



(19)

INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 678086 E

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)

C07C065/36 A A61K031/19 B
C07C065/17 B C07C063/66 B
C07C065/40 B C07C063/49 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) *Data de depósito:* 1993.10.22

(30) *Prioridade:* 1993.01.11 US 3223
1993.03.05 US 27747
1993.04.21 US 52051

(43) *Data de publicação do pedido:*
1995.10.25

(45) *Data e BPI da concessão:*
1999.12.09

(73) *Titular(es):*

LIGAND PHARMACEUTICALS INC.
9393 TOWNE CENTRE DRIVE, SUITE 100 SAN DIEGO, CA 92121
US

(72) *Inventor(es):*

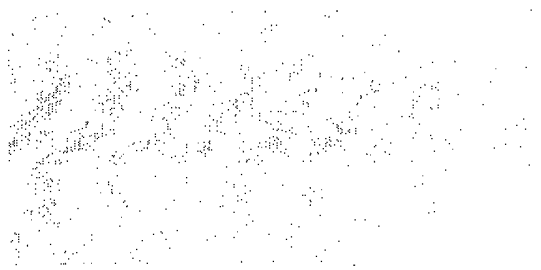
MARCUS F. BOEHM US
RICHARD A. HEYMAN US
LIN ZHI US
STACIE CANAN KOCH US

(74) *Mandatário(s):*

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* COMPOSTOS COM SELECTIVIDADE PARA RECEPTORES DE RETINÓIDES X

(57) *Resumo:*



DESCRIÇÃO

“Compostos com selectividade para receptores de retinóides X”

CAMPO DO INVENTO

Este invento refere-se a receptores intracelulares e aos seus ligandos. Mais especificamente, este invento refere-se a compostos com actividade selectiva para receptores específicos de ácido retinóico e a métodos para o uso destes compostos.


ANTECEDENTES DO INVENTO

Reconhece-se, desde há muito, que o metabolito da vitamina A, o ácido retinóico, induz um largo espectro de efeitos biológicos. Também se verificou que uma variedade de análogos estruturais do ácido retinóico, que foram sintetizados eram bioactivos. Alguns, como Retin-A[®] (marca registada de Johnson & Johnson) e Accutane[®] (marca registada de Hoffmann-LaRoche), têm utilidade como agentes terapêuticos no tratamento de várias condições patológicas. Os metabolitos da vitamina A e os seus análogos sintéticos são aqui designados colectivamente por “retinóides”.

Verificou-se que os retinóides sintéticos mimetizam muitas das acções farmacológicas do ácido retinóico. Contudo o largo espectro de acções farmacológicas do ácido retinóico não é reproduzido na totalidade por todos os retinóides sintéticos bioactivos.

Os profissionais da medicina têm vindo a ficar muito interessados nas aplicações médicas dos retinóides. De entre os seus usos aprovados pelo FDA encontra-se o tratamento de formas graves de acne e psoríase. Existe, também, um grande conjunto de provas de que estes compostos podem ser usados para parar e, em certa medida, inverter os efeitos de danos na pele originados por exposição solar prolongada. Existem outras provas de que estes compostos podem ser úteis no tratamento de uma variedade de cancros graves, incluindo melanoma, cancro cervical, algumas formas de leucemia e carcinomas das células basais e escamosas. Os retinóides também mostraram uma capacidade de serem eficazes no tratamento de lesões celulares pré-malignas, tais como leucoplasia oral e na prevenção da ocorrência de doenças malignas.

O uso dos retinóides está associado a um certo número de efeitos secundários significativos. Os mais graves consistem em, como uma classe, eles se encontrarem entre os mais potentes teratógenos conhecidos. Os teratógenos são compostos que provocam graves



defeitos congénitos durante períodos específicos de exposição fetal. Outros efeitos secundários incluem irritação dos tecidos tratados, que pode ser tão grave que os pacientes não conseguem tolerar o tratamento.

Foram realizadas várias pesquisas para a elucidação das relações estrutura-actividade que governam as capacidades dos retinóides sintéticos em induzirem as várias consequências farmacológicas da exposição ao ácido retinóico. Contudo, isto tem sido uma tarefa difícil, uma vez que os ensaios disponíveis aos investigadores têm sido bioensaios realizados em animais intactos ou em tecidos isolados. As limitações técnicas têm, frequentemente, imposto o uso de diferentes espécies animais, pequenas, para diferentes ensaios. A interpretação dos resultados tem sido complicada por possíveis efeitos farmacocinéticos e metabólicos e possíveis diferenças entre espécies nos receptores envolvidos. No entanto, foram observadas diferenças claras nos efeitos farmacológicos de vários retinóides sintéticos.

Foi conseguida, em 1988, uma percepção importante relativamente ao mecanismo molecular da transdução do sinal do ácido retinóico. Antes disso, várias proteínas de ligação de retinóides, de elevada abundância celular, tinham sido incorrectamente consideradas como os receptores de transdução do sinal para o ácido retinóico. Em 1988, mostrou-se que um membro da superfamília do receptor intracelular esteróide/hormona tiróide (Evans, *Science*, 240:889-95 (1988)) transduzia um sinal de ácido retinóico (Giguere et al., *Nature*, 330:624-29 (1987); Petkovich *et al.*, *Nature*, 330:444-50 (1987)). Esta verificação inesperada relacionou o ácido retinóico com outras hormonas não peptídicas, e elucidou o mecanismo dos efeitos do ácido retinóico na alteração da função celular. É agora conhecido que os retinóides regulam a actividade de duas subfamílias diferentes de receptores intracelulares; os Receptores do Ácido Retinóico (RAR) e os Receptores de Retinóide X (RXR).

O primeiro receptor do ácido retinóico identificado, designado por RAR-alfa, actua na modulação da transcrição de genes alvo, específicos, de um modo que é dependente do ligando, tal como se mostrou ser o caso de muitos dos membros da superfamília do receptor intracelular esteróide/hormona tiróide. O ligando endógeno, de baixa massa molecular, do qual depende a actividade de modulação da transcrição do RAR-alfa é o ácido totalmente *trans*-retinóico. As variações na expressão de genes, mediada pelo receptor do ácido retinóico, resultam em alterações características no fenótipo celular, com as consequências de muitos tecidos manifestarem a resposta biológica ao ácido retinóico. Foram recentemente identificados dois genes adicionais intimamente relacionados com o RAR-alfa e foram designados por RAR-beta e RAR-gama e estão muito relacionados (Brand *et al.*, *Nature*,

332:850-53 (1988); Ishikawa *et al.*, *Mol. Endocrin.*, 4:837-44 (1990)). Na região dos receptores retinóides que se pode mostrar conferir ligação a ligando, as sequências de aminoácidos primárias divergem em menos do que 15% entre os três subtipos ou isoformas de RAR. O ácido totalmente *trans*-retinóico é um ligando natural dos receptores do ácido retinóico (RAR) e é capaz de se ligar a estes receptores com afinidade elevada, resultando na regulação da expressão dos genes. O metabolito retinóide, recém descoberto, ácido 9-*cis*-retinóico é também um ativador dos RAR.

Foi feita, recentemente, uma observação relacionada, mas inesperada, (Mangelsdorf *et al.*, *Nature*, 345:224-29 (1990)), em que outro membro da superfamília do receptor esteróide/tiróide também mostrou ter resposta ao ácido retinóico. Este novo subtipo de receptor retinóide foi designado Receptor de Retinóide X (RXR), porque certos dados anteriores sugeriam que um derivado do ácido totalmente *trans*-retinóico poderia ser o ligando endógeno para o RXR. Tal como com os RAR, sabe-se, também, que os RXR têm, pelo menos três subtipos ou isoformas, nomeadamente RXR-alfa, RXR-beta e RXR-gama, com padrões de expressão únicos, correspondentes. (Mangelsdorf *et al.*, *Genes & Devel.*, 6:329-44 (1992)).

Embora tanto os RAR como os RXR respondam *in vivo* ao ácido totalmente *trans*-retinóico, os receptores diferem em vários aspectos importantes. Primeiro, os RAR e os RXR são significativamente divergentes na estrutura primária (*e.g.* os domínios de ligação de ligando de RAR α e de RXR α têm apenas 27% de identidade de aminoácido). Estas diferenças estruturais reflectem-se nos diferentes graus relativos de capacidade de resposta dos RAR e RXR a vários metabólitos da vitamina A e a retinóides sintéticos. Adicionalmente, são observados padrões distintamente diferentes de distribuição tissular para os RAR e RXR. Por exemplo, em contraste com os RAR, que não são expressos em níveis elevados nos tecidos viscerais, mostrou-se que o ARNm de RXR α é muito abundante no fígado, rim, pulmão, músculo e intestino. Finalmente, os RAR e os RXR têm especificidade diferente para o gene alvo. Por exemplo, foram identificados recentemente elementos de resposta nos genes da proteína de ligação retínica tipo II (CRBP II) e da apolipoproteína AI celulares, que conferem capacidade de resposta ao RXR, mas não ao RAR. Adicionalmente verificou-se recentemente que o RAR reprime a activação mediada por RXR através do elemento de resposta de CRBP II a RXR (Mangelsdorf *et al.*, *Cell*, 66:555-61 (1991)). Estes dados indicam que as duas vias de resposta ao ácido retinóico não são simplesmente redundantes, mas em vez disso, manifestam uma interactividade complexa. Recentemente, Heyman *et al.* (*Cell*, 68:397-406 (1992)) e Levin *et al.* (*Nature*, 355:359-61 (1992)) mostraram, independentemente, que o ácido 9-*cis*-retinóico é um ligando endógeno, natural, dos RXR. Mostrou-se que o ácido 9-*cis*-retinóico se liga e

transactiva os RXR, bem como os RAR e, conseqüentemente, parece actuar como um ligando "bifuncional".

Considerando a natureza relacionada, mas claramente distinta, destes receptores, ligandos que fossem mais selectivos para a subfamília do Receptor de Retinóide X, teriam grande valor para o controlo selectivo de processos mediados por uma ou mais das isoformas de RXR, e proporcionariam a capacidade de controlo independente dos processos fisiológicos mediados pelos RXR. Ligandos que afectam preferencialmente uma ou mais, mas não todas, as isoformas do receptor também oferecem a possibilidade de eficiência terapêutica melhorada, quando usados para aplicações medicinais.

Em EP-A-0206162 e GB-A-2197316 descrevem-se compostos aromáticos bicíclicos e propõem o seu uso para o tratamento de condições dermatológicas. Contudo, estes documentos não fazem referência à actividade selectiva dos compostos descritos sobre os Receptores de Retinóide X.

A totalidade das descrições das publicações e referências anteriormente referidas, e das que adiante se referirem nesta descrição estão aqui incorporadas por referência.

SUMÁRIO DO INVENTO

O presente invento proporciona agora novos compostos aromáticos bicíclicos, que podem ser usados na modulação de processos mediados por um ou mais Receptores de Retinóide X. Mais particularmente, o invento refere-se a compostos que activam selectivamente ou preferencialmente os Receptores de Retinóide X, quando em comparação com os Receptores do Ácido Retinóico. Estes compostos modulam selectivamente processos mediados por Receptores de Retinóide X. Conseqüentemente, este invento também se refere a métodos para a modulação de processos mediados selectivamente por um ou mais Receptores de Retinóide X, quando em comparação com os Receptores do Ácido Retinóico, através do uso dos compostos deste invento. Exemplos de compostos utilizados e que constituem parte deste invento incluem derivados bicíclicos de benzilo, piridinilo, tiofeno, furanilo e pirrolo. Estão também incluídas no âmbito deste invento composições farmacêuticas contendo os compostos descritos. Também estão incluídos métodos de identificação ou de purificação de Receptores de Retinóide X utilizando os compostos deste invento.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

O presente invento pode ser melhor entendido e as suas vantagens avaliadas pelos peritos na arte, por referência aos desenhos em anexo em que :

A Figura 1 apresenta os perfis dose-resposta normalizados mostrando a transactivação de isoformas de RAR e RXR pelo 3-metil-TTNCB

A Figura 2 apresenta os perfis dose-resposta normalizados mostrando a transactivação de isoformas de RAR e RXR pelo ácido totalmente *trans*-retinóico.

A Figura 3 apresenta os perfis dose-resposta normalizados mostrando a transactivação de isoformas de RAR e RXR pelo ácido 9-*cis*-retinóico.

A Figura 4 apresenta os perfis dose-resposta normalizados mostrando a transactivação de isoformas de RAR e RXR pelo 3-metil-TTNEB.

A Figura 5 apresenta os perfis dose-resposta normalizados mostrando a transactivação de isoformas de RAR e RXR pelo 3-bromo-TTNEB.

A Figura 6 apresenta os perfis dose-resposta normalizados mostrando a transactivação de isoformas de RAR e RXR pelo 3-metil-TTNCHBP.

A Figura 7 apresenta os perfis dose-resposta normalizados mostrando a transactivação de isoformas de RAR e RXR pelo 3-metil-TTNEHBP.

A Figura 8 apresenta a inibição da actividade de transglutaminase pelos ácido 9-*cis*-retinóico, ácido totalmente *trans*-retinóico e 3-metil-TTNCB.

A Figura 9 apresenta a Resposta à Dose Tópica, com base no teste em ratinhos Rhino, para o ácido 9-*cis*-retinóico, ácido totalmente *trans*-retinóico, 3-metil-TTNCB e 1,25-di-hidroxi-Vitamina D.

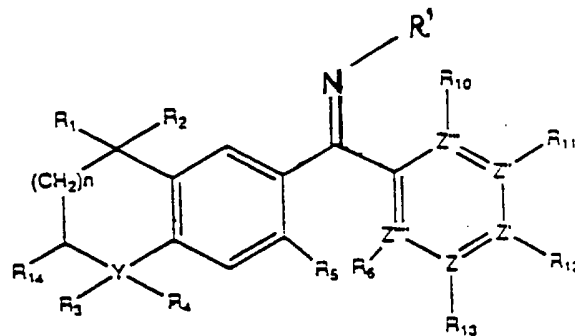
A Figura 10 apresenta o efeito no colesterol HDL de ratazana do ácido totalmente *trans*-retinóico, ácido 9-*cis*-retinóico, 3-metil-TTNCB e 3-metil-TTNEB.

A Figura 11 apresenta o efeito relacionado com a concentração de 3-metil-TTNEB e TTNPB, individualmente, na incorporação de timidina radiomarcada no ADN.

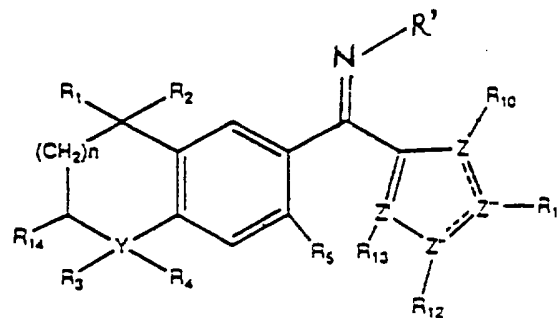
A Figura 12 apresenta o efeito relacionado com a concentração de uma combinação de 3-metil-TTNEB e TTNPB, na incorporação de timidina radiomarcada no ADN.

DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

Este invento descreve compostos ou ligandos semelhantes a retinóide que têm actividade selectiva para membros da subfamília dos Receptores de Retinóide X (RXR), em comparação com membros da subfamília dos Receptores do Ácido Retinóico (RAR). Exemplos destes compostos são derivados bicíclicos de benzilo, piridinilo, tiofeno, furanilo e pirrolo que podem ser representados pelas fórmulas:



ou



nas quais:

R₁ e R₂ representam, cada um independentemente, hidrogénio ou alquilo ou acilo inferior com 1-4 átomos de carbono;

Y representa C, O, S, N, CHOH, CO, SO, SO₂ ou um sal farmacologicamente aceitável;

R₃ representa hidrogénio ou alquilo inferior, com 1-4 átomos de carbono, em que Y é C ou N;

R₄ representa hidrogénio ou alquilo inferior, com 1-4 átomos de carbono, em que Y é C, mas R₄ não existe se Y for N e nem R₃ ou R₄ existem se Y for S, O, CHOH, CO, SO ou SO₂;



R' representa HO, NC, (R₇R₈)N, R₁₇O, R₁₇;

R₅ representa hidrogénio, um alquilo inferior com 1-4 carbonos, halogéneo, nitro, OR₇, SR₇, NR₇R₈, ou (CF)_nCF₃, com a condição de, se em conjunto, R₆, R₁₀, R₁₁, R₁₂ e R₁₃, forem todos hidrogénio e Z, Z', Z'', Z'''', e Z'''' forem todos carbono ou se R' representar HO, então R₅ não é hidrogénio;

R₆, R₁₀, R₁₁, R₁₂, R₁₃, representam, cada um independentemente, hidrogénio, um alquilo inferior com 1-4 carbonos, halogéneo, nitro, OR₇, SR₇, NR₇R₈, ou (CF)_nCF₃ e existem apenas se o Z, Z', Z'', Z''', ou Z'''' em que têm origem for C, ou, cada um independentemente, representa hidrogénio ou um alquilo inferior com 1-4 carbonos se o Z, Z', Z'', Z''', ou Z'''' em que têm origem for N num anel de cinco membros, e em que um de R₆, R₁₀, R₁₁, R₁₂ ou R₁₃, for X;

R₇ e R₈ representam, cada um, independentemente, hidrogénio ou um alquilo inferior com 1-6 carbonos;

R₉ representa um alquilo inferior com 1-4 carbonos, fenilo, alquilo aromático ou q-hidroxifenilo, q-bromofenilo, q-clorofenilo, q-fluorofenilo ou q-iodofenilo, em que q=2-4;

R₁₄ representa hidrogénio, um alquilo inferior com 1-4 carbonos, oxo, hidroxi, acilo com 1-4 carbonos, halogéneo, tiol ou tiocetona;

R₁₇ representa hidrogénio, alquilo inferior com 1-8 carbonos, alcenilo, (incluindo alcenos substituídos com halogéneo, acilo, OR₇ e SR₇), R₉, ácido alquilcarboxílico (incluindo alquilo substituídos com halogéneo, acilo, OR₇ e SR₇), ácido alcenilcarboxílico (incluindo alcenos substituídos com halogéneo, acilo, OR₇ e SR₇), alquilaminas (incluindo alquilo substituídos com halogéneo, acilo, OR₇ e SR₇) e alcenilaminas (incluindo alcenos substituídos com halogéneo, acilo, OR₇ e SR₇);

X é COOH, tetrazolo, PO₃H, SO₃H, CHO, CH₂OH, CONH₂, COSH, COOR₉, COSR₉, CONHR₉ ou COOW em que W é um sal farmacologicamente aceitável e em que X pode ter origem em qualquer C ou N do anel, desde que, contudo, X não possa ser COOH, CHO, CH₂OH, CONH₂, COOR₉, ou COOW quando X é originado de um C na posição 2 ou 6 do anel;

Z, Z', Z'', Z''', e Z'''' representam cada um, independentemente, C, S, O, N ou um sal farmacologicamente aceitável, mas não é O ou S se estiver ligado através de uma ligação



dupla a outro destes Z ou se estiver ligado a outro destes Z que é O ou S, e não é N se estiver ligado através de uma ligação simples a outro destes Z que é N;

$n = 0-3$; e

as linhas a tracejado na segunda estrutura apresentada representam ligações duplas opcionais.

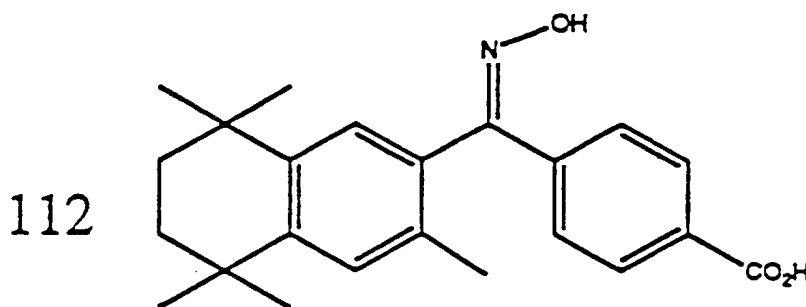
Tal como usado nesta descrição, sais farmacêuticamente aceitáveis incluem, mas não estão limitados a: clorídrico, bromídrico, iodídrico, fluorídrico, sulfúrico, cítrico, maleico, acético, láctico, nicotínico, succínico, oxálico, fosfórico, malónico, salicílico, fenilacético, esteárico, piridina, amónio, piperazina, dietilamina, nicotinamida, fórmico, ureia, sódio, potássio, cálcio, magnésio, zinco, lítio, cinâmico, metilamino, metanossulfónico, pícrico, tartárico, trietilamino, dimetilamino, e tris(hidroximetil)aminometano. São conhecidos pelos peritos na arte sais farmacêuticamente aceitáveis adicionais.

Derivados representativos de acordo com o presente invento incluem os seguintes:

oxima do ácido 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetra-hidro-2-naftil)carboxil]-benzóico, designado por Composto 112, e

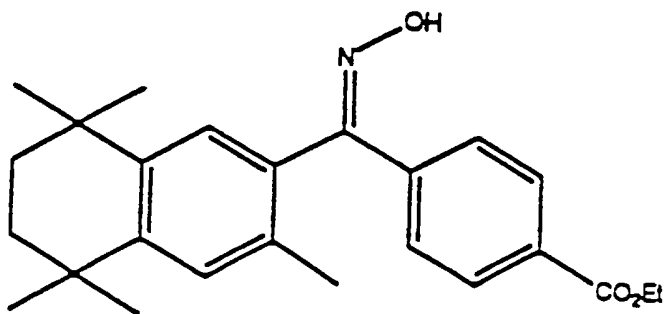
metiloxima do ácido 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetra-hidro-2-naftil)carboxil]-benzóico, designado por Composto 115.

