

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE FARMÁCIA



# SÍNTESE DE COMPOSTOS INDÓLICOS ATIVADORES DA p53

**Adriana Margarida Duarte e Silva**

Dissertação de mestrado orientada pela Doutora Maria Alexandra da Silva Paulo  
e coorientada pela Doutora Maria M. M. Santos

MESTRADO EM QUÍMICA FARMACÊUTICA E TERAPÊUTICA

2021



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE FARMÁCIA



# SÍNTESE DE COMPOSTOS INDÓLICOS ATIVADORES DA p53

**Adriana Margarida Duarte e Silva**

Dissertação de mestrado orientada pela Doutora Maria Alexandra da Silva Paulo  
e coorientada pela Doutora Maria M. M. Santos

MESTRADO EM QUÍMICA FARMACÊUTICA E TERAPÊUTICA

2021



## **Agradecimentos**

Agradeço, em primeiro lugar, às Doutoradas Alexandra Paulo e Maria Santos, pela oportunidade que me concederam em participar neste projeto e pela orientação ao longo do ano. Agradeço, também, à Doutora Eduarda Mendes pela orientação e ajuda nos ensaios FRET *melting assay*. Obrigada ainda à FCT (Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P) pelo financiamento no projeto PTDC/QUI-QOR/29664/2017, ao abrigo do qual esta dissertação foi realizada.

Gostaria, igualmente, de agradecer à team Lab 104, em especial à Margarida, à Elizabeth, à Valentina e ao João Pedro pelo apoio e ajuda que sempre me deram enquanto estive no laboratório, assim como aos restantes colegas do grupo iMedLisboa.

Um agradecimento especial aos meus colegas de mestrado em Química Farmacêutica e Terapêutica, pelo apoio nos dias bons e menos bons, pois sempre tiveram uma palavra solidária para dar.

Às amigas do costume e que, no fim, acabam sempre e incondicionalmente, a ouvir os desabafos e frustrações do costume, Beatriz, Inês e Filipa, e à família Montarroio, que continua a dar apoio, desde três continentes diferentes: muito obrigada.

Agradeço, ainda, ao meu namorado Ricardo, por ter sempre uma energia e pensamento mais positivo que o meu, pelo amor e pelo apoio de sempre, que me incentiva a avançar sempre para conquistar mais.

Finalmente, e não menos importante, obrigada à minha família. Ao meu irmão, Artur, que se resignou à condição de meu colega de casa, ficando condenado a ouvir-me reclamar ou fazer danças da vitória quase diariamente e, ainda assim, sempre garantiu que “vai dar tudo certo”. Aos meus pais, que sempre garantiram abertura e apoio a todos os projetos em que alguma vez me quis meter. E, claro, à restante família que, à distância, sempre acreditou em mim e no meu sucesso.

Obrigada a todos.



## Resumo

A proteína p53 é uma proteína supressora de tumores. Na maior parte dos casos de cancro, a sua função encontra-se inativa. Esta inativação pode ocorrer por mutação ou silenciamento do gene da p53 ou por a p53 se encontrar inibida pelos seus reguladores negativos. Uma estratégia de grande relevância no tratamento do cancro passou a ser a investigação de pequenas moléculas capazes de reativar a p53 ou de ativar a sua expressão. Também o recurso à combinação de dois ou mais fármacos que atuam por mecanismos diferentes se tem revelado uma estratégia vantajosa em oncoterapia. No âmbito desta dissertação de mestrado, desenharam-se e sintetizaram-se moléculas indólicas, incluindo: derivados de spirooxindóis, indutores da expressão da p53 por inibição do seu regulador negativo MDM2 e derivados de indoloquinolinas e indoloisoquinolinas, ligandos de G-quadruplexos (G4) de ADN, inibidores da expressão de oncogenes em células cancerígenas e indutores de apoptose por ativação da expressão da p53. Foram sintetizados, isolados e caracterizados por espectroscopia de RMN 18 compostos. Os derivados spiropirazolina oxindóis **11b** e **12b** foram obtidos por reação de cicloadição 1,3-dipolar entre as respetivas indolinonas e cloretos de hidrazonilo. A síntese das indolo[3,2-*b*]quinolinas **20a** e **21a** realizou-se com sucesso, tendo-se feito melhorias aos procedimentos de síntese dos intermediários **34** e **35**. Desenharam-se e sintetizaram-se novos ligandos de G-quadruplexos: os derivados 5-acetamida (**40** e **23**), 5-benzilamina (**24** e **25**) e 5-benzamida (**26**) do composto 5-amino-11*H*-indolo[3,2-*c*]isoquinolina (**36**). Este foi obtido por reação *one-pot* e utilizado como material de partida para a síntese dos derivados na posição 5. Destas novas moléculas, obtiveram-se os compostos **40**, **25** e **26**. Concluiu-se que o grupo 5-NH<sub>2</sub> da indolo[3,2-*c*]isoquinolina **36** é um nucleófilo fraco, particularmente com haletos de acetilo e benzoílo, reagindo, no entanto, melhor com haletos de benzilo, nas condições experimentadas. As indoloisoquinolinas **36**, **25** e **26** foram estudadas por ensaios de fusão por FRET para avaliação da sua capacidade de estabilização térmica de G4s, verificando-se que não são bons ligandos estabilizadores de G4s, pois apresentaram valores de  $\Delta T_m < 1$ . O efeito anti-cancerígeno da combinação dos spirooxindóis **11b** ou **12b** com a indoloquinolina **20a** será futuramente estudado. As conclusões retiradas deste trabalho quanto à reatividade do grupo 5-NH<sub>2</sub> da indolo[3,2-*c*]isoquinolina são bastante relevantes para a continuação do trabalho de desenho e síntese de novos ligandos de G4s.

**Palavras-chave:** p53, interações proteína-proteína, spirooxindóis, indoloquinolinas, indoloisoquinolinas, G-quadruplexo de ADN, cancro





## **Abstract**

The p53 protein is a tumor suppressor. In most cancers its function is not activated. This can occur by mutation or silencing of the gene that codifies for p53, or by inhibition of p53 by negative regulation. One of the strategies of great relevance in the treatment of cancer is the search for small molecules capable of reactivating p53's function or activating its expression. Also, the combination of two or more anticancer drugs with different mechanisms of action is a strategy that has shown several advantages over monotherapy. For this thesis, several indole derivatives were designed and synthesized, including: spirooxindole derivatives, inducers of the expression of p53 by inhibition of its negative regulator MDM2 and indoloquinoline and indoloisoquinoline derivatives, which are G-quadruplexes ligands that activate p53 expression and down-regulate the expression of oncogenes in cancer cells.

Eighteen compounds were synthesized, isolated and characterized by NMR spectroscopy. Spiropyrazoline oxindole derivatives **11b** and **12b** were obtained by 1,3-dipolar cycloaddition of respective indolinones and hydrazonyl chlorides. Indolo[3,2-*b*]quinolines **20a** and **21a** were also successfully obtained and improvements to the synthetic procedures of intermediates **34** and **35** were made. New potential G4 ligands were designed, namely, 5-acetamides (**40** and **23**), 5-benzylamine (**24** and **25**) and 5-benzylamide (**26**) derivatives of compound 5-amino-11*H*-indolo[3,2-*c*]isoquinoline (**36**). Compound **36** was obtained through one-pot reaction and used as the starting material for the synthesis of derivatives in position 5. Derivatives **40**, **25** and **26** were successfully obtained. It was concluded that the 5-NH<sub>2</sub> group in the indolo[3,2-*c*]isoquinoline skeleton is a weak nucleophile, particularly with acetyl and benzoyl halides, but reacts well with benzyl chloride, in the conditions used. Indoloisoquinoline derivatives **36**, **25** and **26** were studied by FRET melting assay, for their G4 stabilizing capacity. It was concluded that they are not good G4 stabilizing ligands, presenting values of  $\Delta T_m < 1$ .

The antiproliferative effect in cancer cells of spirooxindoles **11b** or **12b** in combination with the indoloquinoline **20a** will be soon studied. The conclusions withdraw from this study on the reactivity of the 5-NH<sub>2</sub> group of indolo[3,2-*c*]isoquinoline are very relevant for the design and synthesis of new G4 ligands.

**Keywords:** p53, protein-protein interactions, spirooxindoles, indoloquinolines, indoloisoquinolines, DNA G-quadruplex, cancer



# Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>i</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>iii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>v</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>ix</b>
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Proteína supressora de tumores p53 como alvo na terapia do cancro</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. G-quadruplexos de ADN como alvos na terapia do cancro</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3. Compostos indólicos ativadores da p53</b> .....	<b>7</b>
1.3.1. Inibidores das interações p53-MDM2/X.....	8
a) Derivados de indolil hindatoínas .....	8
b) Derivados de triptofanol .....	9
c) Derivados de spirooxindóis .....	12
1.3.2. Ligandos de G-quadruplexos ativadores da expressão da p53 .....	19
a) Derivados de dihidro-indolizidino indole .....	19
b) Derivados de carbazóis .....	20
c) Derivados de indoloquinolinas .....	22
<b>1.4. Terapia combinatória para o cancro</b> .....	<b>28</b>
<b>2. Objetivos do trabalho</b> .....	<b>31</b>
<b>3. Resultados e discussão</b> .....	<b>33</b>
<b>3.1. Síntese de spirooxindóis</b> .....	<b>33</b>
<b>3.2. Síntese de indolo[3,2-<i>b</i>]quinolinas</b> .....	<b>38</b>
<b>3.3. Síntese de indolo[3,2-<i>c</i>]isoquinolinas</b> .....	<b>43</b>
3.3.1. Síntese do sistema tetracíclico 5-amino-11 <i>H</i> -indolo[3,2- <i>c</i> ]isoquinolino ( <b>36</b> ).....	43
3.3.2. Síntese de derivados 5-acetamida ( <b>40</b> ).....	47
3.3.3. Síntese de derivados 5-benzilamina ( <b>25</b> ) .....	52
3.3.4. Síntese de derivados 5-benzamida ( <b>26</b> ).....	55
<b>3.4. Determinação da capacidade de estabilização de estruturas de G- quadruplexos de ADN pelos compostos</b> .....	<b>58</b>
<b>4. Conclusões e perspetivas futuras</b> .....	<b>61</b>
<b>5. Materiais e métodos</b> .....	<b>65</b>
<b>5.1. Síntese de spirooxindóis</b> .....	<b>66</b>
5.1.1. Síntese do composto 6-cloro-4'-(3-clorofenil)-5'-(4-metoxifenil)-2'-fenil-2'-4'- dihidrospiro[indolina-3,3'-pirazol]2-ona ( <b>11b</b> ) .....	66
a) Síntese do intermediário 6-cloro-3-(3-clorobenzilideno)indolin-2-ona ( <b>27</b> ) ..	66
b) Síntese do intermediário 1-(4-metoxibenzilideno)-2-fenilhidrazina ( <b>28</b> ).....	66
c) Síntese do intermediário cloreto de 4-metoxi-N-fenilbenzohidrazonil ( <b>29</b> )... 67	

d) Síntese do produto 6-cloro-4'-(3-clorofenil)-5'-(4-metoxifenil)-2'-fenil-2'-4'-dihidrospiro[indolina-3,3'-pirazol]2-ona ( <b>11b</b> ) .....	68
5.1.2. Síntese do composto 4'-(4-bromofenil)-5'-( <i>terc</i> -butil)-6-cloro-5-fluoro-2'-fenil-2',4'-dihidrospiro[indolina-3,3'-pirazol]-2-ona ( <b>12b</b> ) .....	69
a) Síntese do intermediário 3-(4-bromobenzilideno)-6-cloro-5-fluoroindolin-2-ona ( <b>30</b> ) .....	69
b) Síntese do intermediário <i>N</i> '-fenilpivalohidrazida ( <b>31</b> ) .....	69
c) Síntese do intermediário cloreto de <i>N</i> -fenilpivalohidrazonil ( <b>32</b> ) .....	70
d) Síntese do produto 4'-(4-bromofenil)-5'-( <i>terc</i> -butil)-6-cloro-5-fluoro-2'-fenil-2',4'-dihidrospiro[indolina-3,3'-pirazol]-2-ona ( <b>12b</b> ) .....	70
<b>5.2. Síntese de indolo[3,2-<i>b</i>]quinolinas</b> .....	71
5.2.1. Síntese do intermediário ácido 2-(2-((4-etoxicarbonil)fenil)amino)acetamido)benzóico ( <b>34</b> ) .....	71
5.2.2. Síntese do intermediário ácido 11-oxo-10,11-dihidro-5 <i>H</i> -indolo[3,2- <i>b</i> ]-7-carboxílico ( <b>35</b> ) .....	72
5.2.3. Síntese dos produtos 2-(dietilamino)etil 5,10-bis(2-(dietilamino)etil)-11-oxo-10,11-dihidro-5 <i>H</i> -indolo[3,2- <i>b</i> ]quinolina-7-carboxilato ( <b>20a</b> ) e 2-(dietilamino)etil 11-(2-(dietilamino)etoxi)-10-(2-(dietilamino)etil)-10 <i>H</i> -indolo[3,2- <i>b</i> ]quinolina-7-carboxilato ( <b>21a</b> ) .....	73
<b>5.3. Síntese de indolo[3,2-<i>c</i>]isoquinolinas</b> .....	74
5.3.1. Síntese do composto 5-amino-11 <i>H</i> -indolo[3,2- <i>c</i> ]isoquinolino-11-carboxilato de etilo ( <b>36</b> ) .....	74
a) Síntese do intermediário (2-cianofenil)carbamato de etilo ( <b>37</b> ) .....	74
b) Síntese do produto 5-amino-11 <i>H</i> -indolo[3,2- <i>c</i> ]isoquinolino-11-carboxilato de etilo ( <b>36</b> ) .....	75
5.3.3. Síntese do produto 5-(dibenzilamino)-11 <i>H</i> -indolo[3,2- <i>c</i> ]isoquinolina-11-carboxilato de etilo ( <b>25</b> ) .....	76
5.3.4. Síntese do produto 5-(3-nitrobenzamido)-11 <i>H</i> -indolo[3,2- <i>c</i> ]isoquinolina-11-carboxilato de etilo ( <b>26</b> ) .....	77
<b>5.4. Ensaios de fusão por FRET</b> .....	78
5.4.1. Preparação de soluções .....	78
5.4.2. Preparação das placas de 96 poços .....	79
5.4.3. Leitura de placas no RT-PCR .....	79
<b>6. Referências</b> .....	81
<b>Anexo I – Espetros <sup>1</sup>H-RMN dos derivados de spirooxindóis sintetizados e respetivos intermediários</b> .....	91
<b>Anexo II – Espetros de <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C e HMQC de derivados de indolo[3,2-<i>b</i>]quinolinas e seus intermediários</b> .....	95
<b>Anexo III – Espetros <sup>1</sup>H-RMN, COSY, <sup>13</sup>C, <sup>13</sup>C-APT, HMQC e HMBC de derivados de indolo[3,2-<i>c</i>]isoquinolinas e seus intermediários</b> .....	99
<b>Anexo IV – Comunicação por póster apresentada na conferência 6th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry</b> .....	108

## Índice de figuras

Figura 1 - Esquematisação do ciclo de regulação da p53. ....	1
Figura 2 - Esquematisação da cadeia de eventos que leva à ativação da p53.....	2
Figura 3 - Representação gráfica dos domínios funcionais (e sua distribuição) da MDM2 e MDMX. ....	3
Figura 4 - Estrutura genérica de um quadruplexo-G. <b>a</b> – G-quarteto, com 4 guaninas ligadas por ligações de hidrogénio Hoogsteen; <b>b</b> – Representação esquemática de um G-quadruplexo; <b>c</b> – Representação esquemática dos subgrupos dos G4: paralelos, antiparalelos e híbridos (orientação das cadeias de ADN a azul). ....	5
Figura 5 – Estruturas químicas dos derivados de indolil hindatoínas RO-2443 ( <b>1a</b> ) e RO-5963 ( <b>1b</b> ).....	9
Figura 6 - Estrutura química do derivado de triptofanol OXAZ-1 ( <b>2</b> ).....	9
Figura 7 – Estruturas químicas dos derivados de triptofano SLMP53-1 ( <b>3a</b> ) e do enantiómero do derivado SLMP53-1 ( <b>3b</b> ). ....	10
Figura 8 - Estrutura química do derivado de triptofanol DIMP53-1 ( <b>4</b> ).....	11
Figura 9 - Estrutura química do derivado de triptofanol <b>5</b> . ....	12
Figura 10 - Estruturas químicas dos derivados spiropirrolidina oxindóis MI-63 ( <b>6a</b> ), MI-219 ( <b>6b</b> ), MI-888 ( <b>6c</b> ), MI-77301 ( <b>6d</b> ) e MI-1061 ( <b>6e</b> ). ....	14
Figura 11 - Estruturas químicas dos derivados spirooxindóis RO8994 ( <b>7a</b> ), RO2468 ( <b>7b</b> ) e RO5353 ( <b>7c</b> ).....	15
Figura 12 - Estruturas químicas dos derivados spiropirazolina oxindóis <b>8a</b> e <b>8b</b> .....	16
Figura 13 - Estruturas químicas dos derivados spirotriazolina oxindóis <b>9a-h</b> .....	17
Figura 14 - Estruturas dos derivados spirooxindóis <b>10a</b> e <b>10b</b> . ....	17
Figura 15 - Estruturas químicas dos derivados spiropirazolina oxindóis <b>11a</b> e <b>11b</b> . ....	18
Figura 16 - Estrutura químicas dos derivados spiropirazolina oxindóis <b>12a</b> e <b>12b</b> . ....	19
Figura 17 - Estrutura do derivado dihidro-indolizidino índole <b>13</b> . ....	19
Figura 18 – Estrutura química do derivado de carbazole <b>14</b> . ....	20
Figura 19 - Estrutura química do derivado de carbazole IZCZ-3 ( <b>15</b> ).....	21
Figura 20 - Estrutura químicas dos derivados de indolo[3,2-b]quinolinas SYUIQ-05 ( <b>16a</b> ), <b>16b</b> , <b>16c</b> e <b>16d</b> . ....	23
Figura 21 - Estruturas químicas dos derivados de indolo[3,2-b]quinolinas NSC748392 ( <b>17a</b> ), NSC748393 ( <b>17b</b> ) e NSC748394 ( <b>17c</b> ). ....	24
Figura 22 – Estruturas químicas das indolo[3,2-b]quinolinas dissubstituídas <b>18</b> e <b>19</b> . ...	25
Figura 23 – Estruturas químicas dos derivados de indoloquinolinas trialquilamina <b>20</b> e <b>21</b> . ....	27
Figura 24 – Estruturas químicas das indolo[3,2-c]quinolinas dissubstituídas <b>22a-c</b> . ....	27
Figura 25 - Modelo molecular de um complexo 2:1 de uma indolo[3,2-c]quinolina com um G4 antiparalelo telomérico humano (PDB ID: 143D) <sup>116</sup> . ....	28
Figura 26 - Estruturas químicas das indolo[3,2-c]isoquinolinas <b>23a</b> e <b>23b</b> , <b>24</b> , <b>25</b> e <b>26</b> . ....	32
Figura 27 - Esquematisação do processo sintético dos derivados de spirooxindóis <b>11b</b> e <b>12b</b> . ....	33
Figura 28 - Esquematisação do mecanismo sintético das indolinonas <b>27</b> e <b>30</b> (isómeros <b>Z</b> ). ....	34
Figura 29 - Esquematisação do mecanismo sintético do cloreto de hidrazonilo <b>29</b> a partir da hidrazona <b>28</b> . ....	35
Figura 30 - Esquematisação do mecanismo sintético do cloreto de hidrazonilo <b>32</b> a partir da hidrazida <b>31</b> . ....	36
Figura 31 - Esquematisação do mecanismo sintético dos compostos <b>11b</b> e <b>12b</b> . ....	37
Figura 32 - Esquematisação do processo sintético dos compostos <b>20a</b> e <b>21a</b> . ....	38

Figura 33 - Esquematização do mecanismo de formação do composto <b>35</b> a partir de <b>34</b> . .....	39
Figura 34 - Esquematização do processo sintético dos compostos <b>36</b> e <b>36PS</b> . .....	44
Figura 35 - Mecanismo sintético do composto <b>36</b> a partir do intermediário <b>39</b> . .....	45
Figura 36 – Esquematização de interações observadas nos espectros de HMBC (a azul), HMQC (a tracejado verde) e COSY (a vermelho) do composto <b>36</b> . .....	47
Figura 37 - Esquematização do processo sintético dos derivados 5-acetamida <b>40</b> , <b>23a</b> e <b>23b</b> . .....	47
Figura 38 - Primeiro espectro de <sup>1</sup> H-RMN. ....	50
Figura 39 - Espectro bidimensional HMQC do composto <b>40</b> . .....	51
Figura 40 - Espectro de <sup>1</sup> H-RMN, obtido para HMQC do composto <b>40</b> . .....	52
Figura 41 - Esquematização do processo sintético dos derivados 5-benzilamina <b>24</b> e <b>25</b> . .....	53
Figura 42 - Esquematização de interações observadas nos espectros de HMBC (a azul) e HMQC (a tracejado verde) do composto <b>25</b> . .....	55
Figura 43 - Esquematização do processo sintético do derivado 5-benzamida <b>26</b> . .....	55
Figura 44 - Esquematização das interações observadas nos espectros de HMBC (a azul), HMQC (a tracejado verde) e COSY (a vermelho) do composto <b>26</b> . .....	58
Figura 45 - Valores de $\Delta T_m$ de estruturas G4 de ADN (F21T e KRAS) e estruturas duplex (T-loop) estabilizadas pelos compostos analisados por FRET melting assay a 1 e 5 $\mu$ M. ....	59

## **Lista de abreviaturas**

BAX – *Bcl-2 Associated X*

COSY – *Homonuclear Correlation Spetroscopy*

DCM – *Dichlorometane*

DIPEA – *N,N-Diisopropylethylamine*

DMF – *Dimethylformamide*

FRET – *Fluorescence Resonance Energy Transfer*

GADD45 – *Growth Arrest and DNA damage genes*

HTS – *High-Troughput Screening*

MDM – *Murine Double Minute*

MEK – *Mitogen-Activated Protein Kinase*

HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

HMQC – *Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*

NHE - *Nuclease Hypersensitive Element*

OXPPOS – *Oxidative Phosphorilation*

PUMA – *p53 Upregulated Modulator of Apoptosis*

RING – *Really Interesting New Gene*

ROS – *Reactive Oxygen Species*

RT-PCR – *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

SCO2 – *Cytochrome c oxidase assembly*

TLC – *Thin Layer Chromatography*

THF – *Tetrahydrofuran*





# 1. Introdução

## 1.1. Proteína supressora de tumores p53 como alvo na terapia do cancro

A p53 é uma proteína supressora de tumores, estando envolvida em vários processos preventivos da formação de células malignas. Entre as respostas que podem ser desencadeadas pela p53, incluem-se a paragem de ciclo celular, reparação do ADN, diferenciação, senescência e a apoptose<sup>1-4</sup>.

Em circunstâncias normais, o nível desta proteína é baixo, mantido graças a um equilíbrio entre a sua transcrição e degradação pelos respetivos reguladores negativos. Este balanço é absolutamente necessário, já que em níveis excessivamente baixos de p53, pode acontecer o desenvolvimento de células cancerígenas; por outro lado, quando em excesso, a p53 pode levar à morte celular desnecessária. Em determinada altura, esta harmonia pode ser perturbada por exposição a diferentes tipos de *stress* a nível celular como infeções, hipoxia, radiações de elevada energia, alterações metabólicas, carcinogénios químicos, deficiência de nutrientes, entre outros possíveis (Fig. 1)<sup>5-8</sup>.

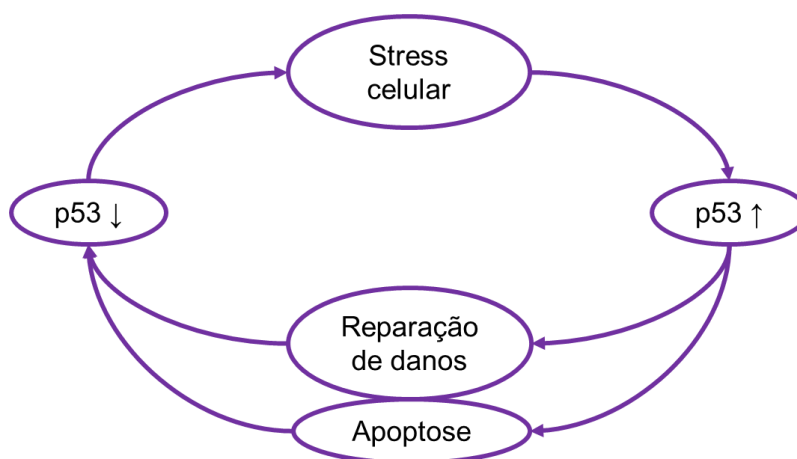


Figura 1 - Esquematização do ciclo de regulação da p53.

Na sequência de *stress* celular, e dependendo do tipo de exposição, a p53 poderá desencadear uma de duas cadeias de eventos: a paragem do ciclo celular e consequente reparação do ADN danificado; ou a apoptose.

A paragem do ciclo celular induzida pela p53 pode acontecer na fase G<sub>1</sub> ou G<sub>2</sub>. Quando são detetados danos no ADN, a p53 ativa o p21 (inibidor de cinase dependente de ciclina), que atua como mediador na paragem do ciclo nas fases G<sub>1</sub> e S, permitindo a reparação do ADN onde é necessária. A p53 pode também ativar a GADD45 que, por sua vez, regula a paragem do ciclo celular nas fases G<sub>2</sub>/M. Assim, durante os diferentes *checkpoints* do ciclo celular, a p53 (desde que na sua forma

funcional) pode intervir, para que seja possível a correção de erros no ADN<sup>9-11</sup>. Quando não há a possibilidade de reparar os danos, a p53 induz o processo de morte celular programada. Este processo pode acontecer via diversos genes que a p53 tem como alvo, como, por exemplo, a família Bcl-2.<sup>12</sup>

O gene TP53 é um dos que mais sofre mutações em cancros humanos: há substituições de aminoácidos, o que provoca uma quebra da ligação entre a p53 e o ADN, levando a perda de função. Quando há células em transformação ou replicação contendo estes genes mutados, podem impedir a apoptose de acontecer, reter um código genético instável e desenvolver condições malignas (Fig. 2). Por estas razões é frequente que células tumorais, que contenham o TP53 silenciado ou mutado, sejam resistentes a uma variedade de agentes quimioterápicos<sup>13</sup>.

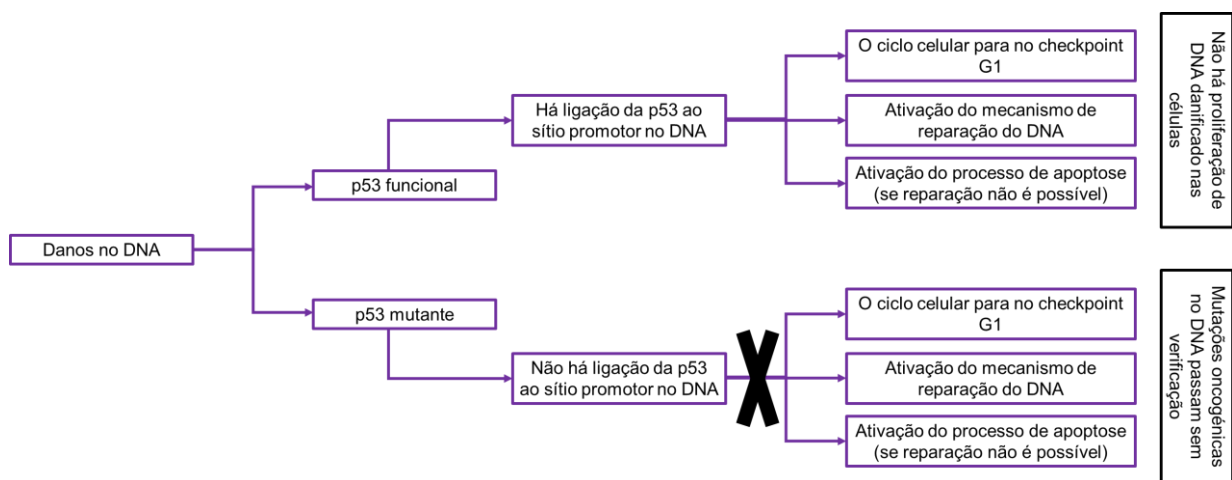


Figura 2 - Esquematização da cadeia de eventos que leva à ativação da p53.

Uma das razões pela qual há perda de função supressora de tumores da p53 é a sobre-expressão da MDM2 e da MDMX, duas proteínas que atuam como reguladores negativos da p53, e que permitem a manutenção do ciclo de regulação. A MDM2 consegue degradar a p53 (por ubiquitinação, quando se liga à p53), continuamente, quando a sua ação não é necessária; por outro lado, a MDMX não tem capacidade de desencadear esse processo, mas consegue inativar a sua função.

A MDM2 humana (HDM2) é uma proteína complexa: os seus 491 resíduos contêm vários domínios funcionais, sítios de modificação e sequências de sinal (Fig. 3). Há três regiões de interação entre a MDM2 e a p53 identificadas até à data. A primeira ocorre entre o domínio terminal-N da MDM2 e o domínio de transativação terminal-N 1 da p53, ou TAD-1. Esta interação impede a ligação da p53 ao mecanismo transcricional. Análises cristalográficas, de modelação molecular e de RMN do terminal-N da MDM2 ligado a um péptido p53 e abrangendo os aminoácidos 15 a 29, levaram à identificação de um sítio hidrofóbico na MDM2, determinando-se que os aminoácidos

fenilalanina (Phe) 19, triptofano (Trp) 23 e leucina (Leu) 26 da p53 permitem a interação entre as duas proteínas<sup>14,15</sup>. Estudos posteriores demonstraram a existência de uma interação entre o domínio ácido central da MDM2 e o domínio específico de ligação ao DNA da p53, que é essencial para que a p53 seja ubiquitinada eficientemente. Foi ainda relatado que a região ácida da MDM2 promove uma alteração conformacional na p53 e a inibição da interação da p53 com o DNA<sup>16</sup>. A terceira interação descoberta acontece entre o terminal-N da MDM2 e o terminal-C da p53: quando esta região da p53 é eliminada, a interação p53-MDM2 diminui, e as modificações no terminal-C podem regular as interações entre a p53 e a MDM2.<sup>17</sup>

A proteína MDMX (ou MDM4) é uma proteína que também se liga à p53, homóloga à MDM2, e que consiste em 490 aminoácidos, apresentando várias semelhanças estruturais a esta última (Fig. 3). A MDMX não apresenta sinal nuclear de localização (NLS), sinal nuclear de exportação (NES) nem sinal nucleolar de localização (NoLS), uma vez que está presente, principalmente, no citoplasma das células, enquanto a MDM2 precisa destas sequências para que ocorra o transporte para o interior ou exterior do núcleo celular. A MDMX demonstrou capacidade de inibir a função de ativação da transcrição da p53.<sup>18,19</sup>

Nesta proteína podem identificar-se quatro regiões principais: a região hidrofóbica terminal-amina, necessária para a interação com a p53 e a p73; o domínio *zinc-finger*; o domínio ácido; e, por fim, o domínio RING terminal-carboxilo envolvido na heterodimerização com a MDM2.<sup>20</sup>

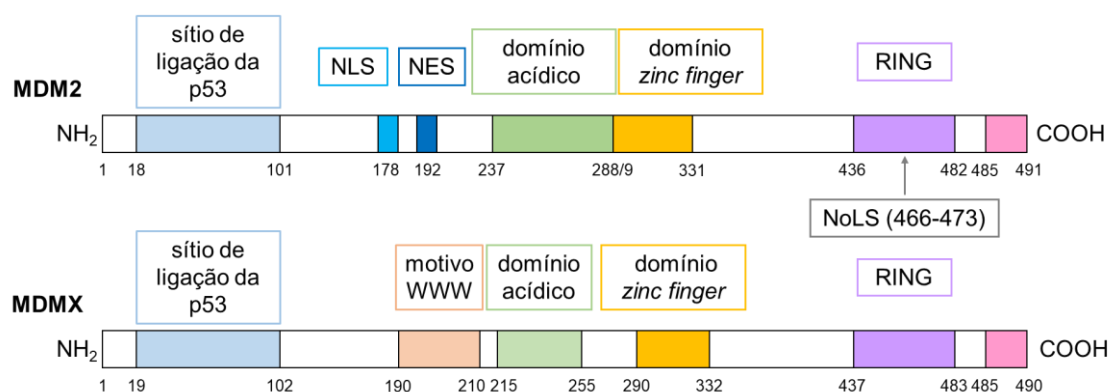


Figura 3 - Representação gráfica dos domínios funcionais (e sua distribuição) da MDM2 e MDMX.

Estudos *in vitro* mostraram que os domínios terminal-amina da MDMX e da MDM2 têm afinidades semelhantes para o domínio de transativação (TAD) da p53. Porém, é de notar que estes resultados não podem ser diretamente extrapolados para situações *in vivo*<sup>21</sup>.

Ainda que a MDM2 e a MDMX sejam estruturalmente semelhantes nos domínios que permitem ligação à p53, análises estruturais mostraram que há diferenças significativas nos sítios de ligação à p53, havendo 2 resíduos no sítio da MDMX que bloqueiam parcialmente a ligação entre as duas proteínas<sup>22</sup>.

Embora a MDMX possa formar homodímeros, tal como a MDM2, não há atividade de ligase E3 detetável nos seus domínios RING, levando à conclusão que, por si só, não consegue degradar a p53. A MDM2 pode, porém, homo-oligomerizar ou hetero-oligomerizar com a MDMX por interação RING/RING, indicando que a MDMX deverá ser monomérica<sup>23,24</sup>. Mais ainda, descobriu-se que a MDMX tem capacidade auto-inibitória. A estrutura apresenta um domínio chamado WWW (que não existe na MDM2) e que permite a interação com o próprio domínio terminal-N, impedindo a interação com a p53. Em formas da MDMX, que não contenham o WWW, a força da interação com a p53 aumenta 32 vezes. Estas formas alternativas podem ser a explicação para efeitos oncogénicos em cancros mais agressivos<sup>25</sup>.

Por si só, a MDMX não afeta a estabilidade da p53, mas, uma vez que a afinidade de ligação à p53 é semelhante à da MDM2, poderá inibir a sua transativação, mesmo que com efeitos menos destrutivos<sup>26</sup>.

## **1.2. G-quadruplexos de ADN como alvos na terapia do cancro**

Um G-quadruplexo (G4) é uma forma de ADN que sobrepõe várias camadas de G-quartetos, estruturas quadrangulares planares formadas por quatro guaninas (Fig. 4a), unidas por ligações de hidrogénio *Hoogsteen*. Nas interações *Hoogsteen*, a geometria de ligação entre pares de bases é ligeiramente diferente da de um par *Watson-Crick*, devido ao comprimento e ângulo das ligações, dando a forma quadrangular à estrutura. Os G4 são estabilizados por catiões monovalentes, como  $K^+$  e  $Na^+$ , devido à sua capacidade de neutralizar a repulsão entre as cargas negativas dos átomos de oxigénio na posição 6 das guaninas (Fig. 4b). Os G4s podem ser classificados em diversos subgrupos como paralelos, antiparalelos ou híbridos (Fig. 4c), conforme a sua topologia, que é dependente da orientação das cadeias de ADN<sup>27-29</sup>.

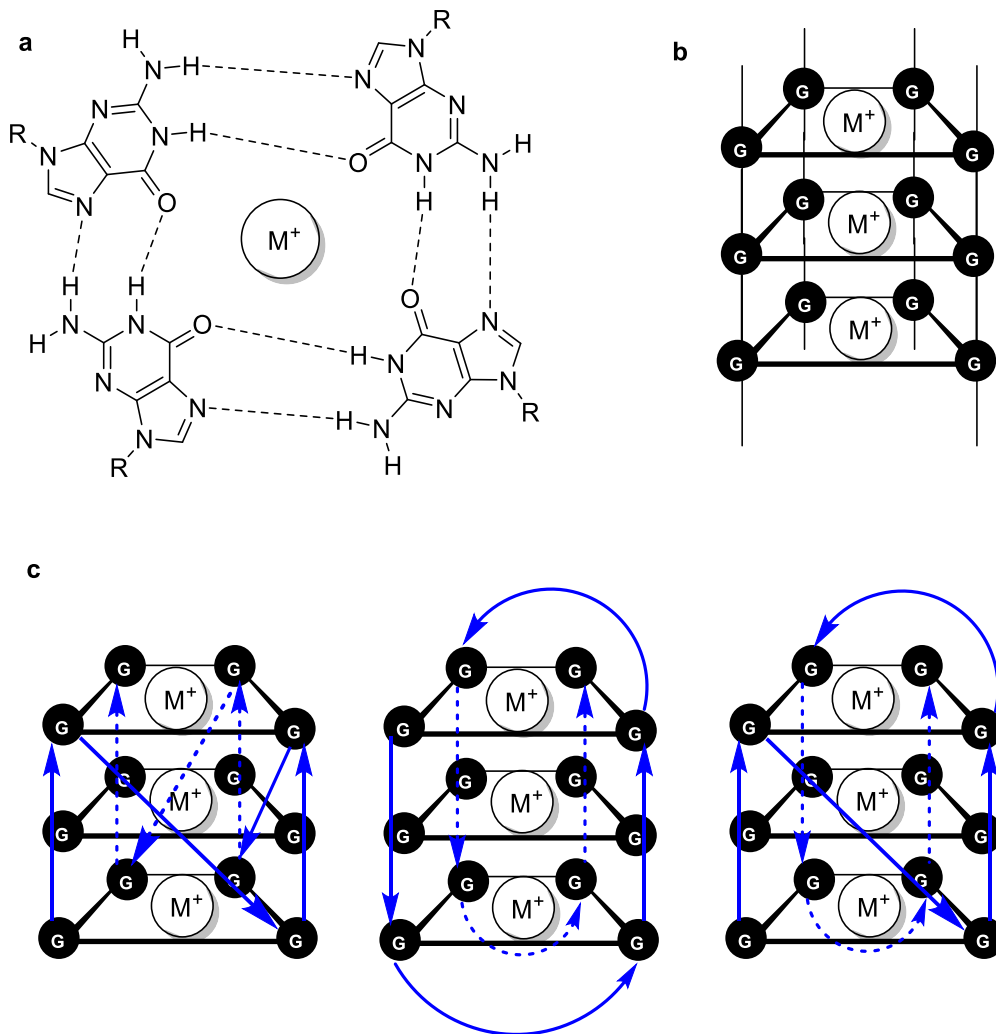


Figura 4 - Estrutura genérica de um quadruplexo-G. **a** – G-quarteto, com 4 guaninas ligadas por ligações de hidrogênio Hoogsteen; **b** – Representação esquemática de um G-quadruplexo; **c** – Representação esquemática dos subgrupos dos G4: paralelos, antiparalelos e híbridos (orientação das cadeias de ADN a azul).

Os G4s estão envolvidos numa série de funções celulares, como a alongação e manutenção do comprimento de telómeros<sup>30</sup>, transcrição<sup>31</sup>, tradução<sup>32</sup> e iniciação de replicação do ADN<sup>33</sup>.

Telómeros são complexos de ADN e proteínas nas pontas dos cromossomas, nos quais a cadeia de ADN contém uma sequência repetida (TTAGGG). Estes complexos servem como uma proteção que evita a fusão do ADN cromossomal e a sua identificação como ADN danificado. Telómeros danificados pelo encurtamento progressivo, causado pelas divisões celulares, podem provocar respostas celulares que conduzem a senescência e morte celular. Porém, algumas células conseguem evadir-se deste processo, mantendo o comprimento dos telómeros no crescimento celular e progredindo, eventualmente, para um tipo maligno. Estas células atingem um estado de imortalidade ativando ou regulando, positivamente, um gene normalmente adormecido, o

*hTERT*. Este gene codifica para a telomerase, uma proteína com atividade de transcriptase reversa e que complexa com outras proteínas e um ARN funcional (codificado pelo gene *hTR*), resultando um complexo enzima ribonucleoproteína. Em cerca de 90% dos câncros humanos, verifica-se que o *hTERT* tem uma expressão muito mais significativa e, portanto, a expressão da telomerase também é aumentada<sup>34,35</sup>.

A proteção presente no fim dos cromossomas consiste numa estrutura com 150-200 nucleotídeos rico em guaninas, formando um complexo *T-loop* ou um complexo G-quadruplexo. O *T-loop* é mantido e estabilizado por seis proteínas: a TRF1 e TRF2, POT1, TPP1, TIN2 e RAP1. Já o G-quadruplexo pode ser estabilizado pelos ligandos BRACO19, RHS4 e telomestatina. Quer o complexo *T-loop* e respetivas proteínas, quer os G4s, podem bloquear a telomerase de aceder aos telómeros<sup>36</sup>. Assim, os G4s presentes nos telómeros estão intimamente relacionados com a inibição da ação da telomerase. Considerando como alvo os G4s teloméricos, pode induzir-se a apoptose de células tumorais por estabilização dos G-quadruplexos nas pontas dos cromossomas com pequenas moléculas<sup>37,38</sup>.

Desde que o sequenciamento do genoma humano foi determinado, realizaram-se análises computacionais com o objetivo de encontrar sequências putativas de formação de G4 não-teloméricos, devendo existir mais de 700 000 destas sequências distribuídas pelo genoma<sup>39</sup>. As sequências estão localizadas em regiões funcionais do genoma como promotores, intrões e regiões não-traduzidas (UTRs) dos genes<sup>40-42</sup>. Interessantemente, as regiões promotoras dos proto-oncogenes têm mais sequências putativas de formação de G4s do que as dos genes supressores de tumores<sup>43</sup>.

Os G4s podem-se formar numa das cadeias de ADN durante a transcrição. Estruturas formadas em sítios promotores da transcrição regulam positiva ou negativamente, a mesma, possivelmente por recrutamento de fatores de transcrição ou por inibição da progressão da ARN polimerase II<sup>44,45</sup>. Os G4s também se podem formar no ARN mensageiro. Aqui, os G4s inibem a progressão dos ribossomas ou o recrutamento de fatores de iniciação da tradução, tendo-se verificado que podem, assim, inibir a tradução<sup>46-48</sup>. Portanto, os G4s podem, potencialmente, regular vários passos da replicação celular.

A estabilização de G4s teloméricos e conseqüente bloqueio de atividade da telomerase por pequenas moléculas é uma estratégia de interesse para tratamentos de tumores<sup>37,49-51</sup>. Têm sido investigados ligandos que possam interagir especificamente com determinados G4s e que afetem um determinado gene relacionado com a proliferação de células cancerígenas, como por exemplo o *c-MYC* ou o *KRAS*, levando a

atividade antitumoral, por regulação negativa da expressão dessa proteína alvo e consequente ativação da expressão de proteínas relacionadas com o processo de morte celular programada, como é o caso da p53, discutida anteriormente.

O *c-MYC* codifica um fator de transcrição que pode atuar como ativador de transcrição de alguns genes envolvidos na proliferação de células, ou como repressor da transcrição de outros genes relacionados com paragem de crescimento celular<sup>52,53</sup>. A região promotora do *c-MYC* contém o NHE III<sub>1</sub> (elemento de nuclease hipersensitivo), onde há uma sequência putativa de formação de G4s neste elemento. Assim, ligandos que estabilizem G4s, podem contribuir para a supressão da expressão de *c-MYC*, impedindo, como consequência, que os genes por si transcritos e que estão envolvidos na proliferação celular atuem, e portanto, travando o crescimento de células malignas<sup>54</sup>.

A família de genes *RAS*, incluindo *NRAS*, *HRAS* e o *KRAS*, é há muito considerada um alvo terapêutico de importância. A mutação do *KRAS* é uma das mutações oncogénicas que acontece em cancros coloriais, do pulmão e pancreáticos, estando também associada ao desenvolvimento de resistência a fármacos quimioterápicos<sup>55</sup>. Assim, desenvolveram-se diversas estratégias para terapias que teriam como alvo esta proteína, mas com pouco sucesso.

O promotor do gene humano do *KRAS* contém, tal como o *c-MYC*, um NHE, composto por 6 porções curtas de guaninas, cruciais para a transcrição. Nesta sequência, podem formar-se vários G4s<sup>56,57</sup> que se sabe estarem relacionadas com a regulação negativa da expressão do *KRAS*<sup>58</sup>.

Assim, procedeu-se à pesquisa de moléculas que atuassem como ligandos estabilizadores de G4s, de forma a diminuir a expressão destes oncogenes e consequentemente a proliferação de células cancerígenas. Para além disso é sabido que a estabilização de G4s conduz a uma resposta celular equivalente à que ocorre quando existe dano no ADN, ou seja, indução de apoptose com aumento da expressão da p53.<sup>59</sup>

### **1.3. Compostos indólicos ativadores da p53**

Tal como já foi referido, a p53 é uma proteína altamente regulada. É também um alvo popular na comunidade de investigação de novos agentes quimioterápicos, com a particularidade de a sua ativação ou indução de expressão serem processos que podem ser desencadeados por diferentes cadeias de eventos. São disso exemplo a inibição dos seus reguladores negativos (a MDM2 e a MDMX)<sup>60-65</sup> ou, por outro lado,

processos que envolvam a ativação ou regulação negativa de outras proteínas, provocando, por sua vez, a (re)ativação da p53, como a repressão da expressão do *c-MYC* e do *KRAS* mutados, que conduz à morte de células cancerígenas por apoptose derivada da ativação da expressão da p53.<sup>44,45,66-68</sup>

### 1.3.1. Inibidores das interações p53-MDM2/X

Há uma diversidade de pequenas moléculas que foram identificadas e estudadas quanto à sua capacidade de se ligarem à MDM2 e/ou à MDMX, não permitindo que estas proteínas interajam com a p53<sup>64,65,69,70</sup>. Desta forma, a função supressora de tumores não ficará inativa. Aqui abordam-se algumas das moléculas de esqueleto indólico mais relevantes.

#### a) Derivados de indolil hidantoínas

Um grupo de investigadores da Hoffman-La Roche apresentou um grupo de moléculas (indolil hidantoínas) com atividade enquanto inibidores duais das interações p53-MDM2/X, identificadas através de HTS de uma biblioteca de moléculas inibidoras da MDMX e verificadas para inibição da MDM2. Identificou-se primeiro o composto RO-2443 (**1a**) (Fig. 5), que tinha uma afinidade semelhante para a MDM2 e para a MDMX, mostrando atividade inibitória *in vitro* para ambas proteínas ( $IC_{50}$ =33 nM e 41 nM, respetivamente). Contudo, o composto apresentava uma solubilidade aquosa insatisfatória, não permitindo uma avaliação da sua atividade em células. Portanto, partindo do **1a**, fez-se uma otimização que permitisse uma melhor biodisponibilidade. Obteve-se o derivado, RO-5963 (**1b**) (Fig. 5), que mostrou ser um pouco mais potente enquanto inibidor dual do que o composto inicial, com atividade menor para MDMX ( $IC_{50}$ =24.7 nM) do que para MDM2 ( $IC_{50}$ =17.3 nM), além de ter melhor solubilidade. Em ensaios em células, o **1b** foi capaz de inibir a sobre-expressão de MDMX e de MDM2 e restaurar a atividade da p53. São aguardados estudos que relatem possíveis otimizações da potência e propriedades farmacológicas que permitam o avanço de ensaios *in vivo* e, possivelmente, clínicos para este composto<sup>71,72</sup>.



