

(11) Número de Publicação: **PT 2046779 E**

(51) Classificação Internacional:

**C07D 403/12** (2011.01) **C07D 207/273** (2011.01)  
**A61K 31/4025** (2011.01)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2007.07.26**

(30) Prioridade(s): **2006.07.28 US 834235 P**  
**2007.03.21 US 896026 P**  
**2007.07.25 US 782742**

(43) Data de publicação do pedido: **2009.04.15**

(45) Data e BPI da concessão: **2011.05.18**  
**140/2011**

(73) Titular(es):

**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY**  
**ROUTE 206 AND PROVINCE LINE ROAD P.O.**  
**BOX 4000 PRINCETON NJ 08543-4000** US

(72) Inventor(es):

**PERCY H. CARTER** US  
**ZILI XIAO** US  
**MICHAEL G. YANG** US  
**JOHN V. DUNCIA** US  
**BOGUSLAW M. MUDRYK** US

(74) Mandatário:

**MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA**  
AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **MODULADORES DA ACTIVIDADE DO RECEPTOR DE QUIMIOCINA, FORMAS CRISTALINAS E PROCESSO**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA UM NOVO ANTAGONISTA OU AGONISTA/ANTAGONISTA PARCIAL DA ACTIVIDADE DO RECEPTOR MCPI1: N-((1R,2S,5R)-5-(TERC-BUTILAMINO)-2-((S)-2-OXO-3-(6-PIRROLIDINA-1-IL)- CICLO-HEXIL)-ACETAMIDA, OU UM SEU SAL, SOLVATO OU PRÓFÁRMACO FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL, QUE POSSUI UMA COMBINAÇÃO INESPERADA DE CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS DESEJÁVEIS. TAMBÉM SÃO PROPORCIONADAS FORMAS CRISTALINAS DA PRESENTE INVENÇÃO. AS COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE CONTÊM ESTES COMPOSTOS E MÉTODOS PARA A SUA UTILIZAÇÃO COMO AGENTES PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS, ALÉRGICAS, AUTO-IMUNES, METABÓLICAS, CANCRO E/OU DOENÇAS CARDIOVASCULARES TAMBÉM CONSTITUI UM OBJECTO DA PRESENTE INVENÇÃO. A PRESENTE DESCRIÇÃO TAMBÉM PROPORCIONA UM PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DOS COMPOSTOS DE FÓRMULA ESTRUTURAL (I), INCLUINDO N-((1R,2S,5R)-5-(TERCBUTILAMINO)- 2-((S)-2-OXO-3-(6-(TRIFLUOROMETIL)-QUINAZOLINA-4-ILAMINO)-PIRROLIDINA-1-IL)-CICLO-HEXIL)-ACETAMIDA: EM QUE OS SÍMBOLOS R1, R8, R9, R10 E *¿HET¿* POSSUEM AS SIGNIFICAÇÕES AQUI DEFINIDAS. TAMBÉM SÃO AQUI PROPORCIONADOS COMPOSTOS QUE SÃO INTERMEDIÁRIOS ÚTEIS DO PROCESSO.

**RESUMO****"MODULADORES DA ACTIVIDADE DO RECEPTOR DE QUIMIOCINA,  
FORMAS CRISTALINAS E PROCESSO"**

A presente invenção proporciona um novo antagonista ou agonista/antagonista parcial da actividade do receptor MCP-II: N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, ou um seu sal, solvato ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável, que possui uma combinação inesperada de características farmacológicas desejáveis. Também são proporcionadas formas cristalinas da presente invenção. As composições farmacêuticas que contêm estes compostos e métodos para a sua utilização como agentes para o tratamento de doenças inflamatórias, alérgicas, auto-imunes, metabólicas, cancro e/ou doenças cardiovasculares também constitui um objecto da presente invenção. A presente descrição também proporciona um processo para a preparação dos compostos de fórmula estrutural (I), incluindo N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida: em que os símbolos R<sup>1</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup> e "HET" possuem as significações aqui definidas. Também são aqui proporcionados compostos que são intermediários úteis do processo.

### DESCRICAÇÃO

#### **"MODULADORES DA ACTIVIDADE DO RECEPTOR DE QUIMIOCINA, FORMAS CRISTALINAS E PROCESSO"**

##### **CAMPO DA INVENÇÃO**

A presente invenção proporciona N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, ou um seu sal, solvato ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável, que possui uma combinação inesperada de características farmacológicas desejáveis. Também são proporcionadas formas cristalinas da presente invenção. As composições farmacêuticas que contêm estes compostos e a sua utilização como agentes para o tratamento de doenças inflamatórias, alérgicas, auto-imunes, metabólicas, cancro e/ou doenças cardiovasculares também constituem um objecto da presente invenção.