Estruturas representativas para estes compostos são as seguintes:



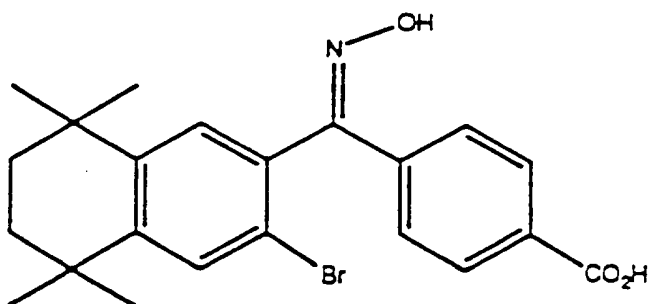
Oxima do ácido 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetra-hidro-2-naftil)carbonil]benzóico

Et-112



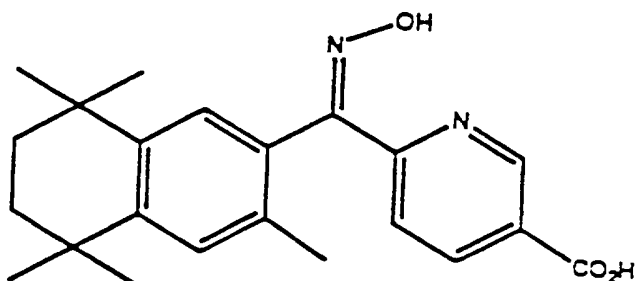
Oxima de etil-4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetra-hidro-2-naftil)carbonil]benzoato

113



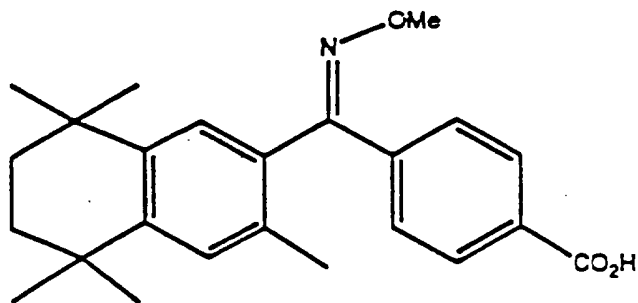
Oxima do ácido 4-[(3-bromo-5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetra-hidro-2-naftil)carbonil]benzóico

114



Oxima do ácido 2-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetra-hidro-2-naftil)carbonil]piridina-5-carboxílico

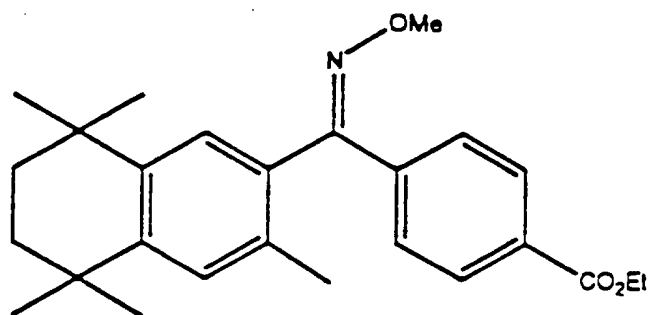
115



Metiloxima do ácido 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetra-hidro-2-naftil)carbonil]benzóico

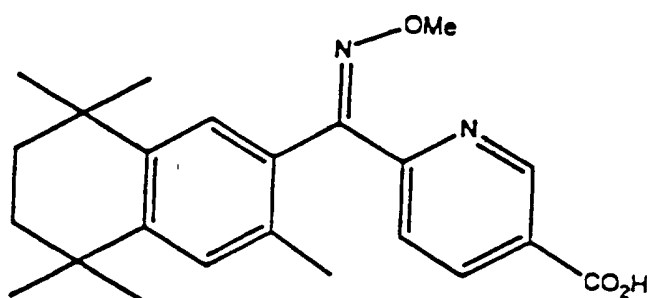


Et-115



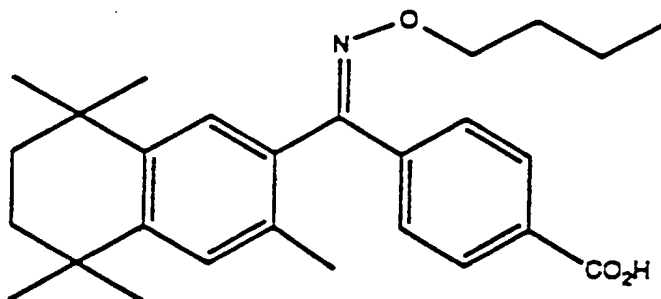
Metiloxima de etil-4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetra-hidro-2-naftil)carbonil]benzoato

116



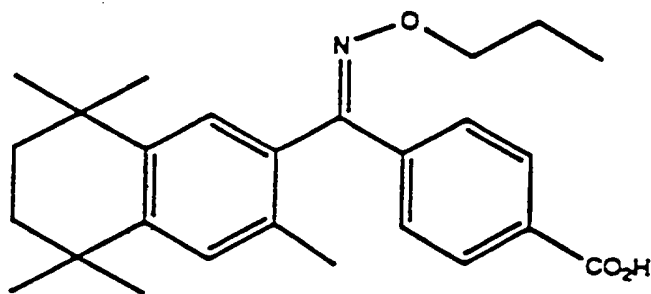
Metiloxima do ácido 2-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetra-hidro-2-naftil)carbonil]piridina-5-carboxílico

138

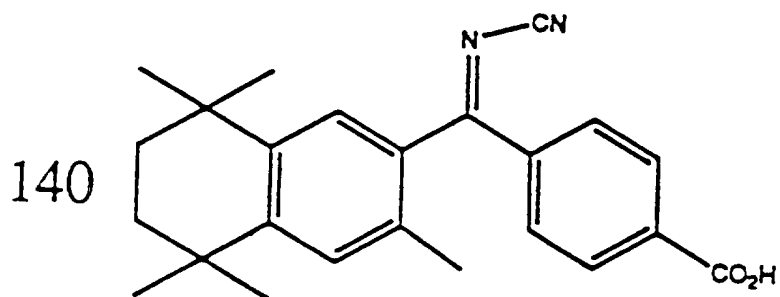
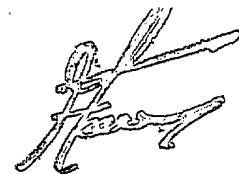


Butiloxima do ácido 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetra-hidro-2-naftil)carbonil]benzóico

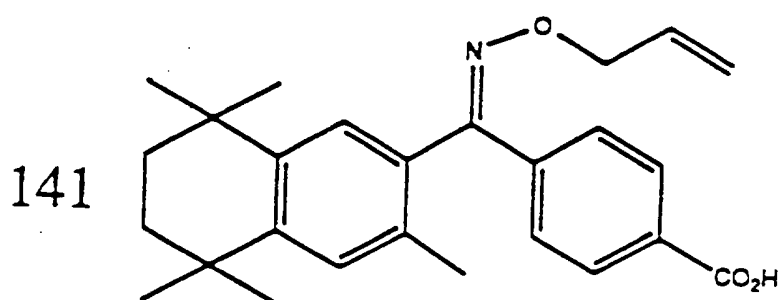
139



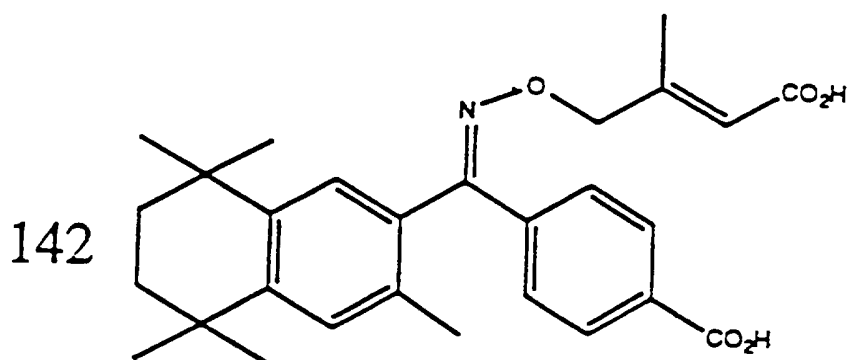
Propiloxima do ácido 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetra-hidro-2-naftil)carbonil]benzóico



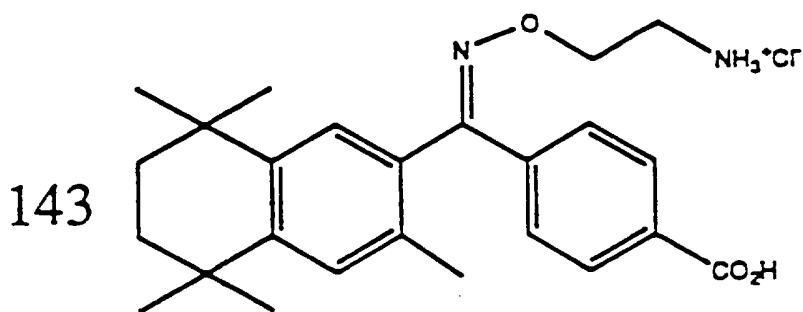
Ciano-imina do ácido 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetra-hidro-2-naftil)carbonil]benzóico



Aliloxima do ácido 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetra-hidro-2-naftil)carbonil]benzóico



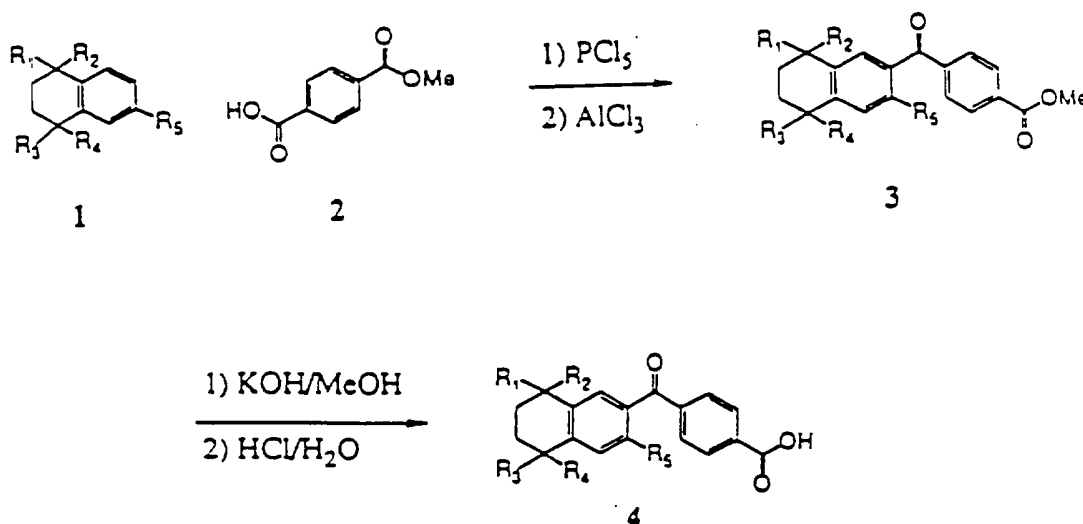
4-(ácido 3-metil-but-2-enóico)oxima do ácido 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetra-hidro-2-naftil)carbonil]benzóico



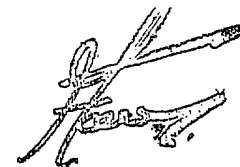
1-Aminoetiloxima do ácido 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetra-hidro-2-naftil)carbonil]benzóico

Adicionalmente, os grupos tiofeno, furanilo, piridina, pirazina, pirazolo, piridazina, tiadiazolo e pirrolo actuam como isosteres dos grupos fenilo e podem substituir-se ao grupo fenilo dos derivados benzílicos bicíclicos anteriores.

Derivados representativos do presente invento podem ser preparados de acordo com os esquemas sintéticos ilustrativos, seguintes, em conjunto com as secções abaixo que se referem à "Síntese de oximas e de metiloximas" e de alquinoximas e cianoiminas:

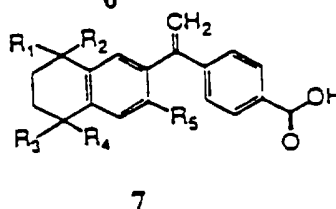
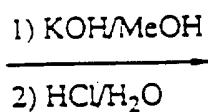
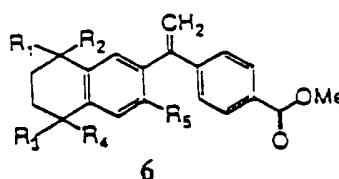
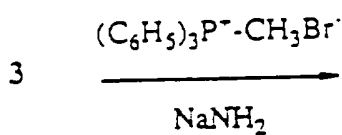
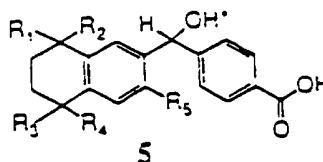
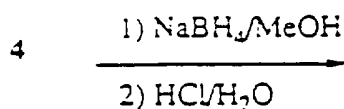


Os compostos de estrutura 1 com R_5 =alquilo inferior são preparados de acordo com a patente U.S. nº 2,897,237. Quando R_5 =Halo, OH, amino ou tio, os produtos são preparados em condições de reacção de Friedel-Crafts comum, combinando o benzeno substituído adequado com 2,5-dicloro-2,5-dimetil-hexano na presença de tricloreto de alumínio.



A condensação de 1 com tereftalato de mono-metilo 2 foi realizada por adição de PCl_5 a 1 e 2, em CH_2Cl_2 , seguida da adição de AlCl_3 , à temperatura ambiente.

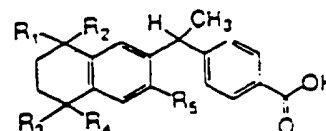
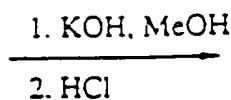
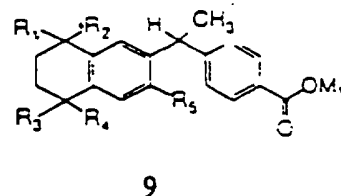
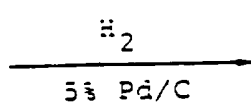
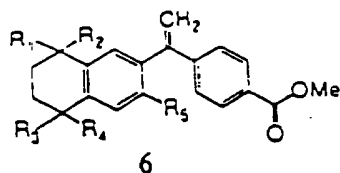
Os ésteres metílicos 3 resultantes são hidrolizados no ácido carboxílico 4 por refluxo em KOH-MeOH aquoso, seguindo-se acidificação.



O tratamento da cetona 4 com NaBH_4 originou o álcool 5.

O tratamento do éster metílico 3 com brometo de metiltrifosfônio-amida de sódio, em THF, originou o composto metano 6.

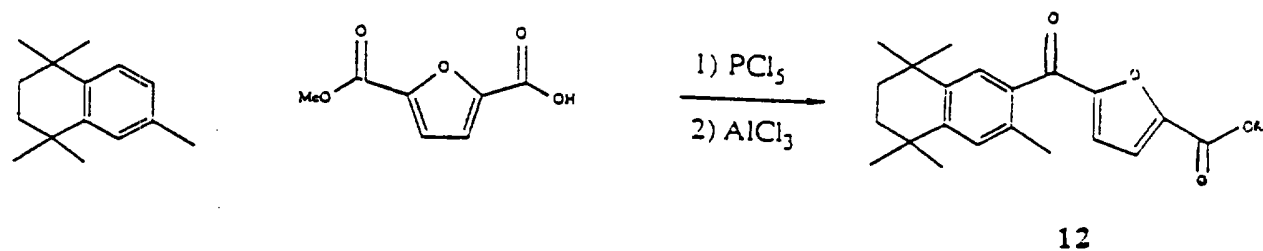
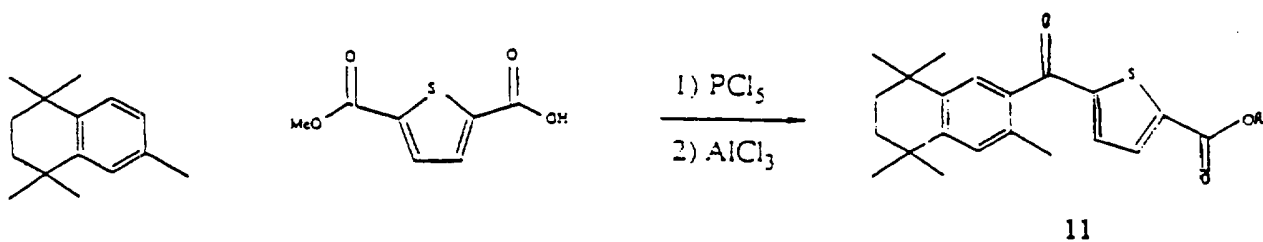
O ácido carboxílico 7 foi formado por adição de KOH ao composto metano 6, em MeOH , seguida de acidificação.





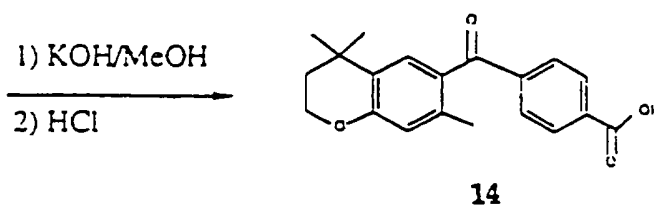
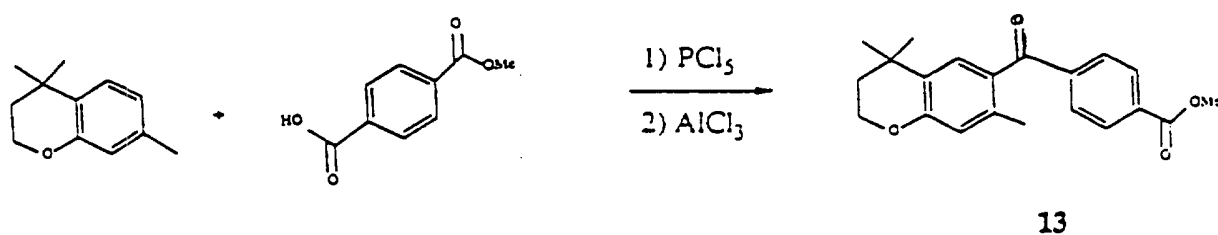
O tratamento do éster metílico 6 com hidrogénio gasoso e paládio a 5% sobre carvão, em acetato de etilo, origina o composto hydrogenado 9.

O tratamento do composto 9 com KOH aquoso em MeOH em refluxo, seguido de acidificação, origina o composto ácido carboxílico 10.

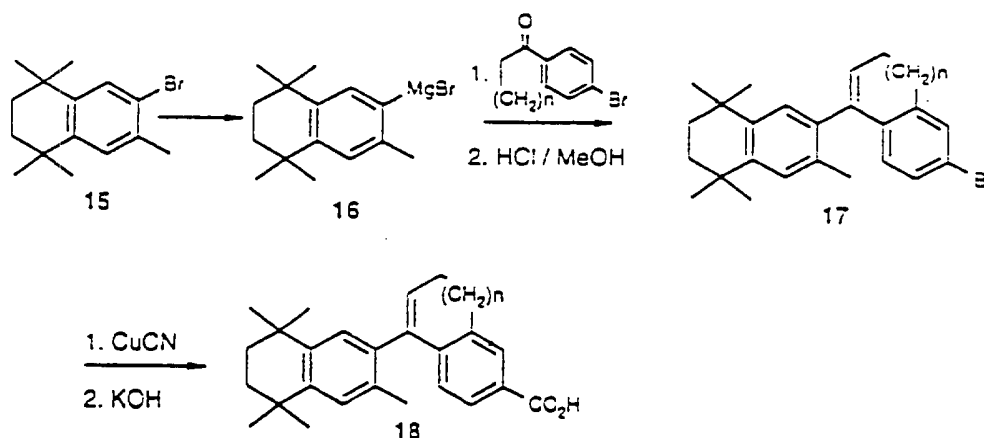


R = Me ou H

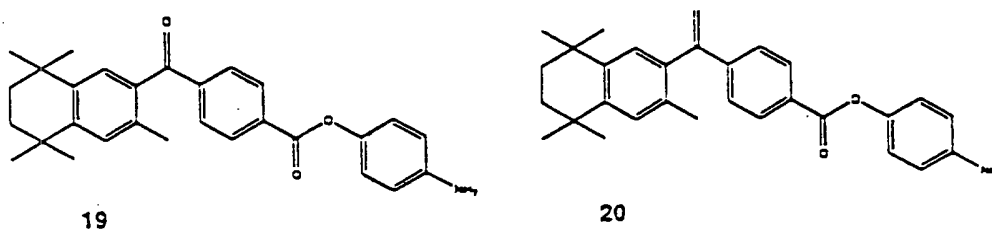
A condensação de 1 com ácido tiofeno-2,5-monometil-dicarboxílico ou ácido furanil-2,5-monometil-dicarboxílico foi realizada por adição de PCl_5 em CH_2Cl_2 , seguida da adição de AlCl_3 , à temperatura ambiente, para originar os ésteres 11 e 12, que foram hidrolizados com KOH, seguindo-se acidificação nos ácidos correspondentes.



Os compostos 4,4-dimetilcromano e 4,4-dimetil-7-alkilcromano do tipo 13 e 14, bem como os análogos 4,4-dimetiltiocromano, 4,4-dimetil-7-alkiltiocromano, 4,4-dimetil-1,2,3,4-tetra-hidroquinolina e 4,4-dimetil-7-alkil-1,2,3,4-tetra-hidroquinolina, foram sintetizados por métodos semelhantes aos utilizados para o composto 3 *i.e.*, condições de Friedel-Crafts combinando o dimetilcromano, dimetiltiocromano ou dimetiltetra-hidroquinolina adequado com o cloreto ácido de tereftalato de mono-metilo, na presença de AlCl_3 ou SnCl_4 , seguindo-se hidrólise básica e acidificação para originar o ácido carboxílico. Para a síntese dos análogos de tetra-hidroquinolina, foi necessário acilar a amina antes do acoplamento de Friedel-Crafts com o cloreto ácido de tereftalato de mono-metilo. Para a síntese dos dimetilcromanos, dimetiltiocromanos e tetra-hidroquinolinas adequados, ver patentes U.S. n^{os} 5,053,523 e 5,023,341 e a publicação de patente europeia n^o 0284288.

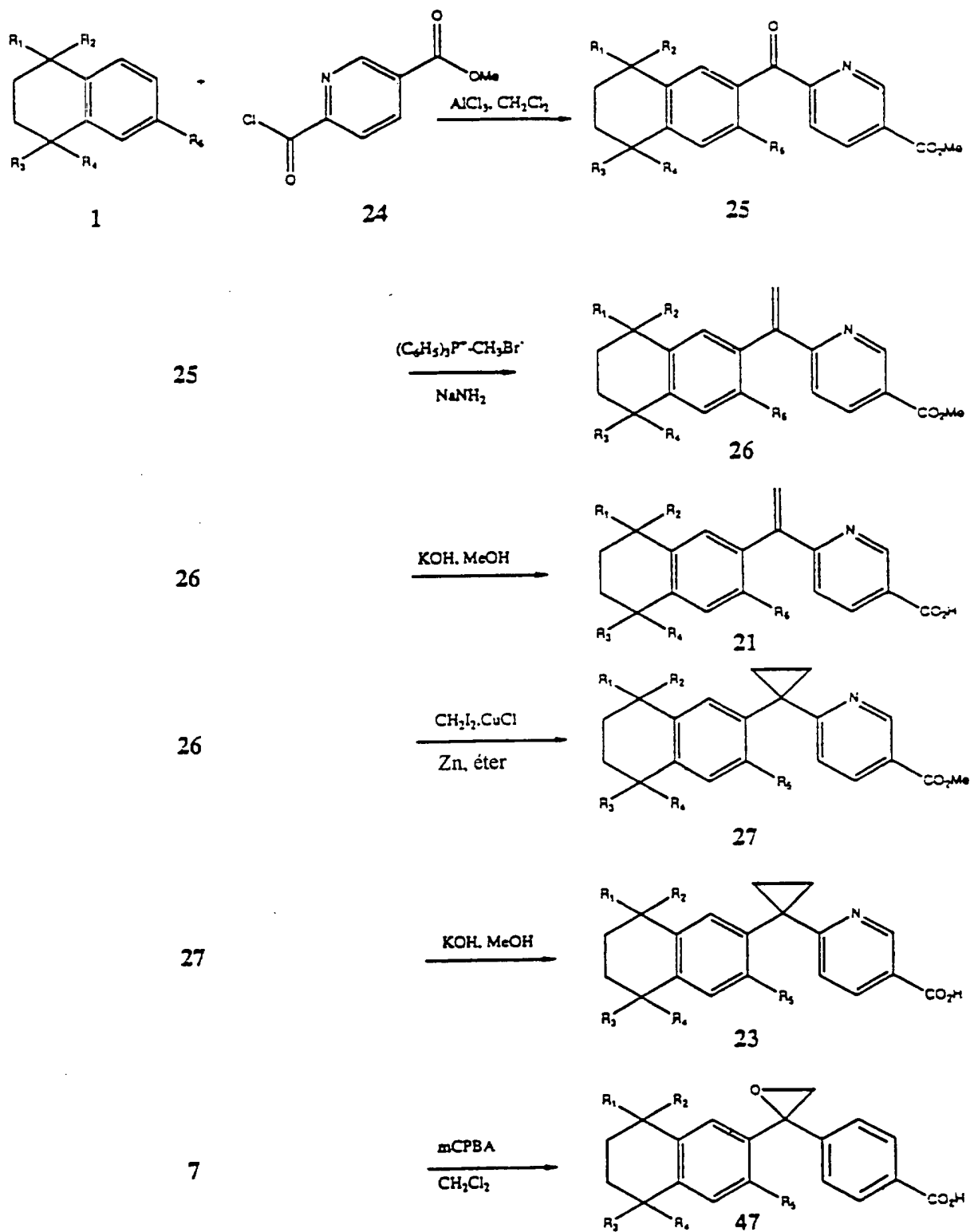


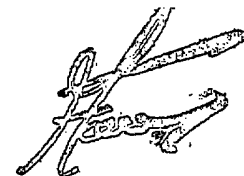
Os compostos do tipo 18 foram sintetizados por adição nucleófila do reagente de Grignard 16 a bromotetralona, bromo-indano, ou outro derivado cetona bicíclica. O tratamento do álcool resultante com HCl metanólico originou o intermediário 17. O deslocamento do bromo com CuCN em quinolina originou o nitrilo que foi, depois, hidrolizado no ácido 18, em KOH em refluxo. O composto de bromo 15 foi sintetizado a partir de 2,5-dicloro-2,5-dimetil-hexano e 2-bromotolueno com uma quantidade catalítica de AlCl_3 .





O tratamento dos compostos 3-metil-TTNCB e 3-metil-TTNEB com DCC, *p*-aminofenol e DMAP resultou nos amino-ésteres 19 e 20.