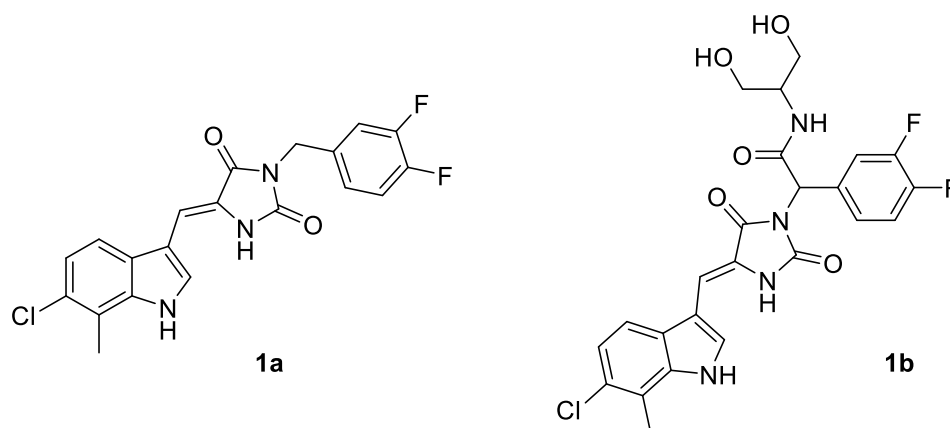


Figura 5 – Estruturas químicas dos derivados de indolil hidantoínas RO-2443 (**1a**) e RO-5963 (**1b**).

#### b) Derivados de triptofanol

Após um rastreio de derivados de (*S*)-triptofanol utilizando células de leveduras que co-expressam p53, MDM2 e/ou MDMX humanas, um grupo português identificou o composto OXAZ-1 (**2**) (Fig. 6), reativador da p53 por inibição da MDM2 e MDMX ( $EC_{50}$ =1.0  $\mu$ M e 2.4  $\mu$ M, respetivamente), aumentando a sensibilidade de células tumorais a fármacos quimioterapêuticos convencionais, como a doxorubicina e o etoposido<sup>73</sup>.

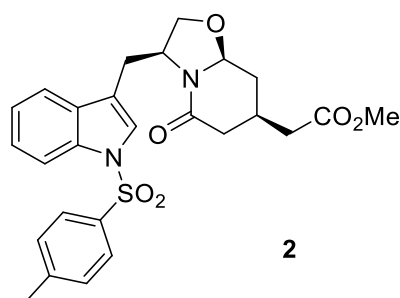


Figura 6 - Estrutura química do derivado de triptofanol OXAZ-1 (**2**).

O mesmo grupo publicou a descoberta de uma nova molécula, um derivado de triptofanol oxazoloisindolinona, o SLMP53-1 (**3a**) (Fig. 7), que atua como reativador de p53 selvagem e mutante, especificamente, da variante p53R280K. Este composto foi sintetizado, juntamente com o enantiómero correspondente (**3b**) (Fig. 7), verificando-se que este último era inativo nos ensaios com leveduras, o que coloca em evidência a importância da estereoquímica da molécula, mais especificamente nas posições C-3 e C-9b, para que seja possível observar atividade.

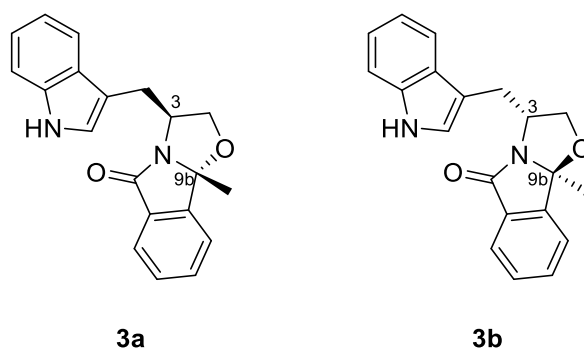


Figura 7 – Estruturas químicas dos derivados de triptofano SLMP53-1 (**3a**) e do enantiômero do derivado SLMP53-1 (**3b**).

A 10  $\mu\text{M}$ , o composto inibiu o crescimento celular e restaurou o efeito inibitório da mutante p53R280K (em cerca de 79%). À mesma concentração, o **3a** aumentou a paragem do ciclo celular nas fases S e G2/M. Observou-se também que o composto não apresenta toxicidade *in vitro* contra células saudáveis: a 16  $\mu\text{M}$ , provocou inibição de crescimento de apenas  $5.6 \pm 3.2\%$  em células não-tumorigênicas MCF10A<sup>74</sup>.

Num estudo posterior, tentou-se compreender melhor o mecanismo de ação deste novo composto na reativação da mutante p53R280K, assim como verificar se poderia reativar outras formas mutantes.

Os resultados mostraram que o **3a** se liga a um sítio hidrofóbico do homodímero da p53, estabelecendo uma interface com o ADN e compensando a perda de contacto direto entre o resíduo K280 e o ADN. Sobrepondo-se os modelos da p53 mutante e da p53 selvagem, verificou-se que o **3a** tem uma forma de ligação semelhante para a p53 selvagem. Os estudos *in silico* também permitiram verificar que os dois enantiômeros têm padrões de ligação distintos, justificando a falta de atividade do enantiômero para reativação da p53 selvagem e da mutante. Mais ainda, foi possível estabelecer que o composto consegue reativar outros *hotspots* de mutantes de p53 de relevância clínica<sup>75</sup>.

Uma vez esclarecida a capacidade de ativação da p53 mutante e selvagem do **3a**, tornou-se necessário aprofundar o seu potencial enquanto futuro candidato a fármaco anticancerígeno. Mais recentemente, estudou-se o efeito do composto no metabolismo da glucose e na angiogénese, de forma a verificar a atividade antitumoral. Os resultados deste estudo mostraram que o **3a** induz morte celular por apoptose dependente de p53 mitocondrial em células cancerígenas, envolvendo a regulação positiva dos níveis de expressão de BAX e PUMA, translocação mitocondrial de p53 e BAX, libertação de citocromo c e geração de ROS dependente da p53<sup>74</sup>. ROS são produtos secundários tóxicos

da fosforilação oxidativa e têm um papel importante na acumulação progressiva de danos nas células cancerígenas e na sua eliminação através da apoptose<sup>76</sup>.

Verificou-se que o **3a** poderá estimular a fosforilação oxidativa através de regulação positiva de SCO2 que, por sua vez, está envolvida na acumulação de ROS e morte celular por apoptose. O composto também causou regulação positiva de COX4, uma subunidade do complexo mitocondrial IV, *in vitro* e *in vivo*. Mais ainda, o **3a** inibe a glicólise por regulação negativa de vários intervenientes glicolíticos, incluindo transportadores de glucose (GLUT1) e enzimas (HK2 e PFKFB3) que são alvos diretos da p53, em células cancerígenas e em tecidos tumorais.

Também foi possível confirmar que o **3a** tem atividade anti-angiogénica, pois verificou-se uma redução significativa da produção de VEGF em células cancerígenas que expressam p53 e também em células endoteliais. Mais ainda, os resultados mostraram que a atividade anti-angiogénica do composto é dependente do ambiente tumoral, especialmente do estado da p53, reforçando que provoca atividade anti-metastática dependente da p53.<sup>77</sup>

Recorrendo ao mesmo protocolo de rastreio com células de leveduras, num estudo posterior, uma série de compostos derivados de um ativador da p53, desenvolvido anteriormente, nos quais se inseriram grupos protetores diferentes no azoto do indole, foi testada para interações p53-MDM2/X. Neste ensaio, identificou-se o composto DIMP53-1 (**4**) (Fig. 8) enquanto potencial inibidor dual destas interações. Os resultados de estudos em células demonstraram que o composto é um supressor eficaz da atividade da MDM2 e MDMX e tem baixa toxicidade em células normais, tanto *in vitro* (para ensaios em células SJSA-1, IC<sub>50</sub>=11.8 µM, e em células MCF-7, IC<sub>50</sub>=13.3 µM) como *in vivo*<sup>78</sup>.

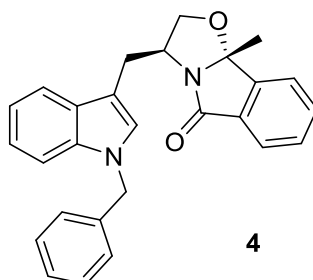
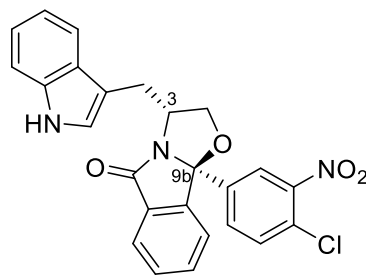


Figura 8 - Estrutura química do derivado de triptofanol DIMP53-1 (**4**).

Tendo em conta o sucesso do composto **3a**, sintetizou-se um novo conjunto de derivados de triptofanol oxazoloisindolinonas, tendo-se desenhado novas moléculas com diferentes substituintes na posição 9b da parte oxazoloisindolinona e sem substituinte no átomo de azoto da parte indole. Este estudo levou

a um novo composto (**5**) (Fig. 9), com atividade antiproliferativa 6 vezes superior ( $IG_{50}=2,6 \mu\text{M}$  em células de p53 HCT-116 p53<sup>+/+</sup>). Também se determinou, através de testes em linhas celulares CCD-18Co normais de cólon, que o composto **5** é seletivo para células cancerígenas, visto que o valor de  $IC_{50}$  para as linhas saudáveis ( $26,7\pm 1,8 \mu\text{M}$ ) é 10 vezes superior ao valor obtido em células HCT-116 p53<sup>+/+</sup>, apesar da expressão de p53 selvagem nas células normais<sup>79</sup>.



**5**

Figura 9 - Estrutura química do derivado de triptofano **5**.

### c) Derivados de spirooxindóis

A Sanofi apresentou uma classe de inibidores da MDM2, com um esqueleto spirooxindole. As primeiras estruturas foram obtidas por *structure-based design*, após análise de raio-X de uma estrutura cristalográfica da MDM2 complexada com a p53. Os estudos de modelação mostraram que o anel oxindole podia mimetizar a cadeia lateral do Trp23 da p53 e que o anel spiro-pirrolidina providenciava uma estrutura rígida na qual se podiam introduzir dois grupos hidrofóbicos de forma a mimetizar as cadeias laterais da Phe19 e da Leu26. O primeiro composto relevante foi o MI-63 (**6a**) (Fig. 10), com um grupo 2-morfolin-4-iletilamina ligado ao esqueleto central base. O **6a** mostrava elevada seletividade para bloquear a interação MDM2-p53 ( $K_i=3 \text{ nM}$  para ligação à MDM2)<sup>80,81</sup>. Porém, tinha um perfil farmacocinético pouco adequado para avaliação *in vivo*, o que levou a novos estudos para melhorar as suas características. Recorrendo a estratégias *de novo structure-based design*, obteve-se o MI-219 (**6b**) (Fig. 10), tendo este elevada seletividade para MDM2 ( $K_i=5 \text{ nM}$ ) e atividade inibitória em ensaios de crescimento celular ( $IC_{50}=0,4-0,8 \mu\text{M}$ ).

Uma vez que o perfil farmacocinético foi melhorado e o composto tinha melhor biodisponibilidade, estudou-se a atividade *in vivo* do **6b** para a ativação da p53, ensaios estes que revelaram inibição de tumores até 86% nos modelos estudados, comparativamente com o controlo, sem toxicidade para tecidos normais<sup>82</sup>. Posteriormente, investigações mostraram que a estereoquímica de compostos da classe dos spirooxindóis tinha grande influência na afinidade de

ligação à MDM2. Nestes estudos, a atividade antitumoral de um dos diastereoisómeros, com configuração *cis-cis*, destacava-se, mas o seu perfil farmacocinético não era ideal.

Esta estrutura foi então modificada de modo a incorporar características que melhorassem o seu perfil *in vivo*, como a inserção de um álcool cíclico e um grupo metilo no carbono ao qual estava ligado o grupo hidroxilo, reduzindo a lipofilia da molécula, de forma a aumentar a sua estabilidade metabólica. O processo levou ao composto que viria a chamar-se MI-888 (**6c**) (Fig. 10), que tem uma boa afinidade de ligação à MDM2, superior relativamente ao isómero *cis-trans* ( $K_i = 0,44$  nM e 4,5 nM, respetivamente)<sup>83</sup>. Os ensaios *in vitro* mostraram que o composto tem também boa atividade inibitória de crescimento de células ( $IC_{50} = 0,06$  e 0,08  $\mu$ M em linhas de células RS4;11 e SJS-1, respetivamente). Seguiram-se os ensaios *in vivo*, que provaram que o **6c** leva a regressão total e duradora de tumores em ratos, portanto, pode ser um candidato viável a ensaios clínicos<sup>84</sup>.

Apesar dos resultados positivos obtidos, estes aconteceram por uso de doses muito elevadas do **6b** e do **6c**. Como tal, realizaram-se novas otimizações, de forma a obter um composto mais potente, substituindo-se o grupo álcool do **6c** por um grupo *trans*-4-hidroxiclohexilamina, resultando o composto MI-77301 (**6d**) (Fig. 10), que é seletivo para a MDM2 ( $K_i = 0,88$  nM em ensaio competitivo com outras proteínas como a MDMX, Bcl-2 e Mcl-1). Em ensaios em linhas de células com p53 selvagem, o composto tem atividades de  $IC_{50} = 10$   $\mu$ M, 10 vezes mais potente que o **6b** e em ensaios *in vivo* a regressão de tumores, nos diferentes modelos, foi de mais de 80%, relativamente aos veículos de controlo<sup>85</sup>. Já com o **6d** em fase I de ensaios clínicos, foi publicado um estudo no qual se relatava que o tratamento prolongado levava à resistência *in vitro* e *in vivo* das células tumorais ao composto, atribuída à mutação do domínio de ligação ao ADN da p53, pelo que esta proteína já não poderia ser ativada pela molécula<sup>86</sup>.

Uma outra investigação, relativa à eficácia do **6d** em glioblastomas, indicou que a sua capacidade para atravessar a barreira hematoencefálica era limitada, comprometendo os resultados que poderiam ser obtidos com uma determinada dose<sup>87</sup>. Os resultados da fase I dos ensaios de avaliação de segurança do **6d** em pacientes com tumores sólidos foram entretanto publicados, relatando-se que este tinha um perfil de segurança aceitável, mas que a atividade foi limitada em pacientes com tumores avançados<sup>88</sup>.

O grupo publicou, ainda, um estudo no qual se experimenta uma estratégia sintética diferente para a obtenção de diastereoisómeros spirooxindóis, envolvendo uma reação de abertura de anel retro-Mannich entre o C-2 e C-3 do anel pirrolidina. Este processo leva à reconfiguração dos substituintes de C-2 e C-3, obtendo-se quatro diastereoisómeros. A segunda geração de compostos desta classe resultou da manipulação destes isómeros, alterando os substituintes de forma a obter atividade e afinidade máxima. Um destes compostos, MI-1061 (**6e**) (Fig. 10), substituído com um grupo ácido benzóico em vez de um 4-hidroxíciclohexil, liga-se à MDM2 com  $K_i=0,16$  nM. Em ensaios com linhas de células obtiveram-se atividades de inibição de crescimento de  $IC_{50}=100$  e 250 nM (SJA-1 e HCT-116 p53<sup>+/+</sup>, respetivamente) e, em ensaios em ratos, verificou-se uma regressão de tumores até 88%. Este composto tem melhor estabilidade química em solução, o que era uma limitação dos seus antecedentes<sup>89</sup>.

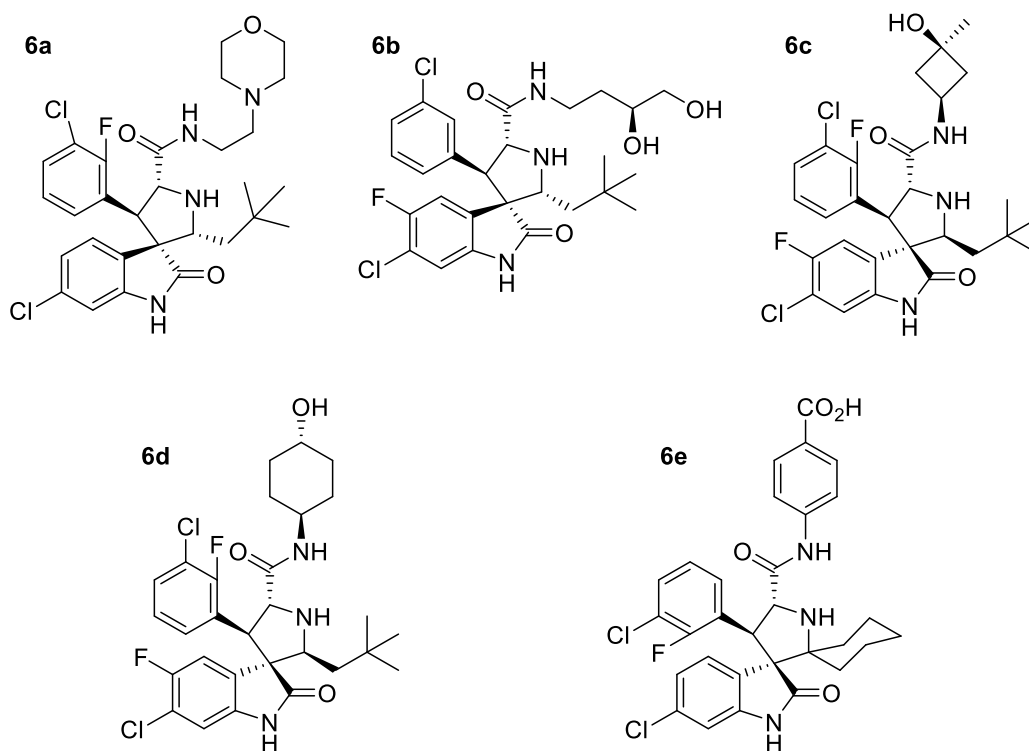


Figura 10 - Estruturas químicas dos derivados spiropirrolidina oxindóis MI-63 (**6a**), MI-219 (**6b**), MI-888 (**6c**), MI-77301 (**6d**) e MI-1061 (**6e**).

Além desta família de compostos, Graves e o seu grupo de investigação reportaram uma nova série de estruturas, com um centro spirooxindole, que começou com o RO8994 (**7a**) (Fig. 11). Este combina características estruturais do RG7388 (um inibidor da MDM2) com o centro spiroindolinona do **6c**, tendo mostrado ser tão ativo como o primeiro composto e mais que o **6c**. Em xenograftos de tumores osteossarcoma SJS-1, com MDM2 e p53 selvagem, o

composto inibiu o crescimento do tumor em mais de 60% e induziu regressão do tumor a uma concentração de 6,25 mg/kg<sup>90</sup>.

Após a otimização do processo de síntese do **7a**<sup>91</sup>, o grupo decidiu sintetizar uma série de compostos análogos, contendo substitutos bioisostéricos para o grupo 6-clorooxindole do composto inicial. Esta investigação resultou na obtenção dos compostos RO2468 (**7b**) e RO5353 (**7c**) (Fig. 11), ambos com bom perfil farmacocinético, boa eficácia em ensaios bioquímicos de afinidade de ligação ( $IC_{50}=6$  nM para ambos compostos), e eficácia em xenograftos de tumores osteossarcoma SJSA-1, sendo que ambos induziram regressão tumoral a concentrações de 10 mg/kg<sup>92</sup>.

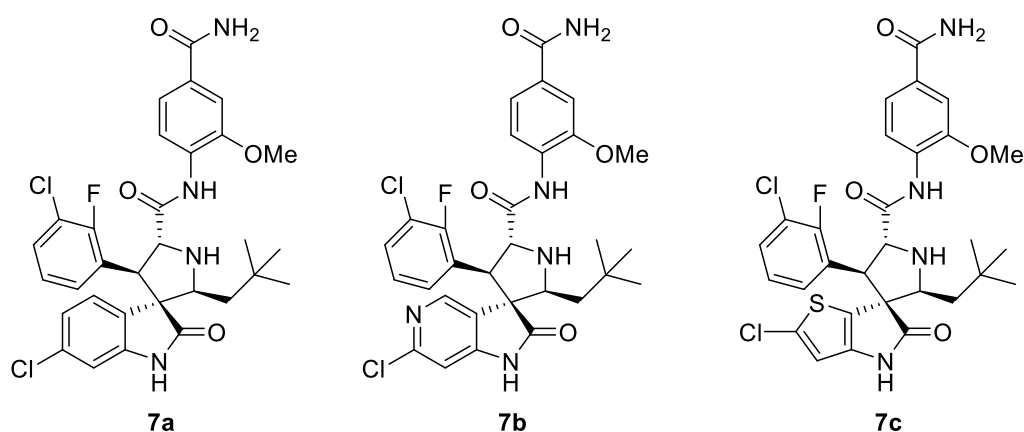


Figura 11 - Estruturas químicas dos derivados spirooxindóis RO8994 (**7a**), RO2468 (**7b**) e RO5353 (**7c**).

Em 2014, o nosso grupo de investigação publicou um estudo no qual uma série de spiropirazolina oxindóis foi, primeiramente, avaliada pela sua atividade citotóxica *in vitro* em linhas de células de cancro da mama MCF-7. Os mais ativos nesse teste foram depois avaliados em linhas de células de cancro da mama MDA-MB-231. Dois deles, **8a** e **8b** (Fig. 12), mostraram potência superior contra as células MCF-7 ( $GI_{50} < 7.4$   $\mu$ M) e elevada seletividade entre as células MCF-7 e as células MDA-MB-231, com valores 10 vezes superiores, não sendo, porém citotóxicos contra linhas de células saudáveis HEK 293T, com seletividade de mais de 4,5 vezes superior para o outro tipo de células<sup>93</sup>.

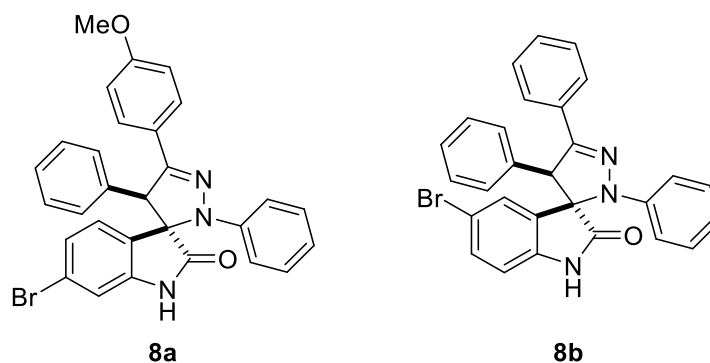


Figura 12 - Estruturas químicas dos derivados spiroirazolina oxindóis **8a** e **8b**.

Posteriormente, tendo em conta estes resultados, sintetizou-se uma nova série de compostos, spirotriazolinas oxindóis, híbridos de 1,2,4-triazóis e oxindóis, dois tipos de estruturas que mostraram, noutros estudos, ter atividade anticancerígena<sup>94,95</sup>. Em ensaios de atividade antiproliferativa, três compostos (**9b-d**) (Fig. 13), com um átomo de bromo na posição 5 do oxindole, eram seletivos contra linhas de células MDA-MB-231 (>2,4 vezes) relativamente às outras linhas testadas, MCF-7, HEK 293T, HCT-116 p53<sup>(+/+)</sup> e HCT-116 p53<sup>(-/-)</sup> (IC<sub>50</sub> entre 3,5 µM e 6,7 µM). Contrariamente, outros quatro compostos (**9a** e **9e-g**) mostraram seletividade para as quatro linhas de células cancerígenas referidas em relação às linhas de células HEK 293T. Destacou-se ainda o composto **9f** pela elevada seletividade (5,6 vezes superior) e pelos IC<sub>50</sub>=17,9 µM contra células HCT-116 p53<sup>(-/-)</sup> e IC<sub>50</sub> > 100 µM contra células HEK 293T. Em estudos para verificação do mecanismo de ação, este e o composto **9h** (Fig. 13) induziram a apoptose e a paragem do ciclo celular na fase G0/G1 e diminuíram os níveis de expressão da MDM2 e células HCT-116, concluindo-se, portanto, que têm capacidade para modular a interação MDM2-p53<sup>96</sup>.



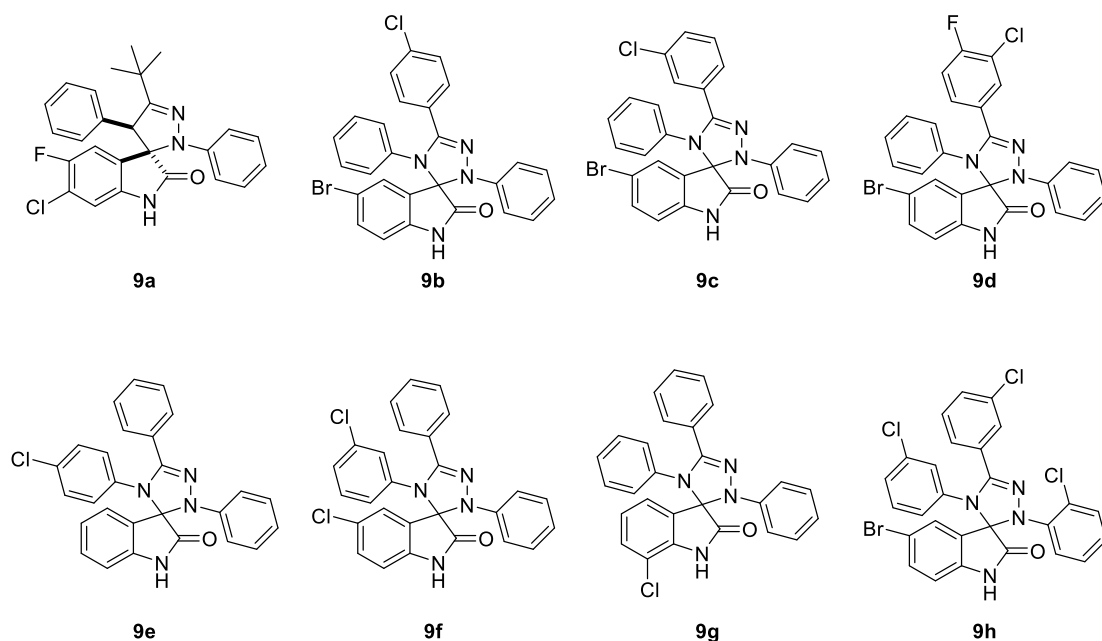


Figura 13 - Estruturas químicas dos derivados spirotriazolona oxindóis **9a-h**

Em 2014, desenharam-se novos derivados da mesma família. Nesta série, o anel isoxazolona atua como centro heterocíclico rígido, enquanto o oxindole mimetiza a cadeia lateral do Trp23 da p53. Dos 18 compostos sintetizados para esse estudo, concluiu-se que compostos com átomos cloro ou bromo na posição 6 do anel oxindole são mais ativos que a nutlina-3 em linhas de células HepG2. Em ensaios de fluorescência, o composto **10a** mostrou capacidade para inibir a interação p53-MDM2, e o composto **10b** (Fig. 14) apresentou a melhor atividade antiproliferativa, com um  $GI_{50} = 29,1 \mu M^{97}$ .

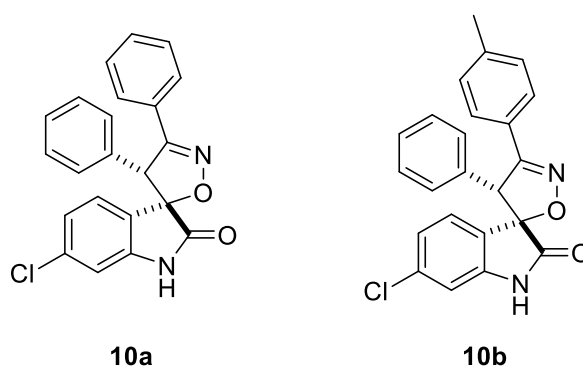


Figura 14 - Estruturas dos derivados spiroisoxazolona oxindóis **10a e 10b**.

Após este estudo, alterou-se o oxigênio no anel isoxazolona para um grupo *N*-fenil, obtendo-se um novo grupo de spiropirazolinona oxindóis que foi avaliado para verificação de efeitos biológicos em células de carcinoma do cólon humano. Dos 23 compostos avaliados, dois (Fig. 15) induzem morte celular após incubação de células HCT-116 p53<sup>(+/+)</sup> com os compostos à concentração de  $IC_{50}$  por 72h e paragem do ciclo celular após 24 h (fase G0/G1). É de notar que

nenhum dos dois tem seletividade para células HCT-116 p53<sup>(+/+)</sup> em relação a HCT-116 p53<sup>(-/-)</sup> (para **11a**, IC<sub>50</sub>=14,2±0,8 µM, e para **11b**, IC<sub>50</sub>=11,6±0,8 µM). O composto **11a** foi ainda testado em ensaios de sinergismo com 5-fluoracilo e concluiu-se que, para que houvesse efeito de sinergismo, a concentração de **11a** tinha de estar abaixo da de IC<sub>50</sub> (13,0 µM)<sup>98</sup>.

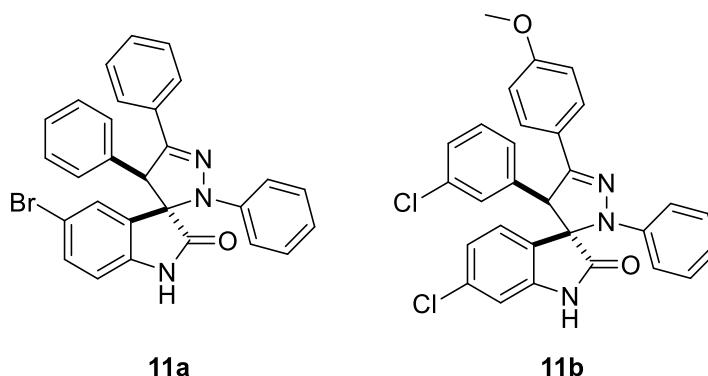


Figura 15 - Estruturas químicas dos derivados spiroirazolinone oxindóis **11a** e **11b**.

Em 2019 o grupo desenhou uma outra série de compostos spiroirazolinone oxindóis para avaliação da sua atividade antiproliferativa em células de glioblastoma. Entre os compostos desenhados, o **12a** (Fig. 16) mostrou seletividade para linhas de células de cancro do cólon que expressam p53 selvagem. O composto foi ainda avaliado em linhas de células de glioblastoma de rato GL-261. Verificou-se que a exposição a concentrações de 25 µM por 24 horas não provocava efeitos tóxicos. Estudou-se, então, a possibilidade de o **12a** interferir com a diferenciação de células de glioma. A análise *Western blot* mostrou que, a concentrações de 25 µM por 24 horas, o tratamento com o composto diminuía os níveis de proteína Sox2 (fator de transcrição de células do cordão umbilical embrionárias) em cerca de 40%, indicando que esta proteína pode ser um alvo do composto em células tumorais neurais. É de notar que o composto **12b** também se destacou por ter elevada seletividade para a inibição da interação p53-MDM2 comparativamente aos seus análogos, com uma diferença de quase 2 vezes em células de carcinoma entre HCT116 p53<sup>(+/+)</sup> e HCT116 p53<sup>(-/-)</sup> (para concentração 12,5 µM, valores 0,1 e 0,79 vezes superiores, respetivamente). A substituição com um halogéneo (no caso, um átomo de bromo) na posição

para do substituinte na posição 4' aumenta a seletividade para a p53, pois mimetiza melhor o sítio de ligação do trp23, e também leva a maior citotoxicidade do composto<sup>99</sup>.

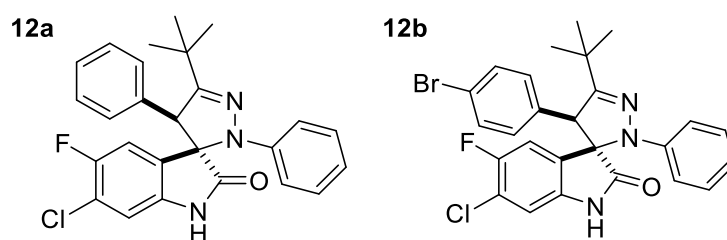


Figura 16 - Estrutura químicas dos derivados spiroirazolina oxindóis **12a** e **12b**.

### 1.3.2. Ligandos de G-quadruplexos ativadores da expressão da p53

Há diferentes tipos de esqueletos de ligandos de G4s já estudados<sup>44,100</sup>. Aqui, abordam-se apenas alguns exemplos de compostos indólicos utilizados como ligandos de G4s e que demonstraram capacidade de reduzir a expressão dos oncogenes *c-MYC* ou *KRAS*.

#### a) Derivados de dihidro-indolizidino indole

Colocou-se em estudo um conjunto de derivados de dihidro-indolizidino indole, verificando-se primeiro as suas afinidades e seletividades de ligação a G4s de ADN humano. O composto **13** (Fig. 17) mostrou a maior seletividade em ensaios de calorimetria, com uma seletividade 3 vezes superior para estruturas G4 em comparação com ADN de cadeia dupla (ADN-ds). Tendo-se confirmado que o composto atuava como ligando estabilizador de G4s, verificou-se se tinha preferência para G4s presentes na região promotora do *c-MYC*. De facto, o composto era capaz de inibir a proliferação de células cancerígenas com IC<sub>50</sub> 4 µM e de reduzir a expressão de *c-MYC* em 50% em ensaios com células de melanoma com concomitante indução de apoptose<sup>101</sup>.

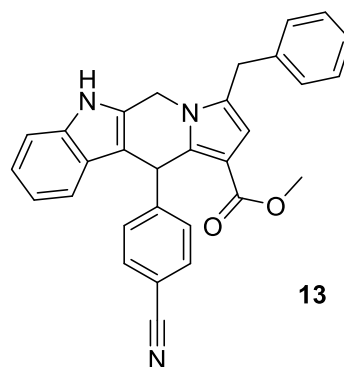


Figura 17 - Estrutura do derivado dihidro-indolizidino indole **13**.

## b) Derivados de carbazóis

Os derivados de carbazóis começaram a ser alvo de estudo, uma vez que, em vários casos, demonstraram atuar como ligandos de G4s de *c-MYC*. É o caso do composto **14** (Fig. 18), um derivado de triazolilcarbazole que, entre a biblioteca estudada de diferentes derivados, não só foi identificado como bom estabilizador do G4 do promotor, mas também mostrou atividade antiproliferativa em diversas linhas celulares cancerígenas, com  $IC_{50}$  4-8  $\mu$ M. Porém, o mesmo não se verificou em células não-malignas de mioblasto de rato C2C12, mesmo com concentrações até 45  $\mu$ M, significando que o composto é pouco tóxico para células saudáveis. Por outro lado, conseguiu induzir uma redução de ARNm e de proteína *c-MYC* em células de carcinoma do fígado HepG2 (redução dependente da dose de composto administrada) e ainda induzir a paragem do ciclo celular em fase G1 e consequente apoptose<sup>102</sup>.

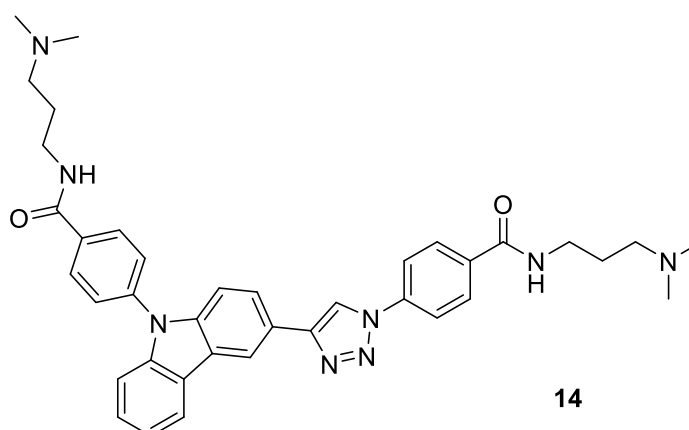


Figura 18 – Estrutura química do derivado de carbazole **14**.

O IZCZ-3 (**15**) (Fig. 19) resulta de uma série de otimizações de um esqueleto estrutural imidazole triaril-substituído desenvolvido por um grupo de investigação chinês. Este grupo de moléculas tem capacidade para se ligar a G4s paralelos e G4s teloméricos multiméricos.



ensaios para o estudo mais extensivo do IZCZ-3, para verificação de especificidade, efeitos na proliferação celular, atividade anticancerígena, entre outros.<sup>106</sup>

Fizeram-se vários ensaios *in vitro* e em células, para avaliar não só a capacidade do composto para estabilizar os G4 na região promotora do *c-MYC*, mas também a capacidade de inibição de proliferação de células cancerígenas e dos efeitos sobre a expressão da proteína *c-MYC* e indução da apoptose. Além de estabilizar seletivamente o G4 do *c-MYC*, este composto mostrou inibir a proliferação celular em várias linhas de células de cancro (SiHa, HeLa, Huh7 e A375 com sobre-expressão de *c-MYC*), com IC<sub>50</sub> entre 2,1 e 4,2 µM. Mais ainda, este composto induz a paragem do ciclo celular nas fase G0/G1, provocando a apoptose de células cancerígenas, e regula negativamente a transcrição de *c-MYC*<sup>106</sup>.

#### c) Derivados de indoloquinolinas

Um grupo de investigadores chineses construiu uma biblioteca de derivados de quindolinas, as indolo[3,2-*b*]quinolinas, uma vez que havia a possibilidade de atuarem como ligandos de G4s presentes em telómeros e região promotora de *c-MYC*.

Realizaram-se ensaios em dois tipos de linhas de células de linfoma de Burkitt (Ramos e CA46) para avaliar o efeito do composto SYUIQ-05 (**16a**) (Fig. 20) no G4 do promotor e na expressão de *c-MYC*. As linhas Ramos retêm a sequência formadora de G4 na região NHE III<sub>1</sub> do promotor após mutação por translocação, enquanto as linhas CA46 perdem este elemento no promotor, não podendo formar a estrutura G4. Verificou-se que, a 10-12,5 µM após 24 horas, o composto conseguia reprimir a transcrição de *c-MYC* em 25% nas linhas Ramos, mas o mesmo não se observava em linhas de células CA46, indicando que a regulação negativa poderia ser devida à interação com o G4 do promotor do *c-MYC*<sup>107</sup>. A partir deste composto, procedeu-se à otimização da estrutura resultando em, pelo menos, mais três estruturas relevantes: **16b**, **16c** e **16d** (Fig. 20).

O **16b** conseguiu, em linhas de células Ramos após 48 horas de exposição a 0,1 µM, inibir a transcrição e expressão do *c-MYC* em 25% mas, uma vez mais, não surtiu o mesmo efeito em células CA46, o que foi atribuído ao facto de o composto conseguir interferir com a ligação da proteína NM23-H2 (proteína com atividade de helicase, que permite a transcrição do gene) ao G4 de *c-MYC*<sup>108</sup>. O **16c** mostrou seletividade 4 a 5 vezes superior para todas

as estruturas G4 testadas comparativamente a ADN-ds. Em ensaios com linhas celulares de cancro colorretal HCT116, a 23  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ ) o composto conseguiu reduzir a expressão do *c-MYC*, *hTERT*, *PDGFR $\beta$*  e *VEGF A* após 24 horas de incubação, mas não a expressão de *HIF1- $\alpha$* . Já o **16d** mostrou boa afinidade a estruturas G4 paralelas de *HIF1- $\alpha$* , mas afinidade muito menor a estruturas G4 de *c-MYC*, ou outras mais complexas. A 31  $\mu\text{M}$ , no mesmo tipo de linhas celulares anterior, o **16d** conseguiu reduzir a expressão de *c-MYC*, *hTERT* e *PDGFR $\beta$*  após exposição por 6 horas, mas os efeitos observados foram revertidos totalmente ao fim de 24 horas.

Apesar de se verificar um efeito de repressão da expressão do *c-MYC*, uma análise aprofundada dos efeitos dos compostos em linhas CA46 acabou por contrariar a teoria de que o mecanismo de ação envolvia o G4 do NHE III<sub>1</sub> do *c-MYC*. Verificou-se que os compostos não tinham seletividade, podendo influenciar a expressão de outros genes, levando à conclusão de que a atividade anti-cancerígena observada pode ser resultado de uma combinação de efeitos em diferentes genes nas linhas celulares de linfoma e cancro do colón e não do facto de o alvo do ligando ser o G4 no promotor do *c-MYC*<sup>109</sup>.

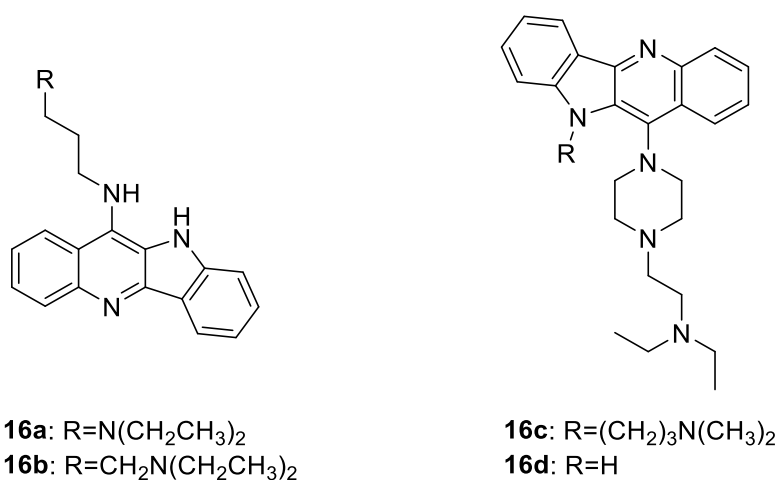


Figura 20 - Estrutura químicas dos derivados de indolo[3,2-*b*]quinolinas SYUIQ-05 (**16a**), **16b**, **16c** e **16d**.

O grupo da Doutora Alexandra Paulo, da FFUL, tem-se dedicado também à investigação de análogos de indolo[3,2-*b*]quinolinas. Em 2011, sintetizou-se uma série de derivados N-5-metilados com diferentes cadeias em C-11<sup>110</sup>, tendo em conta que estudos anteriores demonstraram que este tipo de derivados, com uma cadeia na posição C-11, se ligam preferencialmente a G4 de ADN em vez de estruturas duplex e que a exposição prolongada de

células cancerígenas HL-60 ao análogo 7-fluoreto leva a senescência celular e a um encurtamento do telômero, sugerindo que estes poderiam ser compostos anti-cancerígenos seletivos<sup>111</sup>.

Selecionaram-se 3 compostos: NSC748392 (**17a**), NSC748393 (**17b**) e NSC748394 (**17c**) (Fig. 21), pois tinham um bom perfil de atividade anticancerígena *in vitro*, num painel de 60 linhas celulares. Analisando a capacidade de estabilização de G4s dos compostos através de ensaios de fusão por *fluorescence resonance energy transfer* (FRET), verificou-se que os resultados para os dois primeiros foram positivos, atribuindo-se isso à presença de cadeias laterais com aminas alifáticas, e que, por outro lado, o terceiro composto tinha uma capacidade de estabilização bastante reduzida ( $\Delta T_m=4^\circ\text{C}$ ), devendo este resultado ser consequência da diminuição da basicidade da cadeia lateral em C-11. Também se descobriu que, embora a capacidade de estabilização dos compostos **17a** e **17b** tenha sido considerada potente, estes não são seletivos para estruturas G-quadruplexo e que a aromaticidade das cadeias laterais na posição C-11, embora aumente a seletividade dos compostos, leva a diminuição da afinidade de ligação. Por outro lado, há correlação da afinidade de ligação com a basicidade das aminas nas cadeias laterais<sup>110</sup>.

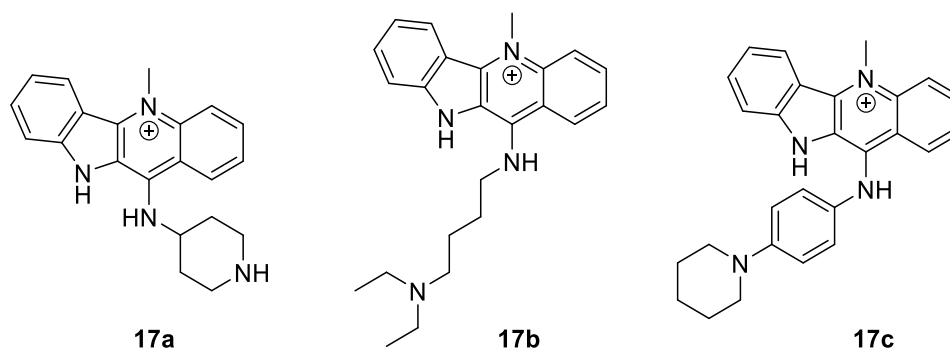


Figura 21 - Estruturas químicas dos derivados de indolo[3,2-*b*]quinolinas NSC748392 (**17a**), NSC748393 (**17b**) e NSC748394 (**17c**).

Seguindo estas descobertas, decidiu-se estudar uma variedade de cadeias laterais para a estrutura indolo[3,2-*b*]quinolina<sup>112</sup>, uma vez que se percebeu que uma série de características químicas, como a presença de grupos eletroatratores, a basicidade e aromaticidade das cadeias laterais, influenciavam a seletividade e afinidade de ligação dos compostos a estruturas G4. Mais ainda, aumentou-se o número de cadeias laterais para 2 e 3 (nas posições 7 e 10 para além da 5 ou 11), verificando-se, à semelhança de estudos anteriores<sup>109,111,113,114</sup>, que isto aumenta a afinidade de ligação a estruturas G4 teloméricas ou de promotores (*KRAS*, *HSP90* e *c-KIT*).



A análise dos resultados dos ensaios de fusão por FRET e estudos de modelação molecular permitiram retirar dados sobre relações estrutura-atividade. O comprimento ideal para uma cadeia lateral na estrutura indolo[3,2-*b*]quinolina será o de uma cadeia propilo, facto corroborado por valores mais baixos de  $\Delta G^\circ$  no estudo de modelação molecular. A introdução de um substituinte arilo não afeta a capacidade de estabilização de G4 dos compostos: os valores de  $\Delta T_m$  são semelhantes aos do composto não-substituído.<sup>112</sup>

A posição relativa das cadeias substituintes também mostrou ter efeito sobre a estabilização térmica de G4s: compostos disubstituídos nas posições N-10 e O-11 são estabilizadores fracos e piores que os compostos disubstituídos nas posições N-5 e N-10 (Fig. 22, **18** e **19**). Adicionalmente, com a introdução de uma terceira cadeia lateral na posição 7 (Fig. 23, **20a** e **21a**), o estabelecimento de interações adicionais (pontes de hidrogénio e interações eletrostáticas) reforça a estabilização do complexo<sup>112</sup>.

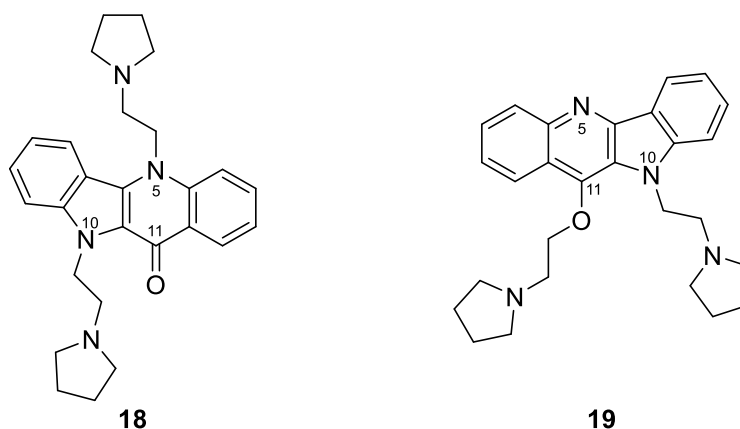


Figura 22 – Estruturas químicas das indolo[3,2-*b*]quinolinas disubstituídas **18** e **19**.