##### **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

As quimiocinas são citoquinas quimiotácticas, que possuem um peso molecular de 6-15 kDa, que são libertadas por diversos tipos de células para atrair e activar, entre outros tipos de células, macrófagos, linfócitos T e B, eosinófilos, basófilos e neutrófilos (discussão em: Charo e Razonhoff, New Eng. J. Med. 2006, 354, 610-621; Luster, New Eng. J. Med. 1998, 338, 436-445; e Rollins, Blood 1997, 90, 909-928). Existem duas classes principais de quimiocinas, CXC e CC, dependendo de as duas primeiras cisteínas na sequência de aminoácidos estarem separadas por um único aminoácido (CXC) ou serem adjacentes (CC). As quimiocinas

CXC, tais como interleucina-8 (IL-8), proteína 2 activadora de neutrófilos (NAP-2) e proteína de actividade estimulatória do crescimento (MGSA), são quimiotácticas principalmente para os neutrófilos e para os linfócitos T, ao passo que as quimiocinas CC, tais como RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , as proteínas quimiotácticas de monócitos (MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4 e MCP-5) e as eotaxinas (-1 e -2) são quimiotácticas para, entre outros tipos de células, macrófagos, linfócitos T, eosinófilos, células dendríticas e basófilos. Existem ainda as quimiocinas linfotactina-1, linfotactina-2 (ambas quimiocinas C) e faractalquina (uma quimiocina CX<sub>3</sub>C) que não pertencem a qualquer uma das subfamílias principais de quimiocinas.

As quimiocinas ligam-se a receptores específicos da superfície das células que pertencem à família das proteínas dos sete domínios transmembranares acoplados à proteína G (descritos em: Horuk, Trends Pharm. Sci. 1994, 15, 159-165), os quais são designados por "receptores de quimiocinas". Ao se ligarem aos seus ligandos associados, os receptores de quimiocinas transduzem um sinal intracelular apesar das proteínas G triméricas associadas, originando, entre outras respostas, um aumento rápido da concentração de cálcio intracelular, alterações nas formas das células, expressão aumentada das moléculas de adesão celular, desgranulação e promoção da migração celular. Existem pelo menos dez receptores de quimiocinas humanos que se ligam ou que respondem a quimiocinas CC com os padrões característicos seguintes (descrição em Zlotnik e Oshie, Immunity 2000, 12, 121): CCR-1 (ou "CKR-1" ou "CC-CKR-I") [MIP-1 $\alpha$ , MCP-3, MCP-4, RANTES] (Ben-Barruch, et al., Cell 1993, 72, 415-425, e Luster, New Eng. J. Med.

1998, 338, 436-445); CCR-2A e CCR-2B (ou "CKR-2A"/"CKR-2B" ou "CC-CKR-2A"/"CC-CKR-2B") [MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5] (Charo, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91, 2752-2756, e Luster, New Eng. J. Med. 1998, 338, 436-445); CCR-3 (ou "CKR-3" ou "CC-CKR-3") [eotaxina-1, cotaxina-2, RANTES, MCP-3, MCP-4] (Combadiere, et al., J. Biol. Chem. 1995, 270, 16491-16494, e Luster, New Eng. J. Med. 1998, 338, 436-445); CCR-4 (ou "CKR-4" ou "CC-CKR-4") [TARC, MDC] (Power, et al., J. Biol. Chem. 1995, 270, 19495-19500, e Luster, New Eng. J. Med. 1998, 338, 436-445); CCR-5 (ou "CKR-5" ou "CC-CKR-5") [MIP-1 $\alpha$ , RANTES, MIP-1 $\beta$ ] (Sanson, et al., Biochemistry 1996, 35, 3362-3367); CCR-6 (ou "CKR-6" ou "CC-CKR-6") [LARC] (Baba, et al., J. Biol. Chem. 1997, 272, 14893-14898); CCR-7 (ou "CKR-7" ou "CC-CKR-7") [ELC] (Yoshie et al., J. Leukoc. Biol. 1997, 62, 634-644); CCR-8 (ou "CKR-8" ou "CC-CKR-8") [1-309] (Napolitano et al., J. Immunol., 1996, 157, 2759-2763); CCR-10 (ou "CKR-10" ou "CC-CKR-10") [MCP-1, MCP-3] (Bonini, et al., ADN e Cell Biol. 1997, 16, 1249-1256); e CCR-11 [MCP-1, MCP-2, e MCP-4] (Schweickert, et al., J. Biol. Chem. 2000, 275, 90550).

Para além dos receptores de quimiocinas de mamíferos, os citamegalovírus de mamíferos, o vírus do herpes e o poxvírus também revelaram expressar, em células infectadas, proteínas com as propriedades de ligação dos receptores de quimiocinas (descrição em: Wells e Schwartz, Curr. Opin. Biotech. 1997, 8, 741-748). As quimiocinas CC humanas, tais como RANTES e MCP-3, podem provocar uma mobilização rápida de cálcio através destes receptores codificados por vírus. A expressão do receptor pode ser permissiva para infecções uma vez que permite a subversão da vigilância do sistema

imune normal e a resposta à infecção. Além disso, os receptores de citoquinas humanas, tais como CXCR4, CCR2, CCR3, CCR5 e CCR8, podem actuar como co-receptores para a infecção de células de mamíferos por meio de micróbios, tal como, por exemplo, os vírus de imunodeficiência humana (VIH).