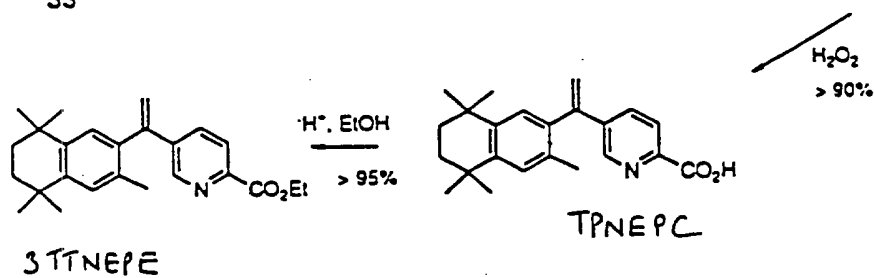
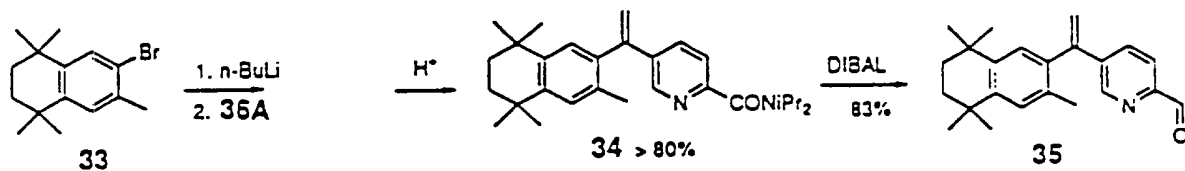
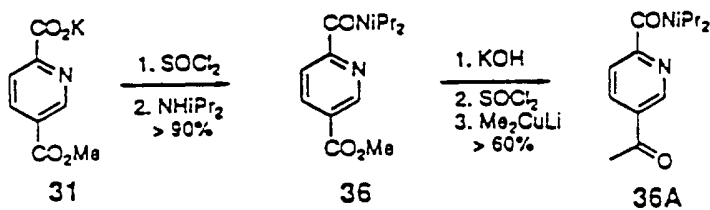
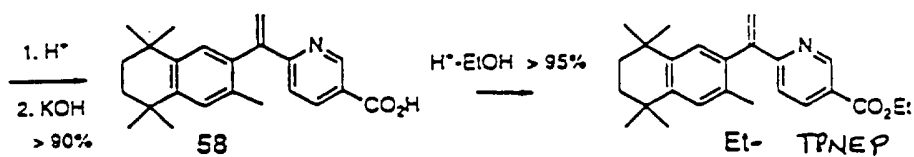
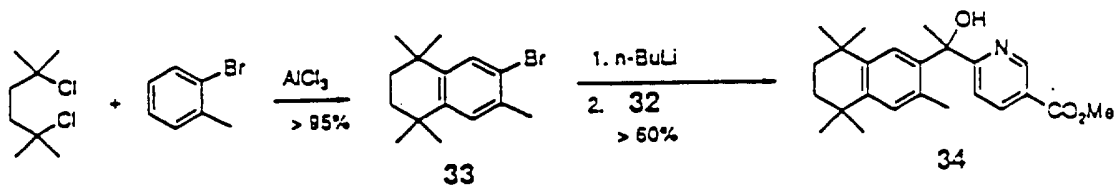
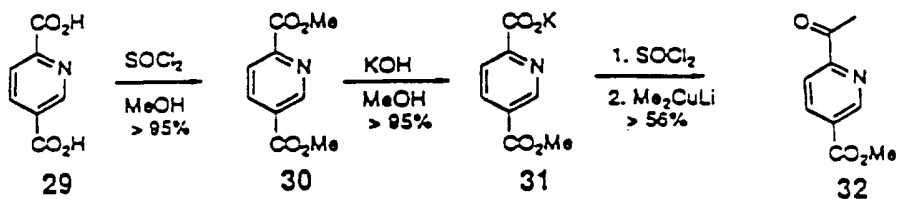
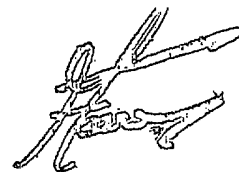


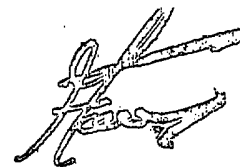
Podem ser preparados derivados piridinal representativos (compostos 21, 23, 26 e 27) de acordo com os esquemas sintéticos ilustrativos apresentados anteriormente. A síntese do composto 21 é semelhante à que foi anteriormente descrita para o composto 7. Os pentametil-tetra-hidronaftaleno 1, cloreto ácido de piridinal 24 e AlCl_3 são agitados em CH_2Cl_2 para originarem a cetona 25. O tratamento da cetona 25 com brometo de metiltrifosfônio-amida de sódio, em THF, originou o composto etenilo 26. A hidrólise de 26 (KOH, MeOH) seguida de acidificação originou o ácido 21. O análogo ciclopropílico 23 foi sintetizado por tratamento do composto etenilo 26 com CH_2I_2 , zinco em pó, CuCl em éter em refluxo (reação de Simmons-Smith). A hidrólise do éster ciclopropílico 27 resultante foi conseguida com KOH metanólico, seguindo-se acidificação, para originar o composto 23. Quando $\text{R}_1\text{-R}_5$ são metilo, por exemplo, é obtido o composto 62 (TPNCP), tal como mostrado no Exemplo 33 seguinte.

Podem ser igualmente preparados pelo mesmo método descrito para o análogo 23 outros derivados ciclopropílicos, como o TPNCB: a olefina 6 é tratada com o reagente de Simmons-Smith descrito anteriormente, seguindo-se hidrólise com KOH metanólico e acidificação (HCl) sendo originado o derivado ciclopropílico desejado. Podem ser sintetizados derivados epoxi, tais como TPNEB, por tratamento do composto 7 com ácido m-cloro-perbenzóico, à temperatura ambiente, em CH_2Cl_2 , durante várias horas.

Alternativamente, análogos piridinal, tais como TPNEP, TPNEPC e 3TTNEPE, podem ser preparados pela via sintética seguinte.

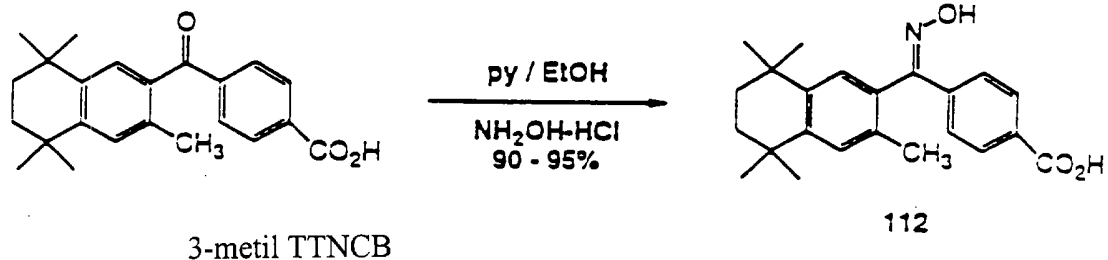
(Segue esquema)



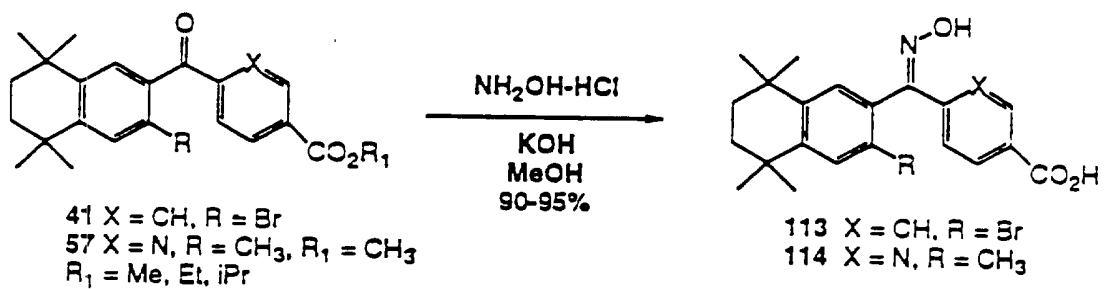


Síntese de Oximas e Metiloximas

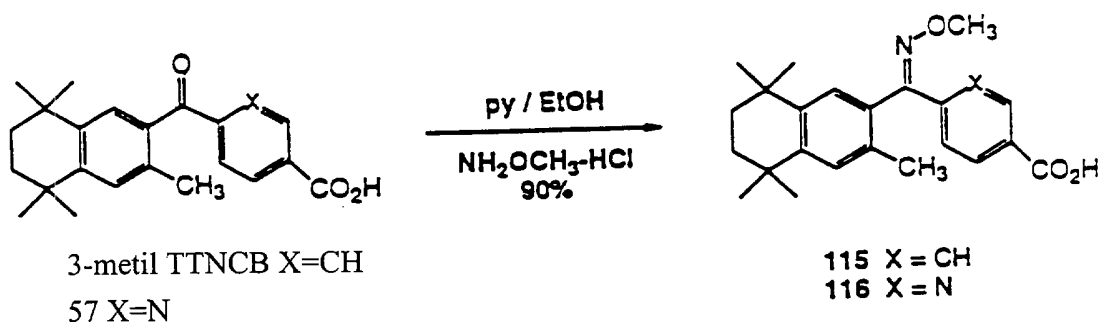
Oxima de Ácido Carboxílico:



Oximas de Ésteres:

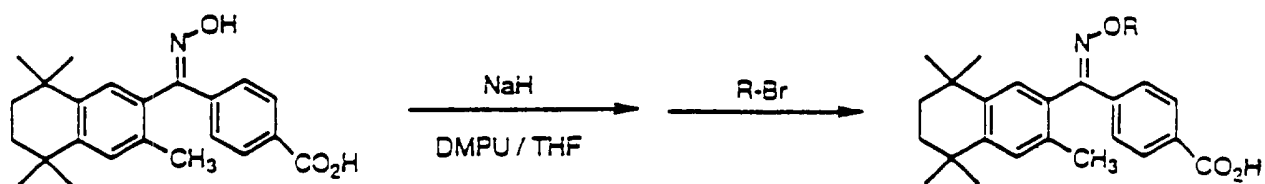


Metiloximas:





Síntese de Alquinoximas



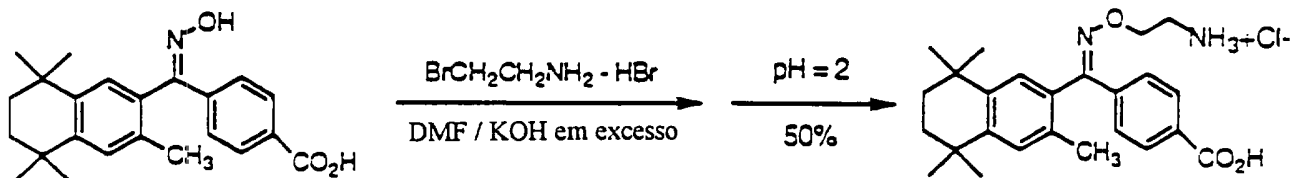
112

138 R= butilo

139 R= propilo

141 R= aliilo

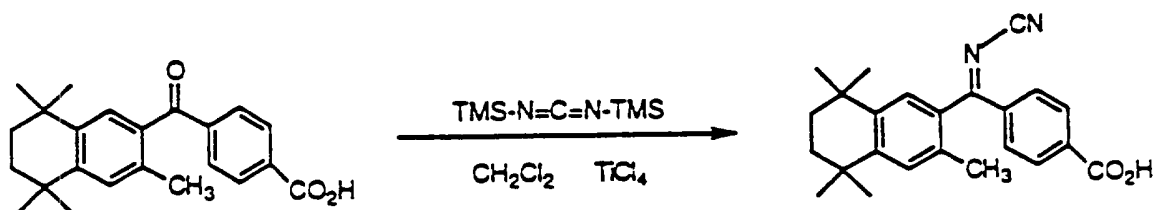
142 R=



112

143

Síntese de Cianoimina



3-metil TTCNB

140

Derivados oxima representativos (compostos 112, 113 e 114) podem ser preparados de acordo com os esquemas sintéticos ilustrativos apresentados anteriormente. A síntese de uma metiloxima representativa (composto 115) também é apresentada. Uma cetona tal como 3-metil-TTNCB é tratada com cloridrato de hidroxilamina em piridina e aquecida ao refluxo para originar a oxima 112. Os ésteres de alquioxima são preparados a partir da cetona correspondente (tal como 3-etil-TTNCB) por tratamento com cloridrato de metiloxima em piridina em refluxo originando a metoxi-imina 116. Ver, também, os Exemplos 44-49, seguintes. O Et-115 (e outros ésteres etílicos tais como Et-58, Et-62, Et-3-metil-TTNEB) podem ser feitos por tratamento dos respectivos ácidos carboxílicos como cloreto de oxalilo para a formação do cloreto de ácido, seguindo-se tratamento com EtOH e piridina originando o éster etílico. A oxima Et-112 pode ser feita a partir de benzoato de Et-4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetra-hidro-2-naftil)carbonil] (Et-3-metil TTNCB) por tratamento com piridina/EtOH e $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{CHl}$ em refluxo.

As oximas substituídas (compostos 138-143) podem, também, ser preparadas tal como apresentado anteriormente. Estes compostos foram sintetizados a partir da oxima livre correspondente (112), por tratamento da oxima com NaH, seguindo-se alquilação com o grupo bromoalquilo adequado (R-Br).

Exemplos ilustrativos para a preparação de alguns dos compostos de acordo com este invento são os seguintes:

Exemplo 1

Preparação do composto 112, no qual R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 são metilo; R' é HO; $\text{X}=\text{COOH}$ (oxima de 3-metil-TTNCB):

Foram tratados 3-metil-TTNCB (4,41g, 12,6 mmol) em EtOH (10 ml) e piridina (15,3 ml) com cloridrato de hidroxilamina (4,38 g, 63 mmol) e a mistura foi aquecida ao refluxo. Após 6 h, a mistura foi arrefecida até à temperatura ambiente e o etanol foi removido *in vacuo*. O resíduo foi retomado em água e a camada aquosa foi ajustada a pH=4-5 com HCl aquoso 1 M. A solução aquosa foi extractada 3 vezes com EtOAc; as camadas orgânicas foram combinadas e lavadas com água (2x) e salmoura. A solução orgânica foi seca (NaSO_4), filtrada e concentrada originando um sólido espumoso, branco. A recristalização (CH_2Cl_2 /éter/hexanos) originou um sólido branco, 4,05 g (88%).

PF: 204-209°C (d); HRMS: 366,2060 (MH⁺); ¹H-RMN (CDCl_3 /d-4 MeOH) δ 1,22 (s, 6H, 2 (CH₃)), 1,32 (s, 6H, 2 (CH₃)), 1,69 (s, 4H, 2 (CH₂)), 2,11 (s, 3H, CH₃), 6,99 (s, 1H, Ar-CH), 7,20 (s, 1H, Ar-CH), 7,53 (1/2 ABq, 2H, J=8,4 Hz, $\Delta v=183,0$ Hz-Ar-CH), 7,99 (1/2 ABq, 2H, J=8,4 Hz, $\Delta v=183,0$ Hz-Ar-CH).

Exemplo 2

Preparação do composto 113, no qual R₁, R₂, R₃, R₄ são metilo; R₅ é bromo; R' é HO; X=COOH (oxima de 3-bromo-TTNCB, 41):

O éster metílico de 3-bromo-TTNCB (399 mg, 0,93 mmol) em MeOH (2 ml) foi tratado com cloridrato de hidroxilamina (97 mg, 1,4 mmol) e KOH (156 mg, 2,8 mmol) e a mistura foi aquecida ao refluxo durante 3 h. A reacção foi processada de um modo idêntico ao descrito para 112 originando um sólido branco, 330 mg (83%).

PF: 240-244°C (d); ¹H-RMN (CDCl₃) δ 1,26 (s, 6H, 2 (CH₃)), 1,33 (s, 6H, 2 (CH₃)), 1,72 (s, 4H, 2 (CH₂)), 7,30 (s, 1H, Ar-CH), 7,54 (s, 1H, Ar-CH), 7,92 (1/2 ABq, 2H, J=8,3 Hz, Δ v=113,5 Hz, Ar-CH), 8,20 (1/2 ABq, 2H, J=8,3 Hz, Δ v=113,5 Hz, Ar-CH).

Exemplo 3

Preparação do composto 114, no qual R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ são metilo; R' é HO; X=COOH, Z=N; Z', Z'', Z'''=CH (oxima de 57):

O composto foi preparado de um modo semelhante ao descrito para 113, com a excepção de o composto 53, em vez de 3-metil-TTNCB, ter sido a cetona de partida. A cromatografia "flash" em SiO₂ (hexanos:EtOAc; CH₂Cl₂:isopropanol= 10:5:1:1) do produto em bruto originou um sólido branco, pegajoso, 83 mg (86%).

PF: 167-172°C (d); HRMS: 367,2025 (MH⁺); IV de FT (puro) 3600-3230 (largo), 2962, 2928, 2664, 1697, 1593, 1296, 1273, 1122, 1028, 964 cm⁻¹; ¹H-RMN (CDCl₃) δ 1,23 (s, 6H, 2 (CH₃)), 1,32 (s, 6H, 2 (CH₃)), 1,69 (s, 4H, 2 (CH₂)), 2,14 (s, 3H, CH₃) 7,05 (s, 1H, Ar-CH), 7,22 (s, 1H, Ar-CH), 7,49 (1/2 ABq, 2H, J=28 Hz, Ar-CH), 8,25 (1/2 ABq, 2H, J=8,0 Hz, Ar-CH); 9,21 (s, 1H, Ar-CH).

Exemplo 4

Preparação do composto 115, no qual R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ são metilo; R' é CH₃O; X=COOH (metoxioxima de 3-metil-TTNCB):

Foram tratados 3-metil-TTNCB (560 mg, 1,60 mmol) em EtOH (2 ml) e piridina (1,3 ml) com cloridrato de metoxilamina (402 g, 4,81 mmol) e a mistura foi aquecida ao refluxo. Após 6 h, a mistura foi arrefecida até à temperatura ambiente e o etanol foi removido *in vacuo*. O resíduo foi retomado em água e a camada aquosa foi ajustada a pH=4-5 com HCl aquoso 1 M. A solução aquosa foi extractada 3 vezes com EtOAc; as camadas orgânicas foram combinadas e lavadas com água (2x) e salmoura. A solução orgânica foi seca (NaSO₄), filtrada, concentrada e recristalizada (CH₂Cl₂/hexanos) originando um sólido



branco, 564 mg (93%).

PF: 228-228,5°C; LRMS: 380 (MH⁺); ¹H-RMN (CDCl₃) δ 1,22 (s, 6H, 2 (CH₃)), 1,31 (s, 6H, 2 (CH₃)), 1,69 (s, 4H, 2 (CH₂)), 2,08 (s, 3H, CH₃), 4,01 (s, 3H, OCH₃), 6,95 (s, 1H, Ar-CH), 7,18 (s, 1H, Ar-CH), 7,57 (1/2 ABq, 2H, J=8,4 Hz, Δ ν=188,3 Hz, Ar-CH), 8,04 (1/2 ABq, 2H, J=8,4 Hz, Δ ν=188,3 Hz, Ar-CH).

Exemplo 5

Preparação do composto 116, no qual R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ são metilo; R' é CH₃O; X=COOH; Z=N; Z', Z'', Z'''=CH (metiloxima de 57):

O éster metílico de 3-metil-TTNCB (151 mg, 0,41 mmol) em EtOH (1 ml) foi tratado com cloridrato de metoxilamina (52 mg, 0,62 mmol) e piridina (70 μl, 0,82 mmol) e a mistura foi aquecida ao refluxo durante 5 h. A reacção foi processada de um modo idêntico ao descrito para 115 originando um sólido (169 mg). O produto em bruto foi hidrolizado em KOH/MeOH em excesso, à temperatura ambiente, durante 24 h. O metanol foi removido *in vacuo*. O resíduo foi retomado em água e a camada aquosa foi ajustada a pH=4-5 com HCl aquoso 1 M. A solução aquosa foi extractada 3 vezes com EtOAc; as camadas orgânicas foram combinadas e lavadas com água (2x) e salmoura. A solução orgânica foi seca (NaSO₄), foi filtrada, concentrada e cristalizada (Et₂O/hexanos) originando um sólido branco, 96 mg (61%).

PF: 260-263°C; ¹H-RMN (CDCl₃) δ 1,22 (s, 6H, 2 (CH₃)), 1,30 (s, 6H, 2 (CH₃)), 1,68 (s, 4H, 2 (CH₂)), 2,10 (s, 3H, CH₃), 4,08 (s, 3H, OCH₃), 6,99 (s, 1H, Ar-CH), 7,18 (s, 1H, Ar-CH), 7,63 (d, 1H, Pi-CH, J=8,0 Hz), 8,31 (d, 1H, Pi-CH, J=8,0 Hz), 9,31 (d, 1H, Pi-CH).

Exemplo 6

Preparação do composto 138, no qual R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ são metilo; R' é n-BuO; X=COOH (n-butiloxima de 3-metil-TTNCB):

Uma solução da oxima de 3-metil-TTNCB (composto 112, 121 mg, 0,33 mmol) em THF (0,3 ml) e DMPU (0,3 ml) foi adicionada, a 0°C, a uma suspensão de NaH (24 mg, 1,0 mmol) em THF (1,0 ml). A suspensão foi deixada aquecer até à temperatura ambiente com agitação, durante 30 minutos e, depois, foi adicionada uma solução de brometo de n-butilo (136 mg, 110 μl, 1,0 mmol) em THF (1,0 ml). A solução foi deixada aquecer até à temperatura ambiente e foi agitada durante 15 horas. Foi adicionado NH₄Cl saturado (3,0 ml) e a camada aquosa foi ajustada a pH=4-5 com HCl aquoso 1 M. A solução aquosa foi extractada 3 vezes com EtOAc; as camadas orgânicas foram combinadas e lavadas com água (2x) e salmoura. A solução orgânica foi seca (MgSO₄), filtrada, concentrada e foi cristalizada (éter/hexanos) originando um sólido branco, 82 mg (58%).

PF: 195-198°C; $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ 0,94 (t, 3H, CH_3 , $J=7,4$ Hz), 1,22 (s, 6H, 2 (CH_3)), 1,31 (s, 6H, 2 (CH_3)), 1,69 (s, 4H, 2 (CH_2)), 1,72 (mult., 2H, CH_2 , $J=7,3$ Hz), 2,05 (s, 3H, CH_3), 4,16 (t, 3H, OCH_2 , $J=6,7$ Hz), 6,97 (s, 1H, Ar-CH), 7,16 (s, 1H, Ar-CH), 7,57 (d, 2H, Ar- CH_2 , $J=8,4$ Hz), 8,04 (d, 2H, Ar- CH_2 , $J=8,4$ Hz).

Exemplo 7

Preparação do composto 139, no qual R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 são metilo; R' é n-ProO; $\text{X}=\text{COOH}$ (n-propiloxima de 3-metil-TTNCB):

Uma solução da oxima de 3-metil-TTNCB (composto número 112, 121 mg, 0,33 mmol) em THF (0,3 ml) e DMPU (0,3 ml) foi adicionada, a 0°C, a uma suspensão de NaH (24 mg, 1,0 mmol). A suspensão foi deixada aquecer até à temperatura ambiente com agitação, durante 30 minutos e, depois, foi adicionada uma solução de brometo de n-propilo (122 mg, 90 μl , 1,0 mmol) em THF (1,0 ml). A solução foi deixada aquecer até à temperatura ambiente e foi agitada durante 15 horas. Foi adicionado NH_4Cl saturado (5,0 ml) e a camada aquosa foi ajustada a $\text{pH}=4-5$ com HCl aquoso 1 M. A solução aquosa foi extractada 3 vezes com EtOAc; as camadas orgânicas foram combinadas e lavadas com água (2x) e salmoura. A solução orgânica foi seca (MgSO_4), foi filtrada, concentrada e cristalizada (éter/hexanos) originando um sólido branco, 99 mg (73%).

PF: 178-180°C; $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ 0,93 (t, 3H, CH_3 , $J=7,4$ Hz), 1,26 (s, 6H, 2 (CH_3)), 1,35 (s, 6H, 2 (CH_3)), 1,51 (mult., 2H, CH_2 , $J=7,4$ Hz), 1,73 (mult., 6H, 2 (CH_2)/ CH_2), 2,09 (s, 3H, CH_3), 4,24 (t, 3H, OCH_2 , $J=7,4$ Hz), 7,00 (s, 1H Ar-CH), 7,19 (s, 1H, Ar-CH), 7,60 (d, 2H, Ar-CH, $J=8,5$ Hz), 8,07 (d, 2H, Ar- CH_2 , $J=8,5$ Hz).