Os compostos com um grupo 7-(aminoalquil)carboxilato adicional mostraram melhores valores de  $\Delta T_m$  (valores entre 17°C e 8°C), com uma seletividade para estruturas de ADN G4 cerca de 10 vezes superior comparativamente a estruturas ADN-ds. Além disto, também mostraram seletividade 100 vezes superior para linhas de células de cancro HCT116 ( $IC_{50}$  e  $IC_{90}$  < 10  $\mu$ M) relativamente a hepatócitos primários de rato, reduzindo a expressão de Hsp90 e *KRAS* naquele tipo de células.

Procurando expandir a série de indolo[3,2-*b*]quinolinas que pudessem ter atividade enquanto reguladores negativos do oncogene *KRAS* por ligação a G4s, desenhou-se uma nova série de compostos, 7-(aminoalquil)carboxilato indolo[3,2-*b*]quinolinas, com variadas cadeias laterais alquil-diaminas<sup>115</sup>.

Nas estruturas sintetizadas neste estudo, cujas cadeias laterais são alquilaminas (IQ3A), verificou-se a capacidade de estabilização de G4s presentes no promotor do *KRAS*, tendo o **20a** e **21a** (Fig. 23), apresentado valores de  $\Delta T_m$  entre 11°C e 20°C a concentrações de 2  $\mu\text{M}$  de ligando. Note-se que as estruturas **20d** e **21d** são melhores estabilizadoras de estruturas G4 do que as duas anteriormente referidas, com valores de  $\Delta T_m$  entre 15°C e 25°C.

Escolheram-se os compostos **20a**, **20d** e **21a** para investigar a atividade em células, tendo-se verificado o crescimento celular após 72h de incubação em diferentes linhas celulares de carcinoma colorretal expressando diferentes tipos de *KRAS* e TP53: a linha HCT116 (*KRAS* mutado e p53 selvagem) e a linha metastática SW620 (*KRAS* mutado e p53 mutado). Paralelamente, usaram-se também linhas celulares normais de rim embrionário humano, HEK293T (*KRAS* e p53 selvagens) e de fibroblasto do cólon CCD18co (*KRAS* e p53 selvagens).

A atividade anti-proliferativa dos compostos **20a** e **20d** é superior à do composto **21a** ( $IC_{50} < 2,69 \mu\text{M}$ ) e à da referência, 5-fluoracilo (5-FU), particularmente em células de cancro metastático colorretal humano SW620, em que o composto **20d** apresenta  $IC_{50} = 0,28 \mu\text{M}$ , quase 20 vezes menor que o do 5-FU ( $IC_{50} = 5,39 \mu\text{M}$ ). No entanto, notou-se que os compostos eram pouco seletivos para as células cancerígenas.

Para avaliar a capacidade de indução de morte celular, realizaram-se ensaios *Guava ViaCount* (que verificam a viabilidade das células) em linhas celulares de cancro (HCT116 e SW620) e normais (HEK293T e CCD18co), comparando-se ao 5-FU e TMPyP4 (ligando de G4 de referência). Em células HCT116, os compostos IQ3A mostraram um efeito apoptótico mais significativo, causando 30 a 70% de morte celular em concentrações entre 0,58 e 3,42  $\mu\text{M}$  ( $IC_{65}$ , **20d** < **20a** < **21a**). Por outro lado, nenhum dos compostos induziu morte celular nas linhas celulares HEK293T e CCD18co, indicando que não são tóxicos em células normais.

Em análise *Western blot* (identificação de proteínas alvo), avaliaram-se os níveis de p53 quando expostos aos compostos IQ3A. Em linhas celulares HCT116, verificou-se um aumento de 4 a 7 vezes dos níveis de p53, podendo isto estar relacionado com os resultados observados nos ensaios *Guava ViaCount*.

Por fim, avaliou-se a capacidade dos IQ3As de reduzir a expressão de *KRAS* através da quantificação dos níveis da proteína em linhas celulares.

Os compostos **20d** e **21a** reduziram a expressão de *KRAS* em 35-60% em linhas cancerígenas HCT116 e SW620. Também se verificou que os compostos **20a**, **20d** e **21a** regulam negativamente a transcrição do *KRAS* em cerca de 40% em linhas celulares HCT116, sendo esta regulação menos significativa em linhas SW620.

Em conclusão, foi possível observar que os compostos reduziram a expressão de RNA mensageiro de *KRAS* e, portanto, os níveis de expressão da proteína em células de cancro do cólon, possivelmente por repressão da transcrição do *KRAS*. Com este efeito de repressão, notou-se, igualmente, o aumento dos níveis da p53 em células HCT116.<sup>115</sup>

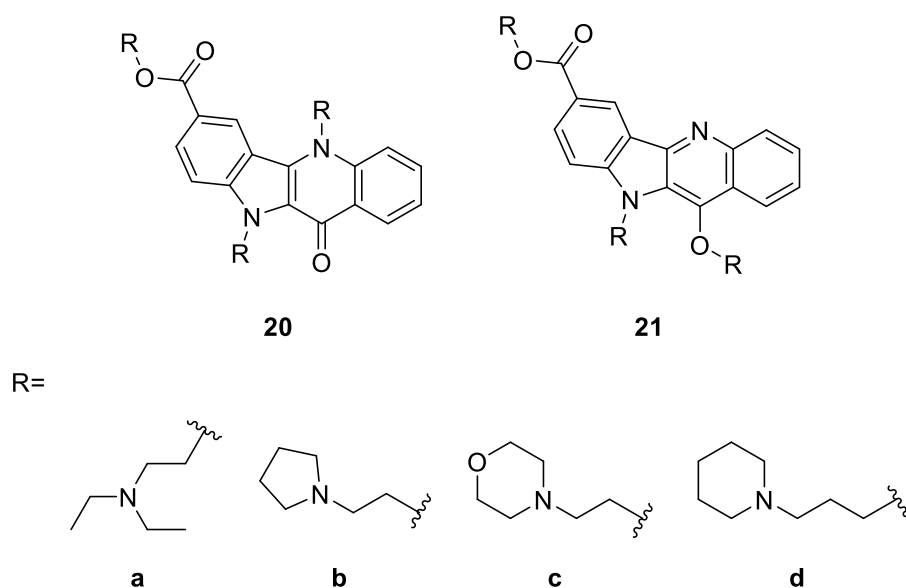


Figura 23 – Estruturas químicas dos derivados de indoloquinolinas trialquilamina **20** e **21**.

As indolo[3,2-c]quinolinas **22a** e **22b** (Fig. 24), desenhadas pelo mesmo grupo, mostraram estabilização potente de estruturas G4 de sequências de telómero, com valores de  $\Delta T_m$  de, aproximadamente, 30°C e com resultados de estudos espectroscópicos a revelarem que estes compostos estabilizam G4s antiparalelos de telómero e formam um complexo com dois ligandos por unidade de G4 (Fig. 25)<sup>116</sup>.

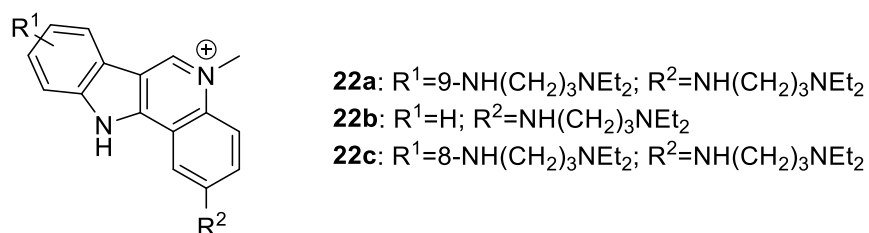


Figura 24 – Estruturas químicas das indolo[3,2-c]quinolinas dissubstituídas **22a-c**.

Verificou-se que os compostos **22a** e **22c** inibem seletivamente a proliferação de linhas de células com *KRAS* mutado ( $IC_{50}$  entre 0,22 e 4,80  $\mu$ M). Em ensaios de luciferase, verificou-se que havia regulação negativa da atividade do promotor do *KRAS* e redução dos níveis de RNA mensageiro em linhas de células de cancro do cólon com *KRAS* mutado. Mais ainda, estes compostos induzem morte celular por via de apoptose com, consequente aumento dos níveis de p53<sup>117</sup>.

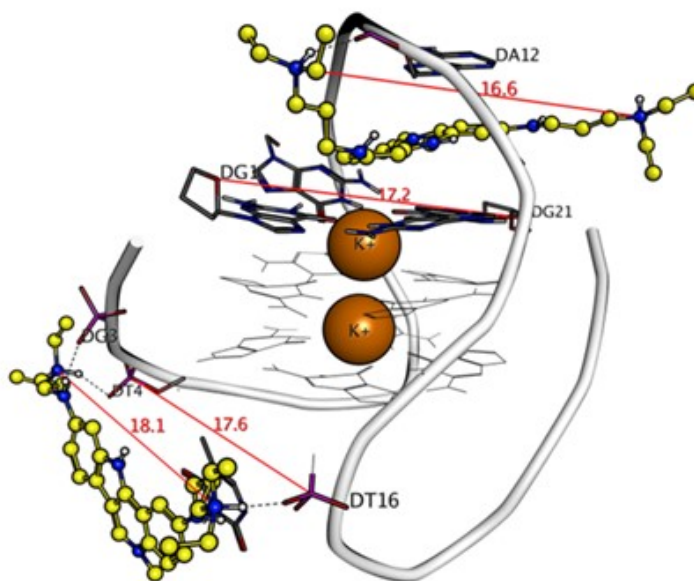


Figura 25 - Modelo molecular de um complexo 2:1 de uma indolo[3,2-c]quinolina com um G4 antiparalelo telomérico humano (PDB ID: 143D)<sup>116</sup>.

#### 1.4. Terapia combinatória para o cancro

Entre as inúmeras alternativas que se tentam criar para o tratamento do cancro, as terapias combinatórias têm ganho alguma popularidade. Este tipo de tratamento pode ter algumas vantagens:

- levar a efeitos sinérgicos anticancerígenos (quando o benefício terapêutico dos fármacos em combinação for maior do que a soma dos efeitos dos mesmos fármacos utilizados em separado);
- evitar resistência das células cancerígenas a fármacos (um problema recorrente na utilização de fármacos quimioterápicos convencionais)<sup>118</sup>;
- reduzir eventuais efeitos de toxicidade, causados não só pelo uso prolongado, mas também pela necessidade de doses mais elevadas devido à acessibilidade limitada do fármaco aos tecidos tumorais e, consequentemente, a seletividade reduzida e efeitos citotóxicos<sup>119</sup>.

Geralmente, as terapias combinatórias consistem na administração simultânea de dois ou mais tipos de terapias ou agentes terapêuticos, tais como imunoterapia, radioterapia, quimioterapia ou terapia hormonal, sendo a opção mais comum o uso de vários agentes quimioterápicos. Isto permite que potenciais efeitos secundários, consequências do uso de doses muito elevadas de um fármaco de cada vez, possam ser reduzidos, já que por se ativarem diferentes vias de ação simultaneamente, as doses necessárias de cada agente são menores<sup>120</sup>. Além disto, fármacos com a mesma via celular podem funcionar com efeito sinérgico, permitindo maior eficácia da terapia e maior seletividade.

Alguns compostos ativadores da p53 são já utilizados em terapias combinatórias, principalmente com outros fármacos quimioterápicos convencionais. Por exemplo, o composto MI-77301 (ver secção 1.3.1., alínea c)) foi incluído num ensaio da Sanofi em colaboração com a Merck, em que era administrado conjuntamente com pimasertib (um fármaco inibidor das MEK) em voluntários com tumores locais avançados ou metastáticos. O relatório publicado indica que se verificaram benefícios clínicos com as doses administradas inicialmente, havendo atividade antitumoral preliminar. Porém, registaram-se depois efeitos secundários e de toxicidade dos compostos, como náuseas, diarreia e vômitos, o que levou à redução das doses ou interrupção total do tratamento. O perfil de segurança dos dois compostos individualmente é consistente com o perfil de segurança dos compostos conjuntamente, mas chegou-se à conclusão de que a dose máxima tolerada que, teoricamente, poderia ser usada de cada um, não corresponde à dose que era efetivamente tolerada quando os compostos foram administrados em conjunto. Isto significa que, para obter os resultados terapêuticos pretendidos e evitar efeitos da potencial toxicidade dos compostos, é necessário diminuir as doses administradas de cada composto, quando estes são administrados em conjunto<sup>121</sup>.



## **2. Objetivos do trabalho**

O grande aumento de casos de cancro, bem como o aparecimento de resistências aos anticancerígenos em uso clínico, requer abordagens inovadoras aplicadas ao desenho de novos anticancerígenos. O recurso à terapia combinatória pode ser uma estratégia vantajosa, conforme referido na secção 1.4.

O principal objetivo deste projeto é explorar a hipótese de ativação da p53 em células cancerígenas recorrendo a uma estratégia de combinação de dois potenciais fármacos: um inibidor da interação p53-MDM2 e um ligando de estruturas G4 de ADN, ativador da expressão da p53.

Assim, para este trabalho de Mestrado foram estabelecidos os seguintes objetivos:

- a) Síntese e caracterização espectroscópica de derivados de spirooxindóis.

Foram selecionados os derivados de spirooxindóis **11b** (Fig. 15), cujo  $IC_{50}$  está abaixo do valor a que se verificaria efeito de sinergismo, tendo em conta os resultados obtidos nos ensaios do composto **11a**, de forma a verificar se o valor de  $IC_{50}$  do composto é um fator crucial para que ocorra efeito de sinergismo (ver secção 1.3.1, alínea b))<sup>98</sup>; e o **12b** (Fig. 16), que foi selecionado pela elevada seletividade apresentada, uma vez que em ensaios de sinergismo futuros se poderá verificar se o efeito é dependente das vias específicas de ativação da p53 ou não (ver secção 1.3.1, alínea b))<sup>99</sup>.

- b) Síntese e caracterização espectroscópica de indolo[3,2-*b*]quinolinas.

Foram selecionados os compostos **20a** e **21a** (Fig. 23) com conhecida capacidade de estabilizar os G4 presentes nos promotores do oncogene *KRAS* e atividade indutora da expressão da p53 em células HCT116, conforme descrito na secção 1.3.2., alínea c))<sup>115</sup>. Pretende-se ainda explorar pequenas modificações ao método de síntese conhecido.

- c) Síntese e caracterização espectroscópica de indolo[3,2-*c*]isoquinolinas.

Foram desenhados os compostos indolo[3,2-*c*]isoquinolinicos presentes na Figura 26, como potenciais novos ligandos de G4 de ADN e consequentemente ativadores da expressão da p53.

Anteriormente, já se tinha descoberto que derivados com cadeias laterais alquilamina são bons ligandos de G4, estando a basicidade destas cadeias diretamente relacionada com a estabilização térmica de G4s de ADN. Aminas aromáticas também melhoravam a ligação a G4s e a estabilização do complexo, embora este facto não seja explicado apenas pelo pKa da amina, mas por o anel aromático permitir interações  $\pi$ - $\pi$ <sup>112,115</sup>.

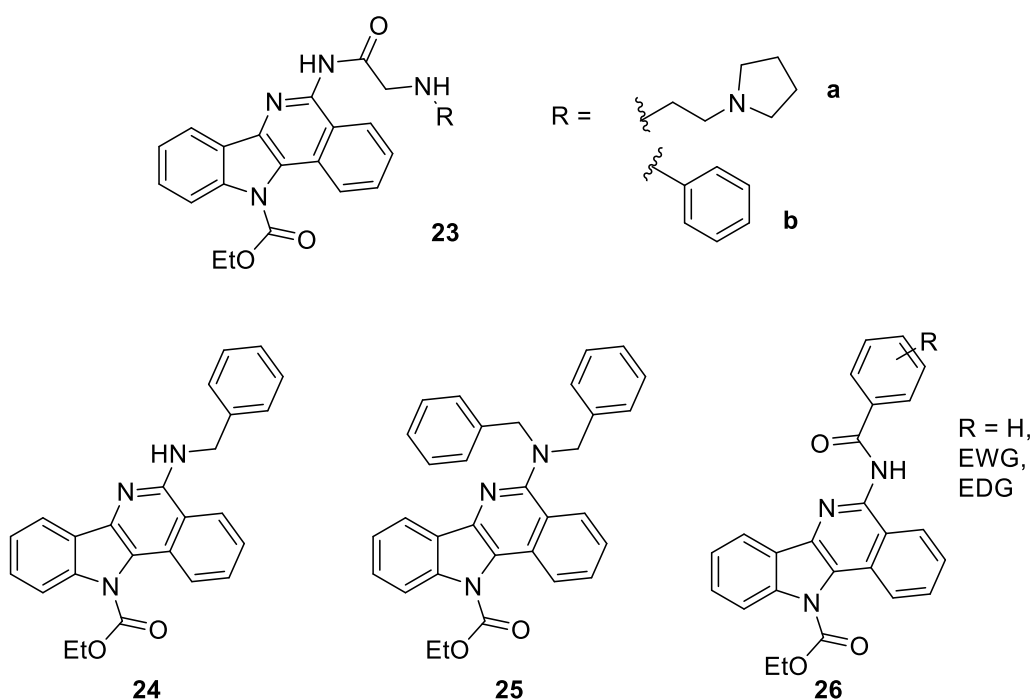


Figura 26 - Estruturas químicas das indolo[3,2-c]isoquinolinas **23a** e **23b**, **24**, **25** e **26**.

d) Determinação da capacidade de interação com G-quadruplexos de ADN.

As indolo[3,2-b]quinolinas e indolo[3,2-c]isoquinolinas sintetizadas serão avaliadas por ensaios de fusão por FRET.

O efeito antiproliferativo dos compostos sintetizados, isoladamente ou em combinação, será estudado em linhas cancerígenas e numa linha normal no âmbito do projeto PTDC/QUI-QOR/29664/2017.



### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Síntese de spirooxindóis

O composto **11b** foi obtido segundo o processo sintético descrito na literatura, por reação entre a 6-cloro-3-(3-clorobenzilideno)indolin-2-ona (**27**) e o cloreto de 4-metoxi-*N*-fenilbenzohidrazonilo (**29**)(Fig. 27)<sup>99</sup>. Da mesma forma, o composto **12b** foi obtido por reação entre a 3-(4-bromobenzilideno)-6-cloro-5-fluoroindolin-2-ona (**30**) e o cloreto de *N*-fenilpivalohidrazonilo (**32**)<sup>98</sup>.

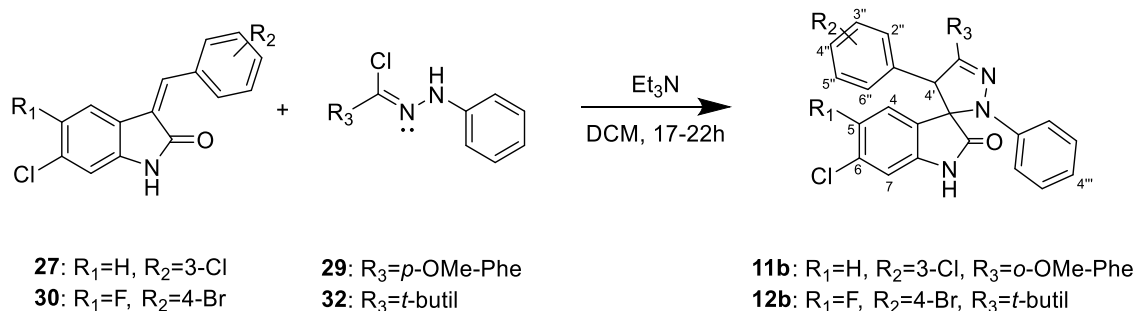


Figura 27 - Esquematização do processo sintético dos derivados de spirooxindóis **11b** e **12b**.

No processo de síntese das indolinonas **27** e **30** (Fig. 28), a piperidina abstrai um próton  $\alpha$ , levando à formação de um enolato. A carga negativa formada permite a reação de adição ao carbonilo do benzaldeído utilizado. A piperidina abstrai o segundo próton  $\alpha$ , permitindo a formação da ligação dupla no carbono C-4'. Uma vez que a reação é feita em aquecimento e sistema de refluxo, isto permite a remoção da água, resultando a indolinona pretendida.

A indolinona **27** foi obtida por condensação do 6-cloro-oxindole com o 3-clorobenzaldeído, na presença de piperidina, em sistema de refluxo, tendo-se obtido um rendimento de 37%. A indolinona **30** foi obtida por condensação da 6-cloro-5-fluoroindolin-2-ona com o 4-bromobenzaldeído, à semelhança do procedimento utilizado para a indolinona **27**, tendo sido obtido um rendimento de 31%.

Comparando os rendimentos obtidos com os reportados na literatura (superiores a 80%) observa-se que estes foram reduzidos<sup>122</sup>. Isto dever-se-á ao facto de a temperatura de refluxo do etanol não ter sido atingida, um fator essencial para o passo de saída do grupo hidroxilo.

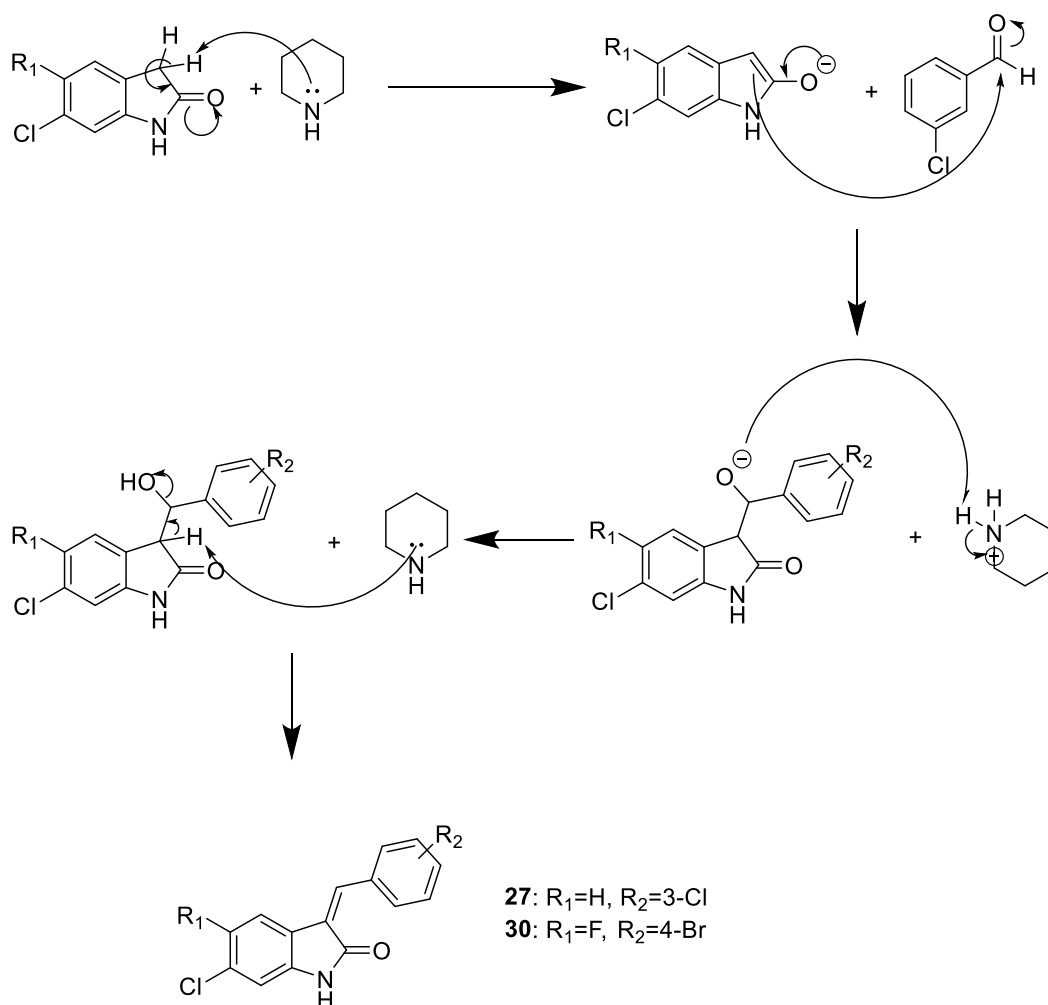


Figura 28 - Esquemática do mecanismo sintético das indolinonas **27** e **30** (isômeros Z).

Para obter o cloreto de hidrazonilo **29**, é necessário sintetizar primeiro a hidrazona **28**, que foi obtida através de uma reação de adição nucleofílica entre a fenilhidrazina e o *p*-metoxibenzaldeído, no escuro, pois a luz pode induzir a clivagem da hidrazona, dando origem a radicais no grupo metoxi. Esta reação resultou num rendimento de 88%, considerado aceitável, e estando de acordo com o descrito na literatura para esta reação<sup>123</sup>. O cloreto de hidrazonilo foi sintetizado utilizando um complexo de *N*-clorosucinamida/Dimetilsulfureto (reagente de Corey-Kim, obtido por reação de uma solução de NCS e DMS a 0°C), havendo um ataque nucleofílico do par de elétrons livre do grupo NH da hidrazona **28** ao catião do complexo NCS/DMS, resultando um catião estável, devido ao azoto adjacente e que pode depois sofrer ataque por parte do ião Cl<sup>-</sup>, resultando o cloreto de hidrazonilo **29** (Fig. 29). Obtém-se maioritariamente o composto **29** pois a reação acontece a -78°C, abrandando o processo devido à baixa temperatura, não permitindo que outros rearranjos do segundo passo deste mecanismo aconteçam. Este composto foi obtido num rendimento de 87%, estando de acordo com a literatura<sup>124,125</sup>.

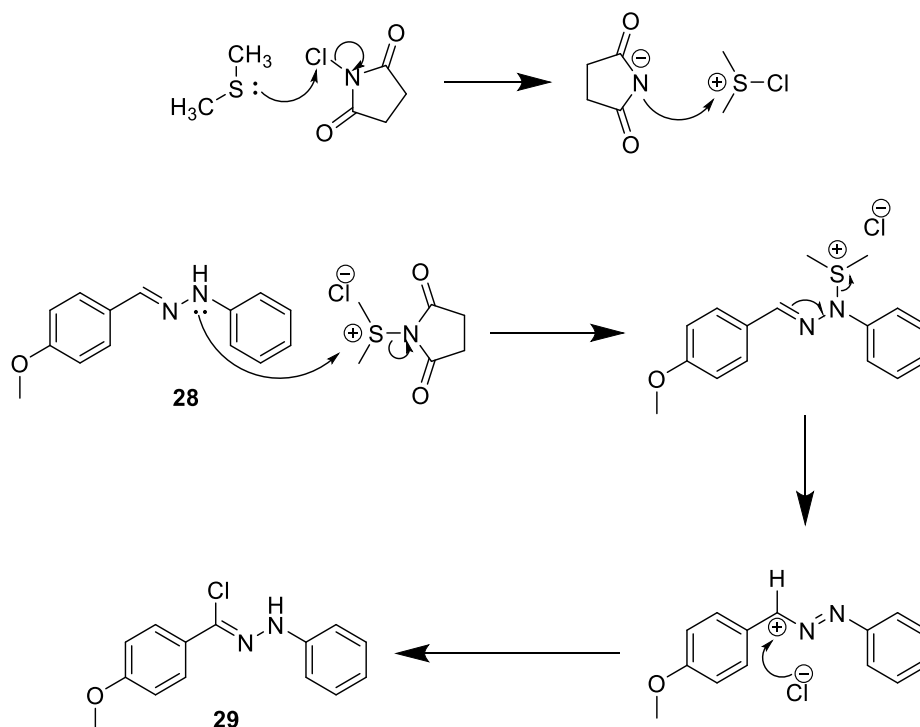


Figura 29 - Esquemática do mecanismo sintético do cloreto de hidrazonilo **29** a partir da hidrazona **28**.

Foi necessário sintetizar previamente a hidrazida para se obter o cloreto de hidrazonilo **32**. Nesta síntese, obtém-se a hidrazida **31** através de uma reação  $\text{S}_{\text{N}}2$  entre a fenilhidrazina e o cloreto de pivalóilo, num rendimento de 98%, estando de acordo com a literatura<sup>126</sup>. Já o cloreto de hidrazonilo foi sintetizado através de uma adaptação da reação de Appel, em que a hidrazida **31** reage com a trifenilfosfina e com o tetracloreto de carbono (Fig. 30). O cloreto de hidrazonilo **32** foi obtido num rendimento de 50%, significativamente inferior ao reportado, podendo a maioria das perdas dever-se ao processo de purificação<sup>127</sup>.

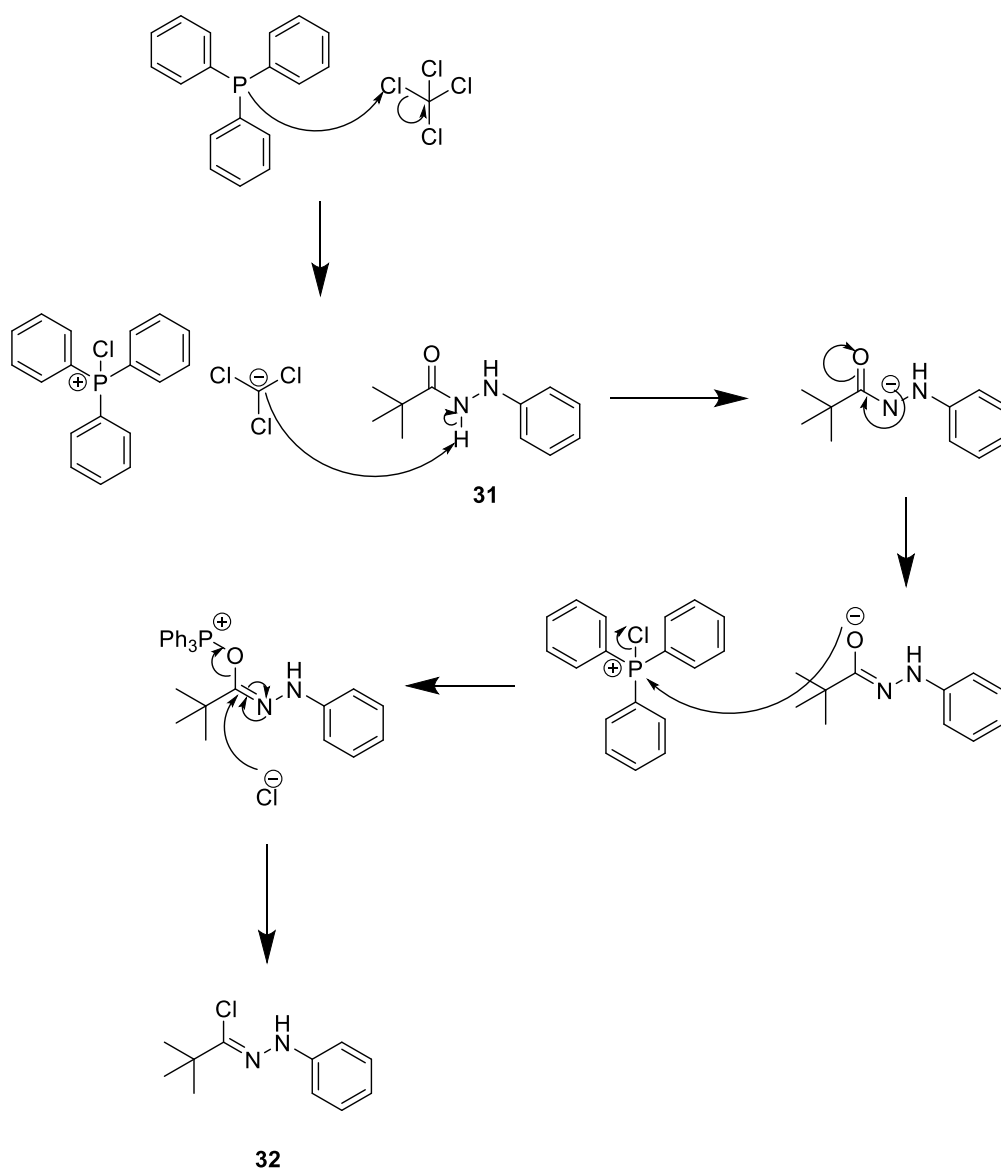


Figura 30 - Esquemática do mecanismo sintético do cloreto de hidrazonilo **32** a partir da hidrazida **31**.

Por fim, os compostos **11b** e **12b** foram sintetizados através de reação de cicloadição 1,3-dipolar, que ocorre entre moléculas dipolarófilas e dipolos 1,3, neste caso, entre as 2-indolinonas **27** e **30** e o dipolo formado *in situ* a partir dos cloretos de hidrazonilo **29** e **32**, devendo este ser um processo concertado (Fig. 32). Os composto foram obtidos em rendimentos de 72% e 48%, respetivamente, abaixo dos rendimentos reportados na literatura, possivelmente por perdas durante os processos de extração e de purificação<sup>93,98,99</sup>.

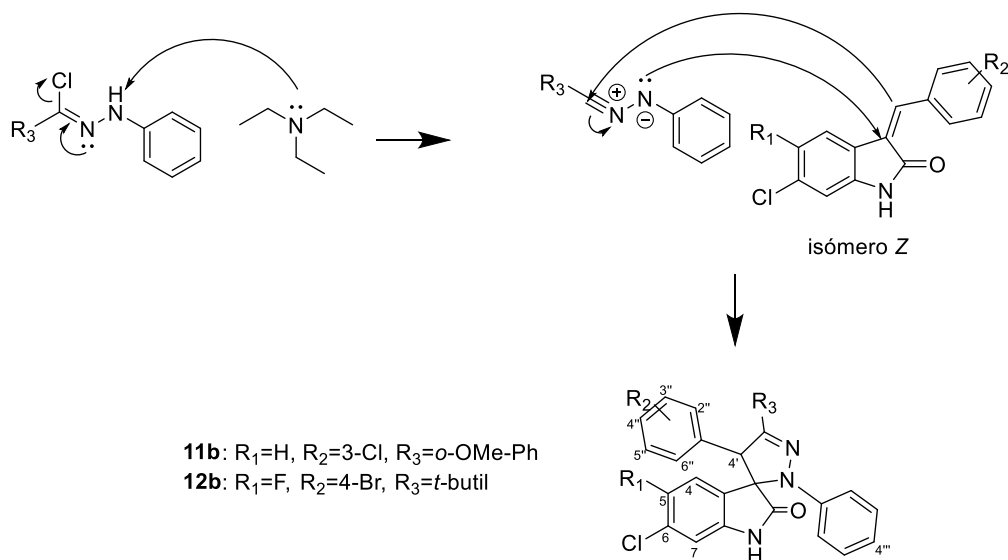


Figura 31 - Esquemática do mecanismo sintético dos compostos **11b** e **12b**.

Os produtos foram analisados por <sup>1</sup>H-RMN (Anexo I), calibrado com a referência interna do solvente.

No espectro do composto **11b**, o próton ligado ao átomo de azoto aparece como um singlete a 7,95 ppm. O singlete a 3,79 ppm, a integrar para 3, corresponde aos prótons do grupo metoxi e o singlete a 5,03 ppm corresponde ao próton H-4' do anel pirazolina. Os prótons aromáticos do grupo anisole aparecem como multipletos a 6,86-6,82 ppm, que integra para 4 prótons. Já o triplo a 7,12 ppm corresponde a três dos prótons aromáticos do *m*-clorobenzeno (H-4'', H-5'' e H-6''), sendo que o próton aromático restante nesse grupo (H-2'') corresponderá ao dupletos a 7,18 ppm. O dupletos de dupletos a 6,89 ppm integra para dois prótons, atribuindo-se a dois prótons aromáticos do grupo indole (H-4 e H-5). Estes dois prótons não são, porém, equivalentes e este sinal, segundo a literatura, deveria aparecer como um dupletos. O singlete a 6,98 ppm corresponde ao terceiro próton aromático do mesmo grupo, H-7.

No caso do espectro do composto **12b**, o próton N-H aparece como singlete a 9,69 ppm. O singlete a 1,16 ppm, que integra para 9 prótons, corresponde aos prótons do grupo *tert*-butilo e o singlete a 4,79 ppm ao próton H-4' do anel pirazolina. Já aos restantes prótons, associados a prótons aromáticos, não é possível fazer uma atribuição exata e inequívoca, uma vez que os sinais são largos, integrando, porém, para um total de 10 prótons. O dupletos a 6,18 ppm é o único próton aromático que se poderá atribuir, correspondendo ao próton H-4, já que poderá acoplar com o átomo de flúor em C-5, explicando a multiplicidade deste desvio químico.

As atribuições correspondem, assim, às anteriormente reportadas e, portanto, conclui-se que foram obtidos, com sucesso, os dois compostos pretendidos.

### 3.2. Síntese de indolo[3,2-b]quinolinas

A síntese dos compostos **20a** e **21a** é um processo de vários passos anteriormente descritos na literatura (Fig. 32)<sup>115</sup>.

Fizeram-se algumas alterações aos procedimentos para síntese dos intermediários **34** e **35**. Estas alterações permitem uma simplificação dos procedimentos, sem prejudicar o rendimento obtido, sendo relevantes para trabalhos futuros. Note-se que, por haver disponibilidade imediata do composto, não se realizou a síntese do intermediário **33**.

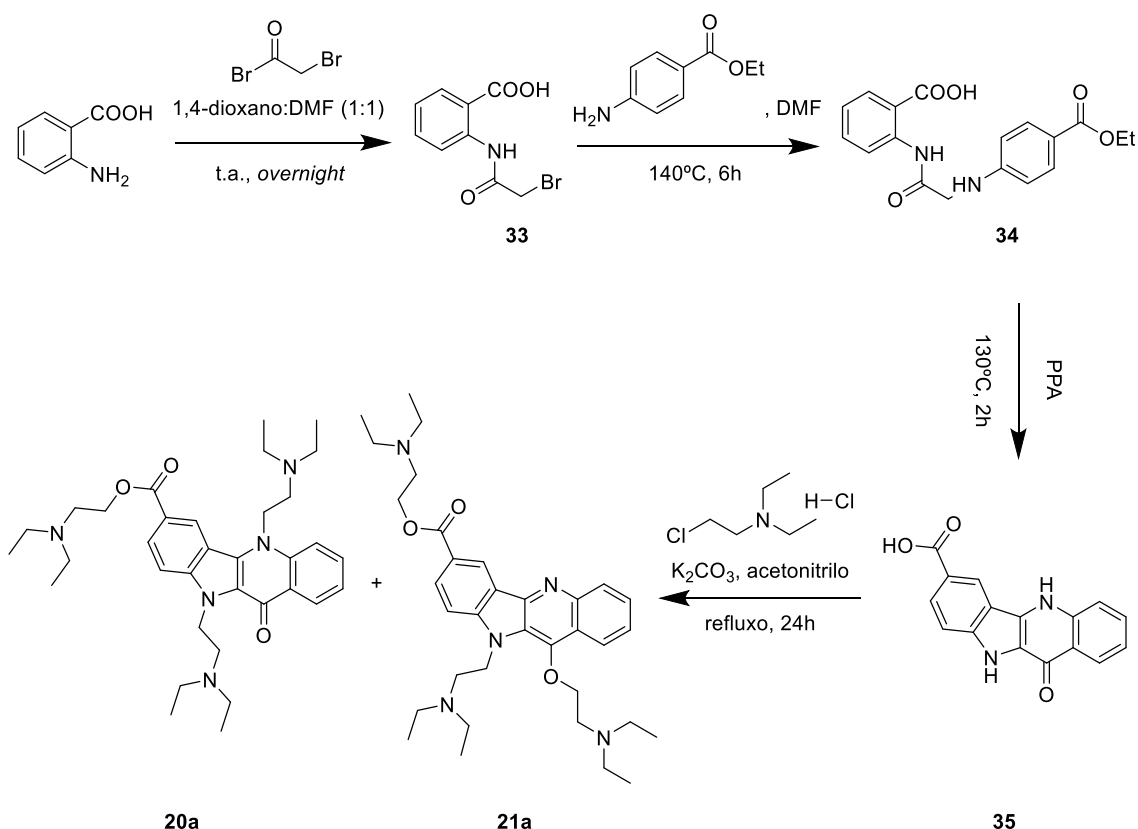


Figura 32 - Esquemática do processo sintético dos compostos **20a** e **21a**.

O intermediário **34** foi sintetizado por reação de substituição nucleofílica entre o grupo amina do 4-aminobenzoato de etilo e o carbono  $\alpha$  do intermediário **33**. Uma versão anterior do procedimento requeria que se colocasse a mistura reacional num micro-ondas a 300 W, a 140°C, por 4 horas. Neste trabalho, o micro-ondas foi substituído por um tubo de pressão, fazendo-se a reação à mesma temperatura, por 6 horas. A vantagem consiste na eliminação de um equipamento que pode não estar disponível num laboratório. O composto foi obtido num rendimento de 37%, inferior ao anteriormente obtido no nosso laboratório para este procedimento (60%)<sup>128</sup> ou ao obtido por recurso ao micro-ondas (62%)<sup>115</sup>. Uma vez que o isolamento do composto depende da

manipulação do valor de pH da mistura reacional para que haja precipitação do produto (em meio ácido), este processo pode ter levado a uma perda de rendimento.

A reação de síntese do composto **35** consiste na ciclização do intermediário **34**, catalisada por ácido polifosfórico em excesso (Fig. 33). O mecanismo é iniciado por um tautomerismo ceto-enólico do composto **34**, seguido de um ataque nucleofílico do carbono  $\alpha$  ao grupo carbonilo do ácido carboxílico, formando um anel de seis membros. Uma vez que um grupo carbonilo é mais estável do que o *gem*-diol formado, ocorre um processo de desidratação. De seguida, ocorre um ataque do carbono na posição *orto* da anilina ao carbonilo formado, induzido pelo par de elétrons livres do azoto, resultando na formação de um anel de cinco membros. Após segunda desidratação e hidrólise do grupo éster, obtém-se o composto **35**.<sup>129</sup>

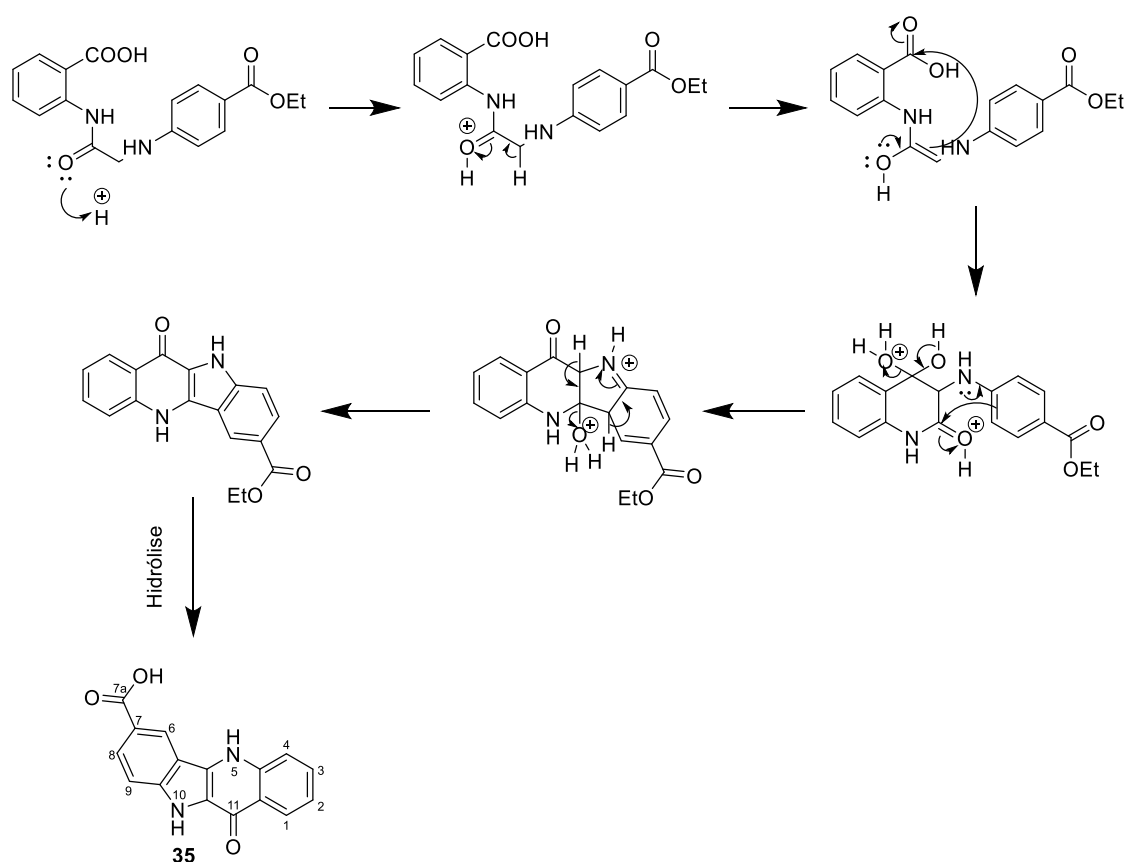


Figura 33 - Esquemática do mecanismo de formação do composto **35** a partir de **34**.

Para o intermediário **35**, alterou-se o procedimento de *work-up* publicado. Anteriormente, após arrefecimento da mistura reacional, alcalinizava-se a solução para pH 4 com uma solução saturada de KOH após adição de água e era feita uma extração líquido-líquido com acetato de etilo, recolhendo-se o produto na fase orgânica. Durante o procedimento, verificou-se que não seria possível realizar corretamente a extração líquido-líquido, pois verificou-se a formação de grande quantidade de precipitado

verde-escuro. Assim, recolheu-se esse precipitado e passou-se diretamente à sua filtração, lavando-o com água. De seguida, dissolveu-se o mesmo precipitado em metanol, deixando as impurezas insolúveis no filtro. Isto permitiu recolher uma solução do produto pretendido, evaporando-se o solvente em excesso e secando totalmente, obtendo-se um rendimento de 65%, uma melhoria considerável relativamente a valores anteriormente reportados de 20%.<sup>115</sup>

O procedimento de síntese dos produtos **20a** e **21a** foram seguidos como descritos anteriormente na literatura. Neste passo final, ocorre uma reação de substituição nucleofílica com a 2-cloro-(*N,N*-dietil)etilamina, sob refluxo e na presença de base ( $K_2CO_3$ ), que dá origem à formação dos dois produtos maioritários trissubstituídos, um com inserção das cadeias laterais nas posições N-5 e N-10 e com o ácido carboxílico a passar a éster (**20a**) e o segundo com a inserção da cadeia lateral na posição O-11 em vez de N-5 (**21a**)<sup>115</sup>. De acordo com a TLC analítica, deverão também ter-se formado produtos secundários minoritários di-substituídos e mono-substituídos, que não foram isolados.

Obtiveram-se os produtos **20a** e **21a** com um rendimento de 27% e 22% antes de purificação final e passagem a sal, resultados semelhantes aos reportados na literatura<sup>115</sup>. Os baixos rendimentos finais devem-se não só à formação de vários produtos secundários, mas também à dificuldade do processo de purificação, uma vez que para se poder fazer uso da técnica de TLC preparativa, as placas têm de ser de óxido de alumínio, pois a acidez da sílica não permite a eluição correta do composto e o óxido de alumínio para TLCs preparativas não tem indicador de fluorescência, dificultando a visualização correta das bandas a isolar.

Para verificar se o composto **20a** tinha sido obtido, fez-se a caracterização com recurso a espetros de  $^1H$ -RMN,  $^{13}C$  e HMQC (anexo II). As atribuições também foram feitas com o suporte dos registos de trabalhos anteriores com as mesmas moléculas. Apenas foi possível caracterizar totalmente o composto **20a**, pois o composto **21a** não foi obtido em quantidade suficiente e em grau de pureza que o permitisse, tendo este sido caracterizado apenas por  $^1H$ -RMN e HMQC (Anexo II).