As quimiocinas e os seus receptores associados foram já implicados como sendo mediadores importantes de doenças e distúrbios inflamatórios, infecciosos e imuno-reguladores, incluindo asma e doenças alérgicas; bem como patologias auto-imunes, tais como artrite reumatóide e esclerose múltipla; e doenças metabólicas, tais como aterosclerose e diabetes (descrição em: Charo e Rasonhoff, *New Eng. J. Med.* 2006, 354, 610-621; Z. Gao e W. A. Metz, *Chem. Rev.* 2003, 103, 3733; P. H. Carter, *Current Opinion in Chemical Biology* 2002, 6, 510; Trivedi, et al, *Ann. Reports Med. Chem.* 2000, 35, 191; Saunders e Tarby, *Drug Disc. Today* 1999, 4, 80; Prcmack e Schall, *Nature Medicine* 1996, 2, 1174). Por exemplo, a quimiocina de monócitos quimioatractora-1 (MCP-1) e o seu receptor, receptor 2 de quimiocinas CC (CCR-2) desempenham um papel crucial na atracção de leucócitos para locais de inflamação e na activação subsequente destas células. Quando a quimiocina MCP-1 se liga a CCR-2, induz um aumento rápido na concentração de cálcio intracelular, uma expressão aumentada das moléculas de adesão celular e a promoção da migração de leucócitos. A demonstração da importância da interacção entre MCP-1/CCR-2 foi fornecida por experiências com murganhos geneticamente modificados. Os murganhos MCP-1<sup>-/-</sup> foram incapazes de recrutar monócitos para locais de inflamação após diferentes tipos de estímulo imune (Bao Lu,

et al., *J. Exp. Med.* 1998, 187, 601). De igual modo, os murganhos CCR-2 -/- foram incapazes de recrutar monócitos ou produzir interferão-γ quando estimulados com diversos agentes endógenos; além do mais, os leucócitos de murganhos com CCR-2 nulo não migraram em resposta a MCP-1 (Landin Boring, et al., *J. Clin. Invest.* 1997, 100, 2552), demonstrando assim a especificidade da interacção MCP-1/CCR-2. Dois outros grupos apresentaram, de um modo independente, resultados equivalentes com estirpes diferentes de murganhos CCR-2 -/- (William A. Kuziel, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 12053, e Takao Kurihara, et al., *J. Exp. Med.* 1997, 186, 1757). A viabilidade e o estado de saúde normal dos animais MCP-1 -/- e CCR-2 -/- foi notável, uma vez que a perturbação da interacção entre MCP-1/CCR-2 não induz crises fisiológicas. Considerados em conjunto, estes dados permitem concluir que as moléculas que bloqueiam as acções de MCP-1/CCR2 serão úteis para o tratamento de diversos distúrbios inflamatórios e auto-imunes (descrição em: M. Feria e F. Díaz-González, *Exp. Opin. Ther. Patents* 2006, 16, 49; e J. Dawson, W. Miltz, e C. Wiessner, *C. Exp. Opin. Ther. Targets* 2003, 7, 35). Esta hipótese foi agora validada em diversos modelos animais de doenças diferentes, conforme a seguir se descreve.

Sabe-se que o MCP-1 é aumentado por externalização em pacientes com artrite reumatóide (Alisa Koch, et al., *J. Clin. Invest.* 1992, 90, 772 - 779). Além do mais, diversos estudos pré-clínicos demonstraram o valor terapêutico potencial do antagonismo da interacção entre MCP-1/CCR2 para o tratamento de artrite reumatóide. Uma vacina de ADN que codifique MCP-1 demonstrou recentemente melhorar a

artrite crónica induzida por poli-adjuvantes em ratos (Sawsan Youssef, *et al.*, *J. Clin. Invest.* 2000, 106, 361). De igual modo, os sintomas da doença puderam ser controlados por meio da administração directa de anticorpos para MCP-1 a ratos com artrite induzida por colagénio (Hiroomi Ogata, *et al.*, *J. Pathol.* 1997, 182, 106), ou artrite induzida pela parede celular de estreptococos (Ralph C. Schimmer, *et al.*, *J. Immunol.* 1998, 160, 1466). Porventura mais significativo, um antagonista peptídico de MCP-1, MCP-1(9-76), demonstrou prevenir o início da doença e reduzir os sintomas da doença (em função do tempo de administração) no modelo de murganho MRL-1pr de artrite (Jiang-Hong Gong, *et al.*, *J. Exp. Med.* 1997, 186, 131). Além do mais, demonstrou-se que a administração de antagonistas de CCR2 de moléculas pequenas reduziu o resultado clínico em modelos de roedores de artrite (C. M. Brodmerkel, *et al.*, *J. Immunol.* 2005, 175, 5370; e M. Xia, *et al.*, pedido de patente de invenção norte-americana nº 0069123, 2006). A administração de um anticorpo anti-CCR2 apresentou efeitos variáveis em murinos CIA, dependendo do tempo de administração (H. Bruhl, *et al.*, *J. Immunol.* 2004, 172, 890). Estudos recentes com murganhos CCR2-/- sugeriram que a supressão de CCR2 pode agravar a artrite em modelos de roedores em circunstâncias experimentais específicas (M. P. Quinones, *et al.*, *J. Clin. Invest.* 2004, 113, 856; M. P. Quinones, *et al.*, *J. Mol. Med.* 2006, 84, 503).