Exemplo 8

Preparação do composto 140, no qual R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 são metilo; R' é CN; $\text{X}=\text{COOH}$ (ciano-imina de 3-metil-TTNCB);

Uma solução de 3-metil-TTNCB (350 mg, 1,0 mmol) em cloreto de metileno (1,5 ml) foi tratada com bis(trimetilsilil)carbodiimida (186 mg, 230 μl , 1,0 mmol), à temperatura ambiente. A solução foi arrefecida até 0°C e foi tratada com uma solução 1 M de TiCl_4 , em cloreto de metileno (2 eq., 2 ml, 2 mmol). A solução vermelho escura resultante foi aquecida ao refluxo durante 8 horas. Foi adicionado um equivalente adicional de TiCl_4 (1 ml, de solução 1 M em cloreto de metileno) e o refluxo foi continuado durante 3 horas e a análise por CCF indicou a conversão completa num único produto. A solução foi arrefecida até à temperatura ambiente e, depois, foi vertida em NaHSO_4 aquoso, gelado. A mistura foi diluída com acetato de etilo e foi filtrada através de uma almofada de celite. A camada aquosa foi lavada duas vezes com acetato de etilo e as camadas orgânicas foram

combinadas. A solução orgânica foi lavada duas vezes com água e uma vez com solução aquosa, saturada, de NaCl, foi seca (Na₂SO₄), filtrada e concentrada. O resíduo foi cristalizado da solução com cloreto de metileno/hexanos/benzeno originando um sólido amarelo claro, 207 mg, (55%).

PF: 217-219°C; IV (pastilha de KBr) 3500-2600 largo, 2961, 2924, 2666, 2210, 1693, 1582, 1560, 1427, 1408, 1314, cm⁻¹; ¹H-RMN (CDCl₃) δ 1,26 (s, 6H, 2 (CH₃)), 1,32 (s, 6H, 2 (CH₃)), 1,72 (s, 4H, 2 (CH₂)), 2,11 (s, 3H, CH₃), 7,14 (s, 1H, Ar-CH), 7,24 (s, 1H, Ar-CH), 7,90 (d, 2H, Ar-CH, J=8,1 Hz), 8,17 (d, 2H, Ar-CH, J=8,1 Hz); ¹³C-RMN (CDCl₃) δ 191.3, 170,5, 148,6, 143,1, 140,4, 133,9, 132,7, 131,8, 130,4, 129,2, 125,9, 34,8, 34,7, 34,4, 34,1, 31,7, 31,6, 19,5; EM FAB C₂₄H₂₆N₂O₂: 375 (MH⁺).

Exemplo 9

Preparação do composto 141, no qual R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ são metilo; R' é alil-O; X=COOH (aliloxima de 3-metil-TTNCB):

Uma solução da oxima de 3-metil-TTNCB (composto número 112, 100 mg, 0,27 mmol) em THF (0,3 ml) e DMPU (0,3 ml) foi adicionada, a 0°C, a uma suspensão de NaH (20 mg, 0,82 mmol) em THF (1,0 ml). A suspensão foi deixada aquecer até à temperatura ambiente com agitação, durante 30 minutos e, depois, foi adicionada uma solução de brometo de alilo (71 µl, 0,82 mmol). A solução foi deixada aquecer até à temperatura ambiente e foi agitada durante um adicional de 12 horas. Foi adicionado NH₄Cl aquoso, saturado (5,0 ml), e a camada aquosa foi ajustada a pH=4-5 com HCl aquoso 1 M. A solução aquosa foi extractada 3 vezes com EtOAc; as camadas orgânicas foram combinadas e lavadas com água (2x) e salmoura. A solução orgânica foi seca (MgSO₄), foi filtrada, concentrada e cristalizada (éter/hexanos) originando um sólido branco, 87 mg (78%).

¹H-RMN (CDCl₃) δ 1,21 (s, 6H, 2(CH₃)), 1,31 (s, 6H, 2 (CH₃)), 1,69 (s, 4H, 2(CH₂)), 2,06 (s, 3H, CH₃), 4,71 (d, 2H, OCH₂, J=5,6 Hz), 5,19 (dd, 1H, =C_{trans}, J=10,4, 1,5 Hz), 5,27 (dd, 1H, =C_{cis}, J=17,2, 1,5 Hz), 6,02 (mult., 1H, =CH), 6,97 (s, 1H Ar-CH), 7,16 (s, 1H, Ar-CH), 7,57 (d, 2H, Ar-CH, J=8,2 Hz), 8,03 (d, 2H, Ar-CH, J=8,2 Hz).

Exemplo 10

Preparação do composto 142, no qual R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ são metilo; R' é HOOC-C=C(CH₃)CH₂-O; X=COOH (4-(3-metil-butenil-1-carboxi)oxima de 3-metil-TTNCB):

Uma solução da oxima de 3-metil-TTNCB (composto número 112, 202 mg, 0,55 mmol) em THF (0,5 ml) e DMPU (0,5 ml) foi adicionada, a 0°C, a uma suspensão de NaH (38 mg, 1,7 mmol) em THF (1,7 ml). A suspensão foi deixada aquecer até à



temperatura ambiente com agitação, durante 30 minutos e, depois, foi adicionada uma solução de carboxilato de 4-bromo-3-metil-but-2-eno-etilo (343 mg, 1,7 mmol). A solução foi deixada aquecer até à temperatura ambiente e foi agitada durante 12 horas. Foi adicionado NH_4Cl aquoso, saturado (5,0 ml), e a camada aquosa foi ajustada a $\text{pH}=4,5$ com HCl aquoso 1 M. A solução aquosa foi extractada 3 vezes com EtOAc ; as camadas orgânicas foram combinadas e lavadas com água (2x) e salmoura. A solução orgânica foi seca (MgSO_4), foi filtrada e concentrada originando um óleo amarelo. A cromatografia radial (placa de SiO_2 de 1 mm, 9:1=hexano: EtOAc , com adição gradual de isopropanol a 2%) originou um óleo amarelo. O éster foi hidrolizado em KOH/MeOH em excesso à temperatura ambiente durante 24 horas. O metanol foi removido *in vacuo*. O resíduo foi retomado em água e a camada aquosa foi ajustada a $\text{pH}=4-5$ com HCl aquoso 1 M. A solução aquosa foi extractada 3 vezes com EtOAc ; as camadas orgânicas foram combinadas e lavadas com água (2x) e salmoura. A solução orgânica foi seca (NaSO_4), foi filtrada, concentrada e cristalizada ($\text{Et}_2\text{O}/\text{hexanos}$) originando um sólido branco, 110 mg (43%).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ 1,25 (s, 6H, 2(CH_3)), 1,31 (s, 6H, 2 (CH_3)), 1,70 (s, 4H, 2(CH_2)), 2,06 (s, 3H, Ar- CH_3), 2,14 (s, 3H, CH_3), 4,71 (d, 2H, OCH_2), 5,85 (s, 1H, =CH), 7,01 (s, 1H Ar-CH), 7,16 (s, 1H, Ar-CH), 7,55 (d, 2H, Ar- CH_2 , $J=8,2$ Hz), 8,02 (d, 2H, Ar-CH, $J=8,2$ Hz).

Exemplo 11

Preparação do composto 143, no qual R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 são metilo; R' é $\text{Cl-NH}_3+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O}$; $\text{X}=\text{COOH}$ (2-aminoetiloxima de 3-metil-TTNCB):

Uma solução da oxima de 3-metil-TTNCB (composto número 112, 108 mg, 0,30 mmol) e bromidrato de 2-bromoetilamina (182 mg, 0,89 mmol) em DMF (1 ml) foi adicionado KOH em pó, em excesso, a 0°C . A solução amarela foi deixada aquecer até à temperatura ambiente e foi agitada durante 48 horas. Foi adicionado NH_4Cl aquoso, saturado (5,0 ml), e a camada aquosa foi ajustada a $\text{pH}=2$ com HCl aquoso 1 M. A solução aquosa foi extractada 3 vezes com EtOAc ; as camadas orgânicas foram combinadas e lavadas com água (2x) e salmoura. A solução orgânica foi seca (MgSO_4), foi filtrada, concentrada e recristalizada ($\text{Et}_2\text{O}/\text{hexanos}$) originando um sólido branco, 64 mg (50%).

IV (pastilha de KBr) 3600-3200 largo, 3420, 2922, 2855, 1695, 1591, 1456, 1364, 1231, 1017 cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ 1,21 (s, 6H, 2(CH_3)), 1,29 (s, 6H, 2 (CH_3)), 1,70 (s, 4H, 2(CH_2)), 2,06 (s, 3H, Ar- CH_3), 2,14 (s, 3H, CH_3), 3,29 (m, 2H, CH_2), 4,37 (m, 2H, CH_2), 7,00 (s, 1H Ar-CH), 7,24 (s, 1H, Ar-CH), 7,50 (d, 2H, Ar- CH_2 , $J=8,0$ Hz), 7,94 (d, 2H, Ar- CH_2 , $J=8,0$ Hz).



Avaliação da Selectividade do Subtipo do Receptor de Retinóide

Compostos retinóides sintéticos representativos do corrente invento foram analisados e verificou-se que exibiam selectividade de subtipo para os receptores retinóides e que eram capazes de modular processos mediados selectivamente pelos receptores de retinóide X, tal como se discute seguidamente com mais detalhe.

Tal como aqui empregue, a frase “processos mediados selectivamente pelos receptores de retinóide X” refere-se a processos biológicos, fisiológicos, endocrinológicos e outros processos corporais que são mediados por receptores ou combinações de receptores que apresentam resposta a processos selectivos para receptores de retinóide X, e.g. compostos que activam selectivamente um e/ou múltiplos membros da subfamília RXR. A modulação inclui activação ou intensificação desses processos, bem como sua inibição ou repressão e pode ser conseguida *in vitro* ou *in vivo*. A modulação *in vivo* pode ser realizada numa larga gama de sujeitos, tais como, por exemplo, humanos, roedores, ovelhas, porcos, vacas e semelhantes. Está bem estabelecido que a modulação destes processos tem relevância directa para o uso no tratamento de estados de doença.

Os receptores que apresentam resposta aos ligandos selectivos para o receptor de retinóide X incluem: receptor de retinóide X-alfa, receptor de retinóide X-beta, receptor de retinóide X-gama e variantes de união codificadas pelos genes para estes receptores, bem como várias suas combinações (*i.e.*, homodímeros, homotrímeros, heterodímeros, heterotrímeros e semelhantes). Também estão incluídas combinações de receptores de retinóide X com outros membros da superfamília dos receptores esteróide/tiróide com os quais os receptores de retinóide X podem interactivar formando heterodímeros, heterotrímeros e os heteromultímeros superiores. Por exemplo, as isoformas do receptor do ácido retinóico-alfa, beta ou gama formam um heterodímero com qualquer uma das isoformas do receptor de retinóide X, (*i.e.* alfa, beta ou gama, incluindo qualquer combinação das diferentes isoformas do receptor) e os vários receptores de retinóide X formam um heterodímero com o receptor tiróide e formam um heterodímero com o receptor da vitamina D. Membros da subfamília de receptores de retinóide X formam um heterodímero com certos “receptores orfãos” incluindo PPAR (Issemann e Green, *Nature*, 347:645-49 (1990)); HNF4 (Sladek *et al.*, *Genes & Development* 4:2353-65 (1990)); a família COUP de receptores (e.g., Miyajima *et al.*, *Nucleic Acids Research* 16:11057-74 (1988) e Wang *et al.*, *Nature*, 340:163-66 (1989)); receptores semelhantes a COUP e homólogos COUP, tais como os descritos por Mlodzik *et al.* (*Cell*, 60:211-24 (1990)) e Ladas *et al.* (*Science*, 251:561-65 (1991)); o receptor ultra-espiráculo (e.g., Oro *et al.*, *Nature*, 347:298-301 (1990)); e semelhantes.



Tal como aqui empregue, a frase “membros da superfamília dos receptores esteróide/tiróide” (também conhecidos como “receptores nucleares” ou “receptores intracelulares”) refere-se a proteínas de ligação de hormonas que operam como factores de transcrição dependentes de ligando. Para além disto, esta classificação inclui membros identificados da superfamília dos receptores esteróide/tiróide para os quais não foram ainda identificados ligandos específicos (referidos daqui em diante como “receptores órfãos”). Todos os membros da superfamília dos receptores intracelulares possuem a capacidade intrínseca de ligação a sequências específicas de ADN. A seguir à ligação, a actividade transcricional de um gene alvo (*i.e.*, um gene associado a uma sequência específica de ADN) é modulada como uma função do ligando que está ligado ao receptor. Ver, também, Heyman *et al.*, *Cell*, 68:397-406 (1992) e pedido co-pendente U.S. nº de série 809,980 apresentado em 18 de Dezembro de 1991, cuja descrição na sua totalidade está aqui incorporada por referência.

A modulação da expressão dos genes pelo ligando ácido retinóico e seus receptores pode ser examinada num sistema reconstituído em cultura celular. Foi utilizado um destes sistemas para avaliar os compostos retinóides sintéticos deste invento quanto à sua interacção com os subtipos RAR α , RAR β , RAR γ , RXR α , RXR β e RXR γ do receptor retinóide.

O sistema para a reconstituição do controlo transcricional, dependente do ligando, que foi desenvolvido por Evans *et al.*, *Science*, 240:889-95 (1988), foi denominado uma “co-transfecção” ou ensaio “*cis-trans*”. Este ensaio está descrito mais detalhadamente nas patentes U.S. nºs 4,981,784 e 5,071,773, que são aqui incorporadas por referência. Ver, também, Heyman *et al.*, *Cell*, 68:397-406 (1992). O ensaio de co-transfecção proporciona um mecanismo para avaliar a capacidade de um composto para modular a resposta de transcrição iniciada por um receptor intracelular. O ensaio de co-transfecção é um ensaio funcional, rápido, que monitoriza a actividade de hormona ou de ligando, permite uma boa previsão de um sistema *in vivo* e pode ser utilizado para quantificar a potência e utilidade farmacológica desses ligandos no tratamento de estados de doença. Berger, *et al.*, *J. Steroid Biochem Molec. Biol.*, 41:733-38 (1992).

Resumidamente, o ensaio de co-transfecção envolve a introdução de dois plasmídeos por transfecção transiente num fundo de células mamíferas negativas para o receptor retinóide. O primeiro plasmídeo contém um ADNc de receptor retinóide e dirige a expressão constitutiva do receptor codificado. O segundo plasmídeo contém um ADNc que codifica uma proteína prontamente quantificável, *e.g.*, luciferase de pirilampo ou cloramfenicol-



acetiltransferase (CAT), sob o controlo de um promotor contendo um elemento de resposta ao ácido retinóico, que confere dependência a retinóide na transcrição do repórter. Neste ensaio de co-transfecção, todos os receptores retinóides respondem ao ácido totalmente *trans*-retinóico de um modo semelhante. Este ensaio pode ser utilizado para medir com precisão a eficiência e a potência do ácido retinóico e de retinóides sintéticos como ligandos que interactivam com os subtipos, do receptor retinóide, individuais.

Consequentemente, os compostos retinóides sintéticos do presente invento foram avaliados quanto à sua interacção com subtipos do receptor retinóide utilizando o ensaio de co-transfecção no qual células CV-1 foram co-transfectadas com um dos subtipos do receptor retinóide, uma construção repórter e um controlo interno para permitir a normalização da resposta quanto à eficiência da transfecção. O exemplo seguinte é ilustrativo.

Exemplo 12

Retinóides: O ácido totalmente *trans*-retinóico (RA) e o ácido 13-*cis*-retinóico (13-*cis*-RA) foram obtidos de Sigma. O ácido 9-*cis*-retinóico (9-*cis*-RA) foi sintetizado conforme descrito em Heyman *et al.*, *Cell*, 68:397-406 (1992). A pureza do retinóide foi estabelecida como sendo superior a 99% por cromatografia líquida de alto desempenho em fase inversa. Os retinóides foram dissolvidos em dimetilsulfóxido para utilização nos ensaios de activação transcricional.

Plasmídeos: Os vectores de expressão do receptor utilizados no ensaio de co-transfecção foram descritos anteriormente (pRShRAR- α : Giguere *et al.* (1987); pRShRAR- β e pRShRAR- γ : Ishikawa *et al.* (1990); pRShRXR- α : Mangelsdorf *et al.*, (1990); pRSmRXR- β e pRSmRXR- γ : Mangelsdorf *et al.*, *Genes & Devel.*, 6:329-44 (1992)). Um repórter plasmídeo basal γ -MTV-LUC (Hollenberg e Evans, *Cell*, 55:899-906 (1988)) contendo duas cópias do elemento de resposta TRE-palindrómico 5'-TCAGGTCATGACCTGA-3' (Umesono *et al.*, *Nature*, 336:262-65 (1988)) foi usado em transfecções para os RAR e foi usado CRBPIIFKLUC, que contém um RXRE (elemento de resposta do receptor de retinóide X (Mangelsdorf *et al.*, *Cell*, 66:555-61 (1991)), foi utilizado em transfecções para os RXR.

Ensaio de Co-transfecção em Células CV-1: Foi utilizada no ensaio *cis-trans* uma linha de células de rim de macaco, CV-1. As células foram transfectadas com dois plasmídeos. O vector *trans* permitiu uma produção eficiente do receptor retinóide nestas células que não expressam, normalmente, esta proteína receptora. O vector *cis* contém um

produto gene facilmente ensaiável, neste caso a luciferase de pirilampo, acoplado a um promotor que responde a retinóide, *i. e.*, um RARE ou RXRE. A adição de ácido retinóico ou de um retinóide sintético adequado resulta na formação de um complexo retinóide -RAR ou -RXR que activa a expressão do gene da luciferase, provocando a emissão de luz pelos extractos celulares. O nível de actividade da luciferase é directamente proporcional à eficácia do complexo retinóide-receptor na activação da expressão do gene. Esta abordagem sensível e reprodutível de co-transfecção permite a identificação de retinóides que interactuam com as diferentes isoformas do receptor.

As células foram cultivadas em DMEM suplementado com soro de bovino fetal a 10% esgotado com resina de carvão vegetal e as experiências foram conduzidas em placas com 96 alvéolos. Os plasmídeos foram transfectados transientemente pelo método do fosfato de cálcio (Umesono e Evans, *Cell*, 57:1139-46 (1989) e Berger *et al.*, *J. Steroid Biochem Molec. Biol.*, 41:733-38 (1992)) utilizando 10 ng de um vector plasmídeo de expressão de receptor pRS (promotor do vírus do sarcoma de Rous) 50 ng do plasmídeo repórter luciferase (LUC), 50 ng de pRS β -GAL (β -galactosidase) como um controlo interno e 90 ng de plasmídeo portador, pGEM. As células foram transfectadas durante 6 horas e, depois, lavadas para a remoção do precipitado. As células foram, então, incubadas durante 36 horas com ou sem retinóide. Após a transfecção, todos os passos subsequentes foram executados num Aparelho Automatizado Beckman Biomek. Foram preparados extractos celulares e, depois, ensaiados quanto às actividades de luciferase e de β -galactosidase, tal como descrito por Berger *et al.* (1992). Todas as determinações foram realizadas em triplicado em duas experiências independentes e foram normalizadas em relação à eficiência da transfecção utilizando β -galactosidase como o controlo interno. A actividade retinóide foi normalizada relativamente à do ácido totalmente *trans*-retinóico e é expressa como potência (EC50), que é a concentração de retinóide requerida para produzir 50% da resposta máxima observada e eficiência (%) que é a resposta máxima observada em relação à do ácido totalmente *trans*-retinóico a 10^{-5} M. Os dados obtidos são a média de, pelo menos, quatro experiências independentes. Valores de eficiência inferiores a 5% não são estatisticamente diferentes do fundo de 0%. Compostos com uma eficiência inferior a 20% a concentrações de 10^{-5} M são considerados como inactivos. A concentrações mais elevadas do composto, tais como 10^{-4} M, estes compostos são geralmente tóxicos para as células e, assim, é referida a eficiência máxima a 10^{-5} M nas tabelas e figuras aqui contidas.

O composto retinóide sintético 3-metil-TTNCB, tal como descrito anteriormente, foi avaliado quanto à sua capacidade para regular a expressão do gene mediada por receptores retinóides. Tal como apresentado na Figura 1, este composto é capaz de activar membros da subfamília RXR, *i.e.*, RXR α , RXR β e RXR γ , mas não tem, claramente, qualquer actividade

significativa para membros da subfamília RAR, *i.e.*, RAR α , RAR β e RAR γ . Foram realizados ensaios utilizando ácido totalmente *trans*-retinóico (Figura 2) e ácido 9-*cis*-retinóico (Figura 3) para referência e põem em evidência que estes isómeros do ácido retinóico activam membros de ambas as subfamílias RAR e RXR.

A potência e a eficiência foram calculadas para o composto 3-metil-TTNCB (não coberto pelas presentes reivindicações), tal como sumarizado na tabela seguinte. Para referência, os dados para o ácido 9-*cis*-retinóico também estão incluídos. Posteriormente proporcionaremos dados mostrando a potência e eficiência para oximas do presente invento.

TABELA 1

	<u>Potência (nM)</u>	<u>Eficiência</u>
<u>3-metil-TTNCB</u>		
RXR α	330	130%
RXR β	200	52%
RXR γ	260	82%
RAR α	>10.000	<2%
RAR β	>10.000	<4%
RAR γ	>10.000	<4%
<u>ácido 9-<i>cis</i>-retinóico</u>		
RXR α	150	140%
RXR β	100	140%
RXR γ	110	140%
RAR α	160	100%
RAR β	5	82%
RAR γ	47	120%

Tal como mostrado pelos dados na Tabela 1, o 3-metil-TTNCB, activa os RXR prontamente e a concentrações baixas. Para além disso, o 3-metil-TTNCB é um activador mais potente dos RXR do que dos RAR e activa, preferencialmente, os RXR quando comparado com os RAR, uma vez que são requeridas concentrações muito mais elevadas do composto para activar os RAR. Em contraste, o ácido 9-*cis*-retinóico não activa preferencialmente os RXR, tal como também se mostra na Tabela 1. Em vez disso, o ácido

9-*cis*-retinóico activa as isoformas RAR β e RAR γ a concentrações mais baixas e mais prontamente do que as isoformas RXR β e RXR γ e tem substancialmente a mesma actividade, dentro da precisão de medida, para a isoforma RAR α quando comparada com a isoforma RXR α .

Um extracto que era referido como contendo ácido 9-*cis*-retinóico tinha sido anteriormente referido como pelo menos 10 vezes mais potente na indução do RXR α do que do RAR α (Heyman *et al.*, *Cell*, 68:397,399 (24 de Janeiro de 1992)). Dados actualmente disponíveis indicam que o ácido 9-*cis*-retinóico não activa preferencialmente os RXR quando comparados com os RAR, tal como mostrado e discutido anteriormente. Os compostos deste invento activam preferencialmente os RXR quando comparados com os RAR e são, preferivelmente, pelo menos, três vezes mais potentes como activadores dos RXR do que dos RAR e, mais preferivelmente pelo menos cinco vezes mais potentes como activadores dos RXR do que dos RAR.

A potência e a eficiência foram também calculados para outros compostos comparativos, nomeadamente, 3-metil-TTNEB, 3-bromo-TTNEB, 3-metil-TTNCHBP, 3-metil-TTNEHBP, TPNEP e TPNCNP, tal como sumarizado a seguir na Tabela 2.