No espetro de RMN de  $^1H$  do composto **20a**, há 6 sinais entre 9,03 ppm e 7,38 ppm, correspondendo aos sete prótons aromáticos da estrutura do esqueleto indoquinolínico. O primeiro, o singuleto a 9,03 ppm, terá de corresponder ao próton H-6, tendo em conta que não tem outros prótons próximos para acoplamento. O duplete a 8,21 ppm e o duplete a 7,65 ppm foram atribuídos, respetivamente, aos prótons H-8 e H-9, uma vez que, conforme observado em espetros anteriores do mesmo composto, acoplam um com o outro. Pelo espetro de HMQC, podemos atribuir os carbonos aos prótons respetivos (Tabela 1).



Tabela 1 - Atribuição de desvios químicos do composto 20a.

Atribuição	$\delta(\text{ppm})$ $^1\text{H}$	$\delta(\text{ppm})$ $^{13}\text{C}$
1	8,65, d	126,9
2	7,38, m	121,7
3	7,75, m	131,7
4	7,75, m	114,7
6	9,03, s	125,3
7a	-	166,9
8	8,21, d	128,5
9	7,65, d	110,7
11	-	169,2
CH <sub>2</sub> (7a)	4,46, t	63,2
CH <sub>2</sub> (N-5)	4,91, t	47,5
CH <sub>2</sub> (N-10)	5,07, t	42,9
CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -N (7a)	3,08-2,99, m	<u>52,9<sup>a</sup></u>
CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -N (N-5)	3,08-2,99, m	<u>51,3<sup>a</sup></u>
CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -N (N-10)	2,92, t	<u>51,1<sup>a</sup></u>
CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> (N-5)	2,76, q	<u>47,6<sup>b</sup></u>
CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> (N-10)	2,76, q	<u>47,5<sup>b</sup></u>
CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> (7a)	2,67, q	<u>47,8<sup>b</sup></u>
CH <sub>3</sub> (7a)	1,12-1,06	<u>12,0<sup>c</sup></u>
CH <sub>3</sub> (N-5)	1,12-1,06	<u>11,6<sup>c</sup></u>
CH <sub>3</sub> (N-10)	1,12-1,06	<u>11,2<sup>c</sup></u>

Nota: <sup>a,b,c</sup> são permutáveis.

O multipletto que aparece a 7,75 ppm e que integra para 2 prótons atribui-se aos prótons H-3 e H-4; o multipletto a 7,38 ppm corresponde ao próton H-2 e o dupletto a 8,65 ppm atribui-se ao próton aromático H-1. Estas atribuições são possíveis por comparação com trabalhos anteriores<sup>130</sup>.

Os três tripletos a 4,46 ppm, a 4,91 ppm e a 5,07 ppm têm os respectivos carbonos com desvios a 63,2 ppm, 47,5 ppm e 42,9 ppm, respectivamente, sendo estes desvios atribuídos aos grupos CH<sub>2</sub> diretamente ligados às posições O-C=O, N-5 e N-10, por esta ordem, uma vez que o átomo de oxigênio irá provocar uma desblindagem maior que o átomo de azoto, sendo isto confirmado pelo HMQC.

Embora os 18 prótons correspondentes aos grupos CH<sub>3</sub> terminais das cadeias alquílicas tenham sido anteriormente caracterizados como dois multipletos (um integrando para 12 e outro para 6 prótons, já que a cadeia lateral carboxilato não teria os

mesmos desvios que as outras duas por não ser equivalente), o espectro obtido não permite essa distinção, apresentando um único sinal largo, de 1,12 a 1,06 ppm, que integra para o total de 18 prótons. Os desvios químicos correspondentes, assim como os restantes desvios não-aromáticos, não podem ser atribuídos inequivocamente, pois a distorção do espectro de HMQC não o permite. Por comparação a trabalhos anteriores, fez-se uma atribuição aproximada, conforme consta na tabela 1.<sup>130</sup>

Por fim, por comparação com o anteriormente reportado, podem ainda atribuir-se os carbonos dos grupos carbonílicos, com o carbonilo 7a a corresponder ao sinal a 166,9 ppm e o carbonilo na posição C-11 a corresponder ao desvio a 169,2 ppm.

Para o composto **21a**, verifica-se nos espectros de próton e de HMQC (Anexo II), tal como no composto **20a**, que há três tripletos a 4,56 ppm, 4,32 ppm e a 4,77 ppm, com os desvios dos carbonos correspondentes a, aproximadamente, 62,1, 74,4 e 43,4 ppm, sendo estes desvios atribuídos aos grupos CH<sub>2</sub> diretamente ligados às posições O-C=O, O-11 e N-10, confirmando que foi isolado o composto trissubstituído.

Pode atribuir-se o tripleto a 0,95 ppm aos seis prótons dos grupos metilo terminais da cadeia lateral ligada à posição 7a e os 12 prótons dos grupos metilo terminais restantes ao multipletto a 1,15 ppm, uma vez que estes estão diretamente ligados a carbonos com 2 prótons. Da mesma forma, atribui-se o quadrupletto a 2,61 ppm aos grupos CH<sub>2</sub> ligados aos grupos metilo da cadeia na posição do carboxilato em 7 e o quarteto a 2,68 ppm aos grupos CH<sub>2</sub> ligados aos grupos metilo terminais restantes, já que estão ligados a grupos com 3 prótons. Estas atribuições são aproximadas, por comparação a resultados obtidos em trabalhos anteriores<sup>130</sup>. O espectro de HMQC apresenta distorções e não é possível fazer correspondências exatas aos respetivos carbonos.

Os 7 prótons aromáticos do esqueleto indoloquinolínico atribuem-se de forma semelhante aos do composto **20a**. Neste espectro, porém, é possível identificar dois sinais diferentes para os prótons H-2 e H-3, aparecendo aqui como dupletos de dupletos de dupletos a 7,61 e 7,71 ppm. Também se verifica que o próton H-6 aparece com um dupletto e não como singletto, como visto anteriormente. A constante de acoplamento é pequena, porém, o que é característico para acoplamento entre prótons em *meta* num anel aromático. Através do HMQC, pode ser feita uma correspondência aproximada para os respetivos carbonos (Tabela 2). Estas atribuições são possíveis com recurso a estudos anteriores sobre a mesma molécula.<sup>130</sup>

Tabela 2 - Atribuição de desvios químicos do composto **21a**.

Atribuição	$\delta$ (ppm) $^1\text{H}$	$\delta$ (ppm) $^{13}\text{C}$ (aprox.)
1	8,36, d	121,2
2	7,61, ddd	124,9
3	7,71, ddd	126,9
4	8,31, d	129,4
6	9,22, d	124,3
8	8,33, d	131,7
9	7,56, d	108,8
CH <sub>2</sub> (7a)	4,56, t	62,1
CH <sub>2</sub> (O-11)	4,32, t	74,4
CH <sub>2</sub> (N-10)	4,77, t	43,4
CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -N (7a)	3,07, t	<u>52,8<sup>a</sup></u>
CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -N (O-11)	3,03, t	<u>50,4<sup>a</sup></u>
CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -N (N-10)	2,85, t	<u>51,5<sup>a</sup></u>
CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> (7a)	2,61, q	<u>47,3<sup>b</sup></u>
CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> (O-11)	2,77, q	<u>47,5<sup>b</sup></u>
CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> (N-10)	2,68, q	<u>47,4<sup>b</sup></u>
CH <sub>3</sub> (7a)	0,95, t	<u>11,38<sup>c</sup></u>
CH <sub>3</sub> (O-11)	1,15, m	<u>11,44<sup>c</sup></u>
CH <sub>3</sub> (N-10)	1,15, m	<u>11,16<sup>c</sup></u>

Nota: <sup>a,b,c</sup> são permutáveis

### 3.3. Síntese de indolo[3,2-c]isoquinolinas

#### 3.3.1. Síntese do sistema tetracíclico 5-amino-11H-indolo[3,2-c]isoquinolino (**36**)

Tal como referido na alínea c) do capítulo 2 desta tese, foram desenhados 5 compostos indolo[3,2-c]isoquinolínicos, partindo a síntese de cada um destes do composto **36**, ao qual se ligariam diferentes cadeias laterais na posição 5-NH<sub>2</sub> da estrutura (ver Figura 26).

O procedimento de síntese do composto **36** foi descrito em 2015<sup>131</sup>, e seguido tal como reportado, uma vez que é simples e com rendimentos razoáveis (Fig. 34).

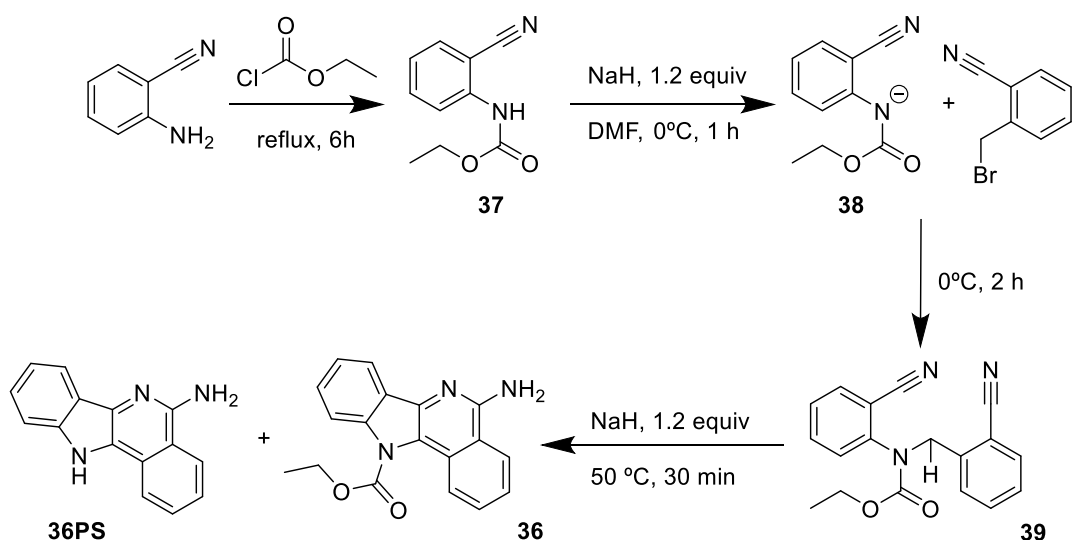


Figura 34 - Esquemática do processo sintético dos compostos **36** e **36PS**.

A síntese do intermediário **37** consiste numa substituição nucleofílica, em que o par de elétrons livre do 2-aminoacrilnitrilo realiza um ataque ao carbonilo do cloroformato de etilo. O processo requer apenas o refluxo dos dois reagentes por 6 horas, sendo o composto **37** o único produto desta reação. Realizou-se um espectro de RMN  $^1\text{H}$ , verificando-se que não havia sinais correspondentes aos materiais de partida e que o mesmo correspondia ao esperado e reportado, tendo-se obtido um rendimento de 85%, superior ao declarado na literatura (70%)<sup>131</sup>.

A síntese de **36** acontece por reação *one-pot* (um só recipiente), desprotonando-se primeiro o composto **37** (utilizando NaH como base); adiciona-se depois o  $\alpha$ -bromo-o-tolunitrilo, despoletando uma reação  $\text{S}_{\text{N}}2$ , dando o intermediário **39**. É, então, adicionada uma segunda porção de NaH, desencadeando um processo de anelação que passa pela abstração de um próton pelo hidreto, formando-se um intermediário aniônico. Este intermediário ataca o grupo nitrilo proveniente do composto **37** e, após tautomerização, dá-se um ataque nucleofílico intramolecular ao segundo grupo nitrilo (da metade derivada do brometo benzílico). O composto **36** é obtido após segunda tautomerização e protonação do grupo 5-amina (Fig. 35).

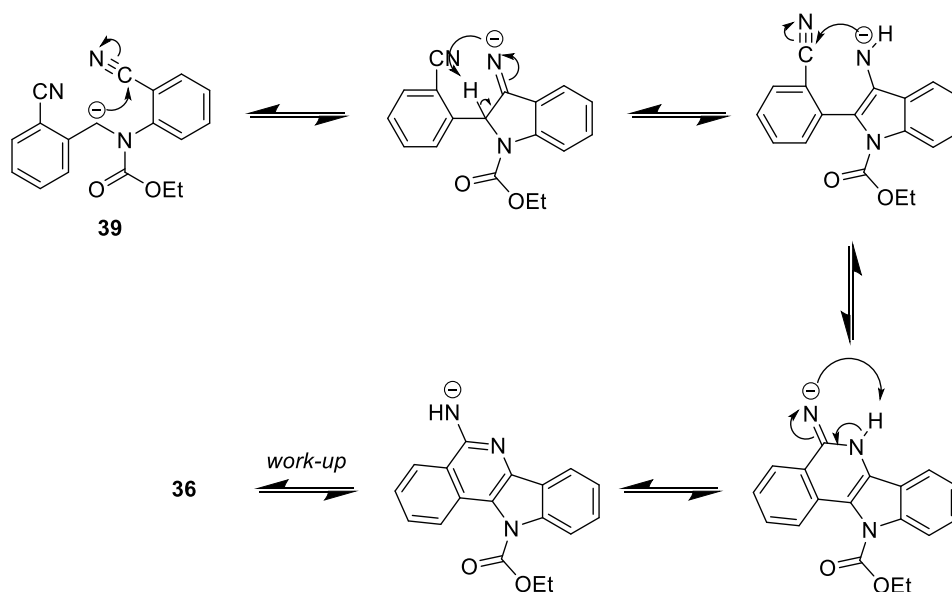


Figura 35 - Mecanismo sintético do composto **36** a partir do intermediário **39**.

Verificou-se que, no último passo da reação em cascata, a temperatura e o tempo que é usado influenciam as proporções relativas do composto **36** e do produto secundário **36PS**, que se constatou ser a molécula hidrolisada, uma vez que o espectro de  $^1\text{H-RMN}$  não apresentava os sinais correspondentes ao grupo etilo do carbamato (apresentado no anexo III).

Realizar este passo a mais que  $50^\circ\text{C}$  e por mais de 30 minutos aumentou a obtenção do produto hidrolisado, uma vez que não houve um controlo rigoroso da temperatura interna da mistura reacional e sim um controlo da temperatura do banho de aquecimento. Por esta razão, os rendimentos obtidos para o composto **36** (30-46%), são menores que os reportados na literatura de 70%<sup>131</sup>.

Por forma a verificar se o produto pretendido tinha sido obtido e para guardar estas informações para trabalhos futuros, fez-se uma caracterização total do composto **36** com recurso a espectros de  $^1\text{H-RMN}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMQC, HMBC e COSY (anexo III).

É possível atribuir o singlete a 7,01 ppm aos 2 protões do grupo amina pelo espectro de protão. Esta atribuição é suportada também pelo HMQC, já que não existe correlação destes dois protões com nenhum carbono. É também possível atribuir o quadrupeto a 4,53 ppm e o tripleto a 1,41 ppm aos grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  da função carbamato da molécula. Analisando as correlações destes dois desvios no espectro de HMQC, pode-se atribuir o sinal a 14,08 ppm ao carbono do grupo  $\text{CH}_3$  e o sinal a 63,61 ppm ao carbono do grupo  $\text{CH}_2$ .

Os desvios correspondentes a protões e carbonos aromáticos são atribuídos conforme indicado na tabela 3. Estas determinações foram alcançadas tendo em conta as interações mostradas nos espectros de HMBC, COSY e HMQC (Fig. 36).

Note-se que, quanto aos carbonos C-3 e C-4, não é possível determinar, inequivocamente, qual dos dois desvios corresponde a qual carbono, uma vez que no HMQC é difícil distinguir os pontos das interações. Mais ainda, o multipletto a 7,52 ppm a integrar para dois prótons que é visível no espectro, aparece na literatura como dois tripletos separados, cada um integrando para um próton.

Tabela 3 - Atribuição de desvios químicos do composto 36.

Atribuição	$\delta(\text{ppm})$ $^1\text{H}$	$\delta(\text{ppm})$ $^{13}\text{C}$
1	8,23, d	124,13
1a	-	127,79
2	7,73, dd	129,46
3	7,52, m	<u>125,05</u>
4	8,34, d	<u>125,02</u>
4a	-	117,21
5	7,01, s (NH <sub>2</sub> )	156,58
6a	-	137,53
7	7,97, d	119,32
7a	-	126,04
8	7,40, dd	123,51
9	7,52, m	127,17
10	8,15, d	115,52
10a	-	139,13
11a	-	120,23
12	-	152,25
13	4,53, q	63,61
14	1,41, t	14,08

Os desvios químicos de  $^1\text{H}$ -RMN e  $^{13}\text{C}$  correspondem aos anteriormente reportadas e, portanto, conclui-se que foi obtido, com sucesso, o composto pretendido.

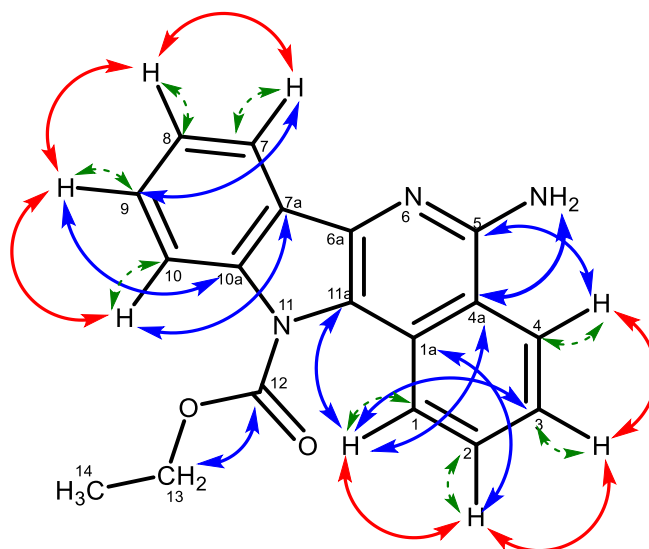


Figura 36 – Esquematização de interações observadas nos espectros de HMBC (a azul), HMQC (a tracejado verde) e COSY (a vermelho) do composto **36**.

### 3.3.2. Síntese de derivados 5-acetamida (**40**)

O plano sintético para a síntese dos compostos **23a** e **23b** envolvia a introdução de um *linker* (utilizando o brometo de bromoacetilo) na posição N-5 do composto **36**, num primeiro passo, e posterior introdução de grupos alquilamina (Fig. 37).

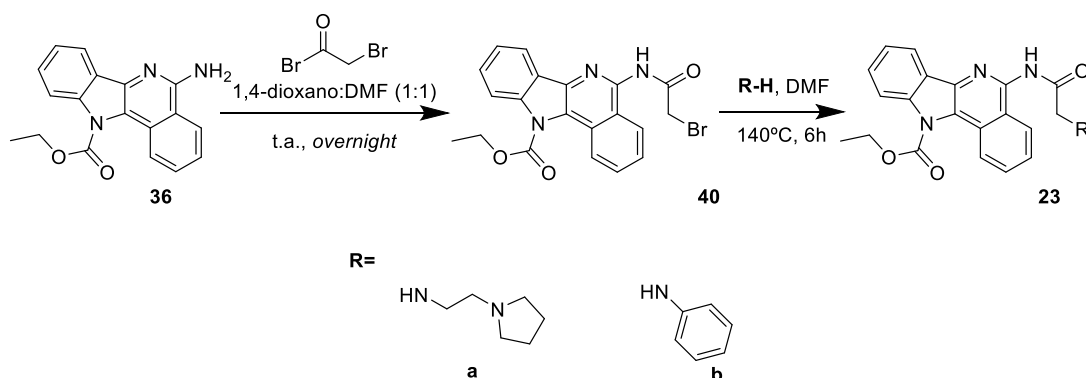


Figura 37 - Esquematização do processo sintético dos derivados 5-acetamida **40**, **23a** e **23b**.

Adaptou-se o procedimento sintético do composto **33** e, ao longo de várias experiências, variou-se o número de equivalentes de brometo de bromoacetilo utilizado, o uso (ou não) de uma base, o solvente, o tempo de reação e a temperatura.

A tabela 4 resume as diversas abordagens tentadas. É de referir que em nenhuma das tentativas foi possível obter o produto com um grau de pureza suficiente para poder ser totalmente caracterizado. Porém, de forma a tentar compreender se o produto pretendido era, de facto, obtido, realizaram-se espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de controlo. Verificou-se que há presença de sinais com multiplicidades e desvios químicos compatíveis com os anteriormente verificados para os prótons aromáticos do esqueleto indoloisoquinolínico. São visíveis os prótons correspondentes aos grupos

CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> da função carbamato da molécula como quadruplete e tripleto, respectivamente, garantindo que não houve hidrólise da molécula. Também se verificou a presença de um singlete a integrar para 2 prótons a 4 ppm, o desvio químico esperado para os prótons do CH<sub>2</sub>-Br da cadeia adicionada (Fig. 38).

Tabela 4 - Resumo de condições reacionais tentadas para a síntese do composto **40**.

Ensaio	Solvente	Base	Brometo de bromoacetilo (eq.)	Condições reacionais	Rendimento global	Rendimento considerando MP consumido
A	1,4-dioxano:DMF (1:1)	-	1,25+1,25	t.a., 20h + 6h após adição da 2ª porção de brometo	28%	-
B	1,4-dioxano:DMF (1:1)	DIPEA (1,1 eq.)	1,25+1,25	t.a., 17h + 3h após adição da 2ª porção de brometo	20%	-
C	DCM	-	1,25+1,25	t.a., 19h + 3h após adição da 2ª porção de brometo	12%	73%
D	DCM	-	1,2	t.a., 21h + 5h em refluxo	14%	-
E	DCM	DIPEA (1,25 eq.)	1,25	t.a., 4h	23%	-
F	DCM	DIPEA (1,2 eq.)	1,2	t.a., 3h:30m	18%	59%
G	THF	DIPEA (1,2 eq.)	1,2	Refluxo, 4h	-	-

Verificou-se que a maioria do material de partida não reagia na totalidade, sendo possível, durante a purificação, recuperar uma porção considerável (60-70%). Mais ainda, além do produto (maioritário na TLC e obtido em maior quantidade na purificação), ocorria a formação de vários outros produtos secundários, com índices de retenção muito similares ao do composto **40**, tornando a obtenção de produto puro, em quantidade razoável, mais difícil.

A indoloisoquinolina **36** pode ser hidrolisada, ficando a posição N-11 disponível para substituição. Uma vez que o brometo de bromoacetilo sofre facilmente hidrólise quando exposto ao ar, a substituição pode acontecer no carbono  $\alpha$  do reagente, e não no carbonilo, como esperado. A molécula poderia ainda sofrer substituição nas posições N-5 e N-11 simultaneamente, sendo esse um outro produto secundário possível.



Considerou-se a mistura de 1,4-dioxano:DMF (1:1) e o DCM como solventes aceitáveis para esta reação, não parecendo haver diferença drástica em termos de quantidade de produto obtido. Porém, é de assinalar que, embora o primeiro solvente permita que se dissolva o material de partida numa quantidade menor de solvente, há necessidade de *work-up* da mistura reacional para remover o DMF, o que leva a diminuição de rendimento.

Constatou-se que, quando o THF foi utilizado em refluxo, a mistura reacional transformou-se numa pasta preta após seca e em TLC não foi possível identificar a mancha correspondente ao composto **40**. Isto pode dever-se ao facto de o THF não ser um solvente adequado, ou, por outro lado, à temperatura mais elevada a que este ensaio se realizou, já que o THF tem um ponto de ebulição significativamente superior ao do DCM, podendo ter levado à degradação do produto ou promoção da formação de produtos secundários.

A utilização de base, de forma geral, provocou maior formação de produtos secundários, observados na TLC. Aumentar o tempo de reação não melhorou o rendimento do produto, tendo, até, ocorrido maior degradação e formação de produtos secundários. O mesmo aconteceu com utilização de refluxo.

Finalmente, mesmo com o composto impuro, era necessário caracterizá-lo, com recurso aos espetros de protão e, depois, de HMQC. No caso dos espetros de protão, um dos sinais que se antecipava observar, tal como referido anteriormente, seria o correspondente aos dois protões do grupo CH<sub>2</sub> (a, aproximadamente, 4 ppm) da cadeia 2-bromo-acetamida introduzida. Verificou-se que o sinal aparecia no espetro, com a integração correta (Fig. 38). Porém, não foi possível verificar a presença deste sinal em todos os ensaios, nem a sua integração correta, colocando duas hipóteses: as impurezas não permitiam a integração correta dos sinais ou o ataque nucleofílico acontecia ao carbono  $\alpha$  e não ao carbonilo, como previsto. Esta última hipótese poderia ser mais favorável se o brometo de acetilo utilizado estivesse hidrolisado.

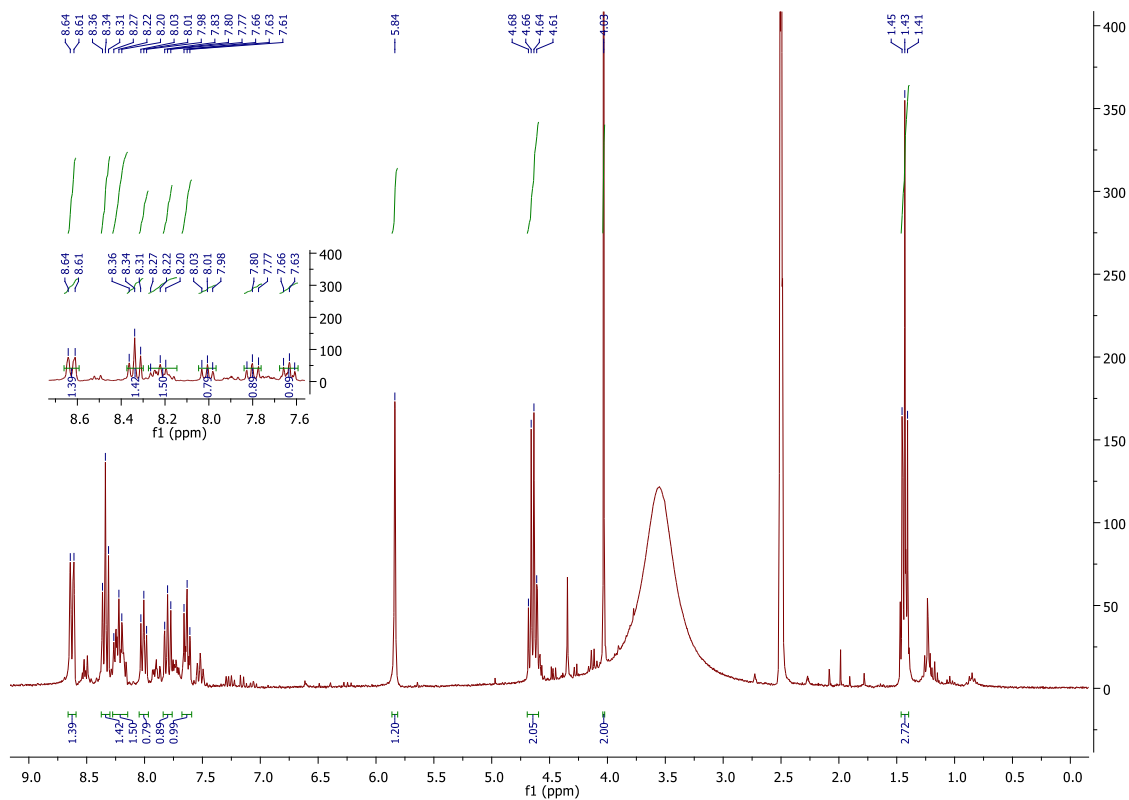


Figura 38 - Primeiro espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto **40** em solução de  $\text{DMSO-d}_6$  preparada recentemente.

Para verificar se a substituição com o brometo de bromoacetilo acontecia corretamente, fez-se um espectro HMQC (Fig. 39). Esperava-se que, a partir deste espectro, se pudesse verificar que este singlete que aparecia a cerca de 4 ppm correspondia, de facto ao carbono  $\alpha$  da cadeia introduzida.

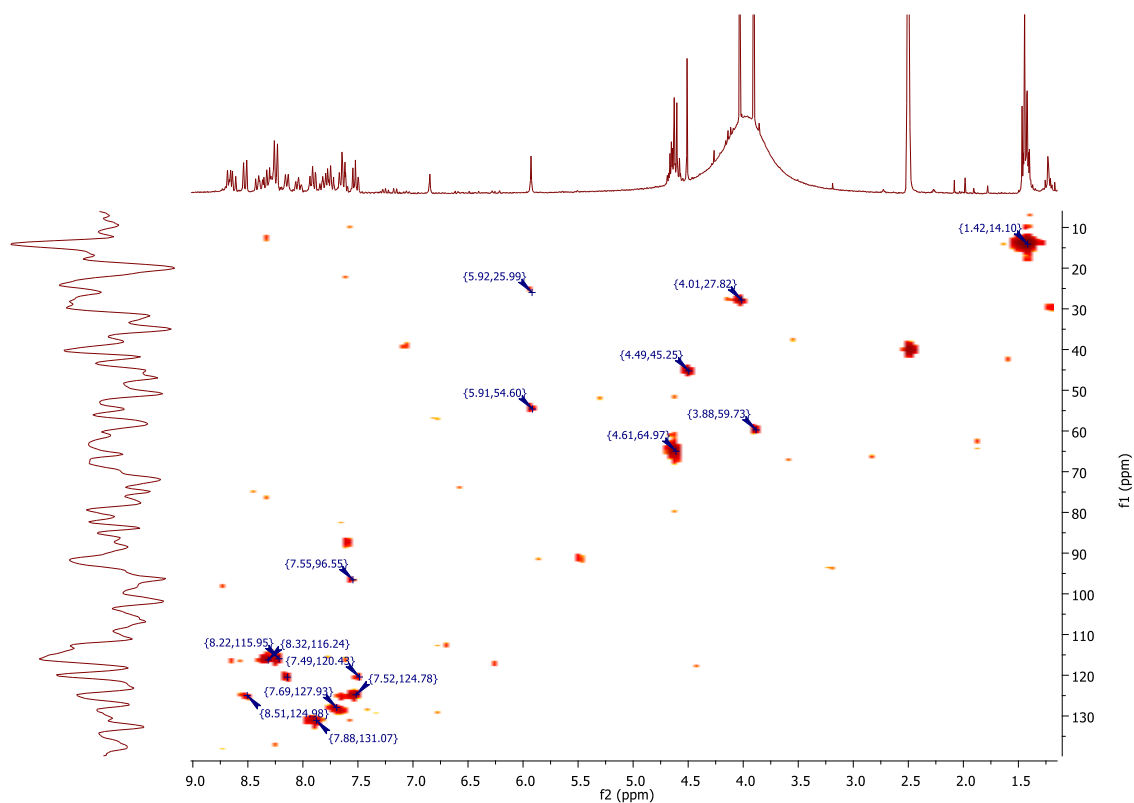


Figura 39 - Espectro bidimensional HMQC do composto **40** em solução de DMSO- $d_6$  preparada há mais de 24 horas.

Constatou-se então que, quando deixado em solução de DMSO deuterado durante mais do que um dia, o composto degradava, verificando-se diferenças drásticas no espectro de protão, levando à conclusão de que este não é estável em solução (Fig. 40). O singlete de interesse, a 4 ppm, apresenta, de facto, correlação no espectro de HMQC com um carbono num desvio químico (27,82 ppm) que é compatível com o verificado no espectro de carbono do brometo de bromoacetilo (28,00 ppm).

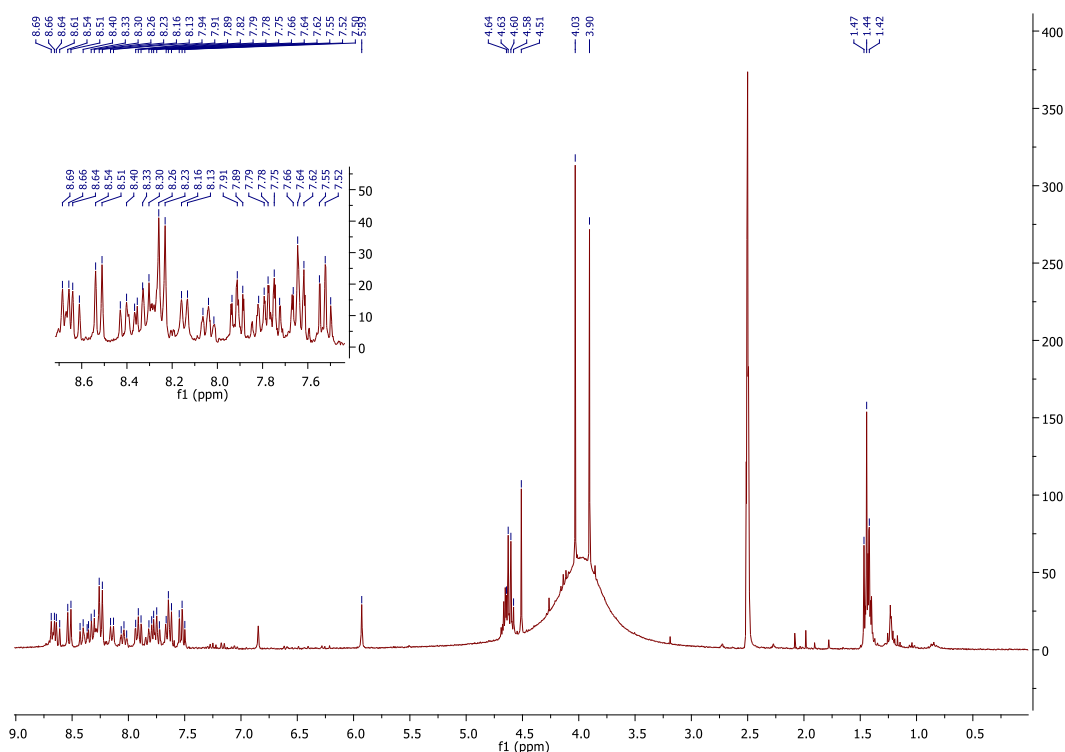


Figura 40 - Espectro de <sup>1</sup>H-RMN do composto **40** em solução de DMSO-d<sub>6</sub> preparada há mais de 24 horas.

Não sendo estável em solução, e devido ao baixo rendimento da reação, bem como às dificuldades de purificação, este não é um intermediário viável para o processo sintético que foi apresentado, sendo então necessário estudar e compreender melhor a reatividade do composto **36**.

### 3.3.3. Síntese de derivados 5-benzilamina (**25**)

Procedeu-se ao estudo da reatividade do grupo 5-NH<sub>2</sub> da indoloisoquinolina **36** com um haleto benzílico (brometo de benzilo).

Considerando as dificuldades encontradas na reação do grupo 5-NH<sub>2</sub> da indoloisoquinolina com um brometo de ácido alquílico, para a síntese de **24** e **25** (Fig. 41) utilizou-se o THF como solvente, para permitir um refluxo a temperaturas moderadas. A reação foi controlada por TLC de hora a hora, verificando-se que a sua evolução, embora lenta, acontecia. Assim, após 22 horas, verificou-se que não havia presença de material de partida no meio reacional e que havia formação de um produto maioritário e passou-se à purificação do crude, sendo que não foi necessário mais do que uma coluna de cromatografia para obtenção do produto puro e em rendimento aceitável (81%). Após secagem total, procedeu-se à caracterização do composto por espectros de <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C, <sup>13</sup>C-APT, HMQC e HMBC (Anexo III).

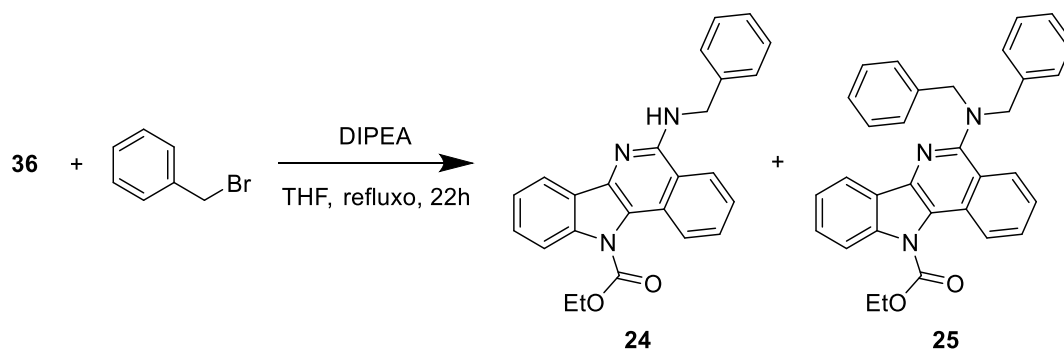


Figura 41 - Esquemática do processo sintético dos derivados 5-benzilamina **24** e **25**.

Por análise do espectro de próton do composto, verificou-se que, em vez de apenas uma cadeia, a adição ocorreu duas vezes, uma vez que a amina ainda tinha um próton que podia ser retirado após a primeira adição e porque foi adicionado brometo em excesso, dando, portanto, origem maioritariamente ao composto **25**. O uso de temperatura pode ter também contribuído para a dupla substituição.

À semelhança do composto **36**, pode atribuir-se primeiro os sinais correspondentes aos grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  da função carbamato da molécula, que aparecem como um quadrupeto a 4,57 ppm e um triplete a 1,43 ppm, respetivamente. Os carbonos correspondentes atribuem-se aos desvios químicos 64,00 ppm e 14,06 ppm, respetivamente, tendo em conta o HMQC. A partir da atribuição do quadrupeto, é possível, por análise do HMBC, atribuir ainda o desvio químico a 152,01 ppm ao carbono do carbonilo do grupo carbamato.

Verifica-se a existência de um singlete a 4,66 ppm, que só pode corresponder aos 4 prótons dos grupos  $\text{CH}_2$  das duas cadeias laterais inseridas na posição N-5. Recorrendo ao HMQC, verifica-se a correspondência destes sinais ao desvio a 55,7 ppm para os carbonos destes dois grupos, que são equivalentes, devido à simetria.

Tabela 5 - Atribuições de desvios químicos do composto 25.

Atribuição	$\delta(\text{ppm}) \text{ } ^1\text{H}$	$\delta(\text{ppm}) \text{ } ^{13}\text{C}$
1	8,39, d	124,89
1a	-	128,53
2	7,80, ddd	129,64
3	7,66, ddd	126,89
4	8,52, d	<u>126,09</u>
4a	-	121,27
5	-	158,49
6a	-	135,62
7	8,04, d	119,35
7a	-	125,54
8	7,47-7,41, m	123,81
9	7,54, ddd	127,60
10	8,18, d	115,55
10a	-	139,11
11a	-	123,33
12	-	152,01
13	4,57, q	64,00
14	1,43, t	14,06
15, 15'	4,66, s	55,74
16, 16'	-	138,70
17, 17'	7.47-7.41, m	127,91
18, 18'	7,29, ddd	128,30
19, 19'	7,19, ddd	<u>126,11</u>

Os desvios correspondentes a prótons e carbonos aromáticos são atribuídos conforme indicado na tabela 5. Estas determinações foram alcançadas tendo em conta as interações mostradas nos espectros de HMBC e HMQC (Fig. 42). Note-se que, quanto aos carbonos C-4, C-19 e C-19', não é possível determinar, inequivocamente, qual dos dois desvios corresponde a qual carbono, uma vez que no HMQC é difícil distinguir os pontos das interações.

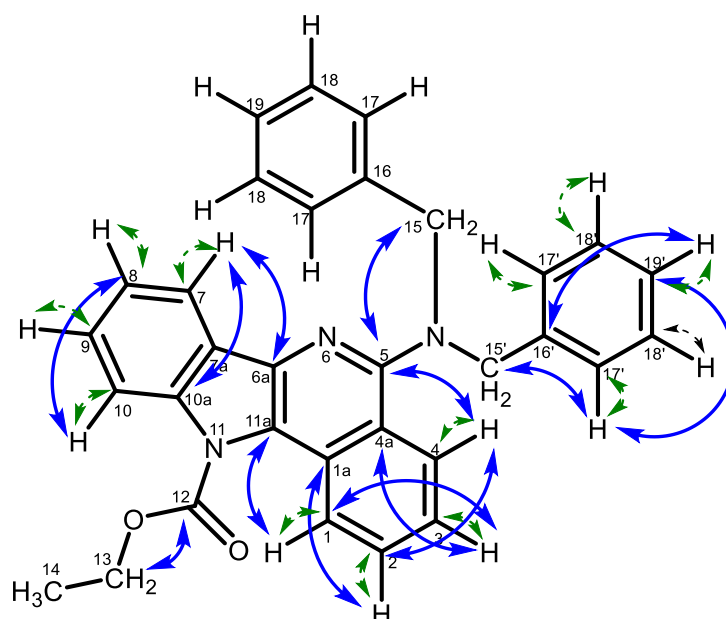


Figura 42 - Esquemática de interações observadas nos espectros de HMBC (a azul) e HMQC (a traçado verde) do composto **25**.

### 3.3.4. Síntese de derivados 5-benzamida (**26**)

Para a síntese do composto **26** adicionou-se o composto **36** ao cloreto de 3-nitrobenzoilo (Fig. 43), utilizou-se piridina como base e, inicialmente, DCM como solvente. As primeiras duas horas de reação ocorreram à temperatura ambiente e, embora se tenha formado produto dentro da primeira meia hora (um pó fino amarelo), a reação não evoluiu a partir desse ponto. Colocou-se então a mistura reacional sob refluxo, esperando que a temperatura acelerasse o processo e que o produto até aí formado se dissolvesse. Porém, após mais três horas, verificou-se que o material de partida já não estava a ser consumido e, portanto, parou-se a reação e procedeu-se à purificação, da qual resultaram 24,2 mg do produto (rendimento de 18%). O rendimento é reduzido e, apesar de se saber que o material de partida não foi totalmente consumido, foram necessárias purificações sucessivas para obter o produto num grau de pureza suficiente para o caracterizar, podendo ter havido perdas. Considerou-se o rendimento insuficiente e, assim, era necessário tentar melhorar o procedimento.

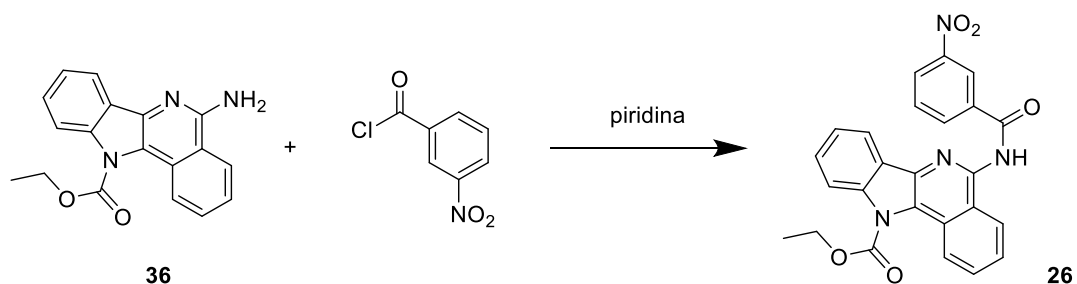


Figura 43 - Esquemática do processo sintético do derivado 5-benzamida **26**.

Substituiu-se o DCM por THF, que tem um ponto de ebulição mais elevado, permitindo realizar a reação a uma temperatura superior. Repetiu-se a reação, desta feita utilizando THF como solvente e utilizando o sistema de refluxo, controlando a reação ao longo do tempo. Ao fim de cerca de 24 horas de refluxo, concluiu-se que a reação não evoluiria mais. Uma vez mais, foram necessárias purificações sucessivas para que se pudesse obter o produto **26** num grau de pureza suficiente para que pudesse, depois, ser totalmente caracterizado, levando, uma vez mais, a perdas no rendimento, que foi de 6%.

Para proceder à caracterização da estrutura, recorreu-se a espectros de  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ -APT, COSY, HMQC e HMBC (anexo III).

Tal como nos compostos anteriores, podem atribuir-se os sinais correspondentes aos grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  da função carbamato da molécula, que aparecem como um quadrupeto a 4,64 ppm e um tripleto a 1,46 ppm, respetivamente. Os carbonos correspondentes atribuem-se aos desvios químicos 64,45 ppm e 14,03 ppm, respetivamente, tendo em conta o HMQC. A partir da atribuição do quadrupeto, é possível, por análise do HMBC, atribuir ainda o desvio químico a 151,97 ppm ao carbono do carbonilo do grupo carbamato.

Os desvios correspondentes a prótons e carbonos aromáticos encontram-se atribuídos conforme indicado na tabela 6. Estas determinações foram alcançadas tendo em conta as interações mostradas nos espectros de HMBC e HMQC (Fig. 44).



Tabela 6 - Atribuição de desvios químicos do composto 26.

Atribuição	$\delta(\text{ppm})$ $^1\text{H}$	$\delta(\text{ppm})$ $^{13}\text{C}$
1	8,60-8,48, m	124,74
1a	-	127,26
2	7,91, <u>dd</u>	<u>130,39</u>
3	7,72, dd	126,93
4	8,22, d	127,04
4a	-	123,62
5	11,59, s (NH <sub>2</sub> )	148,32
6a	-	135,62
7	8,24, d	119,53
7a	-	124,98
8	7,53, ddd	124,22
9	7,65, dd	128,24
10	8,28, d	115,56
10a	-	139,21
11a	-	126,12
12	-	151,97
13	4,64, q	64,45
14	1,46, t	14,03
15	-	165,14
16	-	135,13
17	8,98, dd	122,91
18	-	147,93
19	8,60-8,48, m	126,68
20	7,91, <u>dd</u>	<u>130,24</u>
21	8,60-8,48, m	134,44

Note-se que, quanto aos carbonos C-2 e C-20, não é possível determinar, inequivocamente, qual dos dois desvios químicos corresponde a qual carbono, uma vez que no HMQC é difícil distinguir os pontos das interações. Além disso, tendo em conta a distorção visível, é claro que o sinal a 7,91 ppm corresponde a uma sobreposição de sinais de dois hidrogénios (H-2 e H-20) e deverão desdobrar, cada um, como dupletos de dupletos.

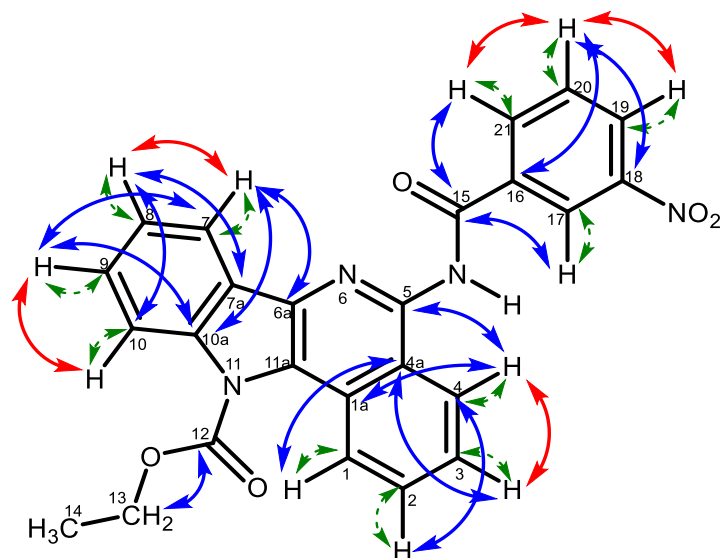


Figura 44 - Esquematisação das interações observadas nos espetros de HMBC (a azul), HMQC (a tracejado verde) e COSY (a vermelho) do composto 26.