Sabe-se que MCP-1 é aumentado por externalização em lesões ateroscleróticas e demonstrou-se que os níveis em circulação de MCP-1 são reduzidos por meio do tratamento com agentes terapêuticos (Abdolreza Rezaie-Majd, *et al.*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002, 22, 1194 - 1199).

Diversos estudos importantes demonstraram o valor terapêutico potencial do antagonismo da interacção entre MCP-1/CCR2 para o tratamento de aterosclerose. Por exemplo, quando murganhos MCP-1  $-/-$  são cruzados com murganhos deficientes no receptor LDL, observa-se uma redução de 83% na deposição aórtica de lípidos (Long Gu, et al., Mol. Cell 1998, 2, 275). De igual modo, quando o MCP-1 foi geneticamente removido de murganhos que já sobreexpressavam a apolipoproteína B humana, os murganhos resultantes foram protegidos da formação de lesões ateroscleróticas comparativamente com murganhos de controlo de MCP-1  $+/+$  apoB (Jennifa Gosling, et al., J. Clin. Invest. 1999, 103, 773). De igual modo, quando murganhos CCR-2  $-/-$  são cruzados com murganhos apolipoproteína E  $-/-$ , observa-se uma diminuição significativa na incidência de lesões ateroscleróticas (Landin Boring, et al., Nature 1998, 394, 894; T. C. Dawson, et al. Atherosclerosis 1999, 143, 205). Por último, quando se administra a murganhos apolipoproteína E  $-/-$  um gene que codifica um antagonista peptídico de CCR2, então o tamanho da lesão é diminuído e a estabilidade das placas é aumentada (W. Ni, et al., Circulation 2001, 103, 2096 – 2101). O transplante de medula óssea proveniente de murganhos CCR2 $-/-$  em murganhos ApoE3-Leiden inibiu a aterogênese precoce (J. Guo, et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2003, 23, 447), mas apresentou efeitos mínimos em lesões avançadas (J. Guo, et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2005, 25, 1014).

Os pacientes com diabetes mellitus de tipo 2 exibem tipicamente resistência à insulina como uma das características principais da doença. A resistência à insulina também está associada ao conjunto de anomalias

designado por "síndrome metabólica" ou "síndrome X", o qual compreende obesidade, aterosclerose, hipertensão e dislipidemia (descrito em: Eckel, et al. Lancet 2005, 365, 1415). Sabe-se que a inflamação desempenha um papel no agravamento do processo de doença em diabetes de tipo 2 e nas patologias de "síndrome X" (descrito em: Chen, Pharmacological Research 2006, 53, 469; Neels e Olefsky, J. Clin. Invest. 2006, 116, 33; Danadona e Aljada, Am J Cardiol. 2002 90, 27G-33G; Pickup e Crook, Diabetologia 1998, 41, 1241). Sabe-se que o MCP-1 desempenha um papel na resistência à insulina induzida pela obesidade. Em cultura, MCP-1 expressos constitutivamente em preadipócitos humanos (Gerhardt, Mol. Cell. Endocrinology 2001, 175, 81). O CCR2 é expresso em adipócitos; a adição de MCP-1 a adipócitos diferenciados *in vitro* diminui a absorção de glicose estimulada por insulina e a expressão de diversos genes adipogénicos (LpL, adipina, GLU-4), aP2, receptor  $\beta$ 3-adrenérgico e PPAR $\gamma$  (P. Sartipy e D. Loskutoff, Proc. Natl. Acad. Sci USA 1999, 96, 6902). Os pacientes com diabetes de tipo 2 apresentam níveis mais elevados de MCP-1 em circulação do que controlos não diabéticos (S. Nomura, et al., Clin. Exp. Immunol. 2000, 121, 437), e a libertação de MCP-1 a partir de tecidos adiposos pode ser reduzida através do tratamento com terapias anti-diabéticas, tais como metformina ou tiazolidinadionas (J. M. Bruun, et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 2005, 90, 2282). De igual modo, o MCP-1 também é sobreexpresso em modelos experimentais de murinos de obesidade e é principalmente produzido pelos tecidos adiposos (Sartipy e Loskutoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003, 100, 7265). Em murganhos obesos, a expressão de MCP-1 precede e ocorre em