TABELA 2

	<u>Potência (nM)</u>	<u>Eficiência</u>
<u>3-metil-TTNEB</u>		
RXR α	40	83%
RXR β	21	102%
RXR γ	34	80%
RAR α	>10.000	6%
RAR β	>10.000	17%
RAR γ	>10.000	19%
<u>3-bromo-TTNEB</u>		
RXR α	64	88%
RXR β	54	49%
RXR γ	52	71%
RAR α	>10.000	3%
RAR β	>10.000	18%
RAR γ	>10.000	15%



3-metil-TTNCHBP

RXR α	1100	113%
RXR β	1100	155%
RXR γ	300	128%
RAR α	>10.000	<2%
RAR β	>10.000	7%
RAR γ	>10.000	17%

3-metil-TTNEHBP (63)

RXR α	140	125%
RXR β	71	121%
RXR γ	48	163%
RAR α	>10.000	<2%
RAR β	1.900	25%
RAR γ	>10.000	10%

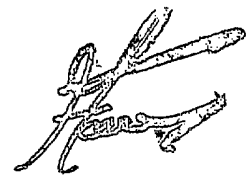
TPNEP (58)

RXR α	5	75%
RXR β	5	138%
RXR γ	6	100%
RAR α	>10.000	<2%
RAR β	>10.000	<2%
RAR γ	1.500	24%

TPNCP (62)

RXR α	4	63%
RXR β	4	93%
RXR γ	3	49%
RAR α	>10.000	<2%
RAR β	>10.000	<2%
RAR γ	>10.000	<2%

Tal como mostrado pelos dados na Tabela 2, cada um de 3-metil-TTNEB, 3-bromo-TTNEB, 3-metil-TTNCHBP, 3-metil-TTNEHBP, TPNEP e TPNCP activa, pronta e



preferencialmente, os RXR, e são mais potentes como activadores dos RXR do que dos RAR. A actividade reduzida destes compostos para os RAR quando em comparação com os RXR também é mostrada para alguns destes compostos nas Figuras 4-7.

A potência e a eficiência dos compostos derivados oxima 112 e 115 também foram calculadas tal como sumarizadas na seguinte Tabela 3.

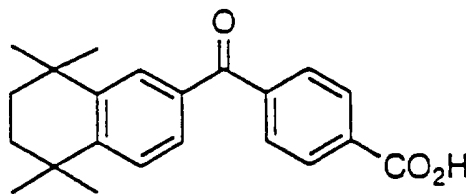
TABELA 3

	<u>Potência (nM)</u>	<u>Eficiência</u>
<u>Composto Oxima 112</u>		
RXR α	15	66%
RXR β	8	51%
RXR γ	12	62%
RAR α	>10.000	3%
RAR β	>10.000	3%
RAR γ	>10.000	3%
<u>Composto Oxima 115</u>		
RXR α	5	61%
RXR β	5	71%
RXR γ	5	70%
RAR α	>10.000	4%
RAR β	>10.000	2%
RAR γ	>10.000	3%

Tal como apresentado, os compostos oxima 112 e 115 activam preferencialmente os RXR em comparação com os RAR.

A actividade selectiva dos compostos deste invento para os Receptores de Retinóide X não é exibida por outros compostos conhecidos. Por exemplo, compostos como os descritos na patente U.S. nº 4,833,240 (Maignan *et al.*) parecem ser estruturalmente semelhantes aos compostos deste invento, mas não têm um grupo funcional (tal como metilo, etilo, isopropilo, bromo, cloro, etc.) na posição 3. Estes compostos têm pouca ou nenhuma potência e não têm qualquer selectividade para os RXR.

Por exemplo, um composto representativo da patente U.S. nº 4,833,240 (Maignan) é apresentado abaixo,



Maignon Ex. II

A potência e a eficiência do composto Maignon são sumarizadas abaixo

	<u>Potência (nM)</u>	<u>Eficiência</u>
<u>Maignon Ex. II</u>		
RXR α	3.000	82%
RXR β	3.000	44%
RXR γ	3.000	64%
RAR α	>10.000	11%
RAR β	1.900	58%
RAR γ	2.000	56%

Tal como mostrado, o composto de Maignon é virtualmente inactivo e não apresenta qualquer selectividade para os RXR. Em contraste, os compostos deste invento que tem um substituinte na posição 3, são activadores potentes dos RXR e exibem a selectividade inesperada para RXR apresentada na Tabela 3 e anteriormente discutida.

É expectável que os ligandos retinóides sintéticos, tais como os exemplificados na Tabela 3 que afectam preferencialmente algumas, mas não todas, as isoformas do ácido retinóico possam, em preparações farmacológicas, proporcionar produtos farmacêuticos com índices terapêuticos mais elevados e um melhor perfil de efeitos secundários do que os retinóides correntemente utilizados. Por exemplo, observou-se que os compostos do presente invento eram menos irritantes para a pele do que os retinóides anteriormente conhecidos.

Os compostos retinóides deste invento são úteis para o tratamento de certas condições dermatológicas como as desordens de queratinização, *i.e.*, diferenciação/proliferação. Um ensaio padrão para determinar a actividade destes compostos consiste na



medição da actividade enzimática para a transglutaminase; esta é uma medida da acção anti-proliferativa dos retinóides. Os retinóides mostraram inibir a via da diferenciação, o que é indicado por uma diminuição de vários marcadores bioquímicos que estão associados à expressão do fenotipo de célula escamosa, tal como a transglutaminase. (Yuspa *et al.*, *Cancer Research*, 43:5707-12 (1983)). Como se pode verificar na Figura 8, o composto 3-metil-TTNCB é capaz de inibir a actividade de transglutaminase e inibe 50% da actividade enzimática a 1×10^{-7} M.

Verificou-se através de testes *in vitro*, que os compostos retinóides deste invento bloqueiam (ou antagonizam) a actividade de AP-1, um conjunto de oncogenes que actuam a proliferação celular. Muitas desordens proliferativas são o resultado de activação de oncogenes/oncogene e, conseqüentemente, um composto que bloqueia a via do oncogene AP-1 pode ser usado no tratamento de doenças associadas a desordens proliferativas incluindo cancros, doenças inflamatórias, psoríase, etc. Por exemplo, o composto 3-metil-TTNEB foi avaliado usando o ensaio de co-transfecção no qual células HeLa foram co-transfectadas com um plasmídeo que exprime RXR α , sob o controlo de um promotor constitutivo e um plasmídeo que exprime o enzima repórter luciferase sob controlo de um promotor condicional (colagenase) contendo um elemento de resposta de AP-1. *E.g.*, Angel *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:2256 (1987); Lafyatis *et al.*, *Mol. Endocrinol.*, 4:973 (1990). Após a activação de AP-1, os resultados do ensaio mostraram o antagonismo da actividade de AP-1 pelo composto 3-metil-TTNEB através de RXR α de um modo dependente da dose. Outros compostos deste invento mostraram um antagonismo semelhante quanto à actividade de AP-1. Estes resultados põem em evidência que os compostos selectivos para RXR, como o 3-metil-TTNEB, podem ser utilizados como anti-proliferantes para a limitação do desenvolvimento celular e para o tratamento de doenças associadas à hiperproliferação.

Os compostos deste invento também exibem boa actividade comedolítica no teste em ratinhos Rhino descrito por Kligman *et al.*, (*J. of Inves. Derm.*, 73:354-58 (1979)) e Mezick *et al.*, (*J. of Inves. Derm.*, 83:110-13 (1984)). O teste em ratinhos Rhino tem sido um modelo para a despistagem de agentes comedolíticos. A actividade do composto retinóide 3-metil-TTNCB, bem como a do ácido 9-*cis* e totalmente *trans*-retinóico é mostrada na Figura 9. Uma solução a 0,1% de 3-metil-TTNCB é capaz de inibir o diâmetro dos utrículos em aproximadamente 50%. Foi, também, observado que o 3-metil-TTNCB é menos irritante para a pele de ratinhos Rhino do que o ácido 9-*cis* ou totalmente *trans*-retinóico.

O ensaio de co-transfecção permite o exame da capacidade de um composto para a modulação da expressão genética de um modo dependente de receptor retinóide. Para examinar a capacidade dos compostos deste invento em interactuarem directamente com os



receptores, examinámos as propriedades de ligação dos ligandos de todos os seis receptores retinóides. Os receptores foram expressos empregando um sistema de expressão de baculovírus tendo sido posto em evidência que o RXR α liga o ácido 9-*cis*-retinóico com elevada afinidade (Heyman *et al.*, *Cell*, 68:397 (1992)). Os parâmetros de ligação dos receptores expressos em sistemas de baculovírus e em sistemas mamíferos são essencialmente idênticos.

Os retinóides sintéticos do presente invento também foram testados utilizando ensaios de deslocamento de radio-ligandos. Testando as capacidades dos vários retinóides sintéticos para competirem com o ácido retinóico radiomarcado quanto à ligação a várias isoformas dos receptores, pode ser examinada a capacidade dos compostos em interactuarem directamente com o receptor e pode ser determinada a constante de dissociação relativa para o próprio receptor. Esta é uma análise suplementar importante relativamente ao ensaio de co-transfecção, uma vez que pode detectar propriedades/determinantes da actividade retinóide diferentes das que são medidas no ensaio de co-transfecção. Estes determinantes/diferenças nos dois sistemas de ensaio podem incluir (1) activação ou inactivação de alterações metabólicas dos compostos em teste, (2) ligação a proteínas do soro o que pode alterar a concentração livre ou outras propriedades do composto em teste, (3) podem ser medidas as diferenças na permeação celular entre os compostos em teste, (4) podem ser medidas directamente diferenças intrínsecas na afinidade dos compostos em teste para as proteínas do receptor, *i.e.*, em K_d , e (5) variações conformacionais produzidas no receptor após ligação do composto em teste, reflectidas nos efeitos na expressão do gene repórter; (*i.e.*, uma medição funcional da activação do receptor).

O composto 3-metil-TTNCB é capaz de deslocar o ácido ^3H -9-*cis*-retinóico ligado aos RXR, mas não é capaz de deslocar o ligando radiomarcado que está ligado aos RAR. Isto indica que o composto 3-metil-TTNCB se liga preferencialmente aos RXR quando comparados com os RAR, uma propriedade que seria expectável de um ligando selectivo para os RXR.

Os valores K_d foram determinados por aplicação da equação de Cleng-Prusoff. Estes valores foram baseados na determinação do valor IC_{50} , tal como determinado graficamente de um gráfico log-logit dos dados.

Os dados de ligação foram obtidos para vários compostos utilizando o método discutido em Weckler & Norman, *Anal. Biochem.*, 92:314-23 (1979). Os resultados são apresentados, seguidamente, na Tabela 4.

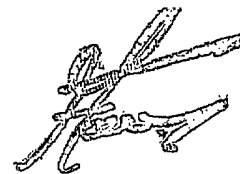


TABELA 4

<u>3-Metil-TTNCB</u>	<u>Ligação (K_{d50} nM)</u>
RXR α	350
RXR β	230
RXR γ	365
RAR α	>10.000
RAR β	>10.000
RAR γ	>10.000
<u>3-Metil-TTNEB</u>	
RXR α	41
RXR β	20
RXR γ	22
RAR α	5.500
RAR β	5.400
RAR γ	3.200
<u>TPNEP</u>	
RXR α	22
RXR β	21
RXR γ	39
RAR α	7.800
RAR β	4.900
RAR γ	6.000
<u>TPNCP</u>	
RXR α	3
RXR β	3
RXR γ	3
RAR α	>10.000
RAR β	>10.000
RAR γ	>10.000
<u>Composto Oxima 112</u>	
RXR α	6
RXR β	5
RXR γ	5
RAR α	8700
RAR β	>10.000
RAR γ	>10.000

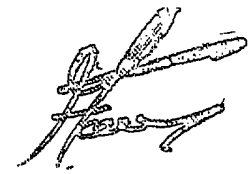


Mostrou-se que os compostos da Tabela 4 activam pronta e preferencialmente os RXR e que são mais potentes como activadores dos RXR do que dos RAR, utilizando o ensaio de co-transfecção, tal como discutido anteriormente. Os resultados de ligação na Tabela 4 mostram que estes compostos também ligam preferencialmente os RXR versus os RAR. Consideradas em conjunto as propriedades de ligação a ligando destes compostos e a sua capacidade para modularem selectivamente os membros da subfamília RXR põem em evidência a identificação de uma classe de compostos com propriedades biológicas únicas. As propriedades de ligação e, especialmente, os ensaios de activação transcricional são um bom elemento de previsão da actividade farmacológica de um composto (Berger *et al.* (1992)).

Foi reconhecido que o ensaio de co-transfecção proporciona uma avaliação funcional do ligando em teste tanto como um agonista ou como um antagonista do processo genético específico que se procura afectar e é um elemento de previsão da farmacologia *in vivo* (Berger *et al.* (1992)). É expectável que ligandos que não reagem significativamente com outros receptores intracelulares, conforme determinado pelo ensaio de co-transfecção, resultem em menos efeitos secundários farmacológicos. Dado que o ensaio de co-transfecção se efectua em células vivas, a avaliação de um ligando proporciona um indicador precoce da toxicidade potencial do candidato em concentrações às quais seria de esperar um benefício terapêutico .

Processos capazes de serem modulados por receptores retinóides, de acordo com o presente invento, incluem a diferenciação celular *in vitro*, a regulação de processos morfogenéticos incluindo morfogénese de membros, regulação da proteína celular de ligação a retinol (CRBP) e semelhantes. Tal como é prontamente reconhecido pelos peritos na arte a disponibilidade dos ligandos para o receptor de retinóide X torna possível, pela primeira vez, elucidar os processos controlados por membros da subfamília de receptores de retinóide X. Adicionalmente, permite o desenvolvimento de ensaios para a identificação de antagonistas para estes receptores.

Os processos capazes de serem modulados por receptores retinóides, de acordo com o presente invento, incluem ainda a modulação *in vivo* do metabolismo dos lípidos; modulação *in vivo* de processos relacionados com a pele (e.g. acne, psoríase, envelhecimento, enrugamento e semelhantes); modulação *in vivo* da morte celular programada (apoptose); modulação *in vivo* do desenvolvimento de células malignas, tal como ocorre, por exemplo, na leucemia promielocítica aguda, cancro da mama, cancro da próstata, cancro do pulmão, cancros da via aerodigestiva, cancro da pele, cancro da bexiga e sarcomas; modulação



in vivo de lesões pré-malignas, como as que ocorrem com a leucoplasia oral e semelhantes; modulação *in vivo* de doenças auto-imunes como a artrite reumatóide; modulação *in vivo* do metabolismo do ácido gordo; e semelhantes. Espera-se que estas aplicações permitam a modulação de vários processos biológicos com ocorrência reduzida de efeitos secundários indesejáveis, tais como os efeitos teratogénicos, irritação da pele, secura das mucosas, distúrbios lipídicos e semelhantes. Aplicações *in vivo* podem ser empregues relativamente a uma larga gama de sujeitos, tais como, por exemplo, humanos, roedores, ovelhas, porcos, vacas e semelhantes.

Por exemplo, relativamente à modulação *in vivo* do metabolismo dos lípidos anteriormente referido, a apolipoproteína A-1 ("apoA1") é um componente proteico principal do colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL), plasmático. Mostrou-se, nos humanos, que o nível circulatório de HDL está correlacionado inversamente com o risco de doença aterosclerótica cardiovascular (ASCVD), a principal causa de morbidez e mortalidade nos Estados Unidos, com um aumento de 3-4% na ASCVD por cada 1% de diminuição no colesterol HDL. Gordon *et al.*, *New Engl. J. Med.*, 321:1311 (1989). Embora não existam actualmente bons regimes terapêuticos para aumentar o colesterol HDL, é expectável que a regulação da síntese de apoA1 possa ser utilizada para afectar as concentrações plasmáticas de colesterol HDL e diminuir o risco de ASCVD. Rubin *et al.*, *Nature*, 353:265 (1991).

Foi estabelecido que a regulação da transcrição de apoA1 é controlada por membros da superfamília de receptores intracelulares e adicionalmente, que o local "A" de início da transcrição do gene de apoA1 é um elemento de resposta ao ácido retinóico, muito selectivo, que responde aos receptores de retinóide X. Rottman *et al.*, *Mol. Cell.Biol.*, 11:3814-20 (1991). Uma vez que os RXR podem formar heterodímeros com trans-repressores tais como ARP-1 e COUP-TF e com trans-activadores como o HNF-4 e que um elemento de resposta a RXR reside no promotor apoA1, os retinóides ou ligandos que activem selectivamente membros da família RXR dos receptores de ácido retinóico podem regular a transcrição de apoA1. Pusemos em evidência, em estudos *in vivo*, que os ligandos deste invento, que têm actividade selectiva para RXR, podem ser usados para modular apoA1/colesterol HDL e para aumentar significativamente os níveis plasmáticos de HDL, tal como evidenciado no estudo seguinte.

Foram obtidas ratas Sprague-Dawley, macho, (160-200 grama) de Harlan. Os animais foram alimentados com dietas laboratoriais comuns (Harlan/Teklad) e mantidos numa casota para animais com um ambiente controlado, com um período de luz que durava das 6 da manhã às 6 da tarde. Os animais foram tratados com drogas preparadas como



suspensões em azeite.

Para verificar que a activação de RXR pode aumentar o apoA1/colesterol HDL plasmático, foi realizado um estudo inicial que incluía o doseamento de ratazanas durante 4 dias com um composto selectivo para RAR, ácido totalmente *trans*-retinóico, o agonista não selectivo de RAR/RXR, ácido 9-*cis*-retinóico e um de dois agentes selectivos para RXR, 3-metil-TTNCB ou 3-metil-TTNEB. Cada droga foi administrada a uma dose de 100 mg/kg, i.p.. Os grupos de controlo positivo receberam azeite como um veículo. Vinte e quatro horas após o último tratamento, as ratazanas foram sacrificadas por inalação de CO₂, foi recolhido sangue da veia cava inferior num tubo contendo 0,1 ml de EDTA 0,15% e foi centrifugado a 1500xg, durante 20 minutos, a 4°C. O plasma foi separado e armazenado a 4°C para avaliação do colesterol total e colesterol de lipoproteína de alta densidade (colesterol HDL) plasmáticos.

O colesterol plasmático total foi medido enzimaticamente utilizando Métodos de Diagnóstico de Colesterol, de Elevado Desempenho, de Boeringer Mannheim, com um Analisador Bicromático ABBOTT VP. O colesterol HDL foi medido após preparação da fracção contendo HDL por precipitação por heparina-manganês do plasma. O colesterol HDL nesta fracção foi estimado tal como referido anteriormente. Todas as separações de HDL foram verificadas quanto à contaminação com outras lipoproteínas por electroforese em gel de agarose.

Os resultados deste estudo são apresentados na Figura 10. Tal como mostrado, ratazanas que recebem os compostos selectivos para RXR exibiam aumentos substanciais e estatisticamente significativos nos níveis de HDL, particularmente quando recebiam 3-metil-TTNEB.

Dado que o ligando selectivo para RXR, 3-metil-TTNEB, era o mais eficaz, foram conduzidas experiências adicionais, de 4 dias, com este agente a doses de 0,3, 1, 3, 6, 10, 30, 100 ou 300 mg/kg i.p. em 1,0 ml de azeite ou 1, 3, 10, 30, 100, 300 mg/kg p.o. em 1,0 ml de azeite durante 4 dias. Foi conduzido um estudo adicional de 30 dias p.o. com 10, 30 ou 100 mg/kg de 3-metil-TTNEB para determinar se se desenvolveria tolerância às suas acções farmacológicas. Para as ratazanas que recebiam 3-metil-TTNEB em várias doses, durante quatro dias, foi observado que o 3-metil-TTNEB aumentava as concentrações plasmáticas de colesterol HDL dum modo dependente da dose, sendo feitos aumentos significativos à dose mais baixa, 0,3 mg/kg i.p.. Na sua dose eficaz, óptima, o 3-metil-TTNEB aumentava as concentração plasmáticas de colesterol HDL de 58 mg/dl para 95 mg/dl – um aumento superior a 60%. A medição do colesterol total mostrou um aumento devido ao aumento da



fracção de colesterol HDL. A medição de triglicéridos não mostrou variação ou mostrou uma ligeira diminuição. O estudo de 30 dias com 3-metil-TTNEB não indicou desenvolvimento de tolerância à sua acção farmacológica.

Este estudo pôs em evidência que o 3-metil-TTNEB aumentava as concentrações plasmáticas de colesterol HDL de um modo dependente da dose a seguir a administração i.p. ou p.o..

Também foi estudado o efeito sobre a apoA1 em circulação do 3-metil-TTNEB administrado oralmente. Foram tratadas, diariamente, durante quatro dias, ratazanas Sprague-Dawley, macho, com 3 mg/kg de peso corporal de 3-metil-TTNEB. Foram colhidas amostras de soro e analisadas por Transferência de Western ("Western Blot"), usando anti-soros específicos para apoA1 de ratazana. O tratamento com 3-metil-TTNEB resultou num aumento significativo no nível de apoA1 em circulação.

Estes estudos põem em evidência que o tratamento com um composto específico para RXR, tal como o 3-metil-TTNEB, aumenta as concentrações plasmáticas de apoA1/colesterol HDL. Uma vez que estes estudos animais são um elemento de previsão aceite para a resposta humana, será, conseqüentemente, esperado que estes compostos possam ser usados para aumentar terapêuticamente o colesterol HDL em pacientes que têm, ou estão em risco de ter, aterosclerose.

Também foram realizados estudos *in vitro* adicionais utilizando o ensaio de co-transfecção anteriormente descrito neste pedido, para por em evidência o efeito de ligandos selectivos para RXR na regulação da transcrição de apoA1, tal como é descrito seguidamente.

Este trabalho focou-se no estudo das propriedades transcricionais dos receptores retinóides RXR e RAR numa molécula repórter (*e.g.*, luciferase) sobre o controlo de um promotor basal contendo o elemento de resposta RXR do gene apoA1 (local "A"). Foram transfectadas, numa linha celular de hepatócitos humanos (HepG-2) construções de plasmídeo codificando os vários receptores em conjunto com o plasmídeo repórter. Os plasmídeos repórteres continham múltiplos do local "A" da apoA1 (-214 a -192, relativamente ao local de início da transcrição) que se tinha mostrado ligar RXR. Widom *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 12:3380-89 (1992); Ladas & Karathanasis, *Science* 251:561-65 (1991). Após transfecção, tratamento, colheita e ensaio, os dados obtidos foram normalizados relativamente a actividade de beta-galactosidase transfectada de modo a controlar a eficiência da transfecção. Os resultados puseram em evidência a activação no sistema com os



ligandos específicos para RXR, 3-metil-TTNCB e 3-metil-TTNEB, de um modo dependente da concentração mostrando que os ligandos específicos para RXR podiam regular as propriedades transcricionais através do local "A" do gene apoA1. Estes compostos não tinham qualquer efeito quando foi usado o RAR na transfecção, evidenciando a especificidade para o receptor. A regulação transcricional por RXR era dependente da presença do elemento de resposta a hormona.

Estes estudos *in vivo* e *in vitro* põem em evidência que os compostos selectivos para RXR deste invento podem ser usados para elevar o apoA1/colesterol HDL e no tratamento terapêutico de desordens cardiovasculares relacionadas.

Relativamente à modulação da morte celular programada (apoptose) os compostos retinóides deste invento mostraram induzir apoptose em certos tipos celulares particulares, incluindo células leucémicas e carcinomas epiteliais escamosos. Normalmente, nas células existe um equilíbrio delicado entre os processos celulares de proliferação, diferenciação e morte celular e compostos que afectem este equilíbrio podem ser usados para tratar certos cancros. Especificamente, foi estudada, a capacidade do 3-metil-TTNEB em induzir diferenciação, inibir proliferação e induzir apoptose numa linha celular de leucemia promielocítica aguda, HL60. A proliferação celular foi medida por um ensaio de incorporação de timidina (Shrivastav *et al.*, *Cancer Res.*, 40:4438 (1980)) e verificou-se que o 3-metil-TTNEB não tinha qualquer efeito na proliferação celular. Isto contrasta com o ácido totalmente *trans*-retinóico que inibe a incorporação de timidina. A diferenciação celular foi medida pela capacidade das células reduzirem nitroazul de tetrazólio (NBT) (Breitman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77:2936 (1980) e verificou-se que o 3-metil-TTNEB não induz diferenciação indevida. A EC_{50} para a diferenciação mediada por 3-metil-TTNEB era $>1000\ \mu\text{M}$, quando comparada com $2,0\ \mu\text{M}$ para o ácido totalmente *trans*-retinóico. Contudo, verificou-se que o 3-metil-TTNEB induz actividade de transglutaminase nas células HL60 (Murtaugh *et al.*, *J. Biol. Chem.* 258:11074 (1983)) de um modo dependente da concentração, que se correlaciona com a indução de apoptose ou morte celular programada. Foi, adicionalmente, verificado que o 3-metil-TTNEB era capaz de induzir apoptose tal como medido por fragmentação de ADN e alterações morfológicas. Outros compostos retinóides deste invento mostraram resultados semelhantes e foram, também, verificados resultados semelhantes noutras linhas celulares tais como linhas celulares epiteliais escamosas e células ME180, um carcinoma cervical humano.