### 3.4. Determinação da capacidade de estabilização de estruturas de G-quadruplexos de ADN pelos compostos

Transferência de energia de ressonância por fluorescência (*Fluorescence resonance energy transfer*) é uma ferramenta de deteção de relações espaciais entre macromoléculas marcadas com fluoróforos, um doador e um aceitador, em que o estado de energia excitado do fluoróforo doador é transferido para o fluoróforo aceitador não-excitado<sup>132</sup>.

Esta técnica tem sido utilizada para estudar uma variedade de biomoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos, obtendo-se conhecimento sobre as suas estruturas 3D<sup>133</sup>.

A fusão de ácidos nucleicos é um processo no qual as interações entre os pares de bases, que estabilizam as moléculas de ADN ou ARN, são partidas. Com o aumento da temperatura, há a desnaturação destas estruturas e a separação das cadeias anteriormente emparelhadas<sup>134</sup>. Para estudar este processo por FRET, ligam-se, às duas pontas da cadeia de ADN/ARN, fluoróforos doadores e aceitadores como a fluoresceína (FAM) e a tetrametilrodamina (TAMRA), respetivamente. Quando o oligonucleótido está num estado dobrado, por exemplo na forma de quadruplexo, a fluorescência do doador é absorvida pelo aceitador, pois os dois marcadores estão próximos um do outro. Quando a temperatura é aumentada, a estrutura começa a desdobrar, afastando o doador do aceitador, levando a um aumento gradual da fluorescência do doador, que atinge um máximo quando a estrutura desdobra totalmente<sup>133</sup>.

Em 2001 desenvolveu-se um ensaio de fusão por FRET para o estudo da capacidade de estabilização da estrutura de G4 pelos seus ligandos, no qual se obtém o perfil

de fusão de oligonucleótidos formadores de estruturas de G4 marcados com os fluoróforos, na presença e na ausência dos ligandos a testar. Quanto mais elevada é a temperatura a que se verifica o desdobramento do G4, ou seja a temperatura de fusão ( $T_m$ ), maior é a capacidade de estabilização do ligando<sup>135,136</sup>.

Anteriormente, o composto **20a** tinha já sido submetido a ensaios de fusão por FRET para verificar a sua competência enquanto estabilizador de estruturas G4. Uma vez que esses resultados foram considerados positivos, decidiu-se utilizar esse composto como uma referência em relação às novas estruturas.

Os valores obtidos para o composto **20a** correspondem aos resultados reportados na literatura<sup>115</sup>. Porém, para os novos compostos, o valor de  $\Delta T_m$  não chega a ser maior que 1 para qualquer das duas concentrações testadas (Fig. 45).

## Estabilização de G-quadruplexos

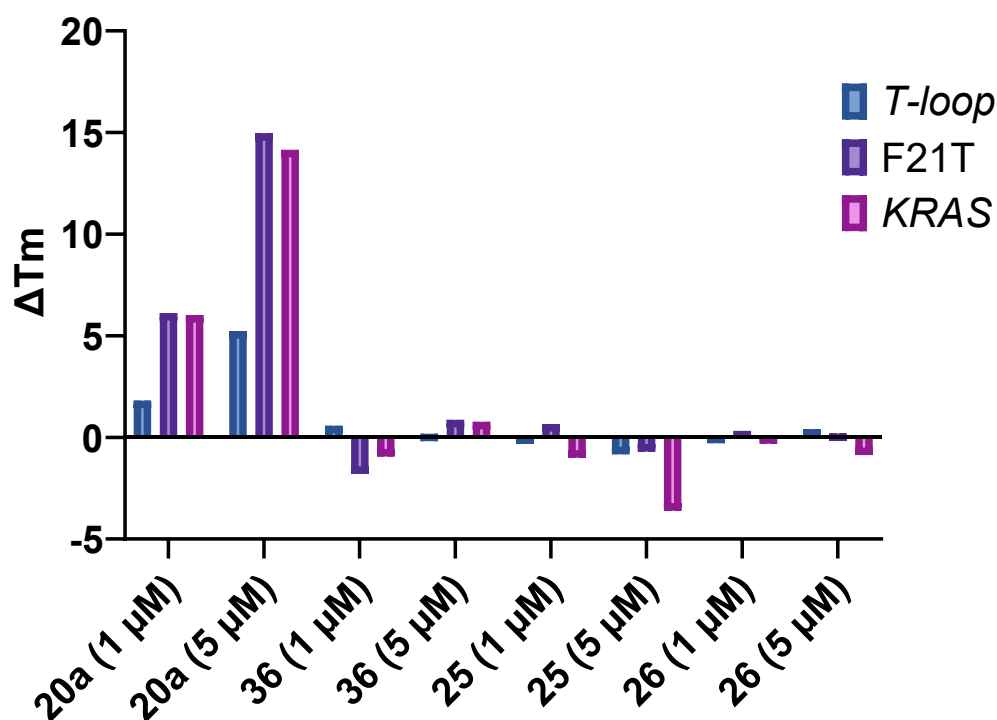


Figura 45 - Valores de  $\Delta T_m$  de estruturas G4 de ADN (F21T e KRAS) e estruturas duplex (T-loop) estabilizadas pelos compostos analisados por ensaios de fusão FRET a 1 e 5  $\mu\text{M}$ .

Estes resultados não são inesperados pois, em estudos anteriores, observaram-se algumas das características de compostos que estabilizam estruturas G4, sendo que as diferentes cadeias laterais têm um impacto importante nesta capacidade. Entre as estruturas que demonstravam menor capacidade de estabilização, em comparação com estruturas com cadeias laterais alquilamina, contavam-se cadeias laterais aromáticas sem grupos básicos. Isto aplica-se aos compostos **25** e **26**, por exemplo. Mais ainda, mesmo que a estrutura indoloisoquinolina do composto **36** pudesse ligar-se por

interações  $\pi$ - $\pi$  com as guaninas dos G4, é muito provável que essa ligação fosse fraca e pouco seletiva, devido à ausência de cadeias laterais que pudessem permitir interações eletrostáticas ou por pontes de hidrogénio, que melhorariam a capacidade de estabilização do composto<sup>110,112,115,117</sup>.

#### **4. Conclusões e perspectivas futuras**

A p53 é um alvo de grande interesse no tratamento do cancro. Ao longo dos anos, desenharam-se várias moléculas, com o objetivo de atuar nas várias vias de ativação da expressão e/ou da função supressora de tumores da p53.

O objetivo desta dissertação foi sintetizar moléculas ativadoras da função supressora de tumores da p53 por inibição da interação p53-MDM2, os spirooxindóis **11b** e **12b**, ou moléculas ativadoras da expressão da p53 via estabilização de G-quadruplexos. Nomeadamente, sintetizaram-se as duas indolo[3,2-*b*]quinolinas **20a** e **21a**, e novos derivados indolo[3,2-*c*]isoquinolínicos.

Os compostos **11b** e **12b** foram sintetizados conforme descrito na literatura<sup>98,99</sup>. As indolo[3,2-*b*]quinolinas **20a** e **21a** foram também obtidas, conforme proposto<sup>115</sup>. Durante a sua síntese fizeram-se alterações aos procedimentos de síntese dos intermediários **34** e **35**, tendo estas sido recentemente publicadas em comunicação sob a forma de póster (anexo IV), na conferência *6th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry*. Nomeadamente, desenvolveu-se um procedimento de síntese do composto **34** sem recurso a micro-ondas e melhorou-se substancialmente o rendimento do intermediário **35** por alteração do procedimento de isolamento.

Para a síntese dos derivados indolo[3,2-*c*]isoquinolínicos procedeu-se, primeiramente, à síntese da molécula base, o composto **36** (5-amino-11*H*-indolo[3,2-*c*]isoquinolino-11-carboxilato de etilo), por reação de *N*-alquilação/ciclização *tandem* em presença de base, conforme publicado anteriormente<sup>131</sup>. Procedeu-se depois ao estudo da derivatização deste composto na posição N-5. Para a obtenção de derivados com cadeias laterais alquilamina (derivados **23a** e **23b**) era necessário introduzir um *linker* por reação com o brometo de bromoacetilo e, posteriormente, as cadeias alquilamina. No entanto, a síntese dos compostos **23a** e **23b** não foi possível, já que não se conseguiu obter o intermediário 5-acetamida **40** em quantidade e pureza suficientes para prosseguir com o plano de síntese. Por outro lado, foram obtidos com sucesso o derivado 5-dibenzilamina **25** e 5-benzamida **26**.

A reatividade do grupo 5-NH<sub>2</sub> da indolo[3,2-*c*]isoquinolina foi estudada pela primeira vez neste trabalho. Constatou-se que reações do composto **36** envolvendo reagentes com grupos acilo levam a rendimentos muito reduzidos, não só devido à pouca quantidade de material de partida que reage efetivamente, mas também porque são necessárias purificações sucessivas, devido aos vários produtos secundários formados durante a síntese, com índices de retenção muito próximos do correspondente ao produto, aumentando ainda mais as perdas de rendimento.

Quando se dá a reação do composto **36** com reagentes como haleto de acilo ou de benzoílo em meio básico, acontece primeiro a remoção de um próton da amina e, depois, o ataque nucleofílico ao grupo carbonilo do haleto utilizado. A baixa nucleofilia do grupo 5-NH<sub>2</sub> pode dever-se a uma deslocalização da carga negativa formada entre o grupo 5-amina e o azoto do núcleo isoquinolínico, conforme já observado nas reações de acilação de 1-amino-isoquinolinas<sup>137</sup>. Isto pode explicar o rendimento insatisfatório e a existência de produtos secundários, uma vez que, se a carga negativa não está na amina, a quantidade de intermediário mais favorável ao ataque nucleofílico aos grupos carbonilo fica reduzida e, portanto, a quantidade de produto que poderia ser obtido reduz também. Mais ainda, se o brometo de bromoacetilo, que sofre facilmente hidrólise quando exposto ao ar, estivesse degradado, o ataque nucleofílico acontecia ao carbono  $\alpha$  e não ao carbonilo, já que o grupo hidróxido não é um bom grupo abandonante nestas circunstâncias, sendo esta mais uma hipótese que explica a dificuldade em obter e purificar o composto **40**. Já no caso do derivado 5-benzamida **26**, obtido com baixos rendimentos, verificou-se igualmente que o material de partida não era completamente consumido e o grupo polar NO<sub>2</sub> pode ter também dificultado a sua purificação. Por outro lado, verificou-se que a reação com o haleto de benzilo utilizado foi bem-sucedida. Porém, para obtenção do composto **24** (mono-alquilação de 5-NH<sub>2</sub>) e não apenas do composto **25**, a quantidade de haleto adicionada tem de ser absolutamente rigorosa para evitar que ocorra polisubstituição, o que não aconteceu neste caso.

Procedeu-se ainda à análise através de ensaios de fusão por FRET dos novos compostos **36**, **25** e **26**, servindo o composto **20a** como referência positiva. Infelizmente, os valores de  $\Delta T_m$  obtidos são menores que 1, concluindo-se que estas estruturas não são bons estabilizadores de G4s. Apesar de os resultados relativos aos compostos **25** e **26** não serem inesperados, considerou-se de interesse sintetizá-los, uma vez que era necessário compreender a reatividade do composto **36** e com que tipo de reagentes a introdução de cadeias laterais era mais eficiente.

Em conclusão, os objetivos do trabalho foram globalmente alcançados, tendo sido sintetizados, isolados e caracterizados por espectroscopia de RMN um total de 18 compostos, entre intermediários e compostos potencialmente indutores da p53, pertencentes a 3 famílias químicas: spirooxindóis, indoloquinolinas e indoloisoquinolinas. De igual modo, a capacidade estabilizadora de G4 de ADN dos novos compostos foi avaliada por ensaios de fusão por FRET.

No seguimento deste projeto, os compostos sintetizados neste trabalho, em particular os spirooxindóis **11b** e **12b** e a indoloquinolina **20a** serão utilizados em combinação para estudar o seu potencial sinergismo na inibição da proliferação de células cancerígenas.

Os resultados obtidos na síntese de compostos derivados de **36** (5-amino-11*H*-indolo[3,2-*c*]isoquinolino-11-carboxilato de etilo) serão utilizados no desenho e síntese de novos derivados indolisoquinolínicos.





## **5. Materiais e métodos**

Todos os reagentes foram obtidos através de fornecedores comerciais e utilizados sem quaisquer purificações adicionais. Os solventes foram igualmente obtidos através de fornecedores comerciais e destilados antes de serem utilizados, com exceção do DMF, que foi comprado já anidro e armazenado em embalagem selada adequadamente. Quando utilizados como solventes de reação, o DCM foi seco com  $\text{CaCl}_2$  e destilado; o THF foi destilado na presença de sódio e benzofenona. A cromatografia em camada fina foi realizada utilizando placas de alumínio Merck Sílica Gel 60 F<sub>254</sub> e placas de óxido de alumínio Macheray-Nagel, visualizadas por luz UV. A cromatografia em coluna foi realizada com Merck Sílica Gel (200-400 mesh ASTM). As preparativas foram realizadas com Merck Sílica Gel GF<sub>254</sub> e óxido de alumínio 60 GF<sub>254</sub> tipo neutro E sobre placas de vidro, e com placas de vidro com óxido de alumínio com indicador de fluorescência pré-preparadas ALOX-100/UV<sub>254</sub> Macheray-Nagel.

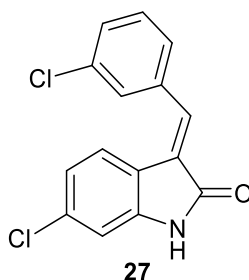
Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram obtidos através de um aparelho Bruker Fourier 300 a 300 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 75 MHz ( $^{13}\text{C}$ ). Os desvios químicos são expressos em partes por milhão (ppm), utilizando o solvente como referência interna e as constantes de acoplamento dos prótons (J) em hertz (Hz). Os dados espectrais  $^1\text{H}$  são expressos na seguinte ordem: deslocamento químico, multiplicidade, constante de acoplamento e integração.

Os ensaios LC-MS foram realizados num equipamento de cromatografia líquida (UHPLC), modelo Waters Acquity™ Ultra Performance LC (Waters ©, Ireland). O espectrômetro de massa utilizados foi do tipo triplo quadrupolo, modelo Waters Acquity™ (Waters ©, Ireland). A ionização dos compostos foi efetuada por fonte de eletrospray em modo positivo (ESI+) e negativo (ESI-), com diferentes voltagens de cone (10 a 40V). Para aquisição e processamento de dados, utilizou-se o software MassLynx® versão 4.1.

## 5.1. Síntese de spirooxindóis

### 5.1.1. Síntese do composto 6-cloro-4'-(3-clorofenil)-5'-(4-metoxifenil)-2'-fenil-2'-4'-dihidrospiro[indolina-3,3'-pirazol]2-ona (11b)

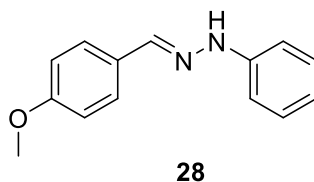
a) Síntese do intermediário 6-cloro-3-(3-clorobenzilideno)indolin-2-ona (**27**)<sup>122</sup>



Dissolveram-se 55,8 mg de 6-clorooxindole (332,94  $\mu\text{mol}$ , 1 equivalente) em 8,5 mL de etanol absoluto e adicionaram-se 41,6  $\mu\text{L}$  de 3-clorobenzaldeído (366,23  $\mu\text{mol}$ , 1,1 equivalentes) e 32,8  $\mu\text{L}$  de piperidina (332,94  $\mu\text{mol}$ , 1 equivalente). Deixou-se a mistura sob refluxo em atmosfera de azoto por 1h25m. Após esse tempo, retirou-se o balão da agitação e colocou-se no congelador para que o produto precipitasse. Depois de precipitar, filtrou-se a vácuo e lavou-se o composto com etanol frio, acabando a secagem na linha de vácuo. Obtiveram-se 36 mg de um sólido alaranjado (37% rendimento).

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz, DMSO),  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 10,40 (s, 1H, NH), 7,72 (s, 1H, Ar), 7,66 (t, 1H, Ar), 7,63 (s, 1H, CH), 7,54 (d,  $J=4,8$  Hz, 2H, Ar), 7,38 (d,  $J=8,1$  Hz, 1H, Ar) 6,94 (d,  $J=1,8$  Hz, 1H, Ar), 6,91 (s, 1H, Ar).

b) Síntese do intermediário 1-(4-metoxibenzilideno)-2-fenilhidrazina (**28**)<sup>123</sup>

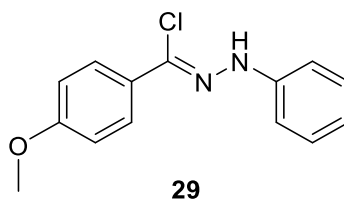


Colocou-se em agitação uma mistura de 545  $\mu\text{L}$  de fenilhidrazina (5,55 mmol, 1 equivalente) e de 670  $\mu\text{L}$  de p-metoxibenzaldeído (5,55 mmol, 1 equivalente) em 11 mL de etanol a 20%, por 4 horas, no escuro. Após esse tempo, filtrou-se o precipitado formado e lavou-se com etanol aquoso 20%

frio (60 mL). Secou-se depois o precipitado lavado a vácuo, obtendo-se 1,116 g (89% rendimento, pó rosado).

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 7,71 (s, 1H, NH), 7,64 (d,  $J=8,7$  Hz, 2H, Ar), 7,27 (dd, 2H, Ar), 7,12 (d,  $J=8,1$  Hz, 2H), 6,92 (d,  $J=8,7$  Hz, 3H, Ar), 6,86 (d,  $J=6,9$  Hz, 1H, Ar), 3,84 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

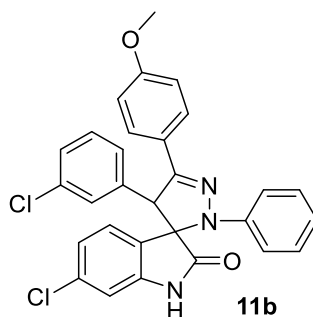
c) Síntese do intermediário cloreto de 4-metoxi-N-fenilbenzohidrazonil (**29**)<sup>126,127</sup>



Pesaram-se 179 mg de NCS (1,34 mmol, 3 equivalentes) e dissolveram-se em 1,6 mL de DCM seco. A  $0^\circ\text{C}$ , adicionaram-se 197  $\mu\text{L}$  de DMS (2,68 mmol, 6 equivalentes), gota a gota (lentamente). Depois de 15 minutos em agitação, reduziu-se a temperatura para  $-78^\circ\text{C}$  e adicionou-se 101 mg da hidrazona **28** (0,446 mmol, 1 equivalente) dissolvida em 2 mL de DCM seco. Controlou-se a temperatura durante 1 hora, não deixando subir acima de  $-78^\circ\text{C}$ . Após esse tempo, deixou-se aquecer até à temperatura ambiente, continuando em agitação em atmosfera de azoto por 3 horas. Retirou-se depois o balão da agitação e adicionou-se *brine* (10 mL) para parar a reação. Separou-se a fase orgânica da fase aquosa. Lavou-se a fase orgânica 2x10 mL de sulfito de sódio aquoso 10 mL de água. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro. Filtrou-se, evaporou-se o solvente e terminou-se a secagem na linha de vácuo. Obteve-se 102 mg de um sólido quase preto (87% rendimento).

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 7,94 (s, 1H, NH), 7,85 (m, 3H, Ar), 7,30 (dd,  $J=7,2$  Hz,  $J=2,1$  Hz, 2H, Ar), 7,16 (dd,  $J=8,7$  Hz, 1,2 Hz, 2H, Ar), 6,93 (dd,  $J=6,9$  Hz,  $J=1,8$  Hz, 1H, Ar), 6,91 (d,  $J=2,4$  Hz, 1H, Ar), 3,85 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

d) Síntese do produto 6-cloro-4'-(3-clorofenil)-5'-(4-metoxifenil)-2'-fenil-2'-4'-dihidrospiro[indolina-3,3'-pirazol]2-ona (**11b**)<sup>98</sup>

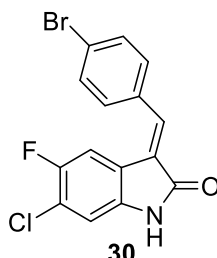


Dissolveram-se 35,7 mg da indolinona **27** (0,123 mmol, 1 equivalente) em 5 mL de DCM seco. Adicionaram-se 67 mg do cloreto de hidrazonil **29** (0,246 mmol, 2 equivalentes) e 102,8  $\mu$ L de trietilamina (0,738 mmol, 3 equivalentes). Deixou-se a mistura em agitação à temperatura ambiente em atmosfera de azoto por 23h. Parou-se a reação adicionando 10 mL de água. Separaram-se as fases orgânica e aquosa, lavando-se a aquosa 3x10 mL de acetato de etilo. Secou-se depois a fase orgânica com sulfato de sódio anidro. Fitrou-se e evaporou-se o solvente. Purificou-se o composto duas vezes por preparativa, com eluente n-hexano:AcOEt (4:1) na primeira, e eluente 100% DCM na segunda, obtendo-se 5 mg de um pó amarelo (8% rendimento totalmente puro; 46 mg, 72% rendimento antes da segunda preparativa).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 7,95 (s, 1H, NH), 7,57 (d, J=9 Hz, 2H, Ar), 7,18 (dd, J=6 Hz, J=2,1 Hz, 1H, Ar), 7,12 (t, 3H, Ar), 6,98 (s, 1H, Ar), 6,89 (dd, J=9 Hz, J=1,2 Hz, 2H, Ar), 6,86-6,82 (m, 4H, Ar), 6,81 (s, 1H, Ar), 6,65 (dd, J=9 Hz, J=1,8 Hz, 1H, Ar), 6,32 (d, J=9 Hz, 1H, Ar), 5,03 (s, 1H), 3,79 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

5.1.2. Síntese do composto 4'-(4-bromofenil)-5'-(*terc*-butil)-6-cloro-5-fluoro-2'-fenil-2',4'-dihidrospiro[indolina-3,3'-pirazol]-2-ona (**12b**)

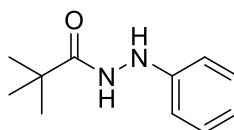
a) Síntese do intermediário 3-(4-bromobenzilideno)-6-cloro-5-fluoroindolin-2-ona (**30**)<sup>122</sup>



Dissolveram-se 50,9 mg de 6-cloro-5-fluoroindolin-2-ona (274,27  $\mu\text{mol}$ , 1 equivalente) em 8,5 mL de etanol absoluto, adicionando-se depois 55,6 mg de 4-bromobenzaldeído (301,70  $\mu\text{mol}$ , 1,1 equivalentes) e 26  $\mu\text{L}$  de piperidina (274,27  $\mu\text{mol}$ , 1 equivalente). Colocou-se a mistura sob refluxo em atmosfera de azoto durante 1h45m. Após esse tempo, retirou-se o balão e colocou-se no congelador para precipitar. Após precipitação, filtrou-se o composto a vácuo, lavando com etanol frio e colocou-se na bomba de vácuo para terminar de secar, obtendo-se uma massa de 30 mg (32% rendimento, pó alaranjado).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO),  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 10,79 (s, 1H, NH), 8,30 (d, J=9 Hz, 1H, Ar), 7,87 (m, 1H, Ar), 7,74 (m, 3H, Ar), 7,37 (d, J=9 Hz, 1H, Ar), 7,01 (d, J=6 Hz, 1H, Ar), 6,94 (d, J=6 Hz, 1H, CH).

b) Síntese do intermediário *N'*-fenilpivalohidrazida (**31**)<sup>126</sup>



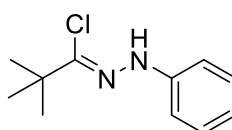
**31**

Diluíram-se 545  $\mu\text{L}$  de fenilhidrazina (5,55 mmol, 1,0 equivalentes) em 8,5 mL de THF seco; adicionou-se, de seguida, 1,65 mL de TEA (11,1 mmol, 2 equivalentes), deixando-se em agitação a 0°C por 10 minutos. Adicionou-se depois 680  $\mu\text{L}$  de cloreto trimetilacetil (6,105 mmol, 1,1 equivalentes), gota a gota, em atmosfera de  $\text{N}_2$ , deixando em agitação à temperatura ambiente por 3 horas. A reação foi parada com a adição de 5 mL de água fria e 5 mL de solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$ . Separaram-se as fases orgânica e aquosa, lavando-se a fase aquosa 3 vezes com 10 mL de AcOEt e a orgânica 2

vezes com 10 mL de solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>. Secou-se depois a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, filtrou-se a vácuo e evaporou-se o solvente, obtendo-se 1,046 g de produto (rendimento 98%, pó amarelado).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ<sub>H</sub> (ppm): 7,66 (s, 1H, O=C-NH), 7,22 (t, 2H, Ar), 6,91 (t, 1H, Ar), 6,83 (d, J=9 Hz, 2H, Ar), 5,43 (s, 1H, NH), 1,26 (s, 9H, 3CH<sub>3</sub>).

c) Síntese do intermediário cloreto de *N*-fenilpivalohidrazonil (**32**)<sup>124</sup>

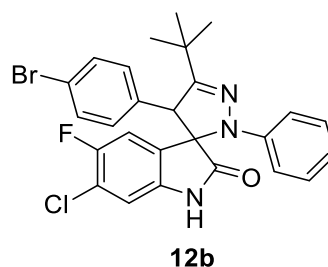


**32**

Dissolveram-se 501 mg da hidrazida **31** (2,60 mmol, 1 equivalente) em 11 mL de acetonitrilo, e adicionou-se 1,702 g de trifenilfosfina (6,50 mmol, 2,5 equivalentes), deixando-se a mistura em agitação por 30 minutos antes de adicionar 630 µL de tetracloreto de carbono (6,5 mmol, 2,5 equivalentes), gota a gota. A mistura reacional permaneceu em agitação em atmosfera de N<sub>2</sub> por 3,5 horas a temperatura ambiente, após as quais se removeu o solvente no rotavapor e depois na linha de vácuo. O crude foi depois colocado em coluna para purificação, usando como eluente 100% hexano. Recolheram-se as frações com produto, e obteve-se uma massa total de 272 mg (50% rendimento, óleo vermelho).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ<sub>H</sub> (ppm): 7,62 (s, 1H, NH), 7,26 (ddd, J=7,8 Hz, J=7,2 Hz, J=1,8 Hz, 2H, Ar), 7,05 (dd, J=8,4 Hz, J=1,2 Hz, 2H, Ar), 6,88 (ddd, J=7,5 Hz, J=6,9 Hz, J=1 Hz, 1H, Ar), 1,31 (s, 9H, 3CH<sub>3</sub>).

d) Síntese do produto 4'-(4-bromofenil)-5'-(*tert*-butil)-6-cloro-5-fluoro-2'-fenil-2',4'-dihidrospiro[indolina-3,3'-pirazol]-2-ona (**12b**)<sup>99</sup>



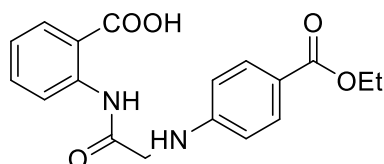
**12b**

Dissolveram-se 30 mg da indolinona **30** (850,8  $\mu\text{mol}$ , 1 equivalente) em 9 mL de DCM seco e adicionaram-se 25 mg de **32** (118,6  $\mu\text{mol}$ , 1,2 equivalentes) e 35,6  $\mu\text{L}$  de trietilamina (255,2  $\mu\text{mol}$ , 3 equivalentes). Deixou-se em agitação à temperatura ambiente em atmosfera de azoto durante 22h. Retirou-se depois o balão da agitação e adicionou-se água para parar a reação (10mL). Separaram-se as fases orgânica e aquosa, lavando a fase aquosa com 3x10 mL de acetato de etilo. Secou-se depois a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente. Purificou-se depois o crude por preparativa, usando como eluente n-hexano:AcOEt 3:1. Separaram-se 3 frações, sendo que apenas a primeira tinha o produto desejado, recolhendo-se um total de 13 mg de um sólido amarelo pálido (30% rendimento puro após preparativa; 22 mg, 49% antes da preparativa).

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz, DMSO),  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 9,69 (s, 1H, NH), 7,72-7,14 (4H, Ar), 7,10-7,04 (3H, Ar), 6,83-6,76 (3H, Ar), 6,18 (d, J=9 Hz, 1H, Ar), 4,79 (s, 1H), 1,16 (s, 9H, 3CH<sub>3</sub>).

## 5.2. Síntese de indolo[3,2-b]quinolinas<sup>115</sup>

### 5.2.1. Síntese do intermediário ácido 2-(2-((4-etoxicarbonil)fenil)amino)acetamido)benzóico (**34**)

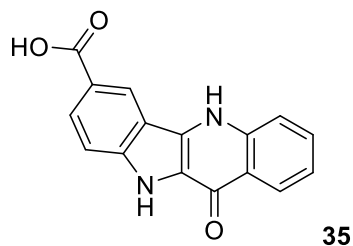


**34**

A uma solução de ácido 2-(2-bromoacetamido)benzóico (**33**, previamente sintetizado no laboratório de acordo com o procedimento descrito em <sup>115</sup>) (3,87 mmol) em DMF anidro (10 mL), adicionou-se 4-aminobenzoato de etilo (13,55 mmol, 3,5 equivalentes). A mistura reacional foi colocada em tubo de pressão e deixada em agitação em banho de óleo a 140°C por 6 horas. Ao fim de 6 horas, e após arrefecimento, adicionaram-se 100 mL de água. A mistura foi alcalinizada para pH $\approx$ 9 com uma solução de NaOH 10% (m/v), e fez-se uma extração líquido-líquido com éter etílico (5x100 mL). A fase aquosa foi recolhida e acidificada para pH $\approx$ 1 com uma solução de HCl 1M, formando-se um precipitado branco amarelado. O mesmo foi filtrado a vácuo, lavado com água e deixado a secar a vácuo (24-48h). Obteve-se uma massa de 489 mg (37% rendimento).

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO),  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 11,85 (s, NH), 8,65 (dd,  $J=8,4$  Hz,  $J=1$  Hz, 1H, Ar), 7,95 (dd,  $J=7,8$  Hz,  $J=1,8$  Hz, 1H, Ar), 7,72 (d,  $J=8,7$  Hz, 2H, Ar), 7,58 (ddd,  $J=8,1$  Hz,  $J=7,5$  Hz,  $J=1,8$  Hz, 1H, Ar), 7,23 (*broad t*,  $J=6$  Hz, NH), 7,13 (ddd,  $J=8,1$  Hz,  $J=6,9$  Hz,  $J=1,2$  Hz, 1H, Ar), 6,66 (d,  $J=8,7$  Hz, 2H, Ar), 4,21 (q,  $J=7,2$  Hz, O-CH<sub>2</sub>), 3,95 (d,  $J=6$  Hz, 2H, N-CH<sub>2</sub>), 1,25 (t,  $J=7,2$  Hz, CH<sub>3</sub>).

5.2.2. Síntese do intermediário ácido 11-oxo-10,11-dihidro-5H-indolo[3,2-b]-7-carboxílico (35)

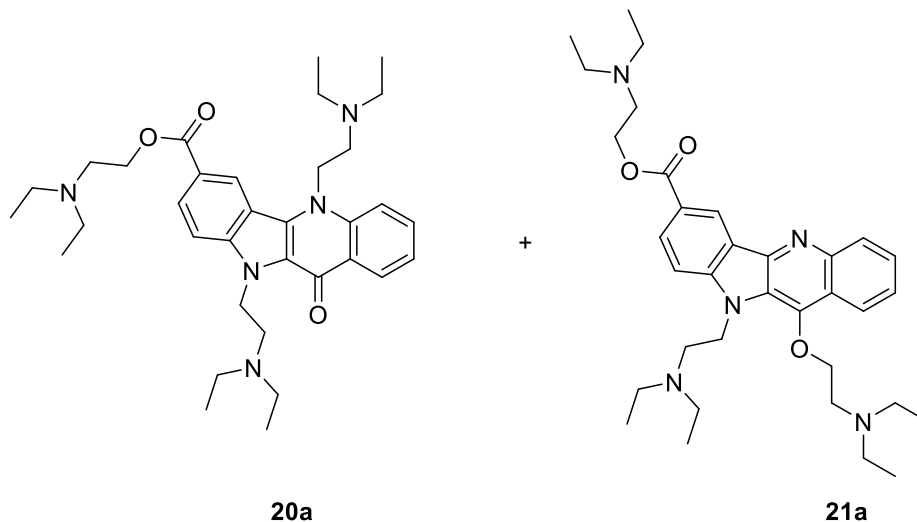


Uma mistura de ácido 2-(2-((4-etoxicarbonil)fenil)amino)acetamido)benzóico (**34**) (0,89 mmol) e ácido polifosfórico (8,96 mmol, 30 equivalentes) foi aquecida a 130°C e deixada em agitação a essa temperatura por 2 horas. Após arrefecimento, adicionaram-se 160 mL de água. A mistura foi alcalinizada até  $\text{pH}\approx 4$  com uma solução de NaOH 1M, e o precipitado formado filtrado e lavado com água. O mesmo precipitado foi dissolvido em metanol e filtrado, e a solução recolhida foi evaporada para obter o produto, 164 mg de um pó amarelo (66% de rendimento).

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO),  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 12,64 (s, NH), 12,06 (s, NH), 8,98 (s, 1H, Ar), 8,34 (d,  $J=8,1$  Hz, 1H, Ar), 8,05 (d,  $J=8,7$  Hz, 1H, Ar), 7,70 (m, 2H, Ar), 7,54 (d,  $J=8,7$  Hz, 1H, Ar), 7,31 (m, 1H, Ar).



5.2.3. Síntese dos produtos 2-(dietilamino)etil 5,10-bis(2-(dietilamino)etil)-11-oxo-10,11-dihidro-5H-indolo[3,2-b]quinolina-7-carboxilato (**20a**) e 2-(dietilamino)etil 11-(2-(dietilamino)etoxi)-10-(2-(dietilamino)etil)-10H-indolo[3,2-b]quinolina-7-carboxilato (**21a**)



A uma solução de ácido 11-oxo-10,11-dihidro-5H-indolo[3,2-b]-7 carboxílico (**35**) (0,35 mmol) em 10 mL de acetonitrilo, adicionou-se carbonato de potássio (3,50 mmol, 10 equivalentes) e 2-cloro-(*N,N*-dietil)etilamina HCl (2,10 mmol, 6 equivalentes). A mistura foi colocada em refluxo por 24 horas, após as quais se evaporou o solvente, resultando um pó verde-acastanhado após seco. A este pó adicionaram-se 15 mL de água e 30 mL de diclorometano, procedendo-se a extração com DCM (4x30 mL). A fase orgânica foi depois seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e o solvente em excesso foi evaporado, resultando um óleo avermelhado. O crude resultante foi purificado por TLC preparativa em óxido de alumínio, com eluente hexano:AcOEt (6:4). Foram isoladas as duas bandas maioritárias, em 2 preparativas consecutivas: a primeira placa preparativa sem indicador de fluorescência, obtendo-se massas de 61 mg e 51 mg de **20a** e **21a** (rendimentos 27% e 23%, respetivamente) e a segunda com indicador, sendo os produtos óleos castanhos. Os mesmos foram passados a sal diluindo o óleo numa quantidade mínima de DCM e adicionando HCL 2M em éter dietílico para obter um precipitado fino. Obtiveram-se 15 mg do produto **20a** e 8,4 mg do produto **21a** na forma de sais puros.

**20a** - <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ<sub>H</sub> (ppm): 9,03 (s, 1H, Ar), 8,65 (d, J=7,8 Hz, 1H, Ar), 8,21 (d, J=8,7 Hz, 1H, Ar), 7,75 (m, 2H, Ar), 7,65 (d, J=9 Hz, 1H, Ar), 7,38 (m, 1H, Ar), 5,07 (t, J=7,2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,91 (t, J=7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,46 (t, J=6,3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,08-2,99 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 2,92 (t, J=6,6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,76 (q, J=7,2 Hz, 8H, 4CH<sub>2</sub>), 2,675 (q, J=7,5 Hz, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 1,12-1,06 (18H, 6CH<sub>3</sub>).

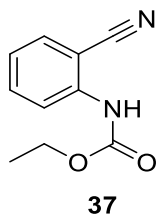
$^{13}\text{C}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 169,2 (C=O), 166,9 (O=C=O), 141,9 (C-Ar), 140,0 (C-Ar), 132,0 (C-Ar), 131,7 (CH-Ar), 128,5 (C-Ar), 126,9 (CH-Ar), 126,0 (CH-Ar), 125,3 (C-Ar), 123,3 (C-Ar), 122,0 (C-Ar), 121,7 (C-Ar), 115,2 (C-Ar), 114,7 (C-Ar), 110,7 (C-Ar), 63,2 (O-CH<sub>2</sub>), 52,9 (N-CH<sub>2</sub>), 51,3 (N-CH<sub>2</sub>), 51,1 (N-CH<sub>2</sub>), 47,9 (N-CH<sub>2</sub>), 47,8 (CH<sub>2</sub>), 47,6 (CH<sub>2</sub>), 47,5 (CH<sub>2</sub>), 42,8 (N-CH<sub>2</sub>), 12,0 (CH<sub>3</sub>), 11,6 (CH<sub>3</sub>), 11,2 (CH<sub>3</sub>).

**21a** -  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 9,22 (d,  $J=1,5$  Hz, 1H, Ar), 8,36 (d,  $J=1,5$  Hz, 1H, Ar), 8,33, (d,  $J=1,8$  Hz, 1H, Ar), 8,31 (d,  $J=0,3$  Hz, 1H, Ar), 7,71 (ddd,  $J=8,4$  Hz,  $J=6,9$  Hz,  $J=1,5$  Hz, 1H, Ar), 7,61 (ddd,  $J=8,4$  Hz,  $J=6,9$  Hz,  $J=1,2$  Hz, 1H, Ar), 7,56 (d,  $J=9$  Hz, 1H, Ar), 4,77 (t,  $J=6$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,56 (t,  $J=6$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,32 (t,  $J=6,3$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,07 (t,  $J=6,3$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,85 (t,  $J=7,5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,77 (q,  $J=6,9$  Hz, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 2,68 (q, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 2,61 (q,  $J=6,9$  Hz, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 1,15 (m, 12H, 4CH<sub>3</sub>), 0,95 (t,  $J=6,9$  Hz, 6H, 2CH<sub>3</sub>).

### 5.3. Síntese de indolo[3,2-c]isoquinolinas

#### 5.3.1. Síntese do composto 5-amino-11H-indolo[3,2-c]isoquinolino-11-carboxilato de etilo (36)<sup>131</sup>

##### a) Síntese do intermediário (2-cianofenil)carbamato de etilo (37)



Uma solução de 2-aminoarilnitrilo (10,0 mmol, 1,1814 g) em cloroformato de etilo (52,0 mmol, 5,0 mL) foi colocada em refluxo por 6 horas. O cloroformato de etilo em excesso foi depois cuidadosamente removido no evaporador rotativo. O produto resultante, 1,619 g de um pó branco, foi colocado a secar em linha de vácuo. (Rendimento 85%)

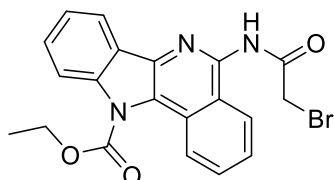
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 8,24 (d,  $J=8,4$  Hz, 1H, Ar), 7,61-7,54 (m, 2H, Ar), 7,11 (ddd,  $J=1$  Hz,  $J=7,5$  Hz,  $J=7,8$  Hz, 1H, Ar), 4,27 (q,  $J=7,2$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,34 (t,  $J=7,2$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).



LC-MS (ESI+)  $m/z$   $C_{18}H_{15}N_3O_2$ : 306  $[M+H]^+$

**36PS** –  $^1H$  NMR (300 MHz, DMSO),  $\delta_H$  (ppm): 11,60 (s, 1H, NH), 8,31 (t,  $J=9$  Hz, 2H, Ar), 7,95 (d,  $J=7,8$  Hz, 1H, Ar), 7,79 (ddd,  $J=7,2$  Hz,  $J=7,2$  Hz,  $J=1$  Hz), 7,53 (m, 2H, Ar), 7,32, (ddd,  $J=6,9$  Hz,  $J=7,2$  Hz,  $J=1,2$  Hz), 7,13 (ddd,  $J=8,1$  Hz,  $J=7,2$  Hz,  $J=1$  Hz, 1H, Ar), 6,42 (s, 2H,  $NH_2$ )

### 5.3.2. Síntese do composto 5-(2-bromoacetamido)-11H-indolo[3,2-c]isoquinolina-11-carboxilato de etilo (40)

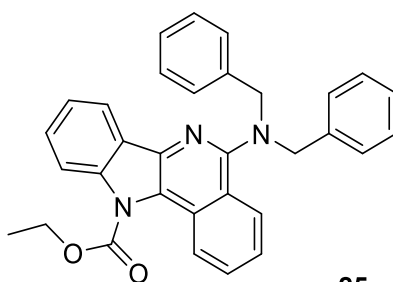


**40**

A uma solução de 5-amino-11H-indolo[3,2-c]isoquinolino-11-carboxilato de etilo (**36**) (1 equivalente, 100 mg), no solvente indicado na tabela 4 (secção 3.3.2.), adicionou-se DIPEA (quando aplicável, número de equivalentes indicado na tabela 2), e, depois, brometo de bromoacetilo (número de equivalentes indicado na tabela 2), gota a gota a 0°C. A mistura reacional foi deixada em agitação, sob atmosfera de azoto, à temperatura e pelo tempo indicados na tabela 4. Quando foi usado DMF, realizou-se extração da fase orgânica com 3x10 mL de AcOEt, lavando-a com 3x10 mL de água. Secou-se depois a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, evaporando-se depois o solvente em excesso. Quando não foi utilizado DMF, evaporou-se apenas o solvente em excesso e secou-se o crude resultante a vácuo. O crude foi purificado por coluna cromatográfica (sistema de eluente hexano:AcOEt 7:3→6:4→2:8) (verificar tabela 4 para rendimentos obtidos).

$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO),  $\delta_H$  (ppm): 8,62 (d,  $J=9,6$  Hz, 1H, Ar), 8,34 (dd,  $J=8,4$  Hz,  $J=7,5$  Hz, 2H, Ar), 8,27-9,15 (m, 2H, Ar), 8,01 (ddd,  $J=7,8$  Hz,  $J=6,9$  Hz,  $J=1$  Hz, 1H, Ar), 7,80 (ddd,  $J=7,5$  Hz,  $J=7,2$  Hz,  $J=1$  Hz, 1H, Ar), 7,63 (t,  $J=8,1$  Hz, 1H, Ar), 4,66 (q,  $J=7,2$  Hz, 2H,  $CH_2$ ), 4,03 (s, 2H), 1,43 (t,  $J=6,9$  Hz, 3H,  $CH_3$ )

### 5.3.3. Síntese do produto 5-(dibenzilamino)-11H-indolo[3,2-c]isoquinolina-11-carboxilato de etilo (25)



**25**

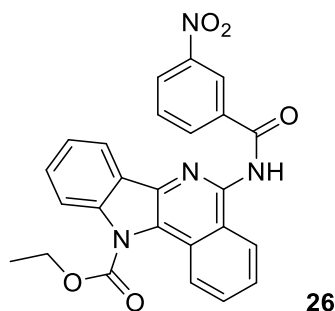
Dissolveram-se 99,2 mg de 5-amino-11*H*-indolo[3,2-*c*]isoquinolino-11-carboxilato de etilo em 6 mL de THF seco e adicionaram-se, aproximadamente, 0,070 mL de DIPEA à solução (1,3 equivalentes). Após 10 minutos, adicionaram-se, aproximadamente, 0,050 mL de brometo de benzilo (1,3 equivalentes), a 0°C, gota a gota, sob atmosfera de azoto. De seguida, colocou-se a mistura sob refluxo. Após 22:30h, retirou-se o balão do aquecimento, secou-se o crude, e purificou-se por coluna cromatográfica, utilizando sistema de eluente hexano:AcOEt (9:1), obtendo-se o produto sob a forma de um pó amarelo claro após seco (129 mg, 81% de rendimento).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO), δ<sub>H</sub> (ppm): 8,52 (d, J=7,8 Hz, 1H, Ar), 8,39 (d, J=8,4 Hz, 1H, Ar), 8,18 (d, J=8,4 Hz, 1H, Ar), 8,04 (d, J=7,5 Hz, 1H, Ar), 7,80 (ddd, J=8,4 Hz, J=6,9 Hz, J=1,2 Hz, 1H, Ar), 7,66 (ddd, J=8,4 Hz, J=6,9 Hz, J=1,2 Hz, 1H, Ar), 7,54 (ddd, J=8,1 Hz, J=7,2 Hz, J=1,5 Hz, 1H, Ar), 7,47-7,41 (m, 5H, Ar), 7,29 (ddd, J=7,2 Hz, J=5,4 Hz, J=1,8 Hz, 4H, Ar), 7,19 (ddd, J=8,1 Hz, J=6,3 Hz, J=2,4 Hz, 2H, Ar), 4,66 (s, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 4,57 (q, J=6,9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,43 (t, J=6,9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (300 MHz, DMSO), δ<sub>C</sub> (ppm): 158,49 (C-N), 152,01 (C=O), 139,11 (C-Ar), 138,70 (C-Ar), 135,62 (C-Ar), 129,64 (CH-Ar), 128,53 (C-Ar), 128,30 (CH-Ar), 127,91 (CH-Ar), 127,60 (CH-Ar), 126,89 (CH-Ar), 126,11 (CH-Ar), 126,09 (CH-Ar), 125,54 (C-Ar), 124,89 (CH-Ar), 123,81 (CH-Ar), 123,33 (C-Ar), 121,27 (C-Ar), 119,35 (C-Ar), 115,55 (CH-Ar), 64,00 (CH<sub>2</sub>), 55,74 (2CH<sub>2</sub>), 14,06 (CH<sub>3</sub>).

LC-MS (ESI+) *m/z* C<sub>32</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>: 486 [M+H]<sup>+</sup>

#### 5.3.4. Síntese do produto 5-(3-nitrobenzamido)-11*H*-indolo[3,2-*c*]isoquinolina-11-carboxilato de etilo (26)



Dissolveram-se 99,2 mg de 5-amino-11*H*-indolo[3,2-*c*]isoquinolino-11-carboxilato de etilo em 8 mL de THF seco e adicionou-se a essa solução piridina (1,2 equivalentes). Após 10 minutos de agitação, adicionaram-se 73,5 mg de cloreto de 3-nitrobenzoílo em 1 mL de THF seco, a 0°C, gota a gota, sob atmosfera de azoto. De seguida, colocou-se a mistura reacional sob refluxo. Após 24 horas de refluxo, evaporou-se o solvente em excesso e purificou-se o crude duas vezes por coluna cromatográfica, usando sistema de eluente hexano:AcOEt (9:1 inicialmente, depois

8:2, 1:1, e 100% AcOEt), obtendo-se o produto sob a forma de um pó amarelo claro após seco (8,3 mg, rendimento 6%).