simultâneo com o início da resistência à insulina (H. Xu, et al., *J. Clin. Invest.* 2003, 112, 1821). Um outro estudo revelou que a expressão de MCP-1 estava correlacionada positivamente com a massa corporal no tecido adiposo perigonadal de murganhos (Weisberg, et al. *J. Clin. Invest.* 2003, 112, 1796). De um modo consistente com estes dados, o desenvolvimento de resistência à insulina em murganhos db/db foi melhorado por meio de supressão genética de MCP-1 ou por expressão induzida por genes de um péptido negativo dominante (H. Kanda, et al. *J. Clin. Invest.* 2006, 116, 1494). A conversão lógica também pode ser demonstrada: a sobreexpressão de MCP-1 em tecidos adiposos promovida pela resistência à insulina (N. Kamei, et al. *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 26602). Um resultado conflituoso que mostra que a supressão genética de MCP-1 não afecta a resistência à insulina em murganhos db/db também foi apresentado (F. Y. Chow, et al. *Diabetologia* 2007, 50, 471). Consistente com os dados sobre MCP-1, estudos directos com CCR2 (o receptor de MCP-1) demonstraram que este desempenha um papel na formação de obesidade e de resistência à insulina induzida pela obesidade. A manutenção de uma dieta com um elevado teor em gordura faz aumentar os valores de monócitos inflamatórios CCR2<sup>+</sup> em circulação em murganhos de tipo selvagem (C. L. Tsou, et al. *J. Clin. Invest.* 2007, 117, 902) e em murganhos ApoE<sup>-/-</sup> (F. Tacke, et al. *J. Clin. Invest.* 2007, 117, 185). A supressão genética de CCR2 fez reduzir os valores de macrófagos activados em tecidos adiposos de murinos (C. N. Lumeng, et al. *Diabetes* 2007, 56, 16), mas não afectou uma população de macrófagos adiposos M2 que se pensava que mantinham um estado "com menos gordura" (C. N. Lumeng, et al. *J. Clin. Invest.* 2007,

117, 175). A supressão genética de CCR2 fez reduzir a obesidade induzida por dieta e fez melhorar a sensibilidade à insulina em modelos de obesidade induzida pela dieta (S. P. Weisberg, *et al.* *J. Clin. Invest.* 2006, 776, 115; P Cornelius, RP Gladue, RS Sebastian, patente de invenção nº WO 2006/013427 A2), 2006), em função das condições experimentais (A. Chen, *et al.* *Obes. Res.* 2005, 13, 1311). A administração de antagonistas de CCR2 de moléculas pequenas também melhorou a sensibilidade à insulina neste mesmo modelo (S. P. Weisberg, *et al.* *J. Clin. Invest.* 2006, 116, 115).

Dois estudos descreveram o papel importante de CCR2 na inflamação vascular induzida pela hipertensão, remodelação e hipertrofia (E Bush *et al.*, *Hypertension* 2000, 36, 360; M Ishibashi, *et al.* *Circ. Res.* 2004, 94, 1203).

Sabe-se que MCP-1 é aumentado por externalização na esclerose múltipla humana e demonstrou-se já que uma terapia eficaz com interferão  $\beta$ -1b reduz a expressão de MCP-1 em células mononucleares de sangue periférico, o que sugere que o MCP-1 desempenha um papel na progressão da doença (Carla Iarlori, *et al.*, *J. Neuroimmunol.* 2002, 123, 170- 179). Outros estudos demonstraram o valor terapêutico potencial do antagonismo da interacção entre MCP-1/CCR-2 para o tratamento de esclerose múltipla; todos estes estudos foram demonstrados em encefalomielite auto-imune experimental (EAE), que é o modelo animal convencional para a esclerose múltipla. A administração de anticorpos para MCP-1 a animais com EAE diminuiu significativamente a recaída da doença (K. J. Kennedy, *et al.*, *J. Neuroimmunol.* 1998, 92, 98). Além do mais, dois relatórios demonstraram que os murganhos CCR-2  $-/-$  são resistentes a EAE (B. T.

Fife, *et al.*, *J. Exp. Med.* 2000, 192, 899; L. Izikson, *et al.*, *J. Exp. Med.* 2000, 192, 1075). Um relatório subsequente estendeu estas observações iniciais examinando os efeitos da supressão de CCR2 em murganhos provenientes de estirpes diferentes (S. Gaupp, *et al.* *Am. J. Pathol.* 2003, 162, 139). De um modo notável, a administração de antagonistas de CCR2 de moléculas pequenas também interrompeu a progressão da doença em murganhos C57BL/6 (C. M. Brodmerkel, *et al.* *J. Immunol.* 2005, 175, 5370).

