL. CLIN CANCER RES vol. 15, 2009, pages 1086 - 1095
24	* VINOD K. AHLUWALIA ET AL: " <i>A convenient synthesis of dihydropyranoxanthenes</i> ", JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, PERKIN TRANSACTIONS 1, 1 January 1983 (1983-01-01), page 1229, XP055062315, ISSN: 0300-922X, DOI: 10.1039/p19830001229
25	* WABO H K ET AL: " <i>Xanthenes and a benzophenone from the roots of Pentadesma butyracea and their antiproliferative activity</i> ", PHYTOCHEMISTRY LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 3, no. 2, 11 June 2010 (2010-06-11), pages 104-107, XP027045531, ISSN: 1874-3900 [retrieved on 2010-05-11]
26	WASSERMAN: ' <i>Biomarkers and Personalized Medicine</i> ' 2ND ANNUAL CMOD CANADIAN BIOMARKERS AND SURROGATE ENDPOINTS MEETING 17 May 2010,
27	* WEN-BO XIN ET AL: " <i>Two Unusual Phenolic Substances and One New Xanthone from Hypericum sampsonii</i> ", HELVETICA CHIMICA ACTA, vol. 94, no. 4, 11 April 2011 (2011-04-11) , pages 686-692, XP055062307, ISSN: 0018-019X, DOI: 10.1002/hlca.201000281
28	XU E WOLF CHEM COMM CHEM COMMUN 2009, pages 1715 - 1717
29	ZHAO ET AL. CELL CYCLE vol. 9, 2010, pages 1847 - 55

\* Citado pelo examinador

## CLASSIFICAÇÕES

Classificação Internacional	<a href="#">C07D311/86</a> , <a href="#">A61K31/352</a> , <a href="#">A61P35/00</a>
Classificação Cooperativa	<a href="#">A61K31/382</a> , <a href="#">C07D311/86</a> , <a href="#">A61K31/352</a>

**EVENTOS LEGAIS**

<b>Data</b>	<b>Código</b>	<b>Evento</b>	<b>Descrição</b>
4 Set 2013	121	Ep: the epo has been informed by wipo that ep was designated in this application	<b>Ref document number:</b> 13713497 <b>Country of ref document:</b> EP <b>Kind code of ref document:</b> A1
9 Jul 2014	NENP	Non-entry into the national phase in:	<b>Ref country code:</b> DE
4 Fev 2015	122	Ep: pct app. not ent. europ. phase	<b>Ref document number:</b> 13713497 <b>Country of ref document:</b> EP <b>Kind code of ref document:</b> A1

[Google Página inicial](#) - [Sitemap](#) - [Transferências USPTO em Massa](#) - [Política de Privacidade](#) - [Termos de Utilização](#) - [Acerca do Google Patentes](#) - [Enviar Comentários](#)

Dados fornecidos por IFI CLAIMS Patent Services