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO),  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 11,59 (s, 1H, NH), 8,98 (d,  $J=2,1$  Hz, 1H, Ar), 8,60-8,48 (m, 3H, Ar), 8,28 (d,  $J=8,4$  Hz, 1H, Ar), 8,24 (d,  $J=9,3$  Hz, 1H, Ar), 8,22 (d,  $J=9,3$ , 1H, Ar), 7,91 (dd,  $J=8,1$  Hz,  $J=7,8$  Hz, 2H, Ar), 7,72 (dd,  $J=7,5$ ,  $J=1,2$  Hz, 1H, Ar), 7,65 (dd,  $J=8,4$  Hz,  $J=7,2$  Hz, 1H, Ar), 7,53 (ddd,  $J=7,5$  Hz,  $J=7,5$  Hz,  $J=1$  Hz, 1H, Ar), 4,64 (q,  $J=7,2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1,46 (t,  $J=6,9$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (300 MHz, DMSO),  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 165,14 (N-C=O), 151,97 (O-C=O), 148,32 (C-NH<sub>2</sub>), 147,93 (C-Ar), 139,21 (C-Ar), 136,33 (C-Ar), 135,13 (C-Ar), 134,44 (CH-Ar), 130,39 (CH-Ar), 130,24 (CH-Ar), 128,24 (CH-Ar), 127,26 (C-Ar), 127,04 (CH-Ar), 126,93 (CH-Ar), 126,68 (CH-Ar), 126,12 (C-Ar), 124,98 (C-Ar), 124,74 (CH-Ar), 124,22 (CH-Ar), 123,62 (C-Ar), 122,91 (CH-Ar), 119,53 (CH-Ar), 115,56 (CH-Ar), 64,45 ( $\text{CH}_2$ ), 14,03 ( $\text{CH}_3$ ).

LC-MS (ESI+)  $m/z$  C<sub>25</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>: 455 [M+H]<sup>+</sup>

## 5.4. Ensaios de fusão por FRET

### 5.4.1. Preparação de soluções

As soluções de oligonucleótidos podem ser preparadas diluindo o oligonucleótido liofilizado em água (*HPLC grade*), conforme indicações do boletim do fornecedor e ser depois armazenadas a -20°C. Os oligonucleótidos marcados têm fluoróforo doador FAM (6-carboxifluoresceína) e o fluoróforo aceitador TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina): KRAS21R (5'-FAM-AGGGCGGTGTGGGAAGAGGGA-TAMRA-3'); F21T (5'-[FAM]-GGGTTAGGGTAGGGTTAGGG-[TAMRA]-3'); T-Loop (5'-FAM-TATAGCTATATTTTTTATAGCTATA-TAMRA-3'). Para os ensaios desta tese, as soluções a 20  $\mu\text{M}$  de cada oligonucleótido já estavam preparadas, sendo, portanto, necessário apenas preparar as soluções a 0,4  $\mu\text{M}$  em tampão FRET, diluído até esta concentração previamente, a partir de uma solução *stock* (60 mM KCl, cacodilato de potássio, pH 7,4).

Para formação dos G4 (anelação), colocaram-se numa placa de aquecimento (previamente programada para 90-95°C) os *ependorfs* com as soluções a 0,4  $\mu\text{M}$  durante 10 minutos. Desligou-se depois a placa e deixou-se arrefecer lentamente até temperatura ambiente (aproximadamente 2 horas).

Para a preparação das soluções-mãe de cada composto a testar, pesou-se a quantidade necessária de cada um para resultar uma solução de 100  $\mu\text{L}$  a 50 mM, e dissolveu-se em DMSO (apropriado para ensaios biológicos).

Para preparar as soluções para ensaios a 5  $\mu\text{M}$ :

- a) Diluíram-se 10  $\mu\text{L}$  da solução a 50 mM em 490  $\mu\text{L}$  de água (HPLC grade), resultando uma solução de 1 mM;
- b) Diluíram-se 40  $\mu\text{L}$  da solução de 1 mM em 360  $\mu\text{L}$  de tampão FRET, resultando uma solução a 100  $\mu\text{M}$ ;
- c) Diluíram-se 100  $\mu\text{L}$  da solução a 100  $\mu\text{M}$  em 900  $\mu\text{L}$  de tampão FRET, resultando uma solução a 10  $\mu\text{M}$ .

Para preparar as soluções para ensaios a 1  $\mu\text{M}$ :

- a) Diluíram-se 100  $\mu\text{L}$  da solução a 10  $\mu\text{M}$  em 400  $\mu\text{L}$  de tampão FRET, resultando uma solução a 2  $\mu\text{M}$ .

#### 5.4.2. Preparação das placas de 96 poços

Utilizaram-se duas placas, sendo que uma tinha os ensaios com os oligonucleótidos F21T e *KRAS*, e a outra com *T-loop*.

Pipetou-se para cada poço 50  $\mu\text{L}$  da solução de G4 a 0,4  $\mu\text{M}$ . De seguida, pipetou-se 50  $\mu\text{L}$  de tampão (serve como branco) ou do composto a testar, a 5  $\mu\text{M}$  ou a 1  $\mu\text{M}$  para cada poço da linha correspondente, sendo que para cada concentração de cada composto testado, o ensaio foi realizado em triplicado. As placas foram depois seladas com a película apropriada.

#### 5.4.3. Leitura de placas no RT-PCR

As leituras de fluorescência foram realizados num aparelho DNA Engine Opticon, feitas em incrementos de 0,5°C, num intervalo de 30-100°C, com temperatura constante mantida por 30 segundos antes de cada leitura para garantir valores estáveis. A análise dos dados finais foi realizada utilizando o *software* GraphPad Prism 8.0, utilizando-se a função de *curve-fitting* para o cálculo dos valores de  $\Delta T_m$  e desvios-padrão associados.





## 6. Referências

1. Levine AJ. p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell*. 1997;88(3):323-331. doi:10.1016/S0092-8674(00)81871-1
2. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature*. 1991;351(6326):453-456. doi:10.1038/351453a0
3. Lane DP. The Guardian of the Genome: p53. *Nature*. 1992;358:15-16.
4. Levine AJ. p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery. *Nat Rev Cancer*. 2020;20(8):471-480. doi:10.1038/s41568-020-0262-1
5. Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, et al. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature*. 1994;372(6508):773-776. doi:10.1038/372773a0
6. Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, et al. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature*. 1996;379(6560):88-91. doi:10.1038/379088a0
7. Blagih J, Buck MD, Vousden KH. P53, Cancer and the Immune Response. *J Cell Sci*. 2020;133(5). doi:10.1242/jcs.237453
8. Mijit M, Caracciolo V, Melillo A, Amicarelli F, Giordano A. Role of p53 in the Regulation of Cellular Senescence. *Biomolecules*. 2020;10(3):1-16. doi:10.3390/biom10030420
9. Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, Stark GR. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(18):8493-8497. doi:10.1073/pnas.92.18.8493
10. Duffy MJ, Synnott NC, O'Grady S, Crown J. Targeting p53 for the treatment of cancer. *Semin Cancer Biol*. 2020;(July 30):1-10. doi:10.1016/j.semcancer.2020.07.005
11. Levine AJ. Targeting Therapies for the p53 Protein in Cancer Treatments. *Annu Rev Cancer Biol*. 2019;3(1):21-34. doi:10.1146/annurev-cancerbio-030518-055455
12. Kuribayashi K, El-Deiry WS. Regulation of Programmed Cell Death by the P53 Pathway. In: Khosravi-Far R, White E, eds. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol 615. Springer; 2008:201-221. doi:10.1007/978-1-4020-6554-5\_10
13. Merkel O, Taylor N, Prutsch N, et al. When the guardian sleeps: Reactivation of the p53 pathway in cancer. *Mutat Res Mutat Res*. 2017;773:1-13. doi:10.1016/j.mrrev.2017.02.003
14. Kussie PH, Gorina S, Marechal V, et al. Structure of the MDM2 Oncoprotein Bound to the p53 Tumor Suppressor Transactivation Domain. *Science (80- )*. 1993;274(5289):948-953. doi:10.1126/science.274.5289.948
15. Blommers MJJ, Fendrich G, García-Echeverría C, Chêne P. On the Interaction Between p53 and MDM2: Transfer NOE Study of a p53-Derived Peptide Ligated to MDM2. *J Am Chem Soc*. 1997;119(14):3425-3426. doi:10.1021/ja9633171
16. Cross B, Chen L, Cheng Q, Li B, Yuan Z, Chen J. Inhibition of p53 DNA Binding Function by the MDM2 Protein Acidic Domain. *J Biol Chem*. 2011;286(18):16018-16029. doi:10.1074/jbc.M111.228981
17. Poyurovsky M V, Katz C, Laptenko O, et al. The C terminus of p53 binds the N-terminal domain of MDM2. *Nat Struct Mol Biol*. 2010;17:982-989.

- doi:10.1038/nsmb.1872
18. Shvarts A, Steegenga WT, Riteco N, et al. MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. *EMBO J*. 1996;15(19):5349-5357. doi:10.1002/j.1460-2075.1996.tb00919.x
  19. Karni-Schmidt O, Lokshin M, Prives C. The Roles of MDM2 and MDMX in Cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2016;11:617-644. doi:10.1146/annurev-pathol-012414-040349
  20. Marine J-C, Jochemsen AG. MDMX (MDM4), a Promising Target for p53 Reactivation Therapy and Beyond. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(7):a026237. doi:10.1101/cshperspect.a026237
  21. McCoy MA, Gesell JJ, Senior MM, Wyss DF. Flexible lid to the p53-binding domain of human Mdm2: Implications for p53 regulation. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(4):1645-1648. doi:10.1073/pnas.0334477100
  22. Popowicz G, Czarna A, Holak T. Structure of the human Mdmx protein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Cell Cycle*. 2008;7(15):2441-2443. doi:10.4161/cc.6365
  23. Tanimura S, Ohtsuka S, Mitsui K, Shirouzu K, Yoshimura A, Ohtsubo M. MDM2 interacts with MDMX through their RING finger domains. *FEBS Lett*. 1999;447:5-9. doi:10.1016/S0014-5793(99)00254-9
  24. Linares LK, Hengstermann A, Ciechanover A, Müller S, Scheffner M. HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(21):12009-12014. doi:10.1073/pnas.2030930100
  25. Bista M, Petrovich M, Fersht AR. MDMX contains an autoinhibitory sequence element. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110(44):17814-17819. doi:10.1073/pnas.1317398110
  26. Mairinger FD, Walter RF, Ting S, et al. Mdm2 protein expression is strongly associated with survival in malignant pleural mesothelioma. *Futur Oncol*. 2014;10(6):995-1005. doi:10.2217/fon.13.261
  27. Adrian M, Heddi B, Phan AT. NMR spectroscopy of G-quadruplexes. *Methods*. 2012;57(1):11-24. doi:10.1016/j.ymeth.2012.05.003
  28. Carvalho J, Mergny J, Salgado GF, Queiroz JA, Cruz C. G-quadruplex , Friend or Foe : The Role of the G-quartet in Anticancer Strategies. *Trends Mol Med*. 2020:1-14. doi:10.1016/j.molmed.2020.05.002
  29. Asamitsu S, Bando T, Sugiyama H. Ligand Design to Acquire Specificity to Intended G-Quadruplex Structures. *Chem Eur J*. 2019;25:417-430. doi:10.1002/chem.201802691
  30. Moye AL, Porter KC, Cohen SB, et al. Telomeric G-quadruplexes are a substrate and site of localization for human telomerase. *Nat Commun*. 2015;(May). doi:10.1038/ncomms8643
  31. Wu G, Xing Z, Tran EJ, Yang D. DDX5 helicase resolves G-quadruplex and is involved in MYC gene transcriptional activation. *PNAS*. 2019;116(41):20453-20461. doi:10.1073/pnas.1909047116
  32. Jodoin R, Carrier JC, Rivard N, Bisailon M, Perreault J. G-quadruplex located in the 5' UTR of the BAG-1 mRNA affects both its cap-dependent and cap-independent translation through global secondary structure maintenance. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(19):10247-10266. doi:10.1093/nar/gkz777
  33. Prorok P, Artufel M, Aze A, et al. Involvement of G-quadruplex regions in mammalian replication origin activity. *Nat Commun*. 2019;10(3274):1-16.

- doi:10.1038/s41467-019-11104-0
34. Jafri MA, Ansari SA, Alqahtani MH, Shay JW. Roles of telomeres and telomerase in cancer , and advances in telomerase- targeted therapies. *Genome Med.* 2016. doi:10.1186/s13073-016-0324-x
  35. Yuan X, Dai M, Xu D. Telomere-related Markers for Cancer. *Curr Top Med Chem.* 2020;20(6):410-432. doi:10.2174/1568026620666200106145340
  36. Shay JW. Are Short Telomeres Predictive of Advanced Cancer? *Cancer Discov.* 2013;3(10):1096-1099. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0506
  37. Sun D, Thompson B, Cathers BE, et al. Inhibition of human telomerase by a G-Quadruplex-Interactive compound. *J Med Chem.* 1997;40(14):2113-2116. doi:10.1021/jm970199z
  38. Fernandes SG, Dsouza R, Pandya G, et al. Role of Telomeres and Telomeric Proteins in Human Malignancies and Their Therapeutic Potential. *Cancers (Basel).* 2020;12(7):1901. doi:10.3390/cancers12071901
  39. Chambers VS, Marsico G, Boutell JM, Di Antonio M, Smith GP, Balasubramanian S. High-throughput sequencing of DNA G-quadruplex structures in the human genome. *Nat Biotechnol.* 2015;33(8):877-881. doi:10.1038/nbt.3295
  40. Huppert JL, Balasubramanian S. G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(2):406-413. doi:10.1093/nar/gkl1057
  41. Eddy J, Maizels N. Conserved elements with potential to form polymorphic G-quadruplex structures in the first intron of human genes. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(4):1321-1333. doi:10.1093/nar/gkm1138
  42. Huppert JL, Bugaut A, Kumari S, Balasubramanian S. G-quadruplexes: the beginning and end of UTRs. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(19):6260-6268. doi:10.1093/nar/gkn511
  43. Eddy J, Maizels N. Gene function correlates with potential for G4 DNA formation in the human genome. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(14):3887-3896. doi:10.1093/nar/gkl529
  44. Francisco AP, Paulo A. Oncogene Expression Modulation in Cancer Cell Lines by DNA G-Quadruplex-Interactive Small Molecules. *Curr Med Chem.* 2017;24:4873-4904. doi:10.2174/0929867323666160829145055
  45. Rigo R, Palumbo M, Sissi C, Montesarchio D. G-quadruplexes in human promoters: A challenge for therapeutic applications. *BBA - Gen Subj.* 2017;1861(5):1399-1413. doi:10.1016/j.bbagen.2016.12.024
  46. Kumari S, Bugaut A, Huppert JL, Balasubramanian S. An RNA G-quadruplex in the 5' UTR of the NRAS proto-oncogene modulates translation. *Nat Chem Biol.* 2007;3(4):218-221. doi:10.1038/nchembio864
  47. Arora A, Dutkiewicz M, Scaria V, Hariharan M, Maiti S, Kurreck J. Inhibition of translation in living eukaryotic cells by an RNA G-quadruplex motif. *RNA.* 2008;14:1290-1296. doi:10.1261/rna.1001708.Ramos
  48. Wolfe AL, Singh K, Zhong Y, et al. RNA G-quadruplexes cause eIF4A-dependent oncogene translation in cancer. *Nature.* 2014;513:65-70. doi:10.1038/nature13485
  49. Wheelhouse RT, Sun D, Han H, Han FX, Hurley LH. Cationic porphyrins as telomerase inhibitors: The interaction of tetra- (N-methyl-4-pyridyl)porphine with quadruplex DNA [1]. *J Am Chem Soc.* 1998;120(13):3261-3262. doi:10.1021/ja973792e

50. Shin-ya K, Wierzba K, Matsuo K, et al. Telomestatin, a Novel Telomerase Inhibitor from *Streptomyces anulatus*. *J Am Chem Soc.* 2001;123(6):1262-1263. doi:10.1021/ja005780q
51. Kim M-Y, Vankayalapati H, Shin-ya K, Wierzba K, Hurley LH. Telomestatin, a Potent Telomerase Inhibitor That Interacts Quite Specifically with the Human Telomeric Intramolecular G-Quadruplex. *J Am Chem Soc.* 2002;124(10):2098-2099. doi:10.1021/ja017308q
52. Adhikary S, Eilers M. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(8):635-645. doi:10.1038/nrm1703
53. Dang C V. MYC on the path to cancer. *Cell.* 2012;149(1):22-35. doi:10.1016/j.cell.2012.03.003
54. Siddiqui-Jain A, Grand CL, Bearss DJ, Hurley LH. Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99(18):11593-11598. doi:10.1073/pnas.182256799
55. Cox AD, Fesik SW, Kimmelman AC, Luo J, Der CJ. Drugging the undruggable RAS: Mission Possible? *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(11):828-851. doi:10.1038/nrd4389
56. Cogoi S, Paramasivam M, Filichev V, Géci I, Pedersen EB, Xodo LE. Identification of a New G-Quadruplex Motif in the KRAS Promoter and Design of Pyrene-Modified G4-Decoys with Antiproliferative Activity in Pancreatic Cancer Cells. *J Med Chem.* 2009;52(2):564-568. doi:10.1021/jm800874t
57. Paramasivam M, Cogoi S, Xodo LE. Primer extension reactions as a tool to uncover folding motifs within complex G-rich sequences: analysis of the human KRAS NHE. *Chem Commun.* 2011;47(17):4965. doi:10.1039/c1cc10269a
58. Cogoi S, Paramasivam M, Spolaore B, Xodo LE. Structural polymorphism within a regulatory element of the human KRAS promoter: formation of G4-DNA recognized by nuclear proteins. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(11):3765-3780. doi:10.1093/nar/gkn120
59. Zell J, Rota Sperti F, Britton S, Monchaud D. DNA folds threaten genetic stability and can be leveraged for chemotherapy. *RSC Chem Biol.* 2021. doi:10.1039/D0CB00151A
60. Arena G, Riscal R, Linares LK, Cam L Le, Cam L Le. MDM2 controls gene expression independently of p53 in both normal and cancer cells. *Cell Death Differ.* 2018;25:1533-1535. doi:10.1038/s41418-018-0156-x
61. Arena G, Cisse MY, Pyrdziak S, Ricchetti M, Linares LK, Cam L Le. Mitochondrial MDM2 Regulates Respiratory Complex I Activity Independently of p53 Article Mitochondrial MDM2 Regulates Respiratory Complex I Activity. *Mol Cell.* 2018;69:594-609. doi:10.1016/j.molcel.2018.01.023
62. Xiong S, Pant V, Zhang Y, Aryal NK, You MJ, Kusewitt D. The p53 inhibitor Mdm4 cooperates with multiple genetic lesions in tumorigenesis. *J Pathol.* 2017;241:501-510. doi:10.1002/path.4854
63. Anifowose A, Agbowuro AA, Yang X, Wang B. Anticancer strategies by upregulating p53 through inhibition of its ubiquitination by MDM2. *Med Chem Res.* 2020;29(7):1105-1121. doi:10.1007/s00044-020-02574-9
64. Silva JL, Lima CGS, Rangel LP, et al. Recent Synthetic Approaches towards Small Molecule Reactivators of p53. *Biomolecules.* 2020;10(4):635. doi:10.3390/biom10040635

65. Zhou L-M, Qu R-Y, Yang G-F. An overview of spirooxindole as a promising scaffold for novel drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2020;15(5):603-625. doi:10.1080/17460441.2020.1733526
66. Fay MM, Lyons SM, Ivanov P. RNA G-quadruplexes in biology: principles and molecular mechanisms. *J Mol Biol.* 2018;429(14):2127-2147. doi:10.1016/j.jmb.2017.05.017.RNA
67. Neidle S. Quadruplex nucleic acids as targets for anticancer therapeutics. *Nat Rev Chem.* 2017;1:1-10. doi:10.1038/s41570-017-0041
68. Hänsel-Hertsch R, Antonio M Di, Balasubramanian S. DNA G-quadruplexes in the human genome: detection, function and therapeutic potential. *Nat Publ Gr.* 2017;18:279-284. doi:10.1038/nrm.2017.3
69. Skalniak L, Surmiak E, Holak TA. A therapeutic patent overview of MDM2/X-targeted therapies (2014–2018). *Expert Opin Ther Pat.* 2019;29(3):151-170. doi:10.1080/13543776.2019.1582645
70. Liu Y, Wang X, Wang G, Yang Y, Yuan Y, Ouyang L. The past, present and future of potential small-molecule drugs targeting p53-MDM2/MDMX for cancer therapy. *Eur J Med Chem.* 2019;176:92-104. doi:10.1016/j.ejmech.2019.05.018
71. Graves B, Thompson T, Xia M, et al. Activation of the p53 pathway by small-molecule-induced MDM2 and MDMX dimerization. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109(29):11788-11793. doi:10.1073/pnas.1203789109
72. Blackburn TJ, Ahmed S, Coxon CR, et al. Diaryl- and triaryl-pyrrole derivatives: inhibitors of the MDM2–p53 and MDMX–p53 protein–protein interactions. *Medchemcomm.* 2013;4(9):1297. doi:10.1039/c3md00161j
73. Soares J, Raimundo L, Pereira NAL, et al. A tryptophanol-derived oxazolopiperidone lactam is cytotoxic against tumors via inhibition of p53 interaction with murine double minute proteins. *Pharmacol Res.* 2015;95-96:42-52. doi:10.1016/j.phrs.2015.03.006
74. Soares J, Raimundo L, Pereira NAL, et al. Reactivation of wild-type and mutant p53 by tryptophan-derived oxazoloisindolinone SLMP53-1, a novel anticancer small-molecule. *Oncotarget.* 2016;7(4):4326-4343. doi:10.18632/oncotarget.6775
75. Gomes AS, Ramos H, Gomes S, et al. SLMP53-1 interacts with wild-type and mutant p53 DNA-binding domain and reactivates multiple hotspot mutations. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2020;1864(1):129440. doi:10.1016/j.bbagen.2019.129440
76. Liou G-Y, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res.* 2010;44(5):479-496. doi:10.3109/10715761003667554
77. Ramos H, Calheiros J, Almeida J, et al. SLMP53-1 Inhibits Tumor Cell Growth through Regulation of Glucose Metabolism and Angiogenesis in a P53-Dependent Manner. *Int J Mol Sci.* 2020;21(2):596. doi:10.3390/ijms21020596
78. Soares J, Espadinha M, Raimundo L, et al. DIMP53-1: a novel small-molecule dual inhibitor of p53 – MDM2/X interactions with multifunctional p53-dependent anticancer properties. *Mol Oncol.* 2017;11:612-627. doi:10.1002/1878-0261.12051
79. Barcherini V, Almeida J, Lopes EA, et al. Potency and Selectivity Optimization of Tryptophanol-Derived Oxazoloisindolinones: Novel p53 Activators in Human Colorectal Cancer. *ChemMedChem.* 2020;(Figure 1):1-10. doi:10.1002/cmdc.202000522
80. Ding K, Lu Y, Nikolovska-Coleska Z, et al. Structure-based design of potent non-

- peptide MDM2 inhibitors. *J Am Chem Soc.* 2005;127(29):10130-10131. doi:10.1021/ja051147z
81. Ding K, Lu Y, Nikolovska-Coleska Z, et al. Structure-Based Design of Spirooxindoles as Potent, Specific Small-Molecule Inhibitors of the MDM2–p53 Interaction. *J Med Chem.* 2006;49(12):3432-3435. doi:10.1021/jm051122a
  82. Shangary S, Qin D, McEachern D, et al. Temporal activation of p53 by a specific MDM2 inhibitor is selectively toxic to tumors and leads to complete tumor growth inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(10):3933-3938. doi:10.1073/pnas.0708917105
  83. Zhao Y, Liu L, Sun W, et al. Diastereomeric spirooxindoles as highly potent and efficacious MDM2 inhibitors. *J Am Chem Soc.* 2013;135(19):7223-7234. doi:10.1021/ja3125417
  84. Zhao Y, Yu S, Sun W, et al. A potent small-molecule inhibitor of the MDM2-p53 interaction (MI-888) achieved complete and durable tumor regression in mice. *J Med Chem.* 2013;56(13):5553-5561. doi:10.1021/jm4005708
  85. Wang S, Sun W, Zhao Y, et al. SAR405838: An optimized inhibitor of MDM2-p53 interaction that induces complete and durable tumor regression. *Cancer Res.* 2014;74(20):5855-5865. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0799
  86. Hoffman-Luca CG, Yang C-Y, Lu J, et al. Significant Differences in the Development of Acquired Resistance to the MDM2 Inhibitor SAR405838 between In Vitro and In Vivo Drug Treatment. Gartel AL, ed. *PLoS One.* 2015;10(6):e0128807. doi:10.1371/journal.pone.0128807
  87. Kim M, Ma DJ, Calligaris D, et al. Efficacy of the MDM2 inhibitor SAR405838 in glioblastoma is limited by poor distribution across the blood–brain barrier. *Mol Cancer Ther.* 2018;17(9):1893-1901. doi:10.1158/1535-7163.MCT-17-0600
  88. de Jonge M, de Weger VA, Dickson MA, et al. A phase I study of SAR405838, a novel human double minute 2 (HDM2) antagonist, in patients with solid tumours. *Eur J Cancer.* 2017;76:144-151. doi:10.1016/j.ejca.2017.02.005
  89. Aguilar A, Sun W, Liu L, et al. Design of Chemically Stable, Potent, and Efficacious MDM2 Inhibitors That Exploit the Retro-Mannich Ring-Opening-Cyclization Reaction Mechanism in Spiro-oxindoles. *J Med Chem.* 2014;57(24):10486-10498. doi:10.1021/jm501541j
  90. Zhang Z, Ding Q, Liu J, et al. Discovery of potent and selective spiroindolinone MDM2 inhibitor, RO8994, for cancer therapy. *Bioorg Med Chem.* 2014;22(15):4001-4009. doi:10.1016/j.bmc.2014.05.072
  91. Shu L, Li Z, Gu C, Fishlock D. Synthesis of a Spiroindolinone Pyrrolidinecarboxamide MDM2 Antagonist. *Org Process Res Dev.* 2013;17:247-256. doi:10.1021/op3003213
  92. Zhang Z, Chu X, Liu J, et al. Discovery of Potent and Orally Active p53-MDM2 Inhibitors RO5353 and RO2468 for Potential Clinical Development. *ACS Med Chem Lett.* 2014;5:124-127. doi:10.1021/ml400359z
  93. Monteiro Â, Gonçalves LM, Santos MMM. Synthesis of novel spiropyrazoline oxindoles and evaluation of cytotoxicity in cancer cell lines. *Eur J Med Chem.* 2014;79:266-272. doi:10.1016/j.ejmech.2014.04.023
  94. Kaur R, Dwivedi AR, Kumar B, Kumar V. Recent Developments on 1, 2, 4-Triazole Nucleus in Anticancer Compounds: A Review. *Anticancer Agents Med Chem.* 2016;16:465-489. doi:10.2174/1871520615666150819121106
  95. Kaur M, Singh M, Chadha N, Silakari O. Oxindole: A chemical prism carrying

- plethora of therapeutic benefits. *Eur J Med Chem.* 2016;123:858-894. doi:10.1016/j.ejmech.2016.08.011
96. Ribeiro CJA, Nunes RC, Amaral JD, et al. Spirotriazoline oxindoles: A novel chemical scaffold with in vitro anticancer properties. *Eur J Med Chem.* 2017;140:494-509. doi:10.1016/j.ejmech.2017.09.037
  97. Ribeiro CJA, Amaral JD, Rodrigues CMP, Moreira R, Santos MMM. Synthesis and evaluation of spiroisoxazoline oxindoles as anticancer agents. *Bioorg Med Chem.* 2014;22(1):577-584. doi:10.1016/j.bmc.2013.10.048
  98. Nunes RC, Ribeiro CJA, Monteiro Â, Rodrigues CMP, Amaral JD, Santos MMM. In vitro targeting of colon cancer cells using spiropyrazoline oxindoles. *Eur J Med Chem.* 2017;139:168-179. doi:10.1016/j.ejmech.2017.07.057
  99. Amaral JD, Silva D, Rodrigues CMP, Solá S, Santos MMM. A novel small molecule p53 stabilizer for brain cell differentiation. *Front Chem.* 2019;7:1-14. doi:10.3389/fchem.2019.00015
  100. Wang W, Hu S, Gu Y, et al. Human MYC G-quadruplex: From discovery to a cancer therapeutic target. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2020;1874(2):1884-10. doi:10.1016/j.bbcan.2020.188410
  101. Nagesh N, Raju G, Srinivas R, Ramesh P, Reddy MD, Reddy CR. A dihydroindolizino indole derivative selectively stabilizes G-quadruplex DNA and down-regulates c-MYC expression in human cancer cells. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2015;1850(1):129-140. doi:10.1016/j.bbagen.2014.10.004
  102. Panda D, Debnath M, Mandal S, Bessi I, Schwalbe H, Dash J. A Nucleus-Imaging Probe That Selectively Stabilizes a Minor Conformation of c-MYC G-quadruplex and Down-regulates c-MYC Transcription in Human Cancer Cells. *Sci Rep.* 2015;5(1):13183. doi:10.1038/srep13183
  103. Dai J, Carver M, PUNCHIHEWA C, Jones RA, Yang D. Structure of the Hybrid-2 type intramolecular human telomeric G-quadruplex in K<sup>+</sup> solution: insights into structure polymorphism of the human telomeric sequence. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(15):4927-4940. doi:10.1093/nar/gkm522
  104. Chen S-B, Wu W-B, Hu M-H, et al. Discovery of a new fluorescent light-up probe specific to parallel G-quadruplexes. *Chem Commun.* 2014;50(81):12173-12176. doi:10.1039/C4CC05394J
  105. Hu M, Chen S, Wang B, et al. Specific targeting of telomeric multimeric G-quadruplexes by a new triaryl-substituted imidazole. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(4):1606-1618. doi:10.1093/nar/gkw1195
  106. Hu MH, Wang YQ, Yu ZY, et al. Discovery of a New Four-Leaf Clover-Like Ligand as a Potent c-MYC Transcription Inhibitor Specifically Targeting the Promoter G-Quadruplex. *J Med Chem.* 2018;61(6):2447-2459. doi:10.1021/acs.jmedchem.7b01697
  107. Zhou J, Zhu X, Lu Y, et al. Senescence and telomere shortening induced by novel potent G-quadruplex interactive agents, quindoline derivatives, in human cancer cell lines. *Oncogene.* 2006;25(4):503-511. doi:10.1038/sj.onc.1209067
  108. Ou TM, Lin J, Lu YJ, et al. Inhibition of cell proliferation by quindoline derivative (SYUIQ-05) through its preferential interaction with c-myc promoter G-quadruplex. *J Med Chem.* 2011;54(16):5671-5679. doi:10.1021/jm200062u
  109. Boddupally PVL, Hahn S, Beman C, et al. Anticancer Activity and Cellular Repression of c-MYC by the G-Quadruplex-Stabilizing 11-Piperazinylquindoline Is Not Dependent on Direct Targeting of the G-Quadruplex in the c-MYC

- Promoter. *J Med Chem.* 2012;55(13):6076-6086. doi:10.1021/jm300282c
110. Lavrado J, Reszka AP, Moreira R, Neidle S, Paulo A. C-11 diamino cryptolepine derivatives NSC748392, NSC748393, and NSC748394: Anticancer profile and G-quadruplex stabilization. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2010;20(23):7042-7045. doi:10.1016/j.bmcl.2010.09.110
  111. Lu Y-J, Ou T-M, Tan J-H, et al. 5-N-Methylated Quindoline Derivatives as Telomeric G-Quadruplex Stabilizing Ligands: Effects of 5-N Positive Charge on Quadruplex Binding Affinity and Cell Proliferation. *J Med Chem.* 2008;51(20):6381-6392. doi:10.1021/jm800497p
  112. Lavrado J, Borralho PM, Ohnmacht SA, et al. Synthesis, G-Quadruplex Stabilisation, Docking Studies, and Effect on Cancer Cells of Indolo[3,2-b]quinolines with One, Two, or Three Basic Side Chains. *ChemMedChem.* 2013;8(10):n/a-n/a. doi:10.1002/cmdc.201300288
  113. Ou T-M, Lu Y-J, Zhang C, et al. Stabilization of G-Quadruplex DNA and Down-Regulation of Oncogene c - myc by Quindoline Derivatives. *J Med Chem.* 2007;50(7):1465-1474. doi:10.1021/jm0610088
  114. Guyen B, Schultes CM, Hazel P, Mann J, Neidle S. Synthesis and evaluation of analogues of 10H-indolo[3,2-b]quinoline as G-quadruplex stabilising ligands and potential inhibitors of the enzyme telomerase. *Org Biomol Chem.* 2004;2(7):981. doi:10.1039/b316055f
  115. Brito H, Martins AC, Lavrado J, et al. Targeting KRAS Oncogene in Colon Cancer Cells with 7-Carboxylate Indolo[3,2-b]quinoline Tri-Alkylamine Derivatives. Amin ARMR, ed. *PLoS One.* 2015;10(5):e0126891. doi:10.1371/journal.pone.0126891
  116. Lavrado J, Ohnmacht SA, Correia I, et al. Indolo[3,2-c]quinoline G-Quadruplex Stabilizers: a Structural Analysis of Binding to the Human Telomeric G-Quadruplex. *ChemMedChem.* 2015;10(5):836-849. doi:10.1002/cmdc.201500067
  117. Lavrado J, Brito H, Borralho PM, et al. KRAS oncogene repression in colon cancer cell lines by G-quadruplex binding indolo[3,2-c]quinolines. *Sci Rep.* 2015;5(1):9696. doi:10.1038/srep09696
  118. Persidis A. Cancer multidrug resistance. *Nat Biotechnol.* 1999;17:94-95. doi:10.1038/80051
  119. Sahoo SK, Parveen S, Panda JJ. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2007;3(1):20-31. doi:10.1016/j.nano.2006.11.008
  120. Lehár J, Krueger AS, Avery W, et al. Synergistic drug combinations tend to improve therapeutically relevant selectivity. *Nat Biotechnol.* 2009;27(7):659-666. doi:10.1038/nbt.1549
  121. de Weger VA, de Jonge M, Langenberg MHG, et al. A phase I study of the HDM2 antagonist SAR405838 combined with the MEK inhibitor pimasertib in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer.* 2019;120(3):286-293. doi:10.1038/s41416-018-0355-8
  122. Sun L, Tran N, Tang F, et al. Synthesis and biological evaluations of 3-substituted indolin-2-ones: A novel class of tyrosine kinase inhibitors that exhibit selectivity toward particular receptor tyrosine kinases. *J Med Chem.* 1998;41:2588-2603. doi:10.1021/jm980123i
  123. Hwu JR, Lin CC, Chuang SH, King KY, Su TR, Tsay SC. Aminyl and iminyl radicals from arylhydrazones in the photo-induced DNA cleavage. *Bioorganic Med*



- Chem.* 2004;12(10):2509-2515. doi:10.1016/j.bmc.2004.03.037
124. Patel H V., Vyas KA, Pandey SP, Fernandes PS. Facile synthesis of hydrazonyl halides by reaction of hydrazones with N-halosuccinimide-dimethyl sulfide complex. *Tetrahedron.* 1996;52(2):661-668. doi:10.1016/0040-4020(95)00916-7
  125. Wang G, Liu X, Huang T, Kuang Y, Lin L, Feng X. Asymmetric catalytic 1,3-dipolar cycloaddition reaction of nitrile imines for the synthesis of chiral spiro-pyrazoline-oxindoles. *Org Lett.* 2013;15(1):76-79. doi:10.1021/ol303097j
  126. Hisler K, Commeureuc AGJ, Zhou S ze, Murphy JA. Synthesis of indoles via alkylidenation of acyl hydrazides. *Tetrahedron Lett.* 2009;50(26):3290-3293. doi:10.1016/j.tetlet.2009.02.060
  127. Zhang CY, Liu XH, Wang BL, Wang SH, Li ZM. Synthesis and antifungal activities of New pyrazole derivatives via 1,3-dipolar cycloaddition reaction. *Chem Biol Drug Des.* 2010;75:489-493. doi:10.1111/j.1747-0285.2010.00948.x
  128. Bered S. Relatório de Estágio (Erasmus). 2018.
  129. Lavrado J, Paulo A, Gut J, Rosenthal PJ, Moreira R. Cryptolepine analogues containing basic aminoalkyl side-chains at C-11: Synthesis, antiplasmodial activity, and cytotoxicity. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2008;18(4):1378-1381. doi:10.1016/j.bmcl.2008.01.015
  130. Martins ACB. Ligandos seletivos de G-quadruplexos de ADN para a terapia do cancro: Derivados de indolo[3,2-b]quinolinas. 2013.
  131. Nguyen HH, Fettinger JC, Haddadin MJ, Kurth MJ. Expedient one-pot synthesis of indolo[3,2-c]isoquinolines via a base-promoted N-alkylation/tandem cyclization. *Tetrahedron Lett.* 2015;56(40):5429-5433. doi:10.1016/j.tetlet.2015.08.006
  132. Juskowiak B, Takenaka S. Fluorescence Resonance Energy Transfer in the Studies of Guanine Quadruplexes. In: *Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes.* Vol 335. New Jersey: Humana Press; 2006:311-342. doi:10.1385/1-59745-069-3:311
  133. Mergny J louis, Bourtoune AS, Garestier T, et al. Fluorescence energy transfer as a probe for nucleic acid structures and sequences. *Nucleic Acids Res.* 1994;22(6):920-928. doi:10.1093/nar/22.6.920
  134. Vologodskii A, Frank-Kamenetskii MD. DNA melting and energetics of the double helix. *Phys Life Rev.* 2018;25:1-21. doi:10.1016/j.plrev.2017.11.012
  135. Mergny JL, Lacroix L, Teulade-Fichou MP, et al. Telomerase inhibitors based on quadruplex ligands selected by a fluorescence assay. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(6):3062-3067. doi:10.1073/pnas.051620698
  136. Mergny JL, Maurizot JC. Fluorescence resonance energy transfer as a probe for G-quartet formation by a telomeric repeat. *ChemBioChem.* 2001;2(2):124-132. doi:10.1002/1439-7633(20010202)2:2<124::AID-CBIC124>3.0.CO;2-L
  137. Muijlwijk-Koezen JE Van, Timmerman H, Link R, Goot H Van Der, Ijzerman AP. A Novel Class of Adenosine A3 Receptor Ligands . 2. Structure Affinity Profile of a Series of Isoquinoline and Quinazoline Compounds. *J Med Chem.* 1998;41(21):3994-4000. doi:10.1021/jm980037i



## Anexo I – Espetros $^1\text{H}$ -RMN dos derivados de spirooxindóis sintetizados e respectivos intermediários

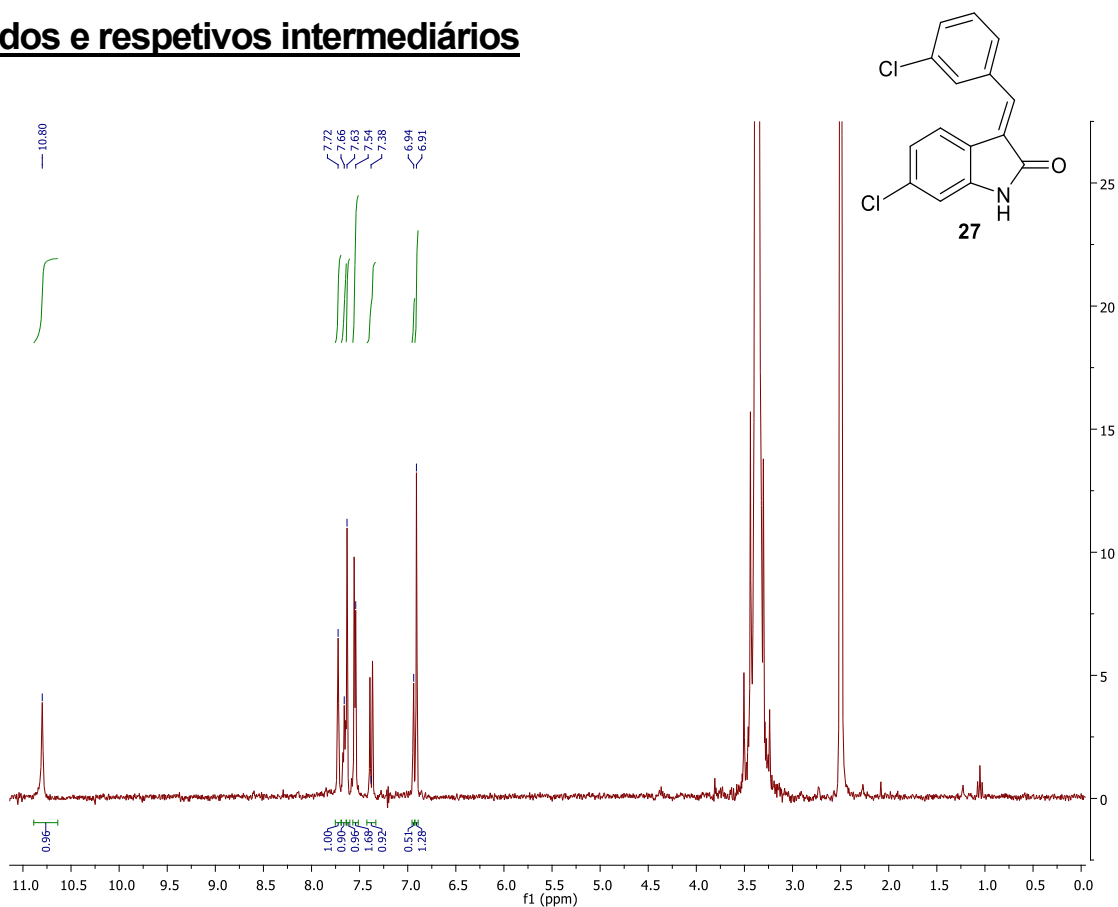


Figura 46 - Espetro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto 27 em  $\text{DMSO-d}_6$ .

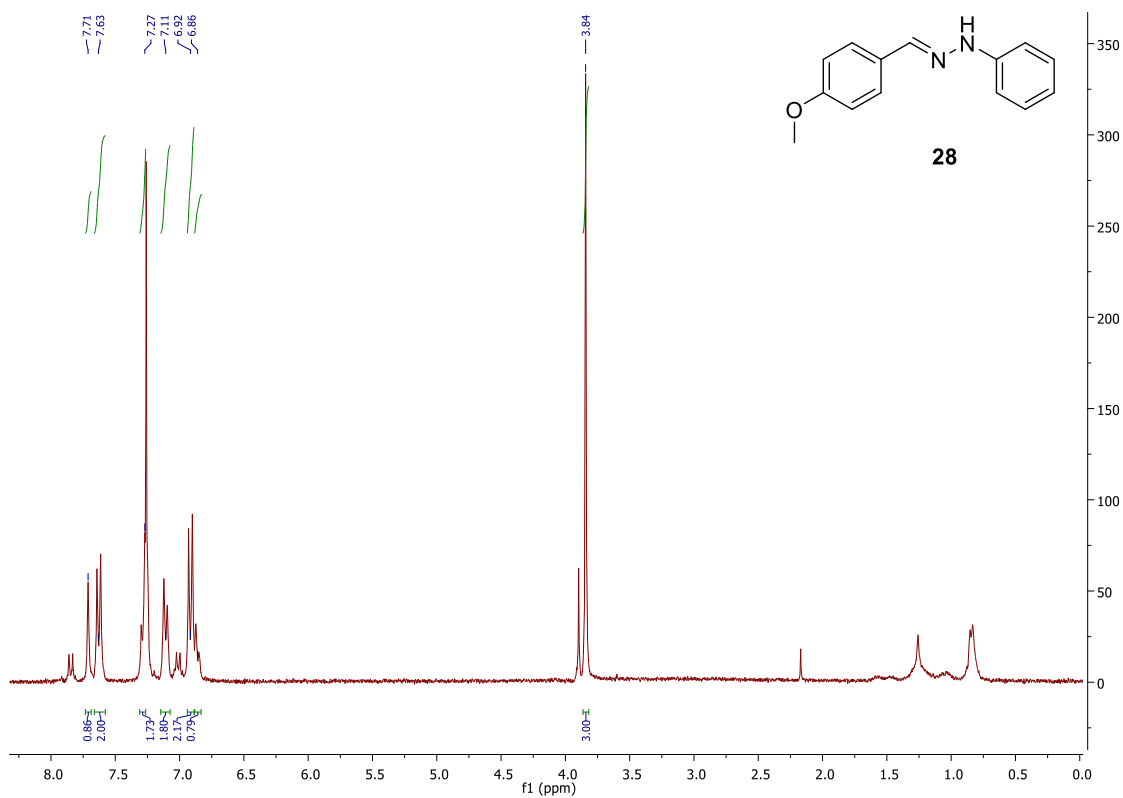


Figura 47 – Espetro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto 28 em  $\text{CDCl}_3$ .

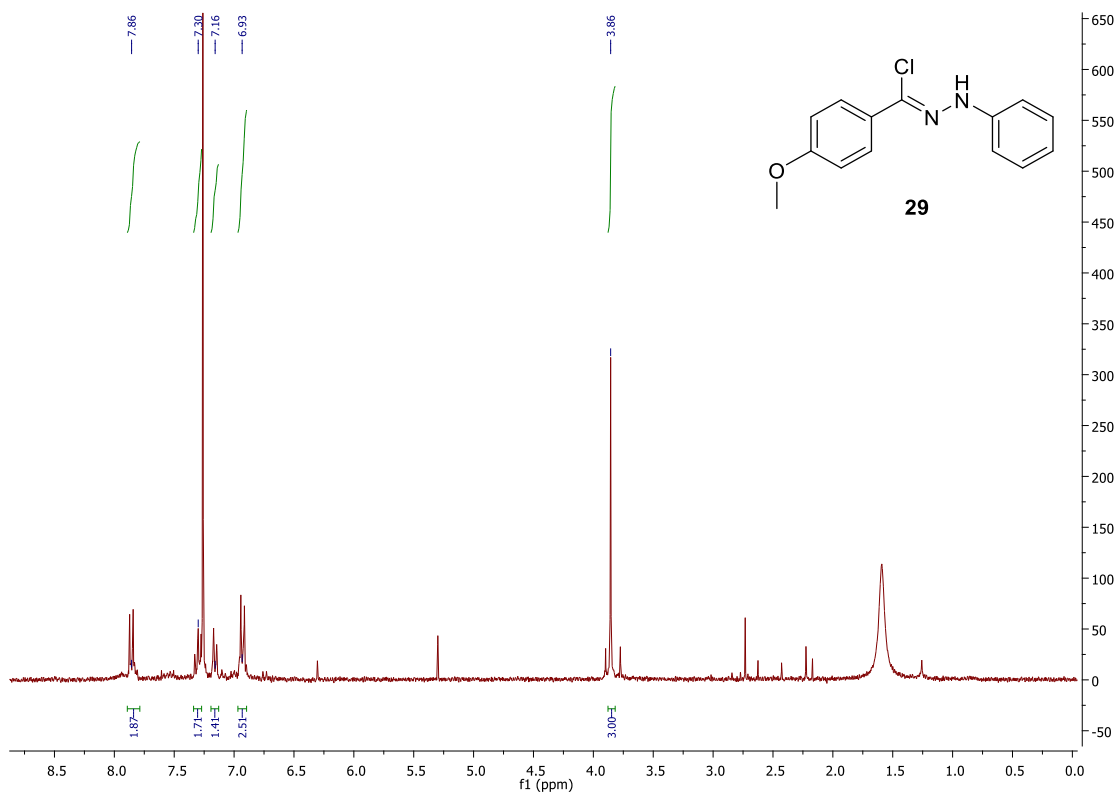


Figura 48 – Espetro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto **29** em  $\text{CDCl}_3$ .