Sabe-se que MCP-1 é aumentado por externalização em pacientes que desenvolvem a síndrome obliterante de bronquiolite após transplante de pulmão (Martine Reynaud-Gaubert, *et al.*, *J. of Heart and Lung Transplant.*, 2002, 21, 721 – 730; John Belperio, *et al.*, *J. Clin. Invest.* 2001, 108, 547 – 556). Num modelo de murino da síndrome obliterante de bronquiolite, a administração de um anticorpo para MCP-1 proporcionou uma atenuação da obliteração das vias aéreas; de igual modo, os murganhos CCR2  $-/-$  eram resistentes à obliteração das vias aéreas neste mesmo modelo (John Belperio, *et al.*, *J. Clin. Invest.* 2001, 108, 547 – 556). Estes dados sugerem que o antagonismo de MCP-1/CCR2 pode ser benéfico para o tratamento da rejeição de órgãos após transplante. Além do mais, os estudos demonstraram que a perturbação do eixo MCP-1/CCR2 permitiu prolongar a sobrevivência do transplante de ilhéus (I. Lee *et al.* *J. Immunol.* 2003, 171, 6929; R. Abdi *et al.*, *J. Immunol.* 2004, 172, 767). Em modelos de enxerto de ratos, o CCR2 e o MCP-1 demonstraram ser aumentados por externalização em enxertos que desenvolveram uma vasculopatia ao enxerto (K. Horiguchi *et al.*, *J. Heart Lung Transplant.* 2002, 21, 1090). Num outro estudo, a

terapia génica anti-MCP-1 atenuou a vasculopatia ao enxerto (A Saiura *et al.*, Artherioscler Thromb Vasc Biol 2004, 24, 1886). Num estudo, foi descrita a inibição da formação neointimal de enxertos de veias experimental por bloqueio de MCP-1 (H Tatewaki *et al.*, J Vasc Surg. 2007, 45, 1236).

Outros estudos demonstraram o valor terapêutico potencial do antagonismo da interacção entre MCP-1/CCR2 para o tratamento de asma. O sequestro de MCP-1 com um anticorpo de neutralização em murganhos com deficiência em ovalbumina provocou uma diminuição acentuada na hiper-responsividade bronquial e na inflamação (Jose-Angel Gonzalo, *et al.*, J. Exp. Med. 1998, 188, 157). Provou-se ser possível reduzir a inflamação alérgica das vias aéreas em murganhos deficientes em ovos de *Schistosoma mansoni* por meio da administração de anticorpos para MCP-1 (Nicholas W. Lukacs, *et al.*, J. Immunol. 1997, 158, 4398). De um modo consistente com este facto, murganhos MCP-1 -/- apresentaram uma resposta reduzida ao estímulo com ovos de *Schistosoma mansoni* (Bao Lu, *et al.*, J. Exp. Med. 1998, 187, 601).

Outros estudos demonstraram o valor terapêutico potencial do antagonismo da interacção entre MCP-1/CCR2 para o tratamento de doenças do rim. A administração de anticorpos para MCP-1 num modelo de murino de glomerulonefrite proporcionou uma diminuição notória na formação crescente e depósito glomerular de colagénio de tipo I (Clare M. Lloyd, *et al.*, J. Exp. Med. 1997, 185, 1371). Além disso, os murganhos MCP-1 -/- com nefrite do soro nefrotóxica induzida revelaram significativamente menos lesões tubulares do que os seus equivalentes MCP-1

+/+ (Gregory H. Tesch, et al., *J. Clin. Invest.* 1999, 103, 73).

Diversos estudos demonstraram o valor terapêutico potencial do antagonismo da interacção entre MCP-1/CCR2 para o tratamento de lúpus sistémico eritematoso. Os murganhos  $CCR2^{-/-}$  exibiram uma sobrevivência prolongada e uma redução em doenças dos rins em comparação com os seus equivalentes WT num modelo de murino de lúpus sistémico eritematoso (G. Perez de Lema, et al. *J. Am. Soc. Neph.* 2005, 16, 3592). Estes dados são consistentes com a actividade modificadora da doença encontrada em estudos recentes sobre a supressão genética de MCP-1 (S. Shimizu, et al. *Rheumatology (Oxford)* 2004, 43, 1121; Gregory H. Tesch, et al., *J. Exp. Med.* 1999, 190, 1813) ou com a administração de um antagonista peptídico de CCR2 (H. Hasegawa, et al. *Arthritis & Rheumatism* 2003, 48, 2555) em modelos de roedores de lúpus.

Verificou-se um aumento notável de 30 vezes em linfócitos própria lamina  $CCR2^+$  no intestino delgado proveniente de pacientes que padecem da doença de Crohn em comparação com o íleo não doente (S. J. Connor, et al. *Gut* 2004, 53, 1287). Também convém salientar, que se verificou uma expansão no subconjunto de monócitos  $CCR2^+/CD14^+/CD56^+$  em circulação em pacientes com doença de Crohn activa em comparação com os controlos. Diversos estudos em roedores demonstraram o valor terapêutico potencial do antagonismo da interacção entre MCP-1/CCR2 para o tratamento da doença de Crohn/colite. Os murganhos  $CCR2^{-/-}$  foram protegidos contra os efeitos de colite induzida com sulfato de dextrano-sódio (Pietro G. Andres, et al., *J. Immunol.* 2000, 164, 6303). A administração de um antagonista de molécula

pequena de CCR2, CCR5 e CXCR3 (afinidades de ligação a murino = 24, 236 e 369 nM, respectivamente) também protegeu contra a colite induzida por sulfato de dextrano-sódio (H. Tokuyama, *et al.* *Int. Immunol.* 2005, 17, 1023). Por último, os murganhos MCP-1-/- demonstraram lesões no cólon substancialmente reduzidas (quer macroscópicas quer histológicas) num modelo de colite induzida com hapteno (W. I. Khan, *et al.* *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2006, 291, G803).