Estes resultados mostram que compostos específicos para RXR, tal como o 3-metil-TTNEB, induz apoptose com um efeito directo mínimo na inibição da proliferação e indução da diferenciação. Compostos que são capazes de induzir apoptose mostraram ser eficazes em quimioterapia do cancro. (*e.g.*, terapia anti-hormonal para o cancro da mama e da próstata).

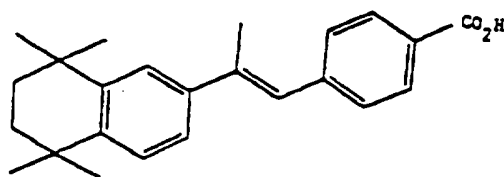
Em contraste, noutro tipo de células mostrou-se que os retinóides inibem a apoptose

por activação actuada por células T e o ácido 9-*cis*-retinóico era aproximadamente dez vezes mais potente do que os ácidos totalmente *trans*-retinóicos (Ashwell *et al.*, *Proceedings National Academy of Science*, Vol. 90, pág. 6170-6174 (1993)). Estes dados indicam que os RXR estão envolvidos neste acontecimento. Assim, os retinóides poderiam ser usados para bloquear e/ou imuno-modular a apoptose de célula T associada a certos estados de doença. (e.g. SIDA).

Verificou-se, surpreendentemente que a administração de um ligando que tem actividade específica para os RXR, mas essencialmente nenhuma actividade para os RAR, em combinação com um ligando que tem actividade específica para os RAR, mas não para os RXR, proporciona uma resposta celular a dosagens extremamente baixas, dosagens às quais os ligandos, individualmente, não proporcionam qualquer resposta significativa. Especificamente, foi estudado, em estudos *in vivo*, usando um ensaio de incorporação de timidina, o efeito relacionado com a concentração de um ligando específico para RXR e de um ligando específico para RAR na proliferação de uma linha celular de mieloma (RPMI 8226). Este ensaio examina a incorporação de timidina radiomarcada em ADN e, pela determinação da capacidade de um composto inibir a incorporação de timidina no ADN, proporciona uma medida da proliferação celular. (L. M. Bradley, *Selected Methods in Cellular Immunology*, Cap. 10.1, pág. 235-38, Mishell & Shiigi (eds.), Freeman & Co., Nova Iorque, 1980). Compostos que inibem a proliferação celular têm utilidade bem conhecida no tratamento de certos cancros.

Tal como foi anteriormente mostrado (Tabela 2), o 3-metil-TTNEB activa membros da subfamília RXR e não tem qualquer actividade significativa para membros da subfamília RAR. O exame dos efeitos do 3-metil-TTNEB na proliferação de células de mieloma mostrou uma inibição da incorporação de timidina dependente da concentração. A IC₅₀ (a concentração de 3-metil-TTNEB necessária para produzir uma inibição de 50% da resposta máxima) é 10⁻⁷ M, tal como apresentado na Figura 11. Concentrações inferiores a 10⁻⁸ M não proporcionam, essencialmente, qualquer efeito sobre a proliferação celular, tal como também é apresentado na Figura 11.

É bem conhecido que o composto TTNPB activa membros da subfamília RAR e não tem qualquer actividade significativa em membros da subfamília RXR. O composto TTNPB é apresentado abaixo e a sua actividade é apresentada na Tabela 5.



TTNPB

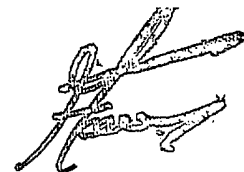


TABELA 5

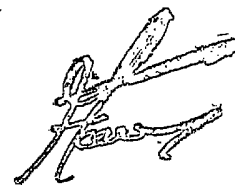
<u>TTNPB</u>	<u>Potência (nM)</u>	<u>Eficiência</u>
RXR α	> 10.000	< 5%
RXR β	> 10.000	< 5%
RXR γ	> 10.000	< 5%
RAR α	52	30
RAR β	4	40
RAR γ	0,4	50

O efeito do TTNPB na proliferação celular é apresentado na Figura 11. O valor de IC₅₀ de TTNPB é cerca de 5×10^{-11} M e uma concentração inferior a 10^{-11} M não produz, essencialmente, qualquer efeito na proliferação celular.

Contudo, verificou-se que quando o 3-metil-TTNEB e o TTNPB estão presentes em conjunto, cada um a uma concentração à qual o composto sozinho não produz, substancialmente, qualquer efeito anti-proliferativo, a combinação dos dois compostos boqueia eficazmente a proliferação celular. A combinação dos dois compostos parece produzir um efeito superior ao da adição ou sinérgico.

Por exemplo, tal como apresentado na Figura 12, a presença de TTNPB a uma concentração de 10^{-11} M produz uma inibição de 9% na incorporação de timidina. Contudo, a sua combinação com o 3-metil-TTNEB a uma concentração de 10^{-8} M (que não resulta em qualquer efeito na proliferação celular) produz um efeito inibidor muito aumentado de 49%. Igualmente, verificou-se, também, que o efeito inibidor do 3-metil-TTNEB é muito aumentado pela presença de TTNPB a uma concentração que, sozinha, não produz qualquer efeito.

Uma vez que é bem conhecido que os efeitos secundários tóxicos de compostos como o TTNPB são dependentes da concentração, é de esperar que o efeito sinérgico que resulta da combinação destes compostos específicos para RAR com compostos específicos para RXR permita dosagens mais baixas que são eficazes e, conseqüentemente, reduzam os efeitos secundários tóxicos. Por exemplo, na quimioterapia do cancro, é de esperar que o uso de dois destes compostos, em combinação, a doses relativamente baixas, produza o efeito benéfico desejado, minimizando, no entanto, os efeitos secundários indesejados que resultam a doses mais elevadas dos compostos.



Estudos *in vitro* utilizando o ensaio de co-transfecção também mostraram este mesmo efeito sinérgico. Por exemplo, foram efectuadas transfecções em células HEPG2, utilizando o ensaio de co-transfecção descrito anteriormente e empregando RAR- α e RXR- α e um repórter consistindo no local "A" elemento de resposta apoA1 no contexto de TKLUC (Ladias & Karathanasis, *Science* 251:561-65 (1991)). Neste estudo foram usados 100 ng do receptor considerado e foi usado RSVCAT como um portador para manter a quantidade do promotor RSV constante. Todos os compostos foram adicionados a uma concentração final de 10^{-7} M. Foram utilizados o composto 3-metil-TTNEB específico para RXR (Tabela 2, anterior) e o composto específico de RAR, TTNPB (Tabela 5, anterior). Tal como é apresentado seguidamente na Tabela 6, a resposta relativa, normalizada, observada utilizando o ensaio de co-transfecção também pôs em evidência um efeito sinérgico quando era utilizada uma combinação dos dois compostos, quando comparada com a resposta conseguida utilizando os compostos individualmente.

TABELA 6

<u>Composto</u>	<u>Actividade do Repórter (n° de vezes de indução)</u>
3-metil-TTNEB	5
TTNPB	32
3-metil-TTNEB + TTNPB	75

Tal como será perceptível para os peritos na arte, da discussão anterior, a resposta biológica de um composto selectivo para RAR a uma dada concentração pode ser melhorada sinérgicamente pela combinação do composto com um composto selectivo para RXR. De modo semelhante, a resposta biológica de um composto selectivo para RXR pode ser melhorada pela combinação do composto com um composto selectivo para RAR. Assim, torna-se possível conseguir uma resposta biológica desejável, usando uma combinação de compostos selectivos para RAR e RXR, a concentrações mais baixas do que seria o caso quando são usados os compostos sozinhos. De entre as vantagens proporcionadas por estas combinações de compostos selectivos para RAR e RXR estão os efeitos terapêuticos desejáveis com menos efeitos secundários. Adicionalmente, podem ser conseguidos, pelas combinações de compostos selectivos para RAR e RXR, novos efeitos que não são obtíveis com qualquer um dos dois agentes sozinhos.

Foi adicionalmente posto em evidência que compostos específicos para RXR também melhoram sinérgicamente a resposta de outros sistemas hormonais. Especificamente o

receptor activado por proliferador de peroxissoma (PPAR) é um membro da superfamília de receptores intracelulares que desempenham um papel na modulação da homeostase dos lípidos. Mostrou-se que o PPAR é activado por carboxilatos anfipáticos, tais como o ácido clofibríco e gem-fibrizol. Estes agentes, designados proliferadores de peroxissoma têm sido usado no Homem como agentes hipolipidémicos. A adição de ácido 9-*cis*-retinóico (um ligando retinóide que activa tanto os receptores RAR como RXR) e ácido clofibríco a células HepG2 transfectadas com plasmídeos de expressão de RXR α e PPAR, resulta em activação do gene receptor que era superior à soma da activação de cada ligando separadamente. (Kliwer *et al.*, *Nature* 358:771 (1992)). De modo semelhante, quando os dois receptores anteriores foram co-transfectados em células HepG2, verificou-se que a adição de um ligando específico para RXR (3-metil-TTNEB) e ácido clofibríco produzia uma resposta superior à da soma, tal como determinado pela activação de um gene repórter alvo, como apresentada a seguir, na Tabela 7.

TABELA 7

<u>Composto</u>	<u>Resposta Normalizada (%)</u>
Ácido clofibríco	100
3-metil-TTNEB	90
ácido clofibríco + 3-metil-TTNEB	425

Foi observado um efeito sinérgico semelhante com RXR e ligandos específicos para RXR e o receptor da Vitamina D (VDR) e os seus ligandos relacionados. Quando receptores RXR β e VD foram co-transfectados em células CV-1 contendo um elemento de resposta a hormona, a adição de 3-metil-TTNEB, selectivo para RXR, e 1,25-di-hidroxi-vitamina D (1,25-D) produziu uma resposta superior à da soma, do que as que eram observadas para cada um dos ligandos individuais, tal como apresentado seguidamente na Tabela 8.

TABELA 8

<u>Composto</u>	<u>Resposta normalizada (%)</u>
1,25-D	100
3-metil-TTNEB	13
1,25-D + 3-metil-TTNEB	190

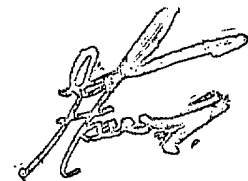
Tal como mostrado, os resultados anteriores indicam que cada par de receptores (RXR α /PPAR e RXR β /VDR, respectivamente), na presença de ligandos que se sabe



activarem especificamente os seus receptores respectivos, são capazes de produzir uma resposta sinérgica. Os resultados indicam que a resposta de um agente sozinho pode ser melhorada pela combinação dos dois agentes ou que podem ser conseguidas respostas biológicas ou terapêuticas comparáveis, pelo uso, em combinação, de doses mais baixas destes agentes.

A observação de que ligandos específicos para RXR são capazes de actuarem sinergicamente com ligandos de RAR, ligandos de PPAR e ligandos de Vitamina D, indica que os ligandos específicos para RXR têm utilidade, não apenas como agentes terapêuticos sozinhos, mas também em terapia de combinação, para a obtenção de resposta biológica ou terapêutica melhoradas pela adição de ligando específico para RXR. Esta terapia de combinação pode, também, proporcionar um benefício adicional de diminuição dos efeitos secundários associados ao agente primário, empregando doses mais baixas desse agente. Por exemplo, o uso de Vitamina D ou de um ligando do receptor de Vitamina D, relacionado, em conjunto com um composto selectivo para RXR, para o tratamento de uma variedade de desordens, incluindo doenças da pele (acne, psoríase) desordens de hiperproliferação (cancros benignos e malignos) e desordens de homeostase do cálcio, podem diminuir os efeitos secundários adversos associados à terapia com Vitamina D sozinha.

Como um exemplo adicional, evidenciou-se *in vitro*, que os compostos específicos para RXR deste invento actuam sinergicamente, com compostos que afectam a proliferação celular, tal como o Interferão. Especificamente, as propriedades de crescimento de duas linhas celulares tumorais, humanas, (ME180, um carcinoma de célula escamosa e RPMI18226, um mieloma múltiplo) foram seguidas na presença do composto 3-metil-TTNEB sozinho e em combinação com Interferão α 2b, utilizando procedimentos comuns de cultura celular. Os efeitos sobre o desenvolvimento destas células foram seguidos por avaliação do número de células e, também, pela avaliação do desenvolvimento em meio semi-sólido para a linha celular RPMI18226. Verificou-se que tanto o 3-metil-TTNEB como o Interferão α 2b inibiam o desenvolvimento celular de um modo dependente da concentração e, cada um sozinho, produzia uma depressão significativa na proliferação celular. Adicionalmente, quando as células foram tratadas com ambos os compostos foi observado um efeito aditivo ou superior ao aditivo na depressão da proliferação celular. Espera-se que o tratamento com outros agentes quimioterapêuticos, incluindo agentes anti-proliferação e/ou moduladores do ciclo celular *e.g.*, metotrexato, fluoro-uracilo (5FU, ARA-C, etc.)) em combinação com compostos específicos para RXR produza resultados semelhantes. Espera-se que o efeito anti-proliferação melhorado permita baixar as doses terapêuticas no tratamento de desordens de proliferação, tais como carcinomas de células escamosas e outros.



Adicionalmente, a terapia de combinação poderia permitir o uso de doses mais baixas destes compostos para se conseguir um efeito benéfico comparável em conjunto com menos efeitos secundários/efeitos tóxicos melhorando, conseqüentemente, o índice terapêutico da terapia. O índice terapêutico é definido como a razão entre a eficiência e a toxicidade de um composto.

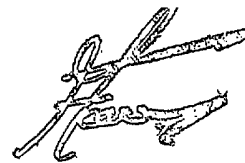
Uma vez que se sabe que o RXR forma heterodímeros com vários membros da superfamília do receptor intracelular, é expectável que a resposta sinérgica observada com o uso de ligandos selectivos para RXR possa ser conseguida com outros receptores com os quais os heterodímeros são formados. Estes incluem PPAR, RAR, Vitamina D, receptores da hormona tiróide, HNF4, a família COUP de receptores, tal como referido acima, e outros membros ainda não identificados da superfamília de receptores intracelulares.

Tal como será adicionalmente perceptível pelos peritos na arte, os compostos descritos acima podem prontamente ser utilizados em aplicações farmacológicas em que é desejada actividade selectiva para o receptor retinóide e em que é desejado minimizar as reactividades cruzadas com outros receptores intracelulares relacionados. Aplicações *in vivo* do invento incluem administração dos compostos descritos a sujeitos mamíferos e, em particular, a humanos.

Os compostos do presente invento são pequenas moléculas que são relativamente solúveis em gordura ou lipófilas e entram na célula por difusão passiva através da membrana plasmática. Conseqüentemente, estes ligandos estão bem adaptados a administração oral e por injeção, bem como topicamente. Por administração, estes ligandos podem activar selectivamente receptores de retinóide X e, conseqüentemente, modular selectivamente processos mediados por estes receptores.

As composições farmacêuticas deste invento são preparadas em formas de dosagem unitária, convencionais, por incorporação de um composto activo do invento ou uma mistura destes compostos, com um portador farmacêutico, não tóxico de acordo com procedimentos aceites, numa quantidade não tóxica suficiente para produzir a actividade farmacodinâmica num mamífero e, em particular, num sujeito humano. Preferivelmente, a composição contém o ingrediente activo numa quantidade activa, mas não tóxica, seleccionada de cerca de 5 mg a cerca de 500 mg de ingrediente activo por unidade de dosagem. Esta quantidade depende da actividade biológica específica desejada e da condição do paciente.

O portador ou veículo farmacêutico empregue pode ser, por exemplo, um sólido ou



líquido. Pode ser empregue uma variedade de formas. Assim, quando é usado um portador sólido, a preparação pode ser simplesmente moída, micronizada em óleo, transformada em comprimido, colocada numa cápsula de gelatina dura ou cápsula com revestimento entérico em forma de pó micronizado ou de pelete, ou na forma de um trocisco, pastilha ou supositório. Quando é usado um portador líquido, a preparação pode estar na forma de um líquido, como uma ampola ou uma suspensão líquida aquosa ou não aquosa. Para administração tópica o ingrediente activo pode ser formulado usando bases hidratantes, macias tais como unguentos e cremes. Exemplos de bases adequadas para unguentos são a vaselina, vaselina com silicones voláteis, lanolina e emulsões água em óleo tais como Eucerin (Beiersdorf). Exemplos de bases adequadas para cremes são o Creme Nivea (Beiersdorf), creme de limpeza da pele (USP), Purpose Cream (Johnson & Johnson), unguento hidrófilo (USP) e Lubriderm (Warner-Lambert).

Formulações de composições farmacológicas ilustrativas são como se segue:

São preparadas cápsulas de gelatina dura usando os seguintes ingredientes:

	Quantidade (mg/cápsula)
3-metil-TTNCB	140
Amido, seco	100
Estearato de magnésio	<u>10</u>
Total	250 mg

Os ingredientes anteriores são misturados e usados para o enchimento de cápsulas de gelatina dura em quantidades de 250 mg.

É preparado um comprimido usando os ingredientes seguintes:

	Quantidade (mg/comprimido)
3-metil-TTNCB	140
Celulose, microcristalina	200
Dióxido de silício, fumado	10
Ácido esteárico	<u>10</u>
Total	360 mg

Os componentes são misturados e prensados para formarem comprimidos, pesando, cada um, 360 mg.



São feitos comprimidos, contendo cada um 60 mg do ingrediente activo, como se segue:

	Quantidade (mg/comprimido)
3-metil-TTNCB	60
Amido	45
Celulose, microcristalina	35
Polivinilpirrolidona (PVP) (como uma solução a 10% em água)	4
Carboximetil-amido de sódio (SCMS)	4,5
Estearato de magnésio	0,5
Talco	<u>1.0</u>
Total	150 mg

O ingrediente activo, amido e celulose são passados através de um peneiro de malha U.S. nº 45 e misturados cuidadosamente. A solução de PVP é misturada com os pós resultantes, que são depois passados através de um peneiro de malha U.S. nº 14. Os grânulos assim produzidos são secos a 50°C e passados através de um peneiro malha U.S. Nº 18. Os SCMS, estearato de magnésio e talco, previamente passados através de um peneiro malha U.S. nº 60, são, então, adicionados aos grânulos que, após mistura, são prensados numa máquina de fazer comprimidos originando comprimidos que pesam 150 mg cada um.

Podem ser feitos supositórios, contendo cada um 225 mg do ingrediente activo, do modo seguinte:

3-metil-TTNCB	225 mg
Glicéridos de ácido gordo saturado	<u>2.000 mg</u>
Total	2.225 mg

O ingrediente activo é passado através de um peneiro de malha U.S. nº 60 e suspenso nos glicéridos de ácido gordo saturado, previamente fundidos, usando o calor mínimo necessário. A mistura é, então, vertida num molde de supositórios normal, com capacidade de 2g e deixada arrefecer.

Pode ser preparada uma formulação intravenosa como se segue:

3-metil-TTNCB	100 mg
Solução salina isotónica	1.000 ml
Glicerol	100 ml

O composto é dissolvido no glicerol e, depois, a solução é diluída lentamente com solução salina isotónica. A solução dos ingredientes anteriores é, então administrada intravenosamente a uma taxa de 1 ml por minuto a um paciente.

Os compostos deste invento também têm utilidade, quando marcados, como ligandos para uso em ensaios para a determinação da presença de RXR. Eles são particularmente úteis devido à sua capacidade para se ligarem selectivamente a membros da subfamília RXR e podem, por isso, ser usados para a determinação da presença de isoformas de RXR na presença de outros receptores relacionados.

Devido à selectividade específica dos compostos deste invento para receptores de retinóide X, estes compostos também podem ser usados para a purificação, *in vitro*, de amostras de receptores de retinóide X. Esta purificação pode ser realizada por mistura de amostras contendo os receptores de retinóide X com um ou mais dos compostos derivados, bicíclicos, descritos, de modo que o composto (ligando) se ligue ao receptor e, depois, fazer a separação da combinação ligando/receptor por técnicas de separação que são conhecidas dos peritos na arte. Estas técnicas incluem separação em coluna, filtração, centrifugação, marcação e separação física e complexação com anticorpos, entre outras.

Lisboa, -8. MAR. 2000

Por LIGAND PHARMACEUTICALS, INC.

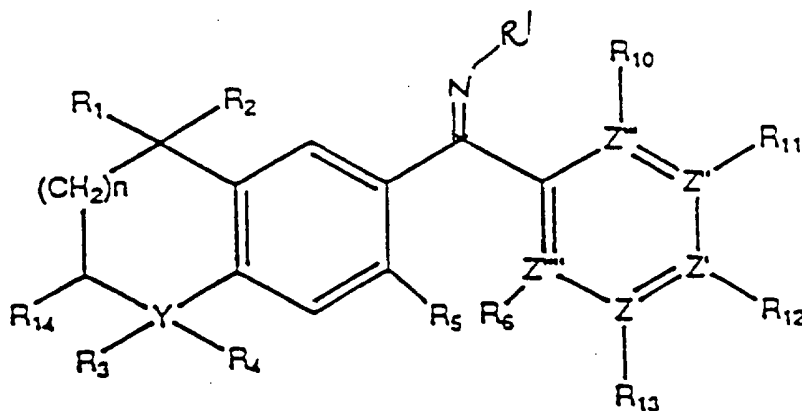
- O AGENTE OFICIAL -
O ADJUNTO



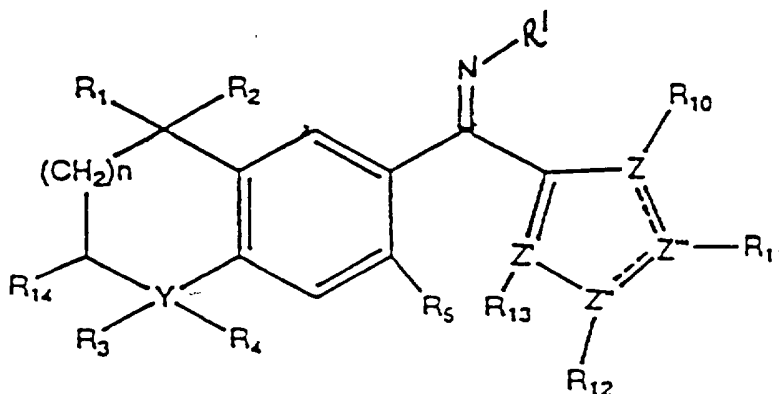
ENG.º ANTÓNIO JOÃO
DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74 - 4.º
1200 LISBOA

REIVINDICAÇÕES

1. Composto de fórmula:



ou



nas quais:

R_1 e R_2 representam, cada um independentemente, hidrogénio ou alquilo ou acilo inferior com 1-4 átomos de carbono;

Y representa C, O, S, N, CHOH, CO, SO, SO₂ ou um sal farmacologicamente aceitável;

R_3 representa hidrogénio ou alquilo inferior, com 1-4 átomos de carbono, em que Y é C ou N;

R_4 representa hidrogénio ou alquilo inferior, com 1-4 átomos de carbono, em que Y é C, mas R_4 não existe se Y for N e nem R_3 ou R_4 existem se Y for S, O, CHOH, CO, SO ou SO₂;

R' representa HO, NC, (R₇R₈)N, R₁₇O ou R₁₇;

R_5 representa hidrogénio, um alquilo inferior com 1-4 carbonos, halogénio, nitro, OR₇, SR₇, NR₇R₈, ou (CF)_nCF₃, com a condição de, se em conjunto, R₆, R₁₀, R₁₁, R₁₂ e R₁₃, forem



todos hidrogénio e Z, Z', Z'', Z''' e Z'''' forem todos carbono ou se R' representar HO então R₅ não é hidrogénio;

R₆, R₁₀, R₁₁, R₁₂, R₁₃, representam, cada um independentemente, hidrogénio, um alquilo inferior com 1-4 carbonos, halogéneo, nitro, OR₇, SR₇, NR₇R₈, ou (CF)_nCF₃ e existem apenas se o Z, Z', Z'', Z''', ou Z'''' em que têm origem for C, ou, cada um independentemente, representa hidrogénio ou um alquilo inferior com 1-4 carbonos se o Z, Z', Z'', Z''', ou Z'''' em que têm origem for N num anel de cinco membros, e em que um de R₆, R₁₀, R₁₁, R₁₂ ou R₁₃, for X;

R₇ e R₈ representam, cada um, independentemente, hidrogénio ou um alquilo inferior com 1-6 carbonos;

R₉ representa um alquilo inferior com 1-4 carbonos, fenilo, alquilo aromático ou q-hidroxifenilo, q-bromofenilo, q-clorofenilo, q-fluorofenilo ou q-iodofenilo, em que q=2-4;

R₁₄ representa hidrogénio, um alquilo inferior com 1-4 carbonos, oxo, hidroxil, acilo com 1-4 carbonos, halogéneo, tiol ou tiocetona;

R₁₇ representa hidrogénio, alquilo inferior com 1-8 carbonos, alcenilo, (incluindo alcenos substituídos com halogéneo, acilo, OR₇ e SR₇), R₉, ácido alquilcarboxílico (incluindo alquilo substituídos com halogéneo, acilo, OR₇ e SR₇), ácido alcenilcarboxílico (incluindo alcenos substituídos com halogéneo, acilo, OR₇ e SR₇), alquilaminas (incluindo alquilo substituídos com halogéneo, acilo, OR₇ e SR₇) e alcenilaminas (incluindo alcenos substituídos com halogéneo, acilo, OR₇ e SR₇);

X é COOH, tetrazolo, PO₃H, SO₃H, CHO, CH₂OH, CONH₂, COSH, COOR₉, COSR₉, CONHR₉ ou COOW em que W é um sal farmacologicamente aceitável e em que X pode ter origem em qualquer C ou N do anel, desde que, contudo, X não possa ser COOH, CHO, CH₂OH, CONH₂, COOR₉, ou COOW quando X é originado de um C na posição 2 ou 6 do anel;

Z, Z', Z'', Z''' e Z'''' representam cada um, independentemente, C, S, O, N ou um sal farmacologicamente aceitável, mas não é O ou S se estiver ligado através de uma ligação dupla a outro destes Z ou se estiver ligado a outro destes Z que é O ou S, e não é N se estiver ligado através de uma ligação simples a outro destes Z que é N;

n = 0-3; e



as linhas a tracejado na segunda estrutura apresentada representam ligações duplas opcionais.