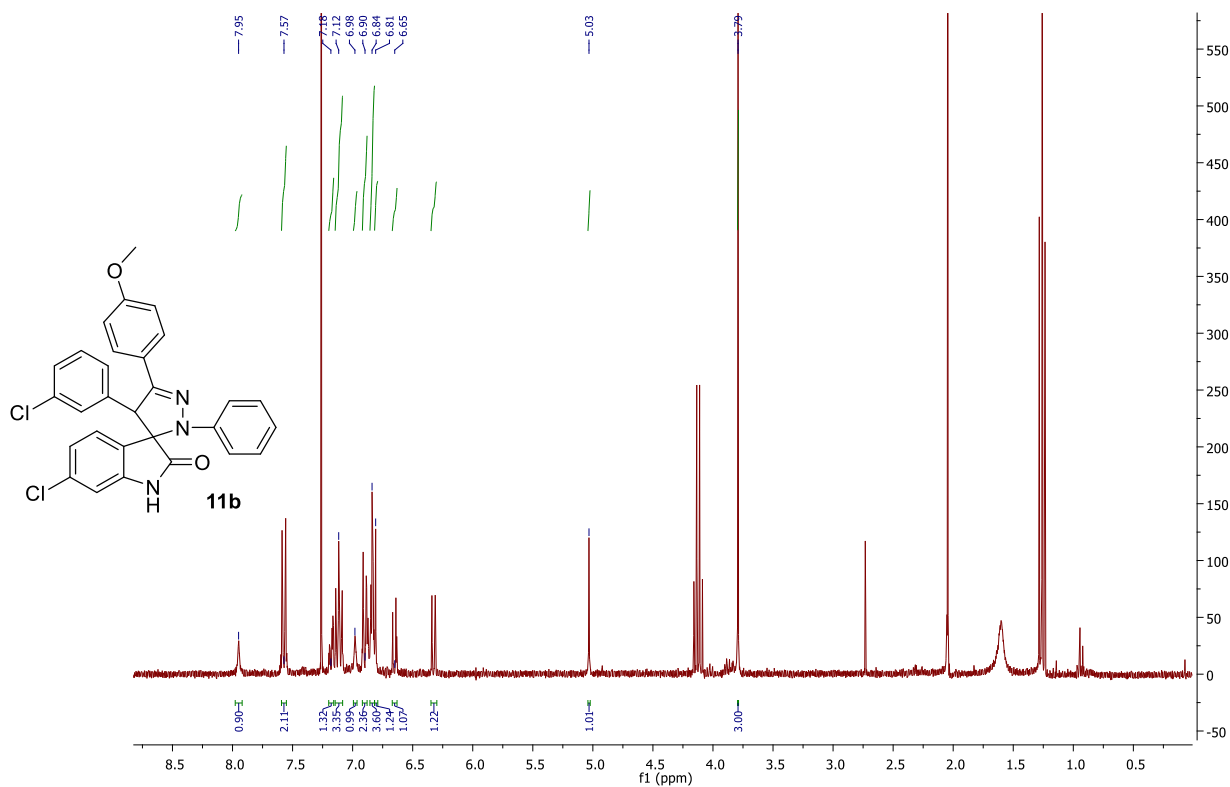


Figura 49 – Espetro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto **11b** em  $\text{CDCl}_3$ .

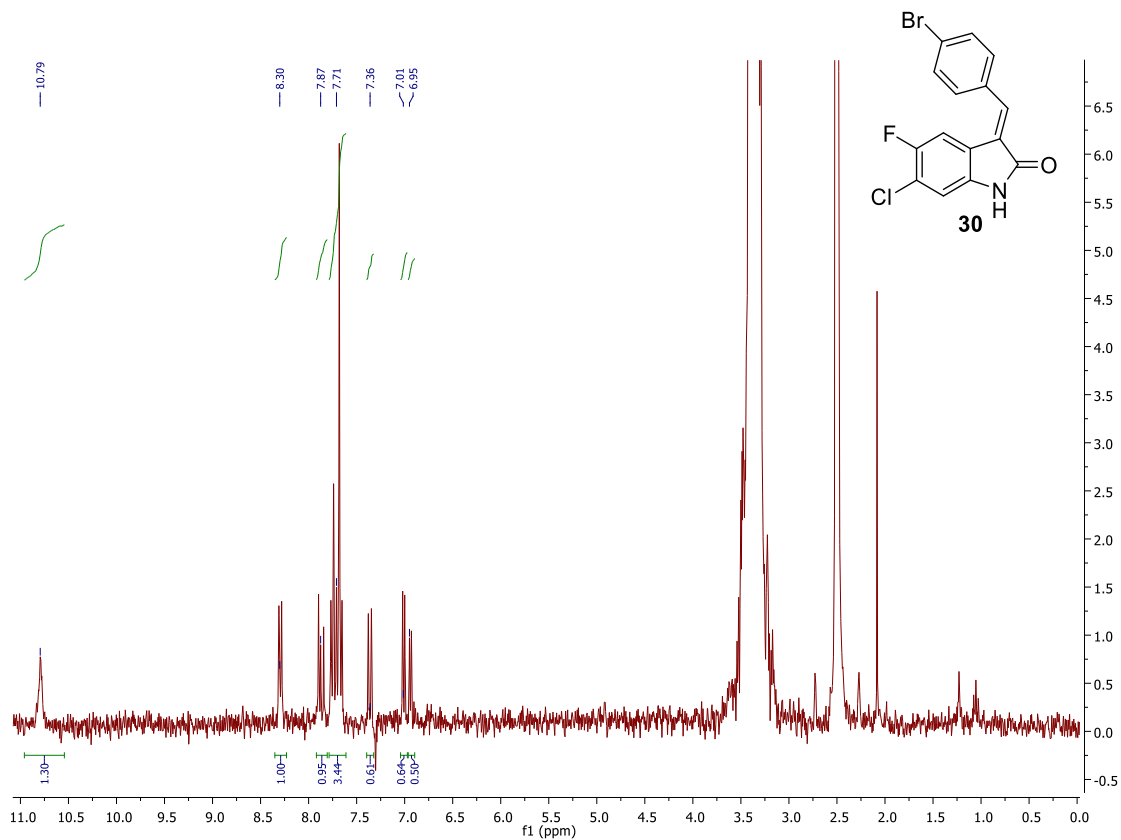


Figura 50 – Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto 30 em  $\text{DMSO-d}_6$ .

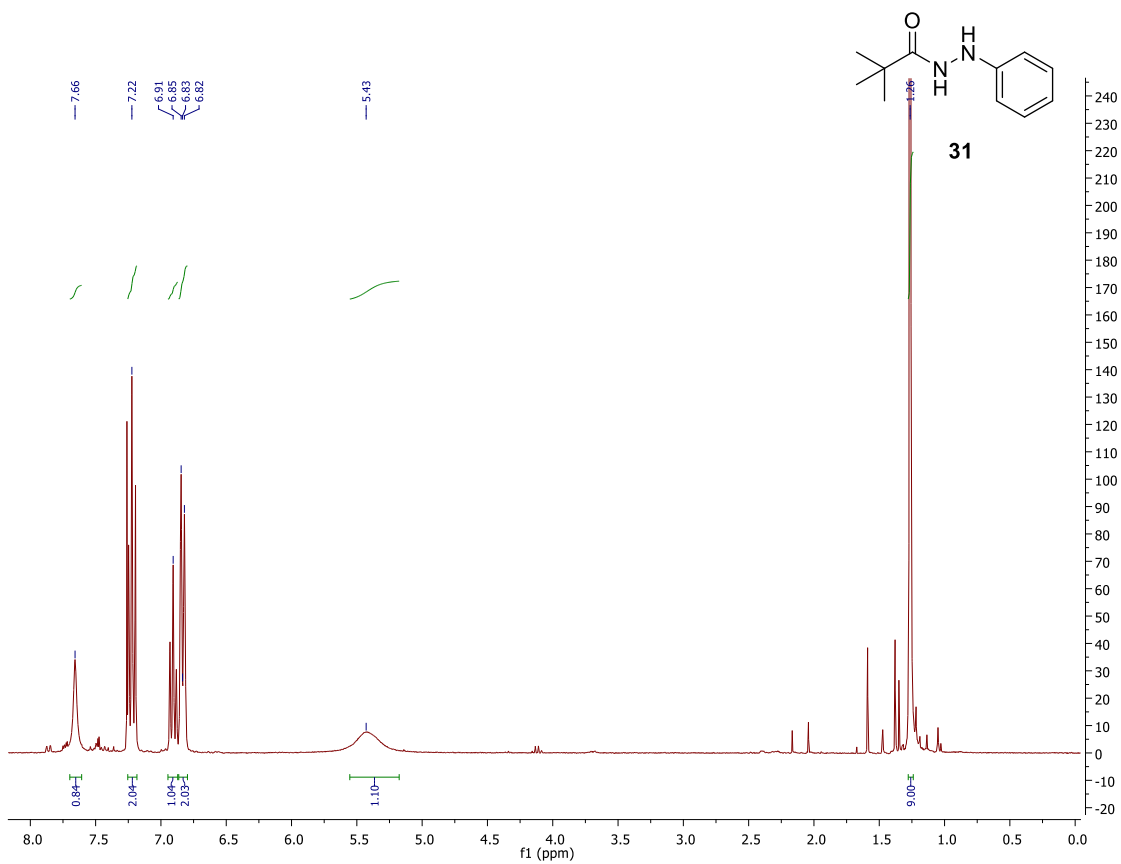


Figura 51 – Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto 31 em  $\text{CDCl}_3$ .

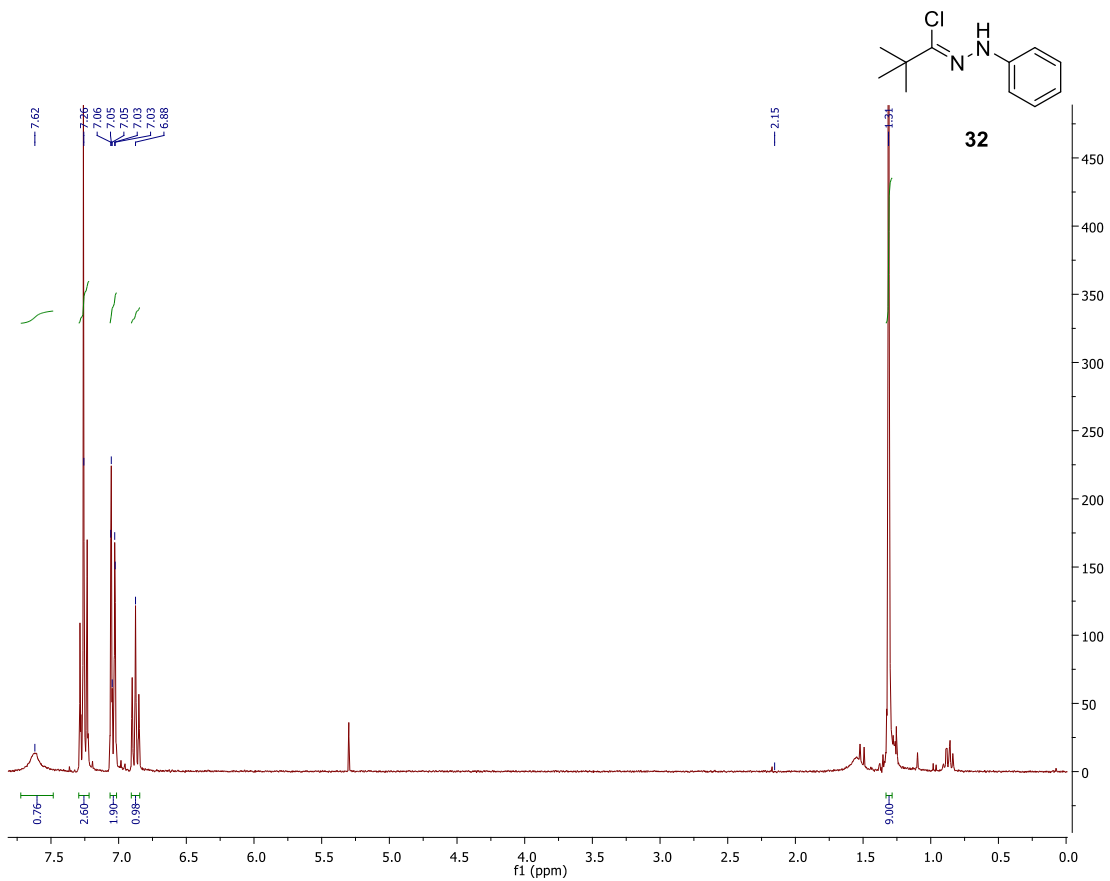


Figura 52 – Espetro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto **32** em  $\text{CDCl}_3$ .

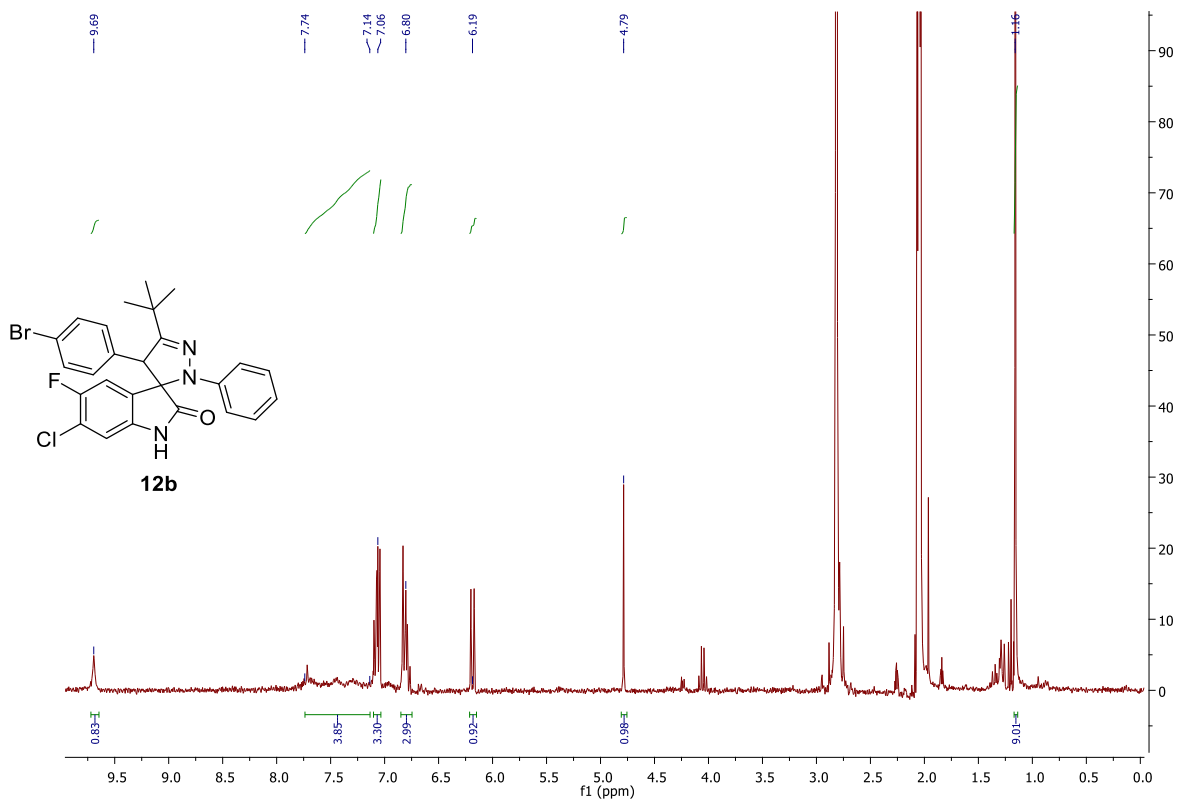


Figura 53 – Espetro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto **12b** em  $\text{DMSO}-d_6$ .

## Anexo II – Espectros de $^1\text{H}$ -RMN, $^{13}\text{C}$ e HMQC de derivados de indolo[3,2-*b*]quinolinas e seus intermediários

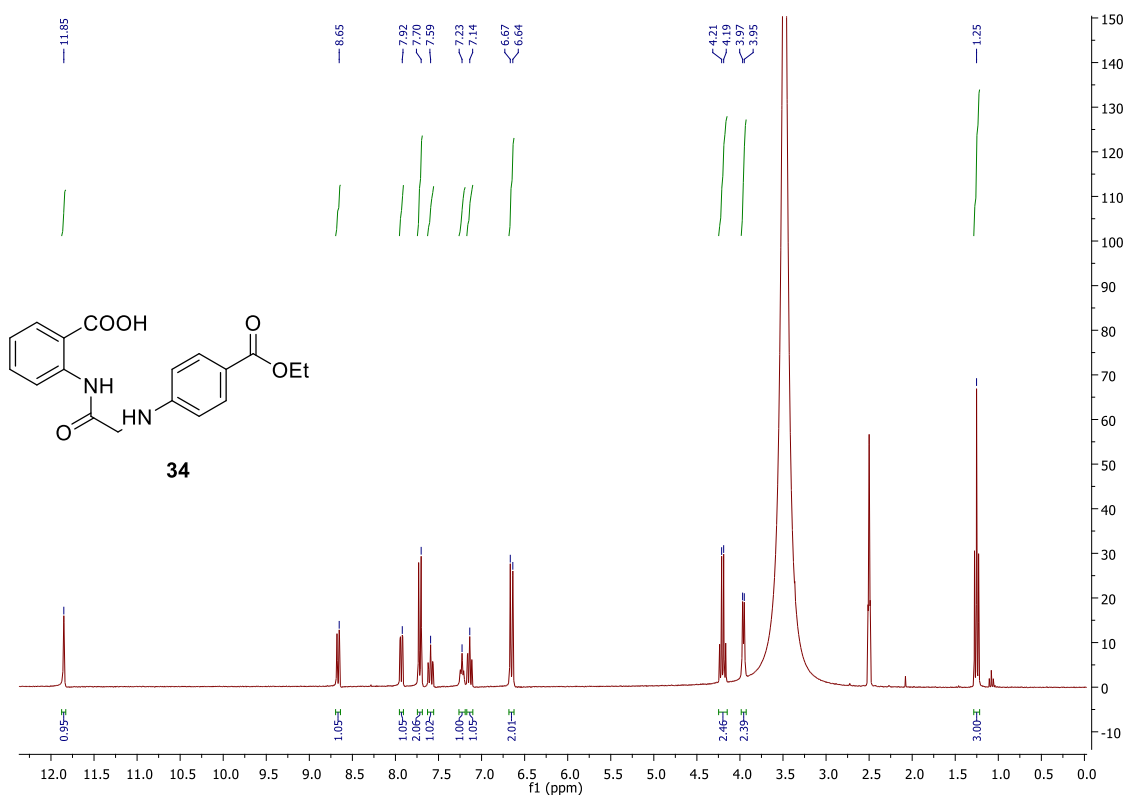


Figura 54 – Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto 34 em DMSO- $d_6$ .

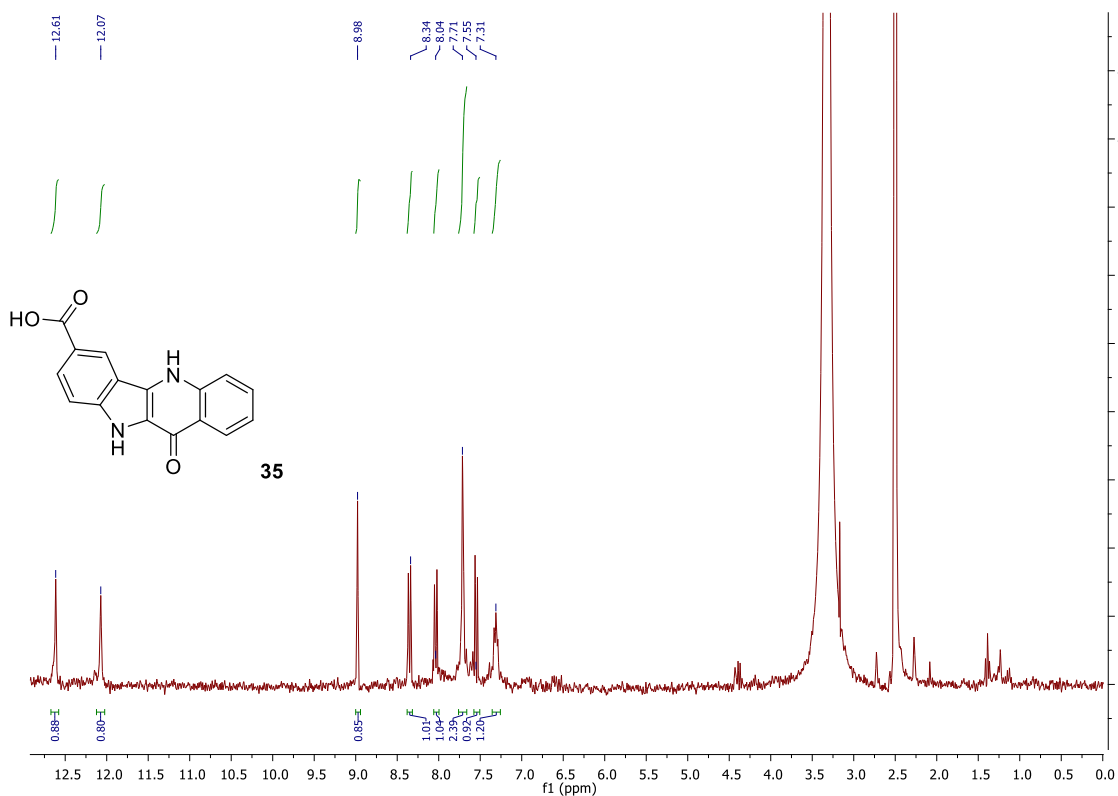


Figura 55 – Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto 35 em DMSO- $d_6$ .

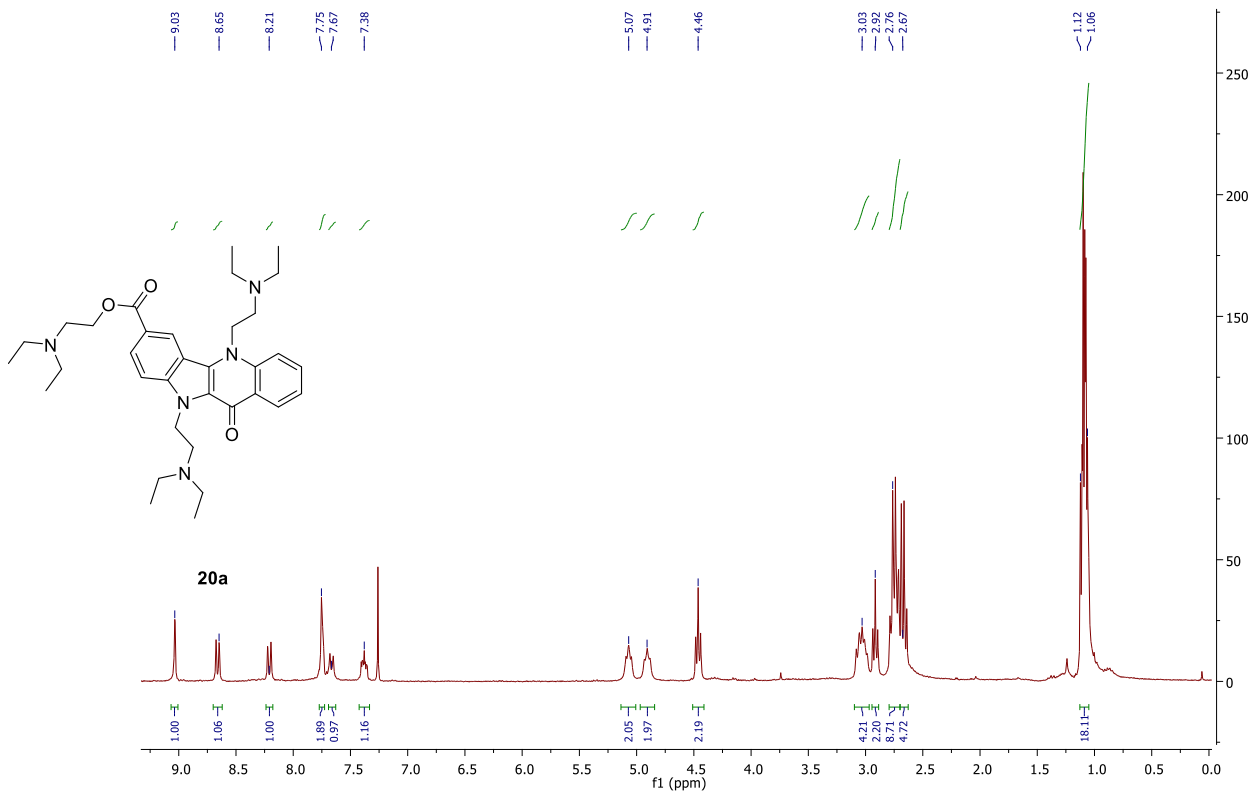


Figura 56 – Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto **20a** em  $\text{CDCl}_3$ .

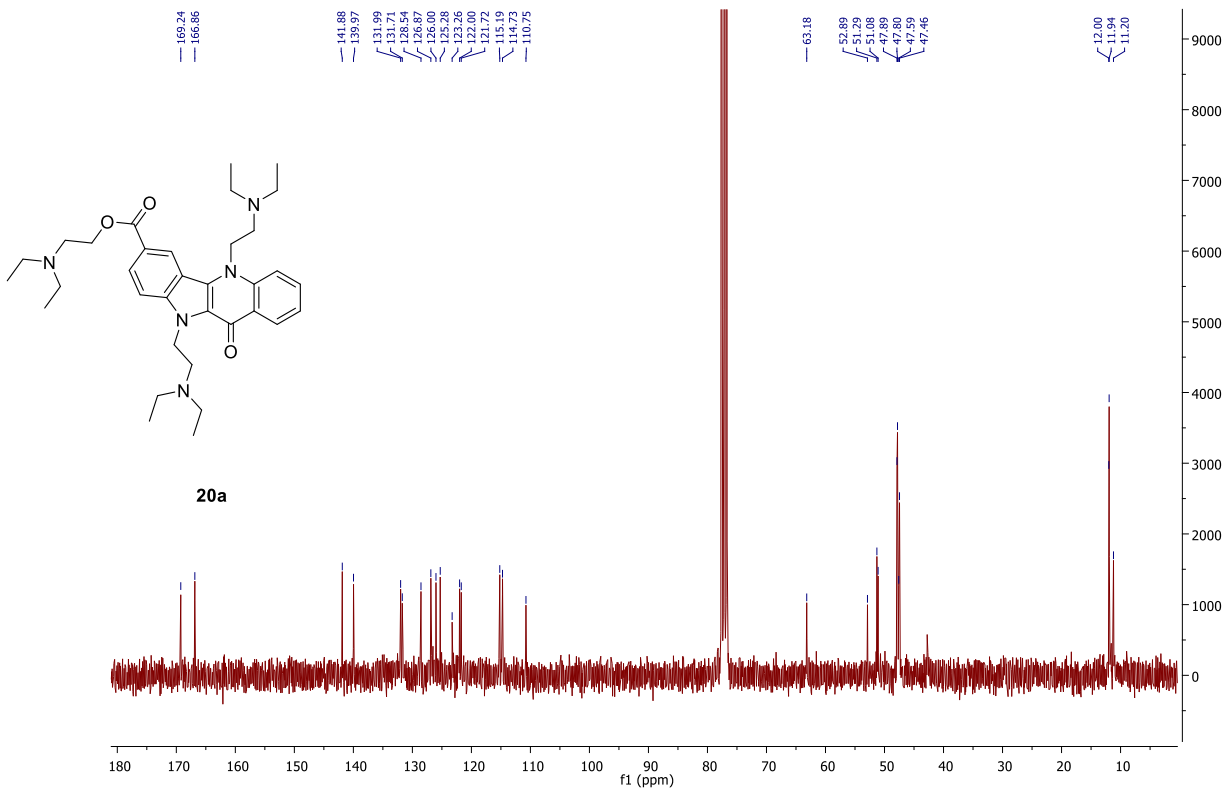


Figura 57 – Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN do composto **20a** em  $\text{CDCl}_3$ .



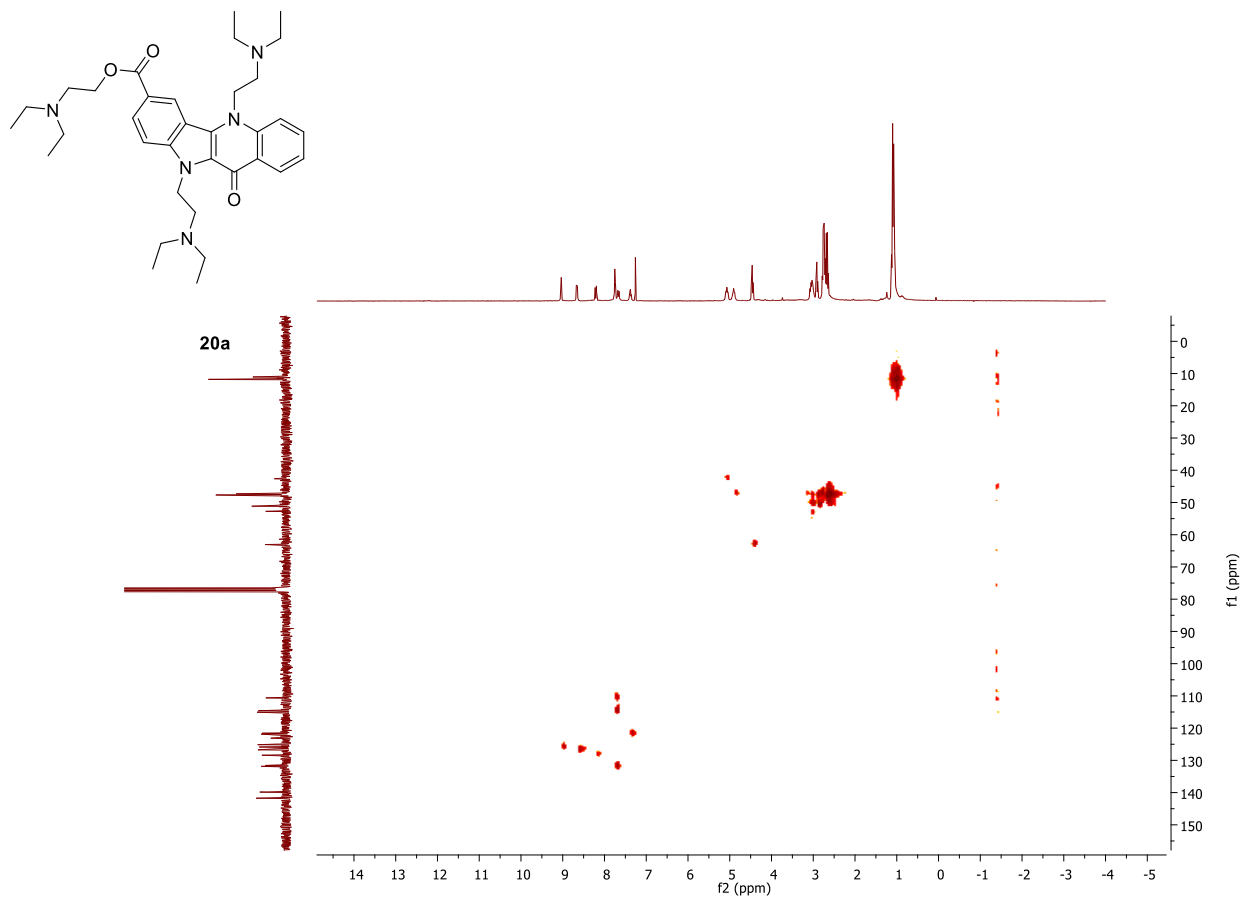


Figura 58 - Espectro bidimensional HMQC do composto **20a** em  $\text{CDCl}_3$ .

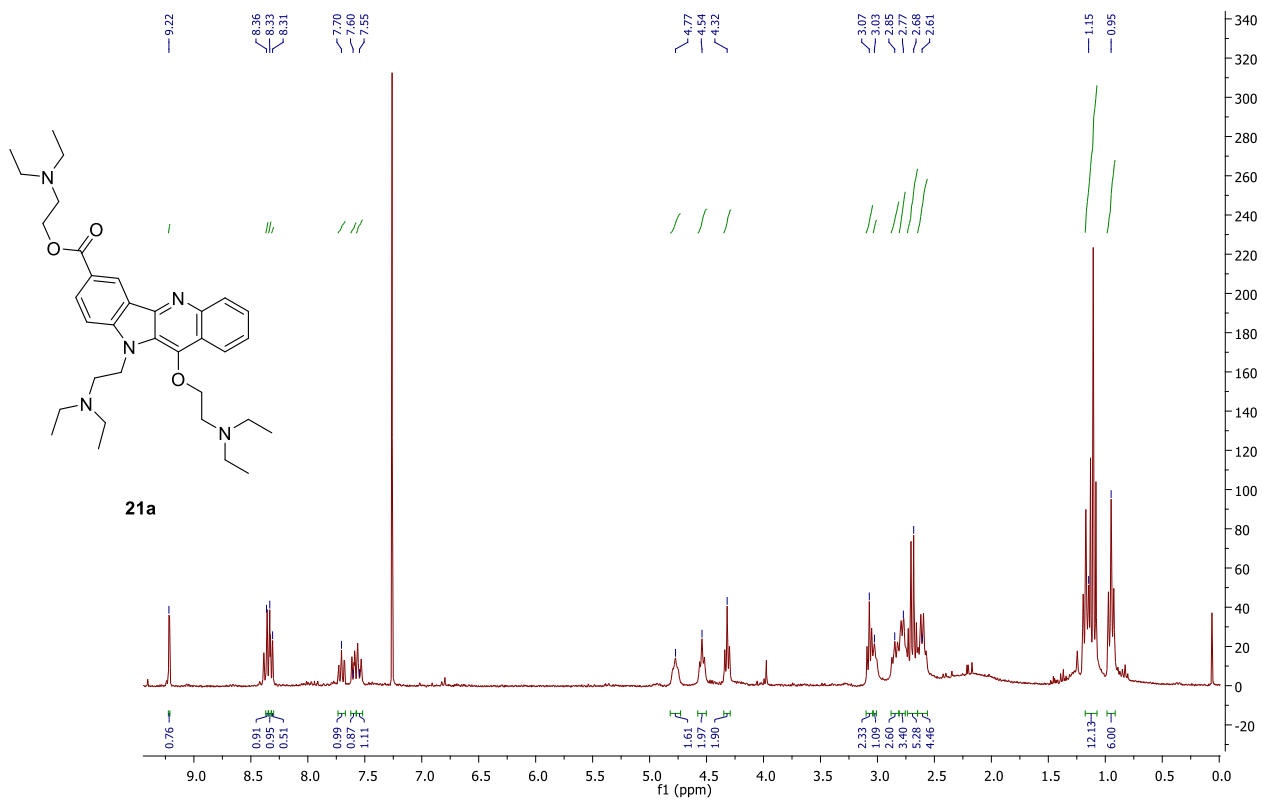


Figura 59 - Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto **21a** em  $\text{CDCl}_3$ .

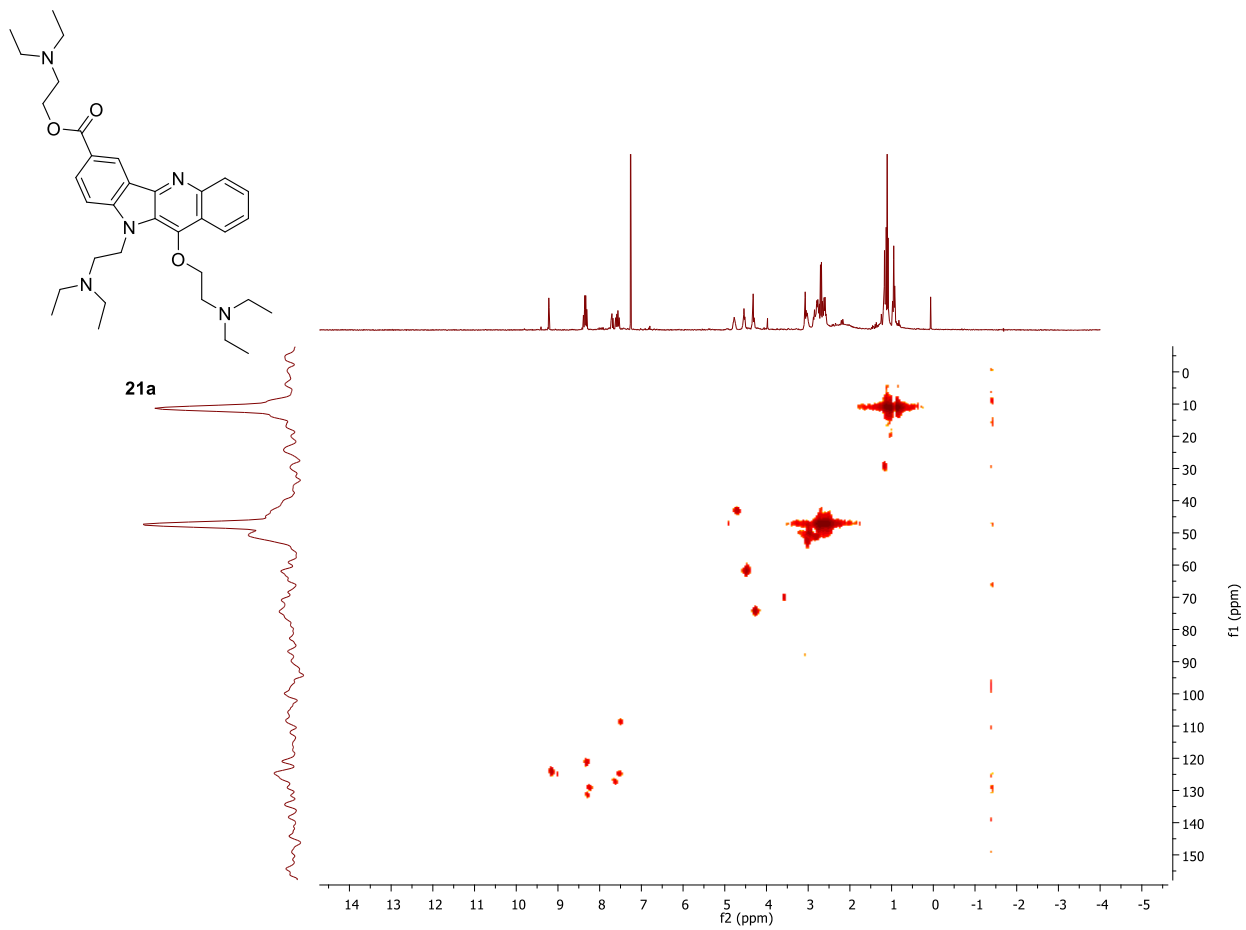


Figura 60 - Espectro bidimensional HMQC do composto **21a** em CDCl<sub>3</sub>.

## Anexo III – Espectros $^1\text{H}$ -RMN, COSY, $^{13}\text{C}$ , $^{13}\text{C}$ -APT, HMQC e HMBC de derivados de indolo[3,2-c]isoquinolinas e seus intermediários

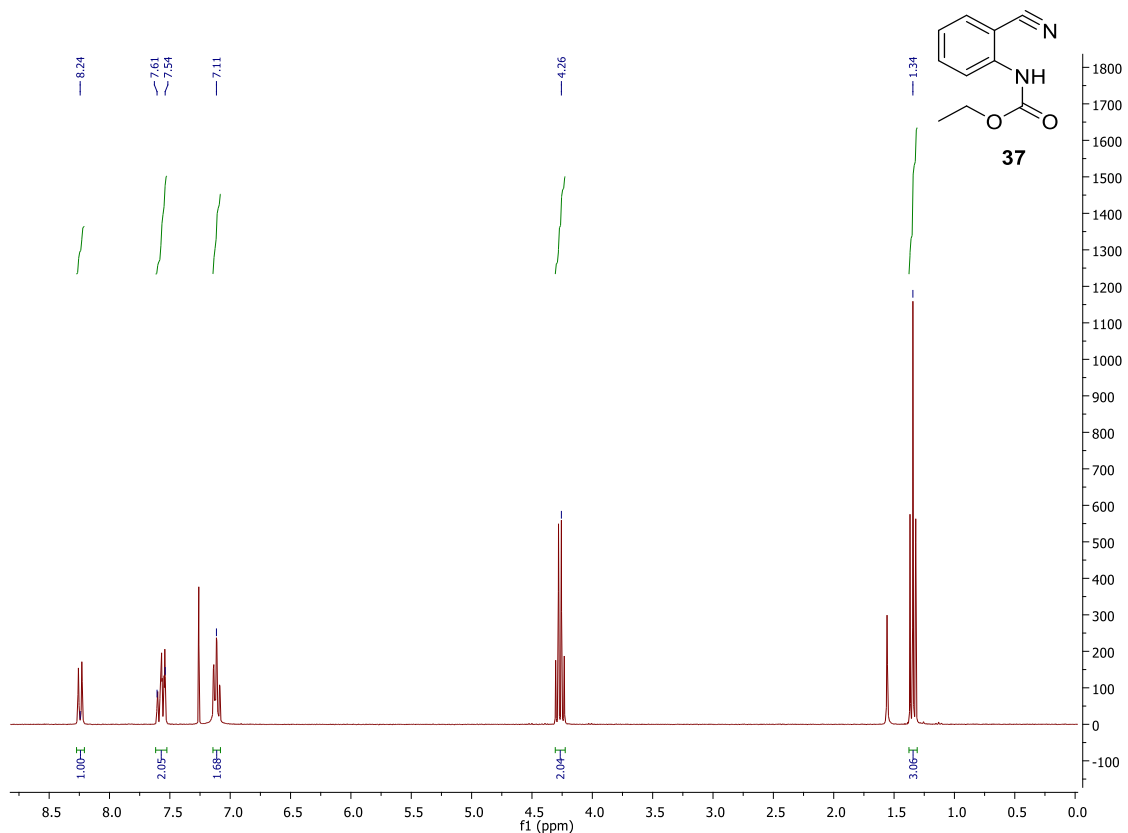


Figura 61 – Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto 37 em  $\text{CDCl}_3$ .

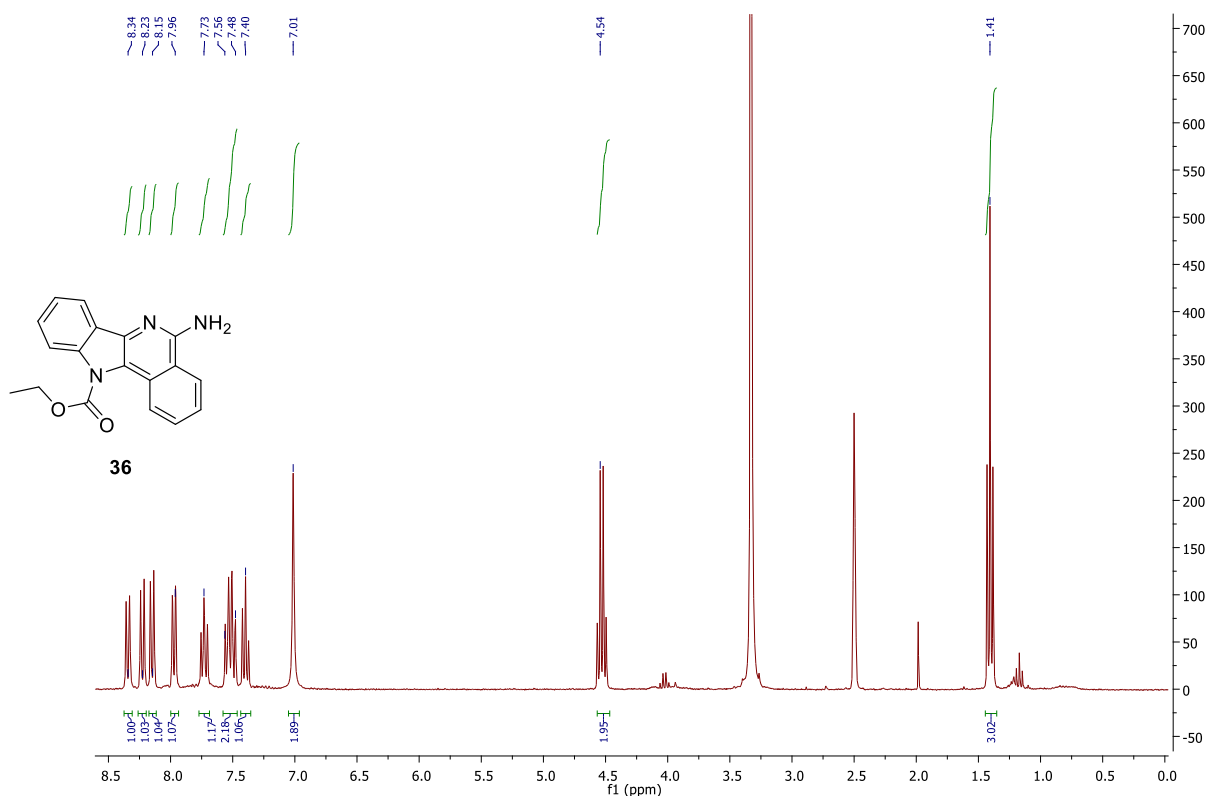


Figura 62 – Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto 36 em  $\text{DMSO}-d_6$ .

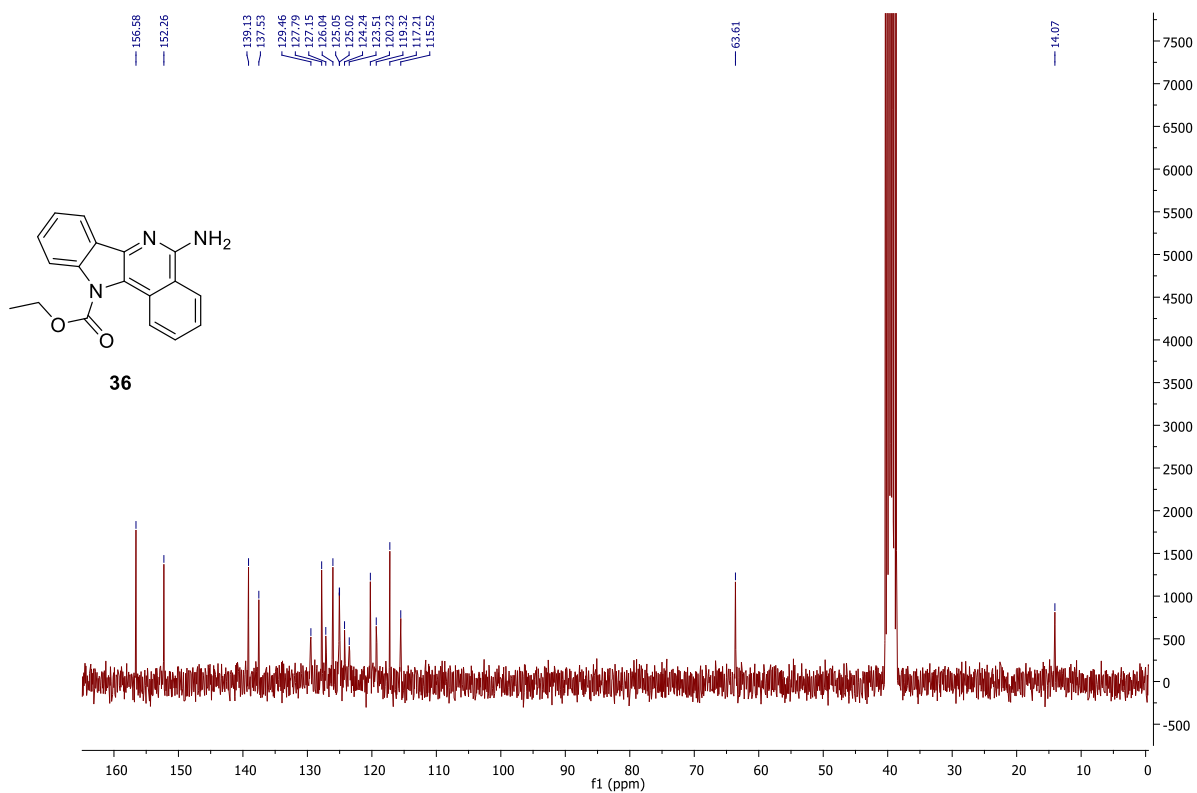


Figura 63 – Espetro de  $^{13}\text{C}$ -RMN do composto **36** em  $\text{DMSO-d}_6$ .