EM dois relatórios, é descrita a sobreexpressão de MCP-1 nas células epiteliais do intestino e na mucosa do intestino de pacientes que padecem da doença inflamatória do intestino (H. C. Reinecker, *et al.*, *Gastroenterology* 1995, 108, 40, e Michael C. Grimm, *et al.*, *J. Leukoc. Biol.* 1996, 59, 804).

Um estudo descreve a associação do promotor de polimorfismo no gene MCP-1 com escleroderma (esclerose sistémica) (S Karrer *et al.*, *J. Invest Dermatol.* 2005, 124, 92). Em modelos associados de fibrose de tecidos, a inibição do eixo CCR2/MCP-1 reduziu a fibrose na pele (T Yamamoto e K Nishioka, *J. Invest Dermatol.* 2003, 121, 510; AM Ferreira *et al.*, *J. Invest Dermatol.* 2006, 126, 1900), no pulmão (T Okuma *et al.*, *J. Pathol.* 2004, 204, 594; M Gharaee-Kermani *et al.*, *Cytokine* 2003, 24, 266), no rim (K Kitagawa *et al.*, *Am. J. Pathol.* 2004, 165, 237; T Wada *et al.*, *J. Am. Soc. Nephrol.* 2004, 15, 940), no coração (S Hayashidani *et al.*, *Circulation* 2003, 108, 2134) e no fígado (S Tsuruta *et al.*, *Int. J. Mol. Med.* 2004, 14, 837).

Um estudo demonstrou o valor terapêutico potencial do antagonismo da interacção entre MCP-1/CCR2 para o tratamento de alveolite. Quando ratos com uma lesão do

pulmão complexa imunes a IgA foram tratados por via intravenosa com anticorpos desenvolvidos contra MCP-1 de ratos (JE), os sintomas de alveolite foram particularmente melhorados (Michael L. Jones, et al., *J. Immunol.* 1992, 149, 2147).

Diversos estudos demonstraram o valor terapêutico potencial do antagonismo da interacção entre MCP-1/CCR2 para o tratamento de cancro (descrição em: M. J. Craig e R. D. Loberg, *Cancer Metastasis Rev.* 2006, 25, 611; I. Conti e B. Rollins, *Seminars in Cancer Biology* 2004, 14, 149; R. Giles e R. D. Loberg, *Curr. Cancer Drug Targets* 2006, 6, 659). Quando murganhos imunodeficientes que suportam células do carcinoma de mama humano foram tratados com uma anticorpo anti-MCP-1, observou-se uma inibição de micrometástases no pulmão e um aumento na sobrevivência (Rosalba Salcedo, et al., *Blood* 2000, 96, 34-40). Utilizando pacientes tumorais clínicos humanos, a expressão de CCR2 estava associada à progressão do cancro da próstata (Y. Lu, et al. *J. Cell. Biochem.* 2007, 101, 676). *In vitro*, a expressão de MCP-1 demonstrou mediar o crescimento e a invasão de células do cancro da próstata (Y. Lu, et al. *Prostate* 2006, 66, 1311); além do mais, MCP-1 expresso pelas células de cancro da próstata induziram progenitores de medula óssea humana para a reabsorção óssea (Y. Lu, et al., *Cancer Res.* 2007, 67, 3646).

Diversos estudos descreveram o valor terapêutico potencial do antagonismo da interacção entre MCP-1/CCR2 para o tratamento de restenose. Em seres humanos, os níveis de MCP-1 estão correlacionados directamente com o risco de restenose (F. Cipollone, et al. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001, 21, 327). Murganhos deficientes em CCR2 ou em

MCP-1 apresentaram reduções na área intimal e na proporção íntima/média (em relação a ratos do tipo selvagem) após lesão arterial (Merce Roque, et al. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002, 22, 554; A. Schober, et al. *Circ. Res.* 2004, 95, 1125; W. J. Kim, et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003, 310, 936). Em murganhos, a transfecção de um inibidor negativo dominante de MCP-1 no músculo do esqueleto (K. Egashira, et al. *Circ. Res.* 2002, 90, 1167) também reduziu a hiperplasia intimal após lesão arterial. O bloqueio de CCR2 utilizando um anticorpo de neutralização reduziu a hiperplasia neointimal após tratamento com endoprótese em primatas (C. Horvath, et al. *Circ. Res.* 2002, 90, 488).