2. Composto de acordo com a reivindicação 1, seleccionado entre o grupo consistindo em:

oxima de 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetra-hidro-2-naftil)carbonil]-benzoato de etilo,

oxima do ácido 4-[(3-bromo-5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetra-hidro-2-naftil)carbonil]benzóico,

oxima do ácido 2-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetra-hidro-2-naftil)carbonil]piridina-5-carboxílico,

metiloxima de 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetra-hidro-2-naftil)carbonil]benzoato de etilo, e

metiloxima do ácido 2-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetra-hidro-2-naftil)carbonil]piridina-5-carboxílico.

3. Oxima do ácido 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetra-hidro-2-naftil)carbonil]-benzóico.

4. Metiloxima do ácido 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetra-hidro-2-naftil)carbonil]-benzóico.

5. Composto de acordo com a reivindicação 1, seleccionado entre o grupo consistindo em:

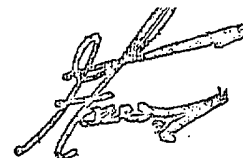
butiloxima de ácido 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetra-hidro-2-naftil)-carbonil]benzóico,

propiloxima do ácido 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetra-hidro-2-naftil)carbonil]benzóico,

cianoimina do ácido 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetra-hidro-2-naftil)carbonil]benzóico,

aliloxima do ácido 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetra-hidro-2-naftil)-carbonil]benzóico,

4-(ácido 3-metil-but-2-enóico)oxima do ácido 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetra-hidro-2-



naftil)carbonil]benzóico e

1-amino-etil-oxima do ácido 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetra-hidro-2-naftil)carbonil]-benzóico.

6. Composição farmacêutica compreendendo, num veículo farmacêuticamente aceitável, adequado para administração entérica, parentérica ou tópica, um ou mais compostos de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5.

7. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, para administração a um sujeito mamífero para a modulação de um processo mediado por um ou mais Receptores de Retinóide X.

8. Composto de acordo com a reivindicação 7, para uso na modulação de um processo mediado por Receptores de Retinóide X seleccionados de entre Receptor de Retinóide X-alfa, Receptor de Retinóide X-beta e Receptor de Retinóide X-gama.

9. Composto de acordo com a reivindicação 7 ou reivindicação 8, para uso na modulação do metabolismo dos lípidos, modulação de processos relacionados com a pele, modulação do desenvolvimento de células malignas, modulação de lesões pré-malignas ou modulação da morte celular programada.

10. Composto de acordo com a reivindicação 9, para uso na intensificação *in vivo* da morte celular programada.

11. Composto de acordo com a reivindicação 9, para uso na inibição *in vivo* da morte celular programada.

12. Composto de acordo com a reivindicação 7 ou reivindicação 8, para uso na modulação *in vivo* do desenvolvimento e diferenciação celular ou na morfogénese *in vivo* de membros.

13. Uso de um composto de acordo com a reivindicação 1, para a modulação *in vitro* do desenvolvimento e diferenciação celular.

14. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, para uso no tratamento de um sujeito mamífero que requer terapia de Receptor de Retinóide X.



15. Composto de acordo com qualquer umas das reivindicações 1 a 5, para uso no aumento da concentração plasmática de lipoproteína de alta densidade num sujeito mamífero.

16. Método para a determinação da presença de um ou mais Receptores de Retinóide X compreendendo combinar um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5 com uma amostra contendo um ou mais receptores desconhecidos, e determinação de se o referido composto se liga a qualquer receptor na referida amostra.

17. Método para a purificação de Receptores de Retinóide X compreendendo combinar um composto de acordo com a qualquer uma das reivindicações 1 a 5 com uma amostra de um ou mais Receptores de Retinóide X referidos, permitir que o referido composto se ligue aos Receptores de Retinóide X e separar a referida combinação dos referido composto e Receptor de Retinóide X.

18. Composição farmacêutica compreendendo, num veículo farmacêuticamente aceitável para administração entérica, parentérica ou tópica, um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, que activa selectivamente Receptores de Retinóide X na presença de Receptores de Ácido Retinóico, em combinação com um segundo composto que activa selectivamente um ou mais receptores intracelulares diferentes de Receptores de Retinóide X.

19. Composição farmacêutica de acordo como a reivindicação 18, na qual o referido segundo composto activa selectivamente Receptores de Ácido Retinóico na presença de Receptores de Retinóide X.

20. Composição de acordo com a reivindicação 18, para uso num sujeito mamífero, na modulação de um processo mediado por receptores intracelulares, sendo o efeito fisiológico produzido pela referida composição quando administrada a uma dada concentração para o referido uso sendo superior ao efeito aditivo conseguido utilizando cada um dos referidos compostos sozinhos à mesma concentração.

21. Composição de acordo com a reivindicação 20, em que o referido segundo composto activa selectivamente Receptores De Ácido Retinóico na presença de Receptores de Retinóide X.

22. Composição de acordo com a reivindicação 20, para uso na modulação do metabolismo dos lípidos, modulação de processos relacionados com a pele, modulação do

desenvolvimento de células malignas, modulação de lesões pré-malignas ou modulação de morte celular programada.

23. Composição de acordo com a reivindicação 20 ou reivindicação 21, que é capaz de ser administrada a uma concentração à qual nenhum dos referidos primeiro ou segundo composto poderia, sozinho, produzir uma resposta terapêutica significativa.

24. Composição de acordo com a reivindicação 20, em que o referido segundo composto activa receptores de proliferador de peroxissoma activado.

25. Composição de acordo com a reivindicação 20, em que o referido segundo composto activa receptores de Vitamina D.


26. Composição de acordo com a reivindicação 20, em que o referido segundo composto activa receptores de hormona tiróide, receptores HNF4 ou membros da família de receptores COUP.

Lisboa, -8. MAR. 2000

Por LIGAND PHARMACEUTICALS, INC.

- O AGENTE OFICIAL -

O ADJUNTO



ENG.º ANTÓNIO JOÃO
DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74 - 4.º
1200 LISBOA

FIG. 1.

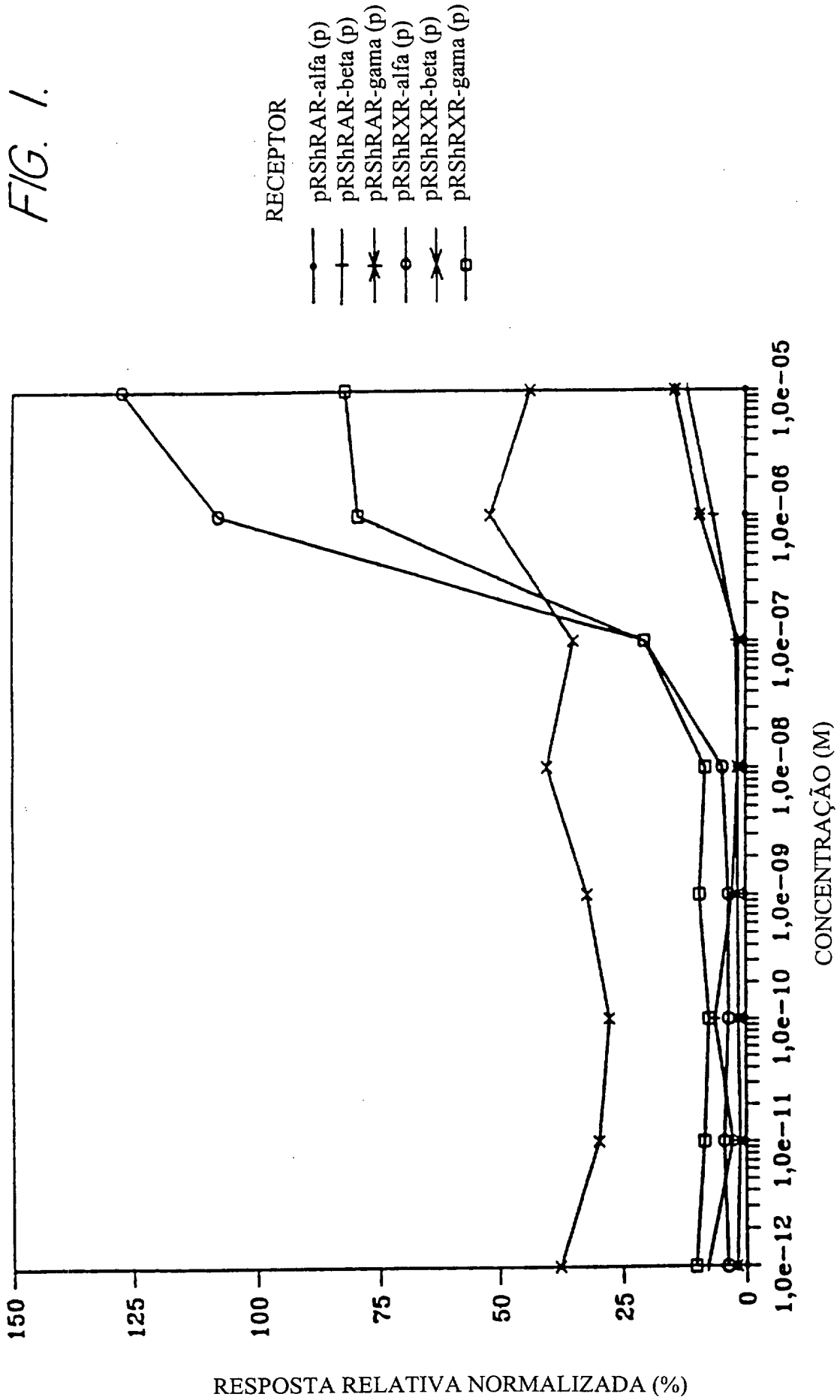


FIG. 2.

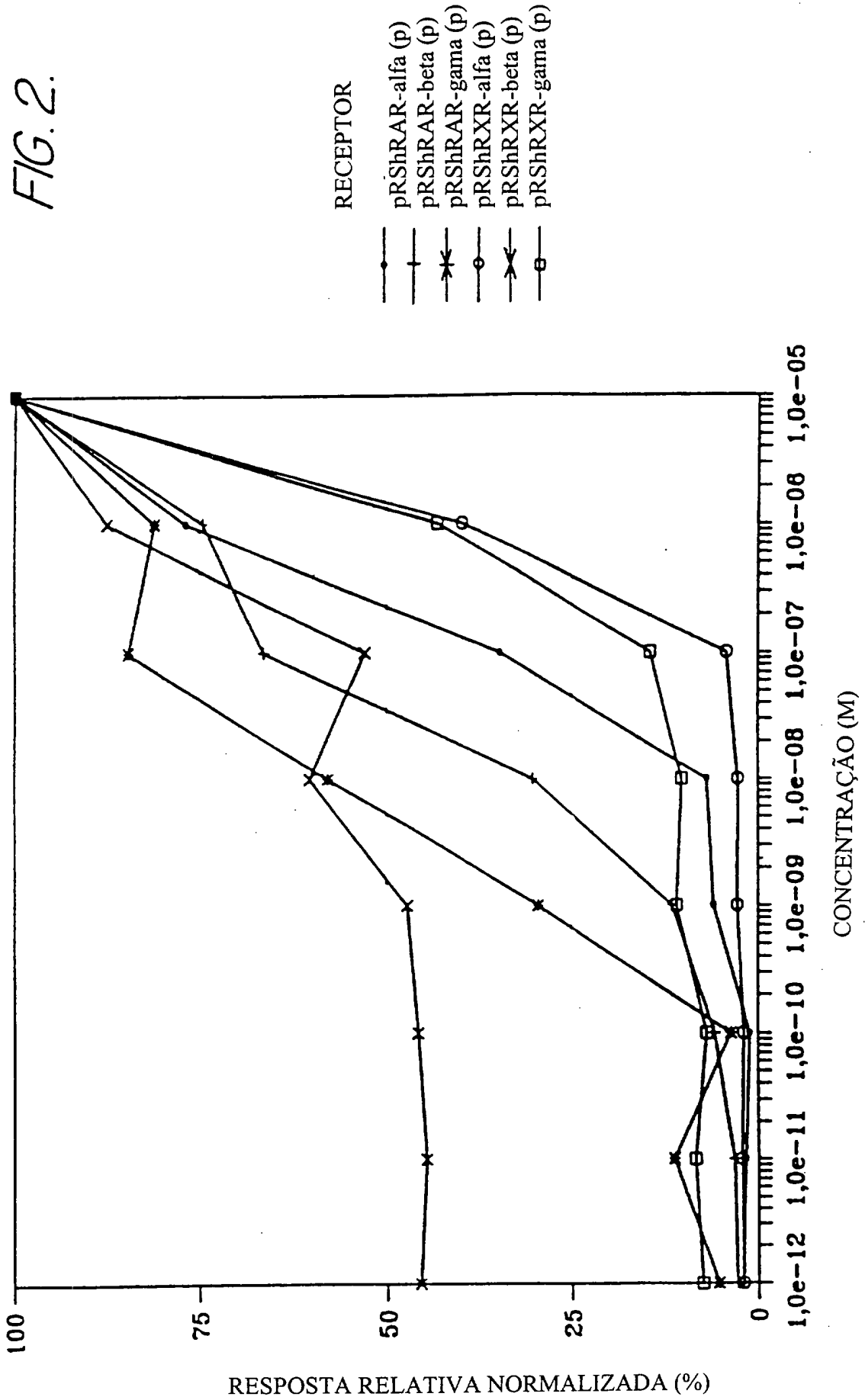


FIG. 3.

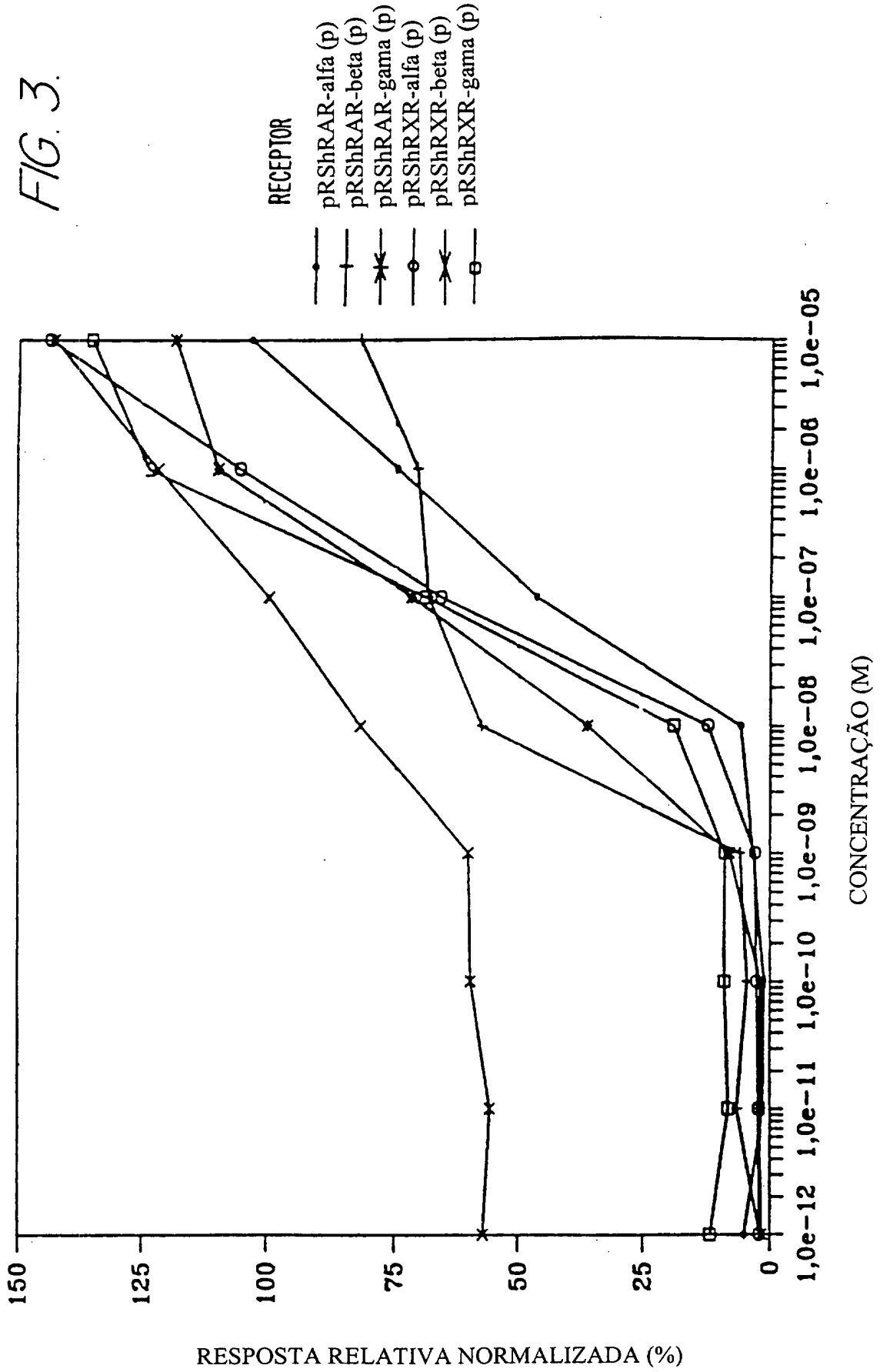




FIG. 4.

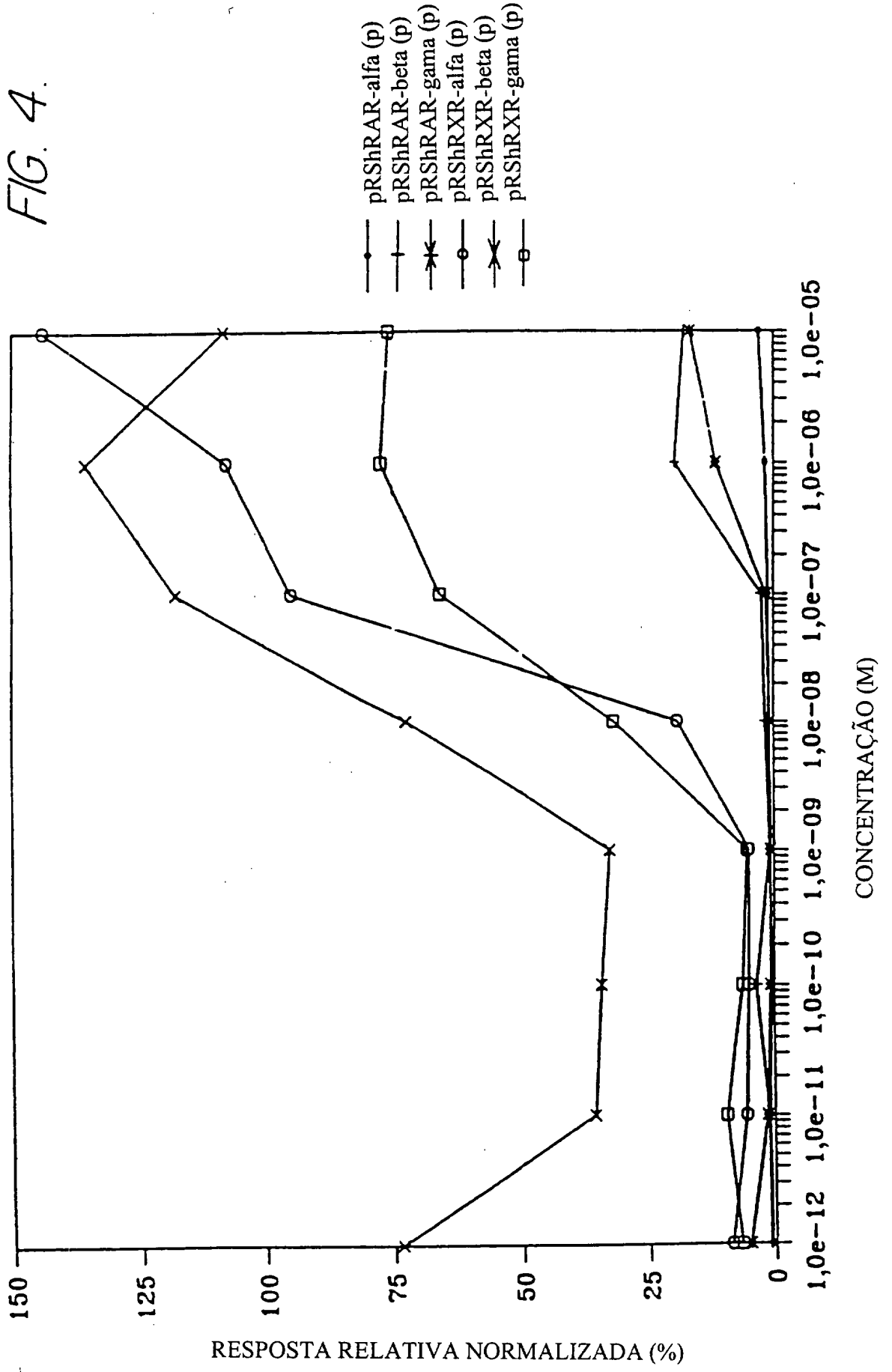


FIG. 5.