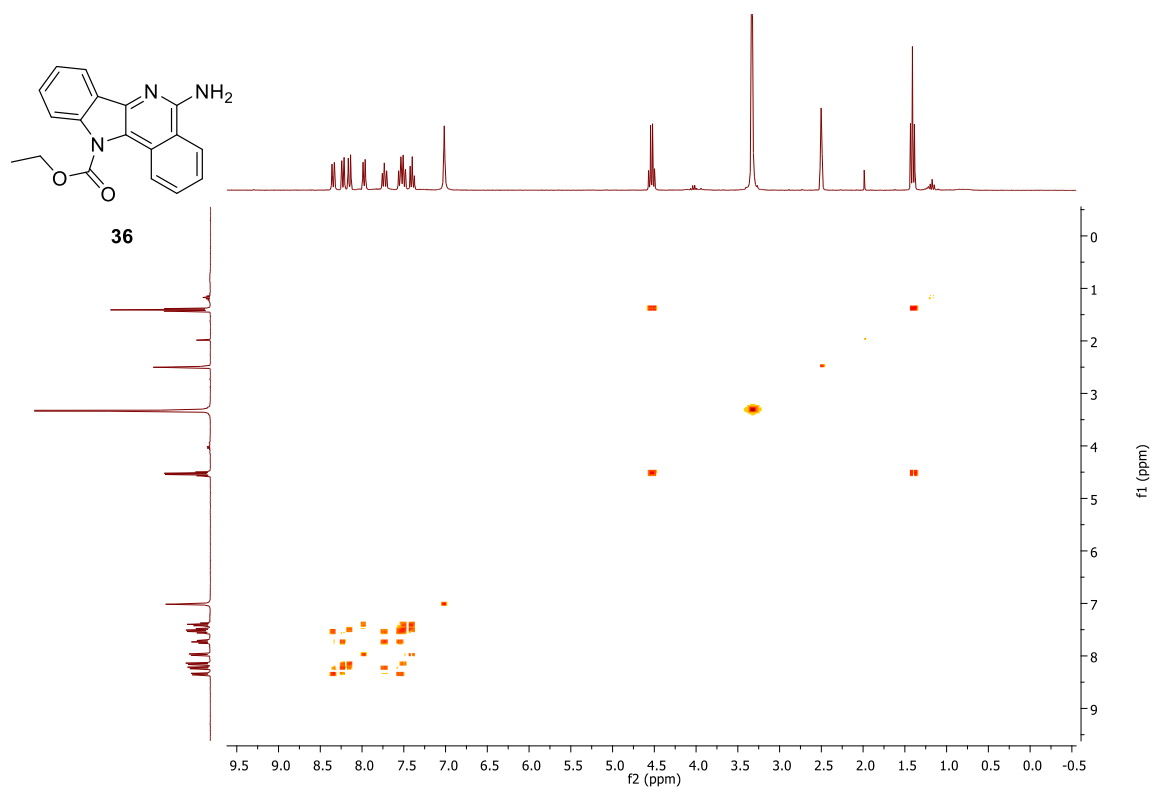


Figura 64 – Espetro bidimensional COSY do composto **36** em  $\text{DMSO-d}_6$ .

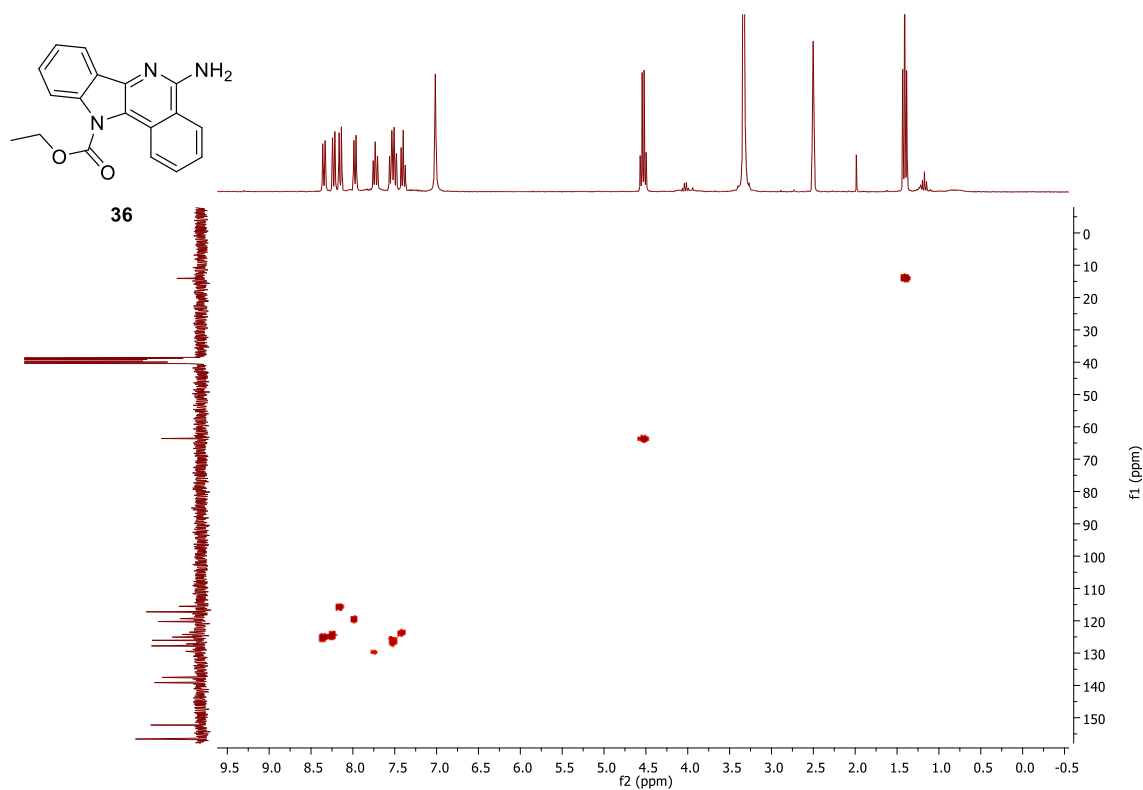


Figura 65 - Espectro bidimensional HMQC do composto **36** em DMSO- $d_6$ .

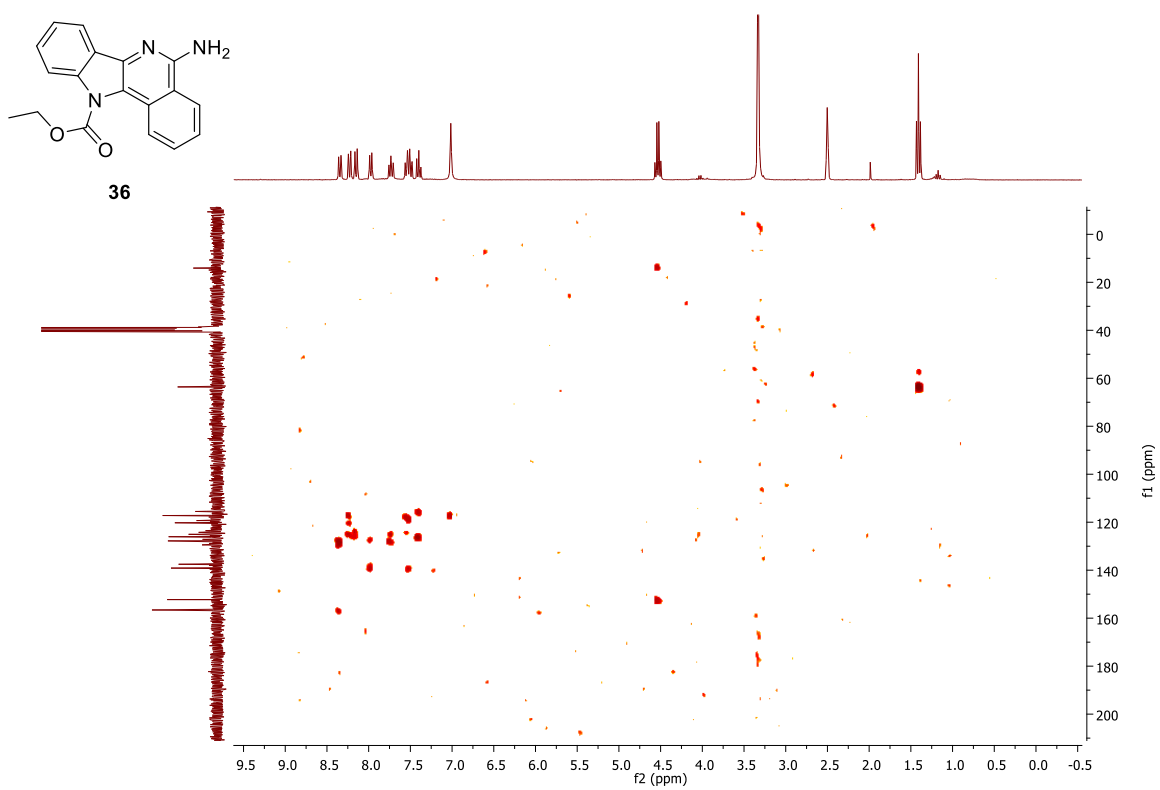


Figura 66 - Espectro bidimensional HMBC do composto **36** em DMSO- $d_6$ .

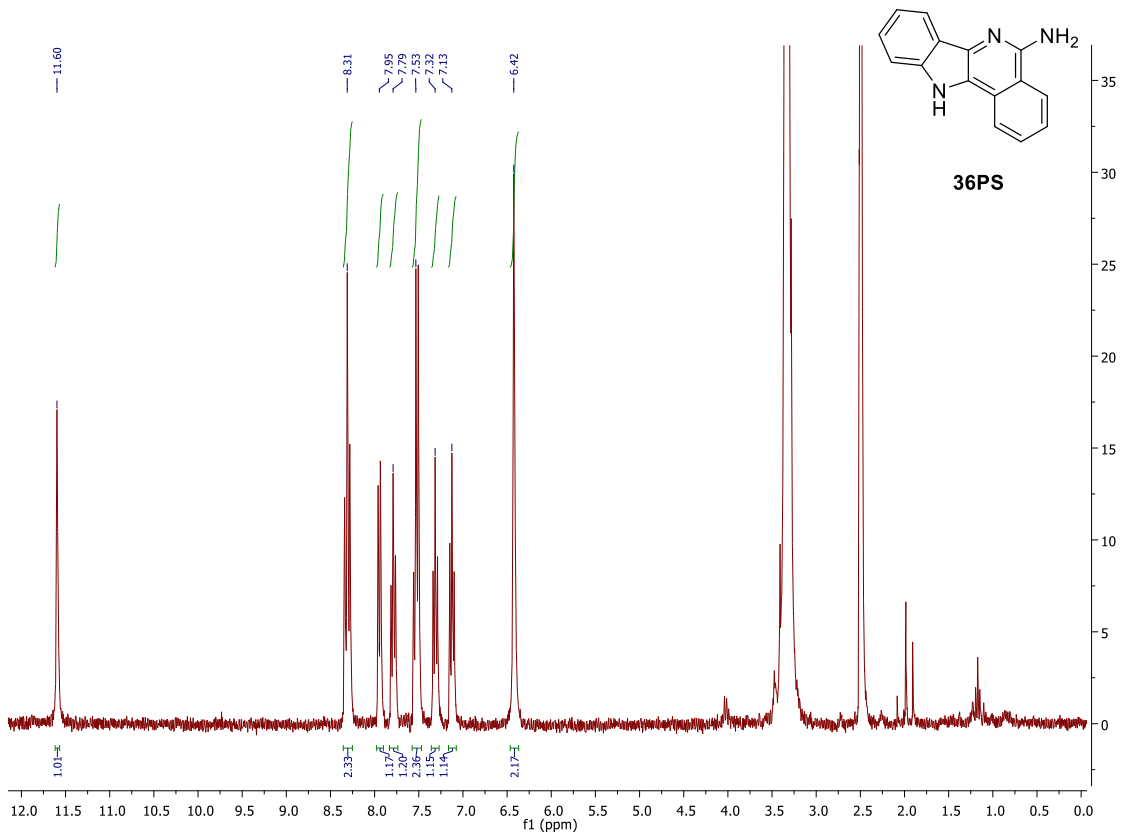


Figura 67 – Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto **36PS** em  $\text{DMSO-d}_6$ .

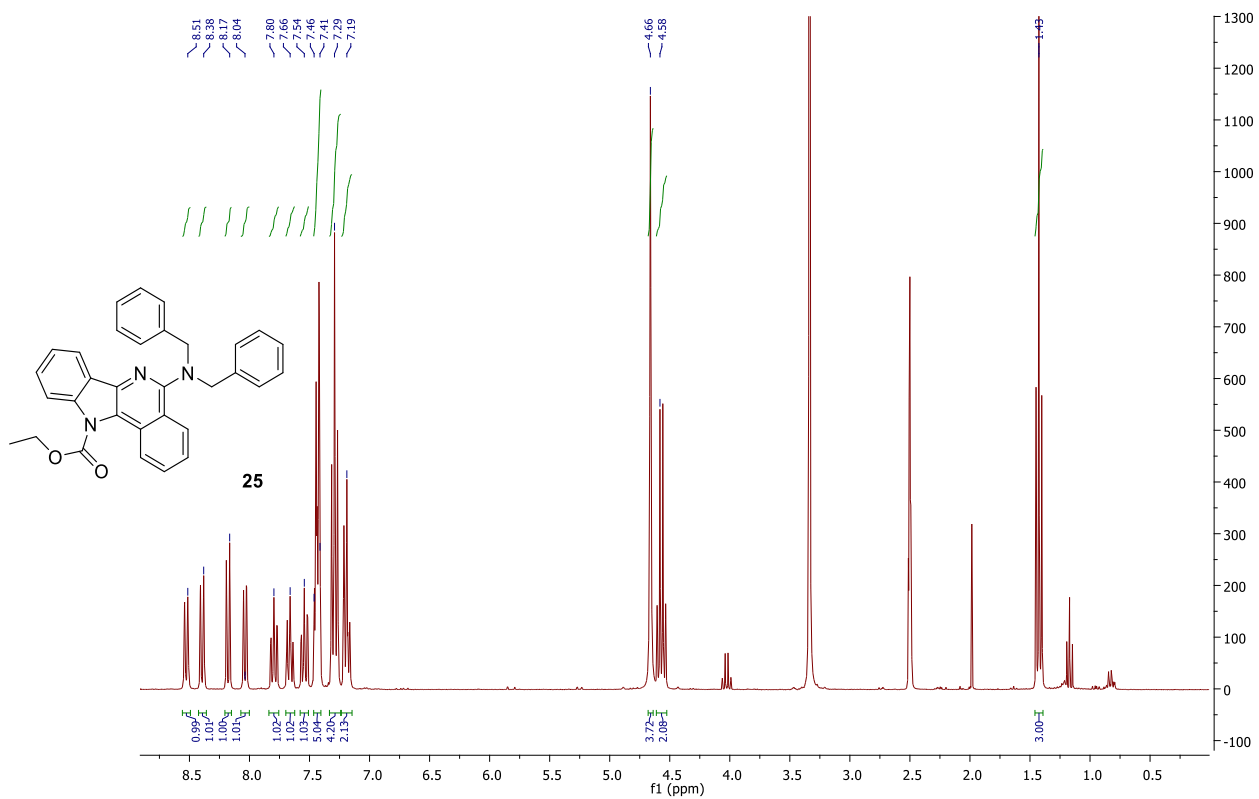


Figura 68 – Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto **25** em  $\text{DMSO-d}_6$ .

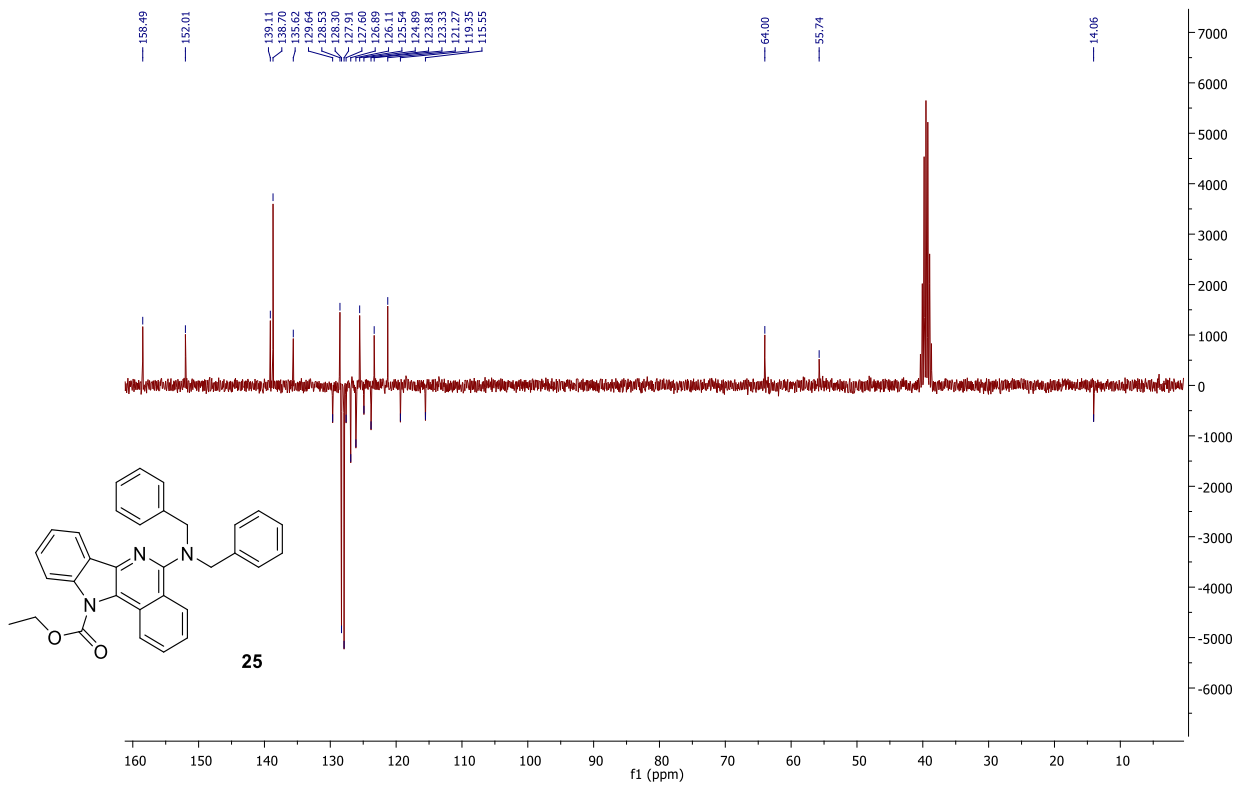


Figura 69 – Espectro de  $^{13}\text{C}$ -APT do composto 25 em  $\text{DMSO-d}_6$ .

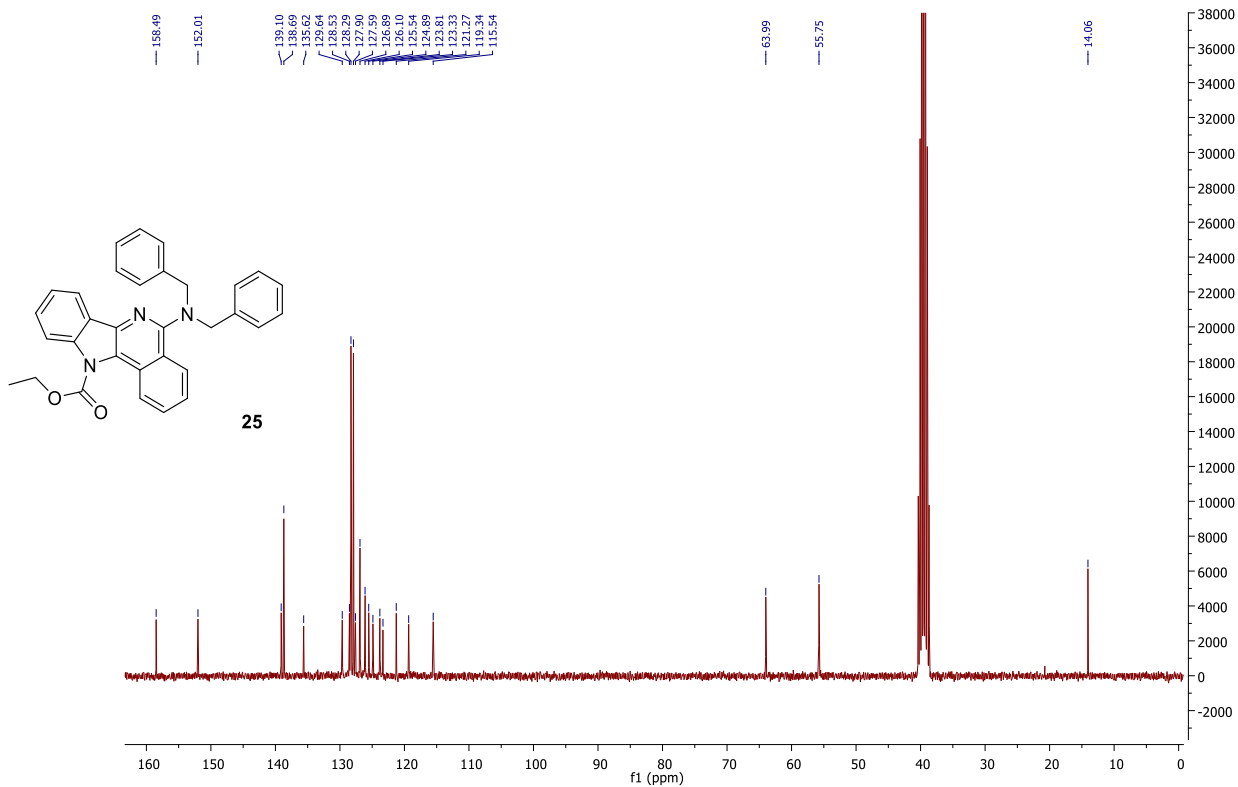
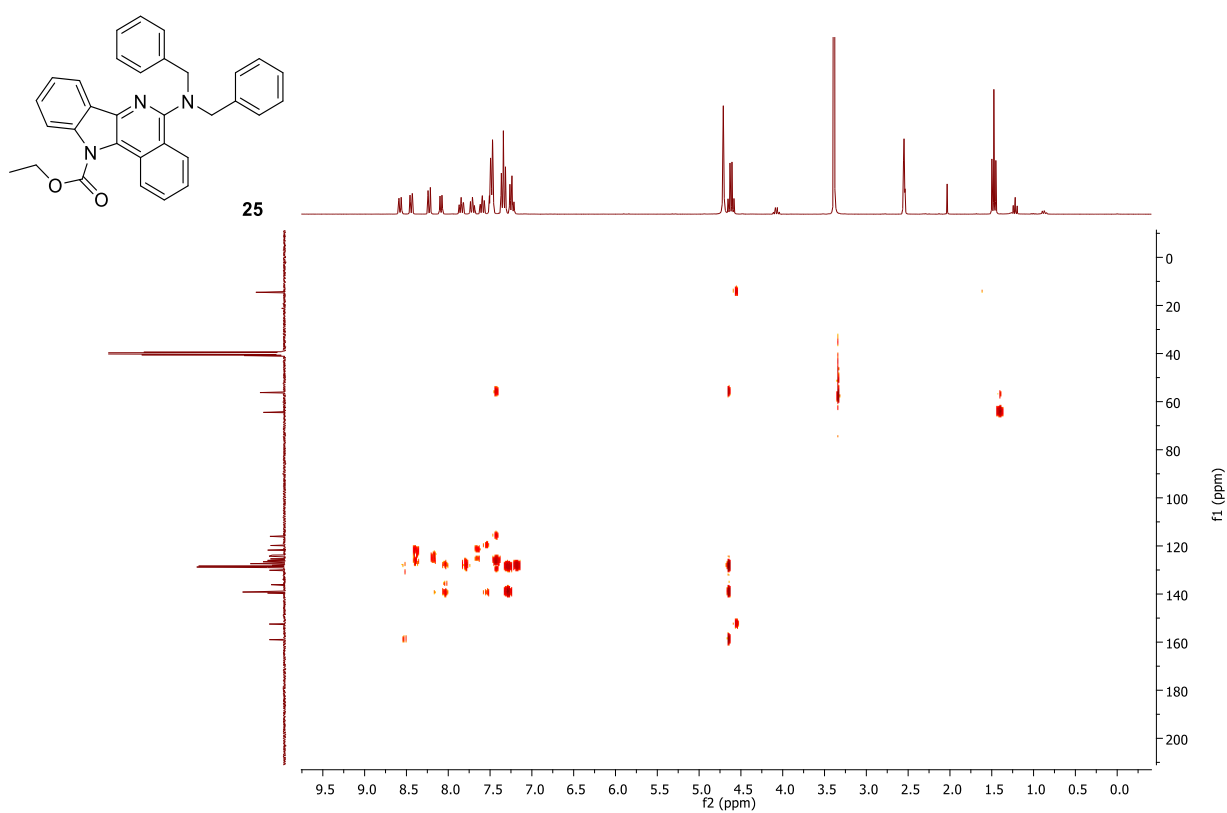
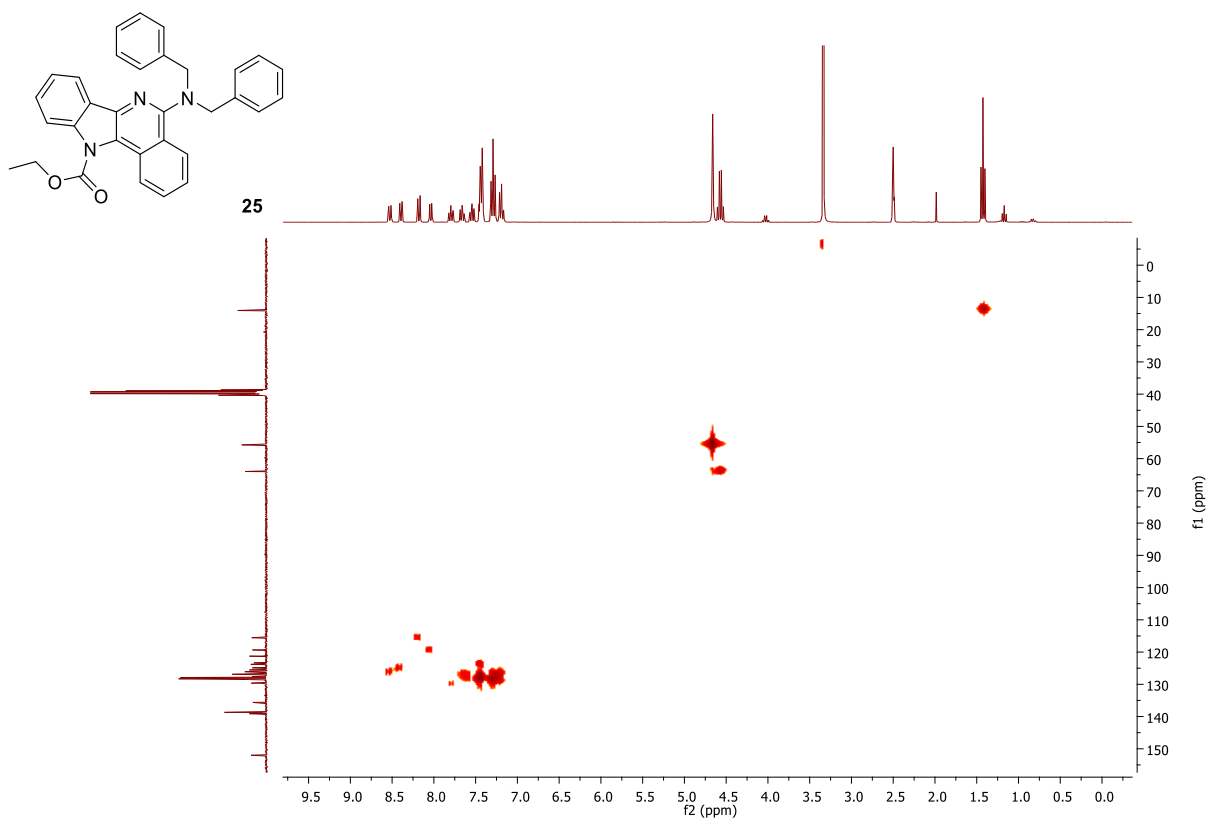


Figura 70 – Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN do composto 25 em  $\text{DMSO-d}_6$ .





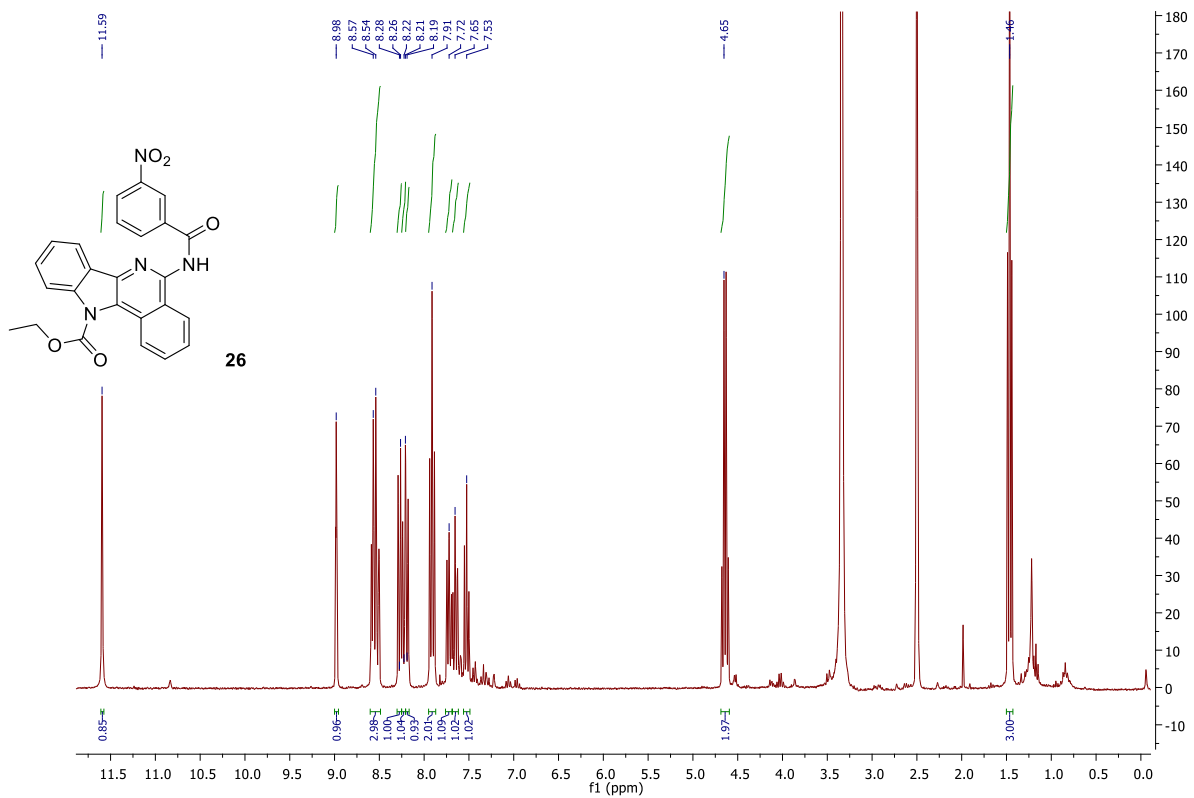


Figura 73 – Espetro de  $^1\text{H-NMR}$  do composto 26 em  $\text{DMSO-d}_6$ .

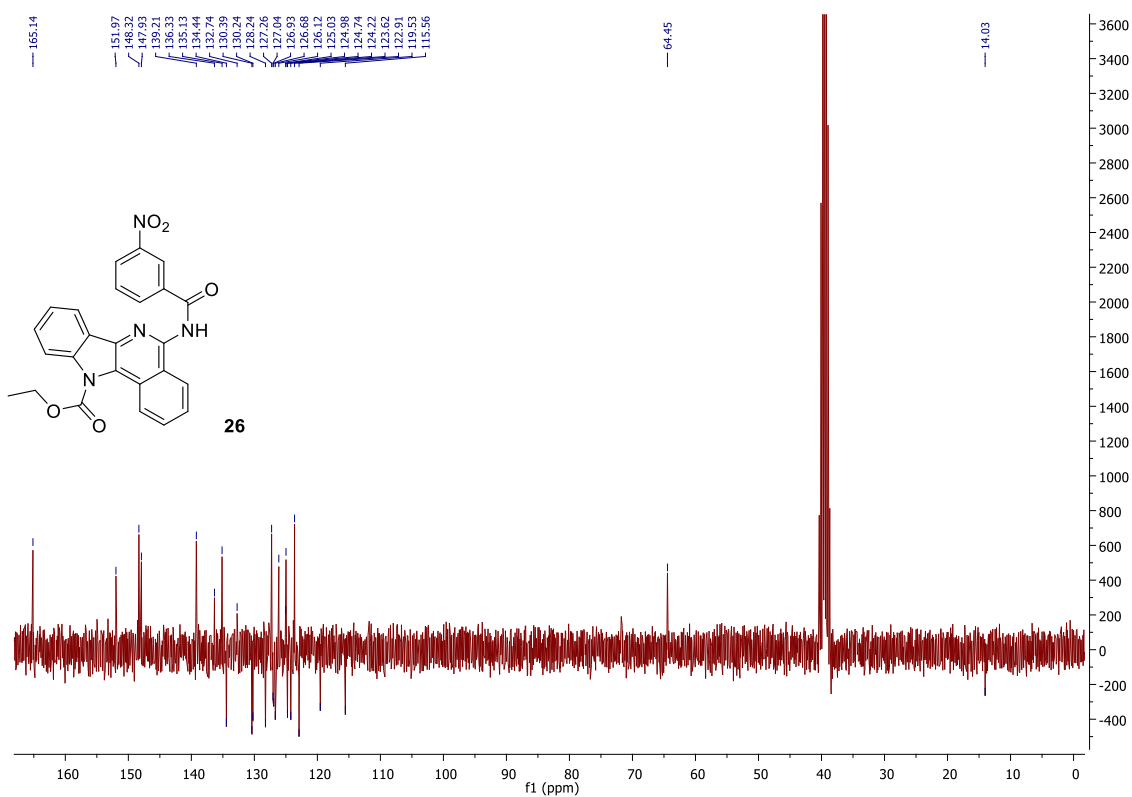


Figura 74 – Espetro de  $^{13}\text{C-APT}$  do composto 26 em  $\text{DMSO-d}_6$ .

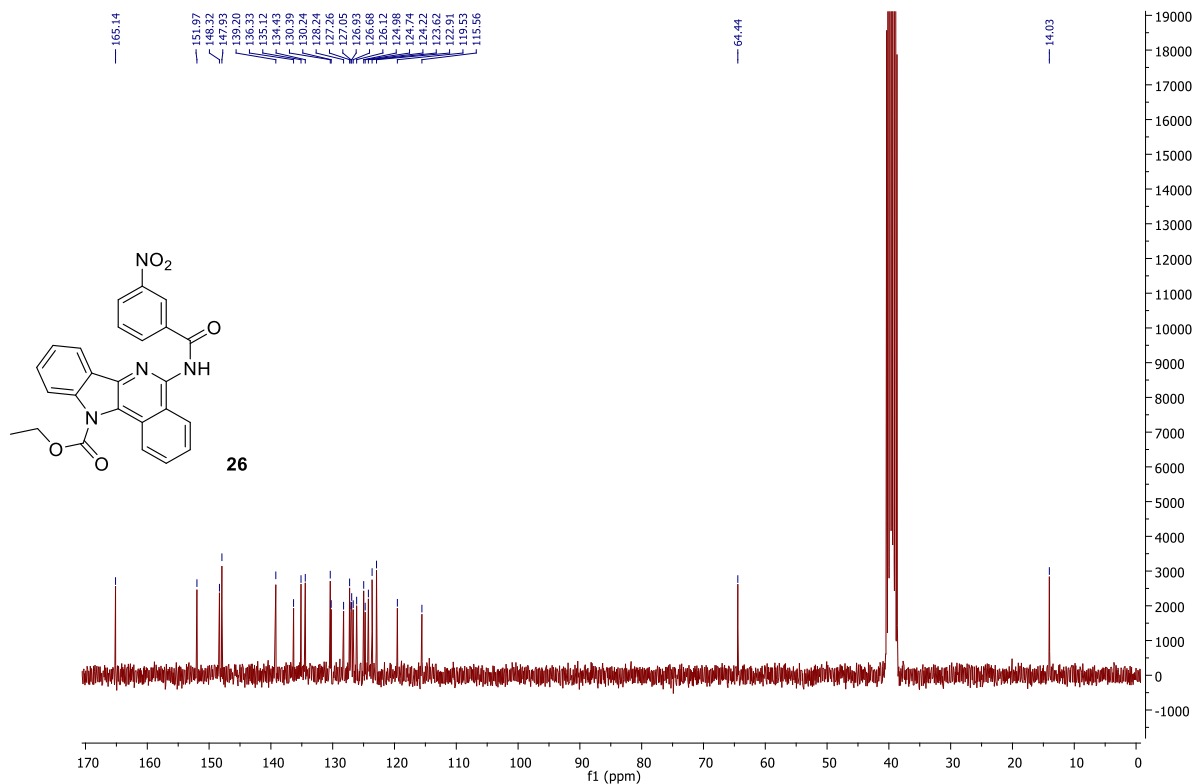


Figura 75 – Espetro de  $^{13}\text{C}$ -RMN do composto 26 em  $\text{DMSO-d}_6$ .

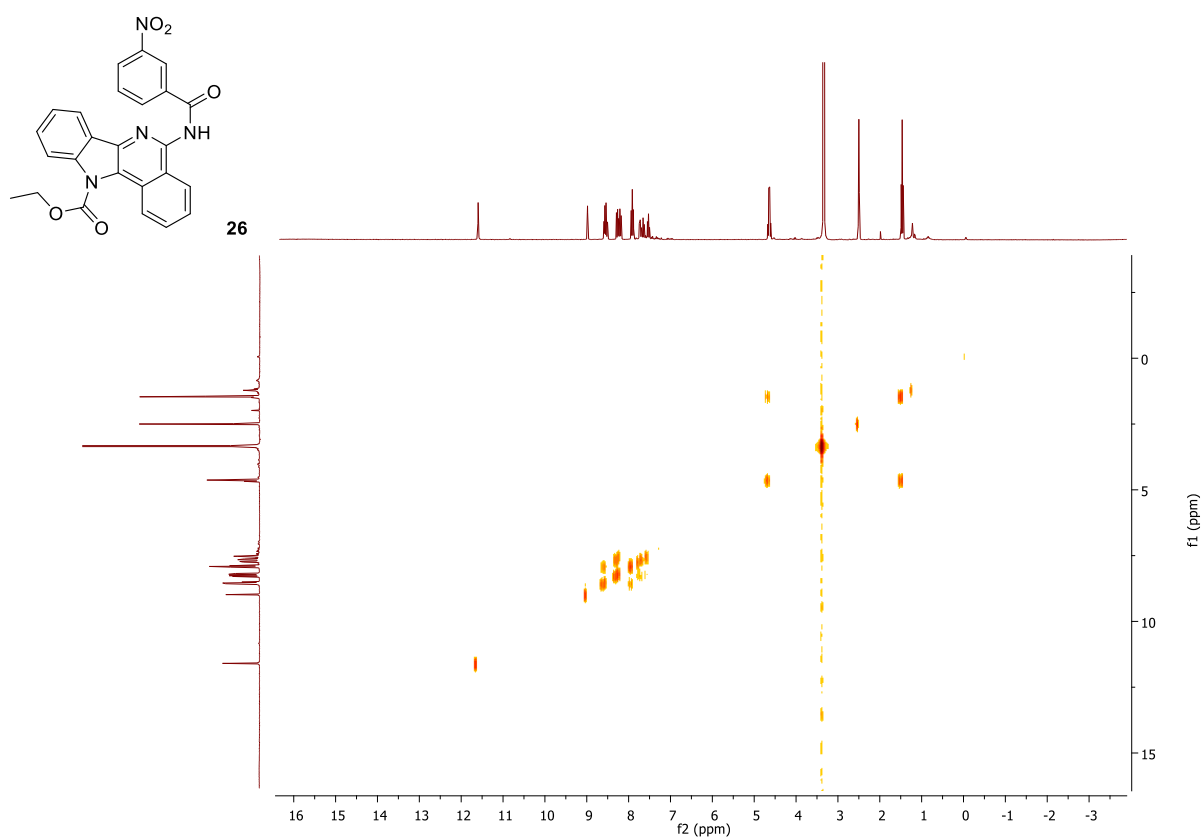


Figura 76 - Espetro bidimensional COSY do composto 26 em  $\text{DMSO-d}_6$ .

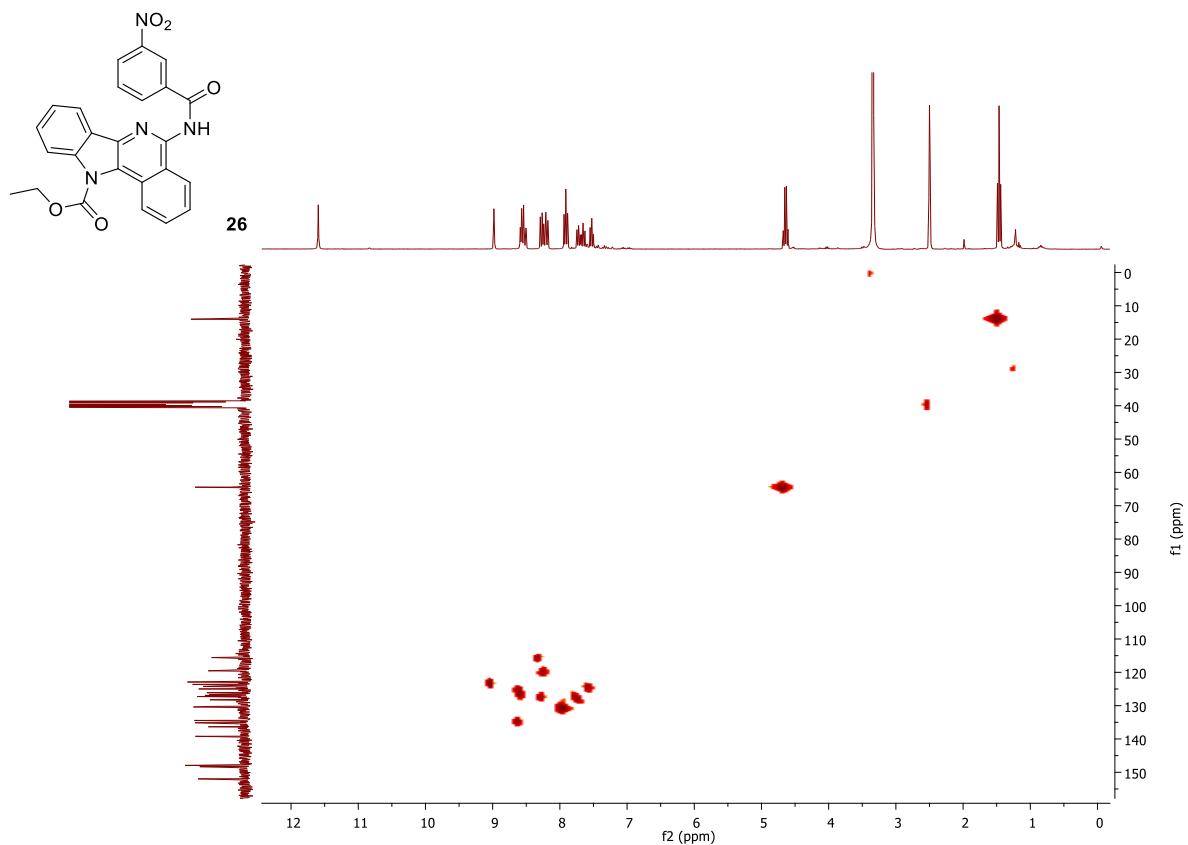


Figura 77 - Espectro bidimensional HMQC do composto **26** em  $\text{DMSO-d}_6$ .

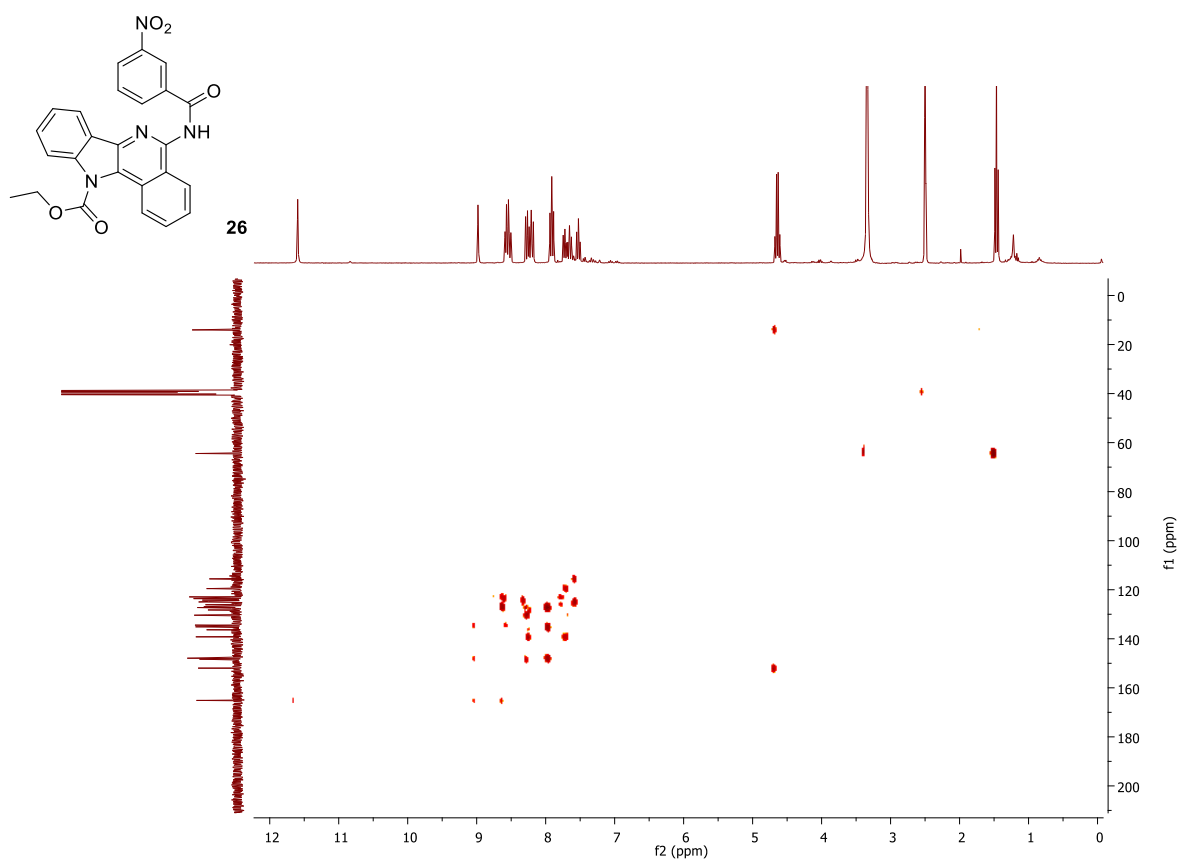


Figura 78 - Espectro bidimensional HMBC do composto **26** em  $\text{DMSO-d}_6$ .