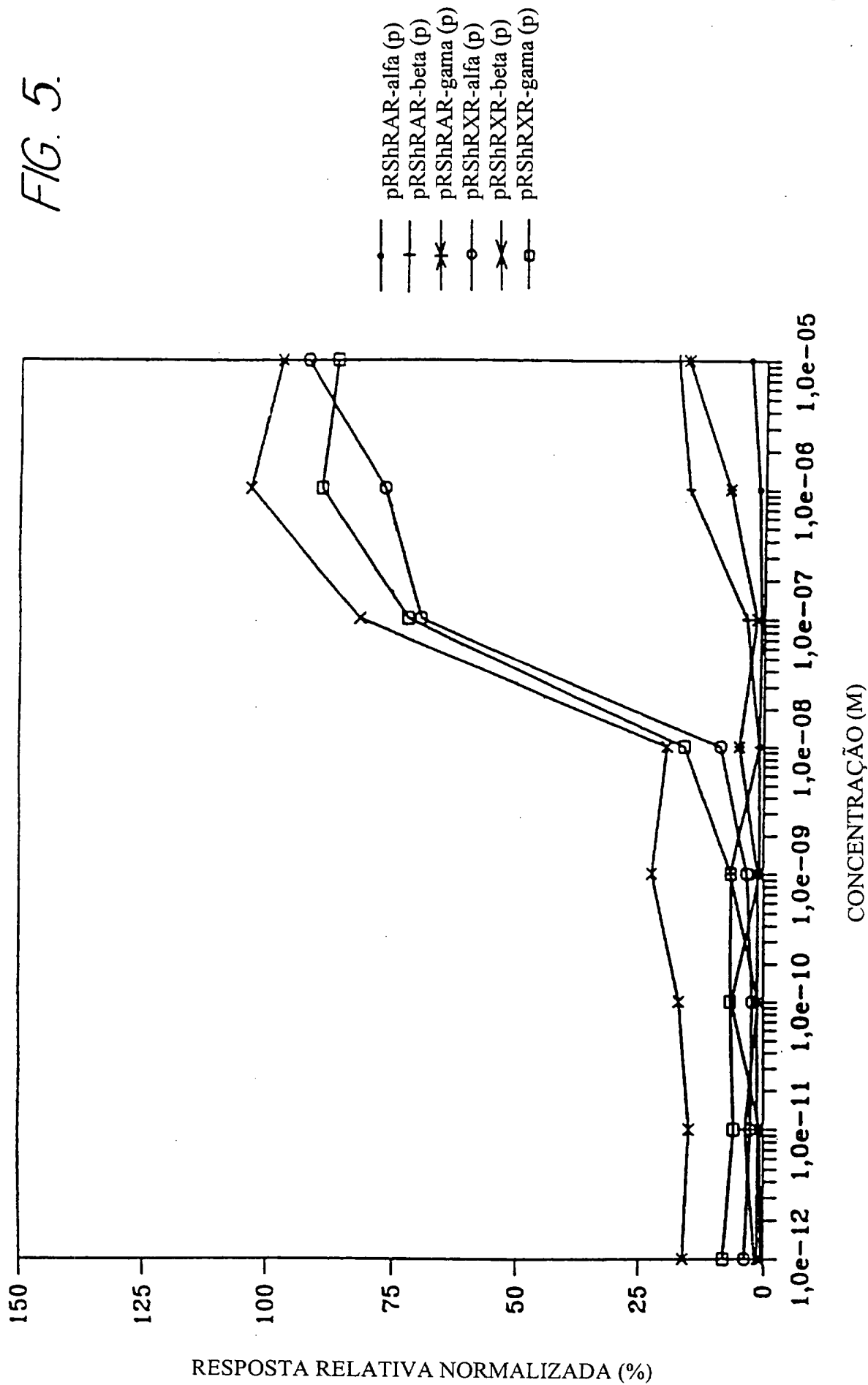
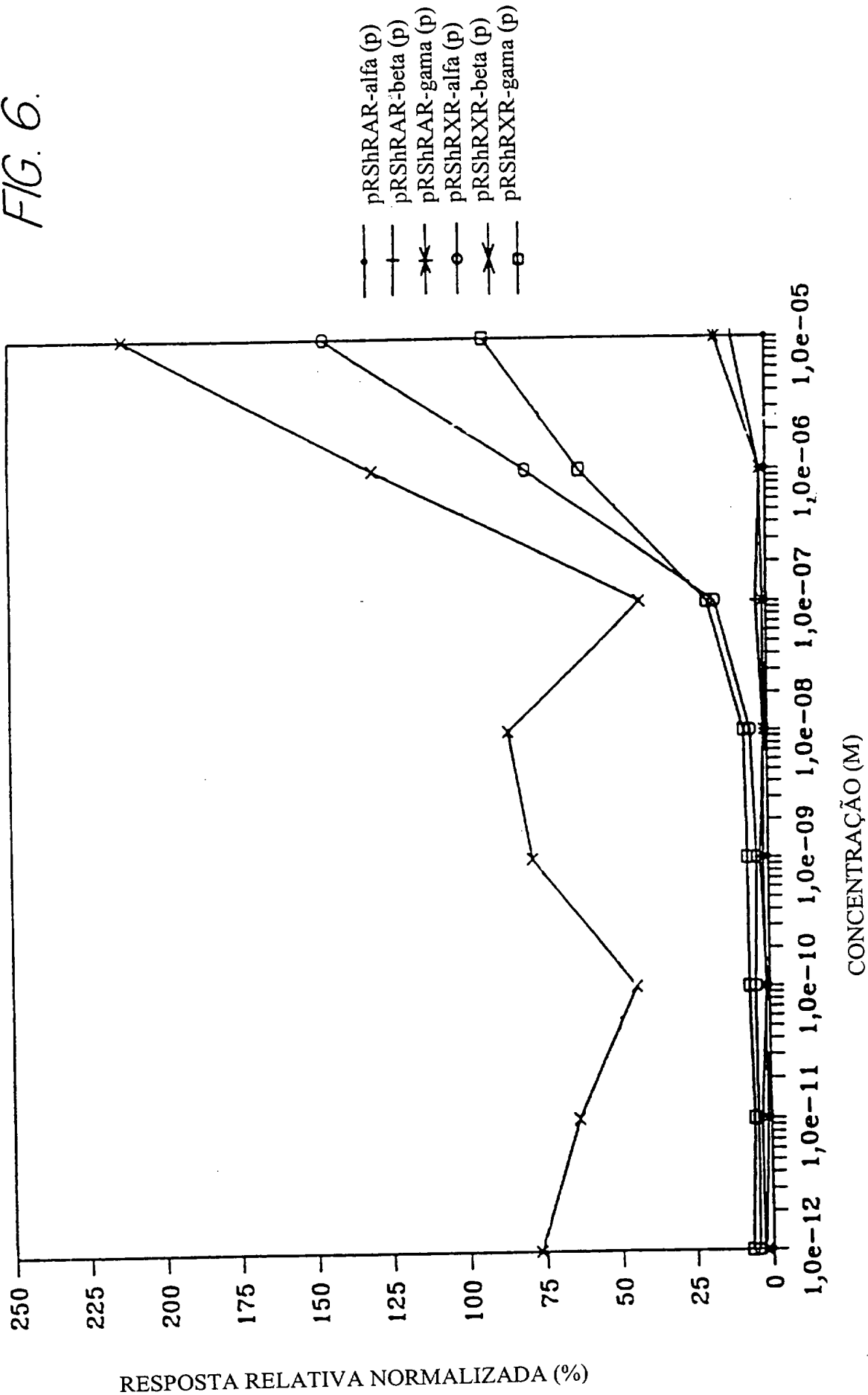


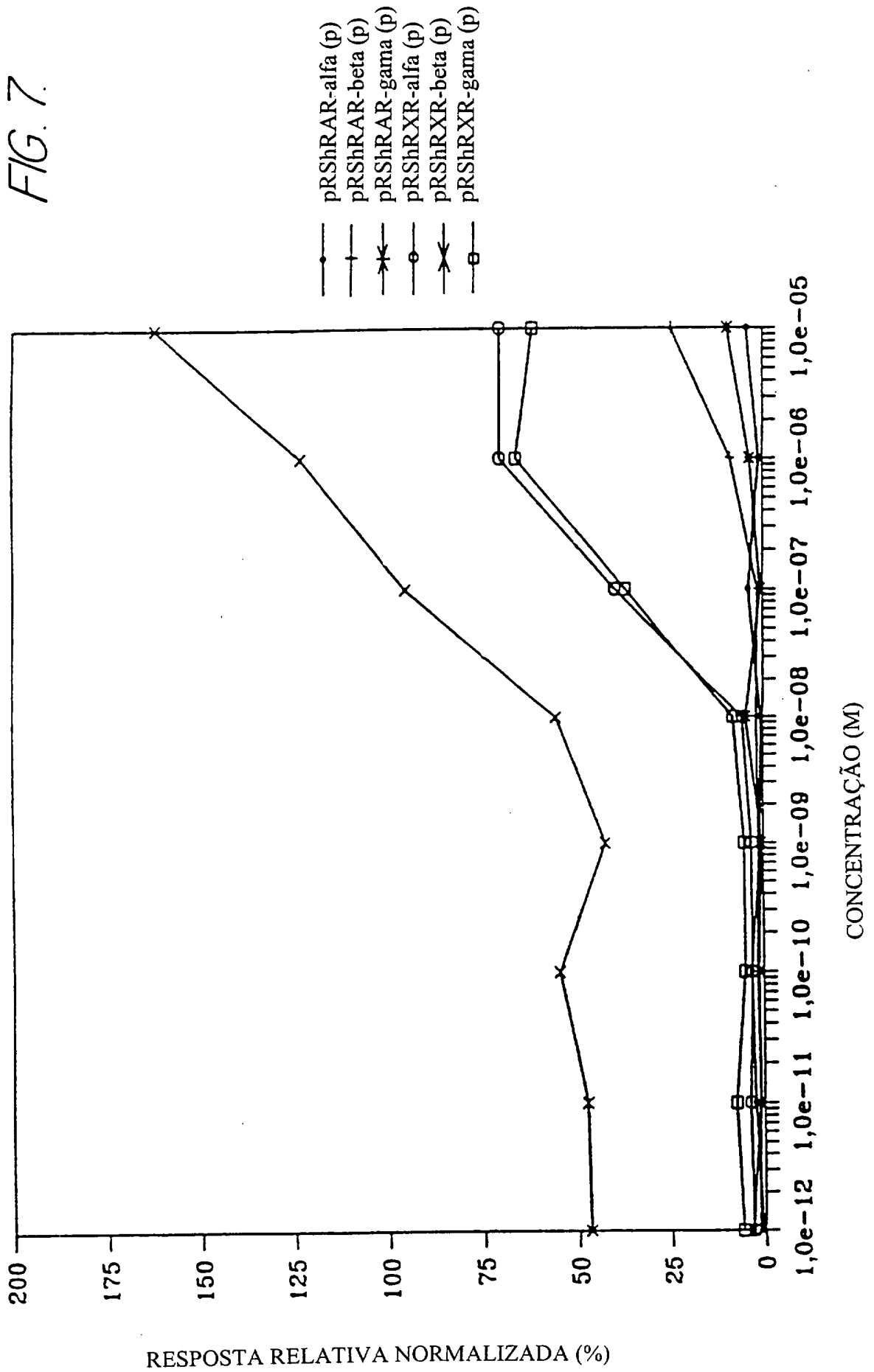
FIG. 6.



RESPOSTA RELATIVA NORMALIZADA (%)

CONCENTRAÇÃO (M)

FIG. 7.



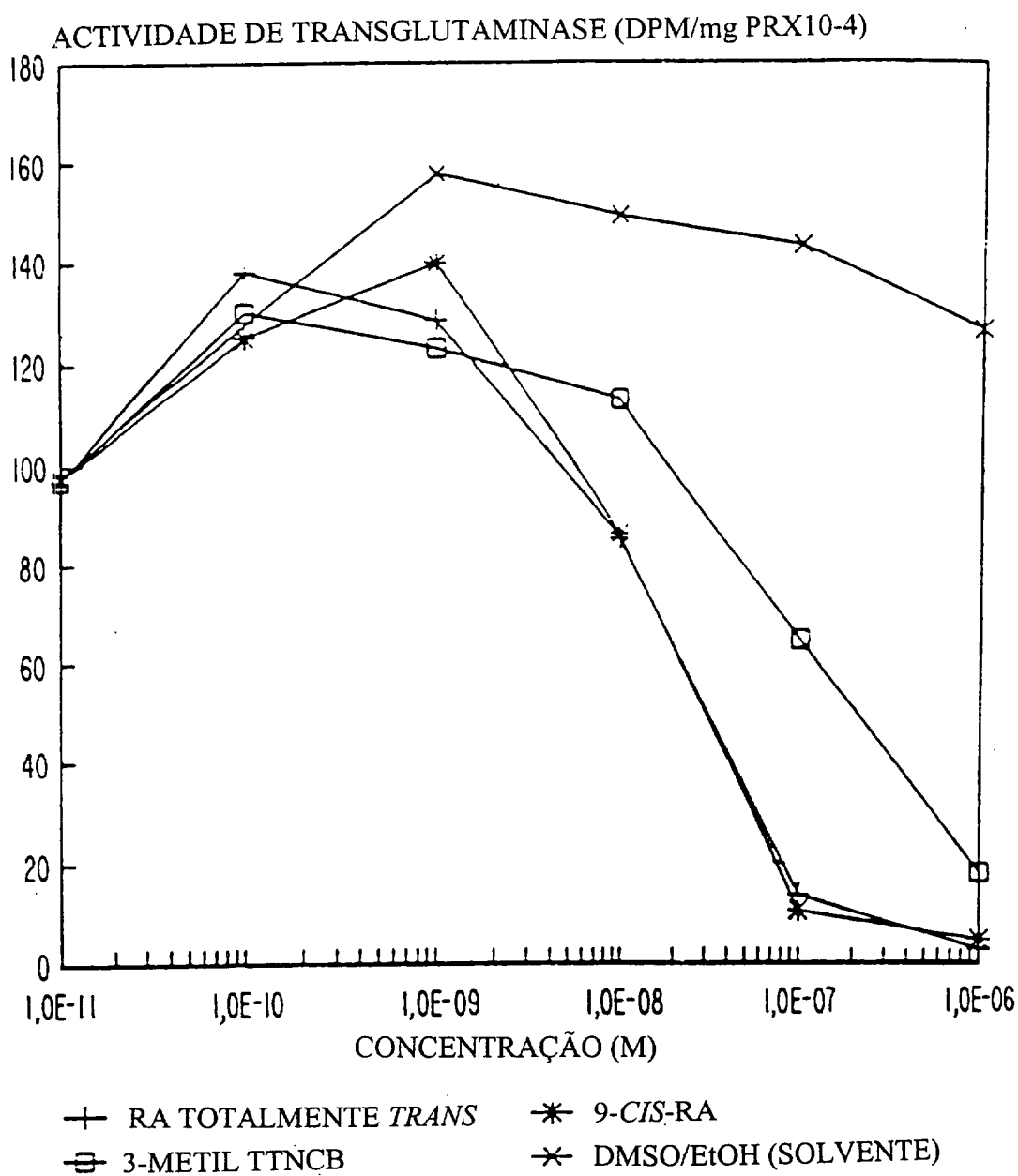


FIG. 8.

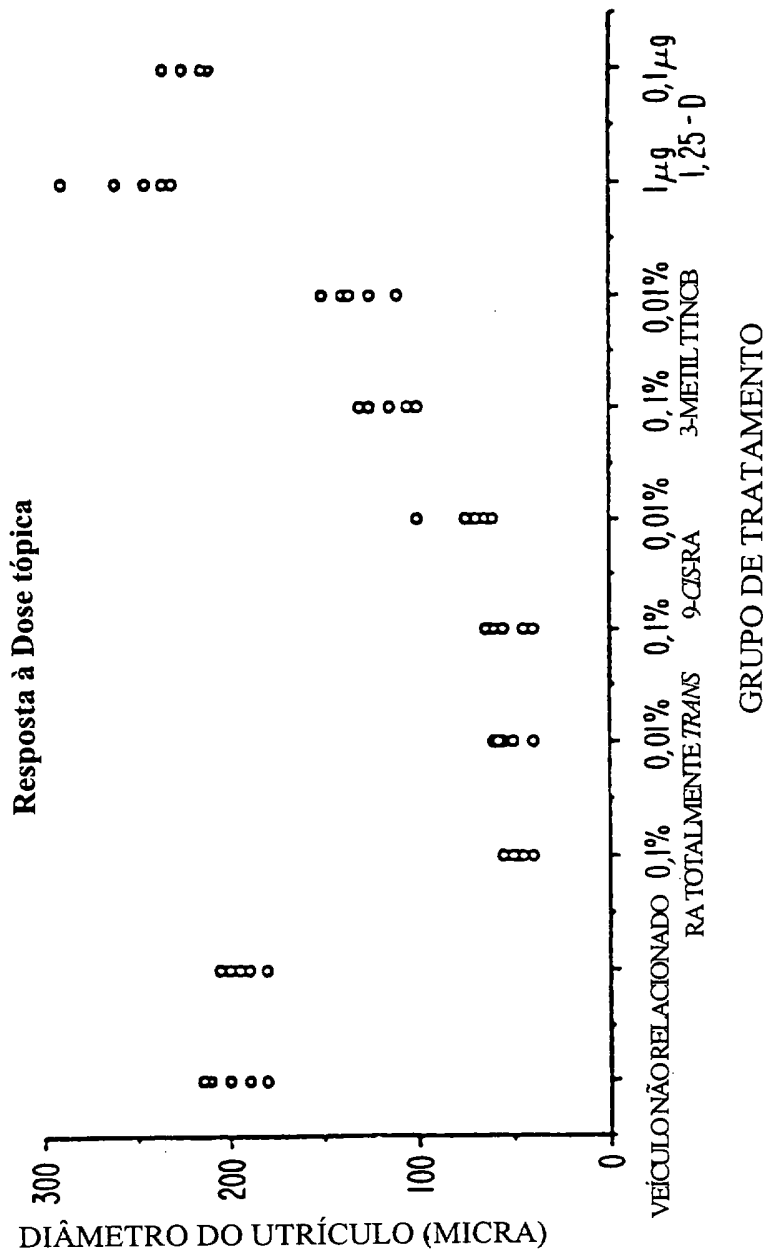


FIG. 9.

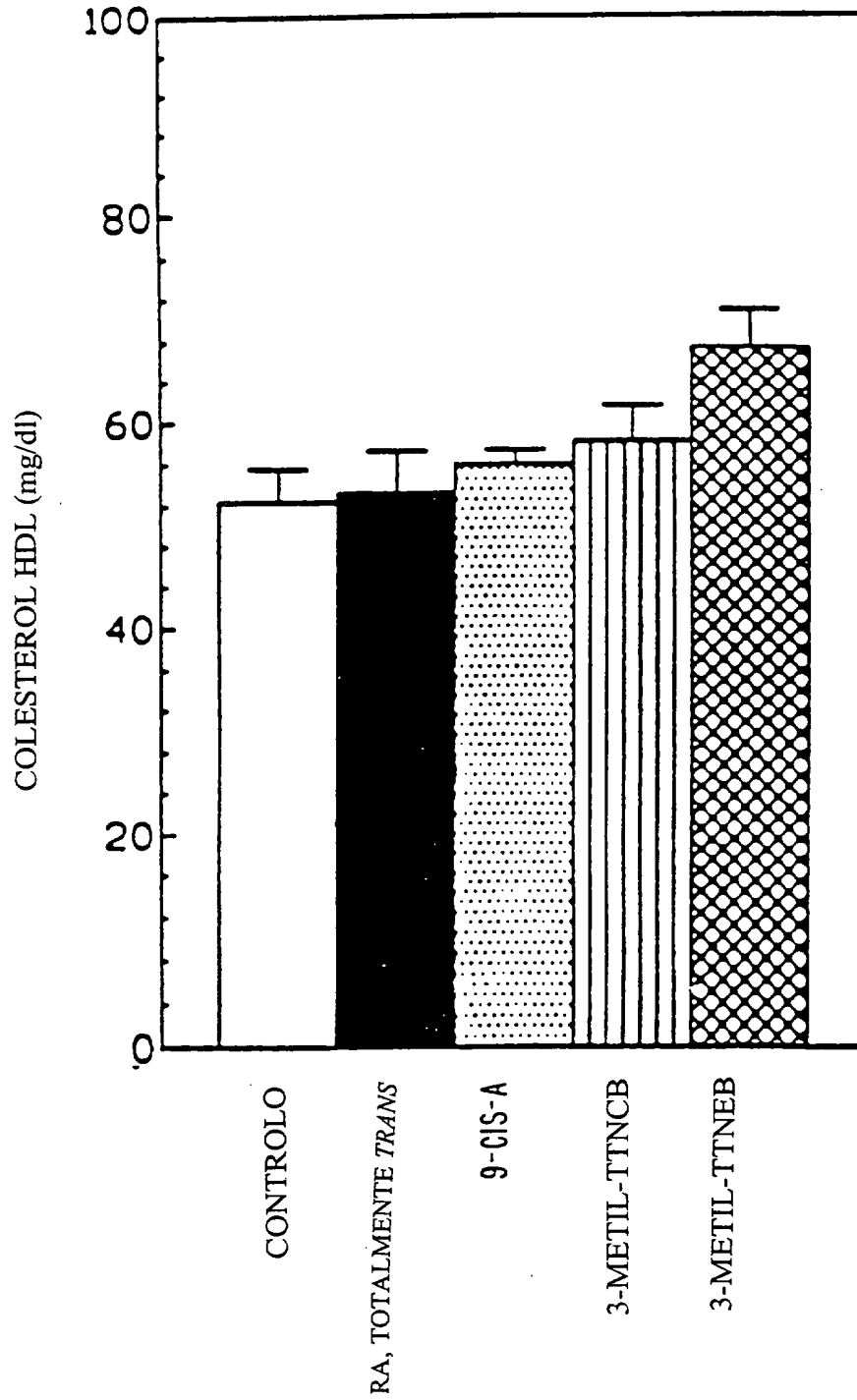


FIG. 10.



FIG. 11.

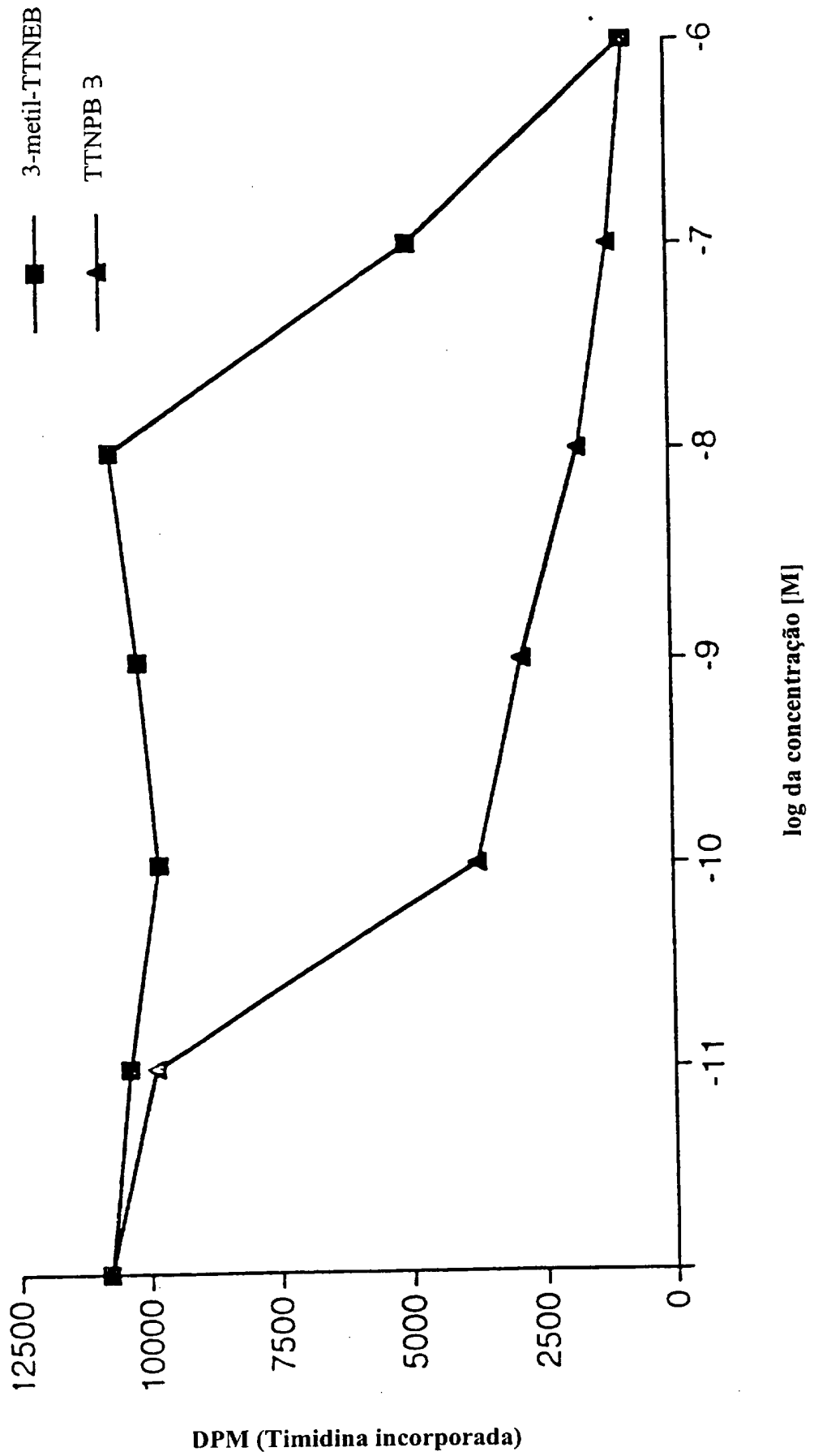


FIG. 12.