Dois relatórios descreveram a sobreexpressão de MCP-1 em ratos com lesão cerebral induzida (J. S. King, et al., *J. Neuroimmunol.* 1994, 56, 127, e Joan W. Berman, et al., *J. Immunol.* 1996, 156, 3017). Além disso, os estudos demonstraram que murganhos CCR2<sup>-/-</sup> (O. B. Dimitrijevic, et al. *Stroke* 2007, 38, 1345) e murganhos MCP-1<sup>-/-</sup> (P. M. Hughes, et al. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2002, 22, 308) são parcialmente protegidos de lesões isquémicas/lesões de reperfusão.

Sabe-se que os monócitos/macrófagos desempenham um papel importante no desenvolvimento da dor neuropática (Liu T, van Rooijen N, Tracey DJ, *Pain* 2000, 86, 25). De um modo consistente com esta noção, foi descrito recentemente um papel potencial para o CCR2 no tratamento de dor inflamatória e neuropática. Os murganhos CCR2<sup>-/-</sup> apresentaram respostas alteradas à dor inflamatória em comparação com os seus equivalentes WT, incluindo um comportamento reduzido à dor após injecção de formalina por

via intraplantar e uma alodinia mecânica ligeiramente reduzida após injeção intraplantar de CFA (C. Abbadie, *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci., USA 2003, 100, 7947). Além disso, os murganhos  $CCR2^{-/-}$  não apresentaram alodinia mecânica significativa após lesão do nervo ciático. De igual modo, um antagonista de CCR 2 de molécula pequena reduziu a alodinia mecânica para ~80% dos níveis pré-lesão após administração por via oral (C. Abbadie, J. A. Lindia, e H. Wang, WO PCT 110376, 2004).

Um estudo descreveu o papel crítico de MCP-1 em cardiomiopatia isquémica (N. G. Frangogiannis, *et al.*, Circulation 2007, 115, 584). Um outro estudo descreveu a atenuação de paragem cardíaca experimental após inibição de MCP-1 (S Hayashidani *et al.*, Circulation 2003, 108, 2134).

Outros estudos forneceram provas de que o MCP-1 é sobreexpresso em diversos estados patológicos não mencionados *supra*. Estes relatórios proporcionam provas de que os antagonistas de MCP-1 podem ser compostos terapêuticos úteis para tais doenças. Um outro estudo demonstrou a sobreexpressão de MCP-1 em aloenxertos cardíacos em roedores, sugerindo um papel para o MCP-1 na patogénese de arteriosclerose em transplantes (Mary E. Russell, *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, 90, 6086). A sobreexpressão de MCP-1 foi observada em células endoteliais do pulmão em pacientes com fibrose pulmonar idiopática (Harry N. Antoniades, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992, 89, 5371). De igual modo, a sobreexpressão de MCP-1 foi observada na pele de pacientes com psoríase (M. Deleuran, *et al.*, J. Dermatol. Sci. 1996, 13, 228, e R. Gillitzer, *et al.*, J. Invest. Dermatol. 1993, 101, 127); conclusões correlacionadas com predominância de células

CCR2+ também foram descritas (C. Vestergaard, *et al.* *Acta Derm. Venerol.* 2004, 84, 353). Por último, um relatório recente demonstrou que o MCP-1 é sobreexpresado nos fluidos cerebral e cerebrospinal de pacientes com demência associada ao VIH-1 (Alfredo Garzino-Demo, WO 99/46991).

Além do mais, o polimorfismo de CCR2 tem demonstrado estar associado a sarcoidose pelo menos num subconjunto de pacientes (P. Spagnolo, *et al.* *Am J Respir Crit Care Med.* 2003, 168, 1162).

Também se faz salientar que o CCR-2 foi implicado como co-receptor para algumas estirpes de VIH (B. J. Doranz, *et al.*, *Cell* 1996, 85, 1149). Também foi determinado que a utilização de CCR-2 como co-receptor de VIH pode estar correlacionado com a progressão da doença (Ruth I. Connor, *et al.*, *J. Exp. Med.* 1997, 185, 621). Esta conclusão é consistente com a descoberta recente de que a presença de um mutante de CCR-2, CCR2-641, está correlacionada positivamente com o início retardado de VIH na população humana (Michael W. Smith, *et al.*, *Science* 1997, 277, 959). Embora o MCP-1 não tenha sido implicado nestes processos, é possível que os antagonistas de MCP-1 que actuem por meio da ligação a CCR-2 possam apresentar efeitos terapêuticos benéficos para retardar a progressão da doença em SIDA para pacientes infectados com VIH.

Faz-se salientar que o CCR2 também é o receptor para as quimiocinas humanas, MCP-2, MCP-3 e MCP-4 (Luster, *New Eng. J. Med.* 1998, 338, 436-445). Uma vez que os novos compostos de fórmula estrutural (I) aqui descritos antagonizam o MCP-1 por ligação ao receptor CCR-2, pode ser possível que estes compostos de fórmula estrutural (I) também sejam antagonistas eficazes para as acções de MCP-2,

MCP-3 e MCP-4 que sejam mediadas por CCR-2. Assim sendo, quando aqui se referir "antagonismo de MCP-1", assume-se que tal é equivalente a "antagonismo da estimulação de quimiocinas de CCR-2".

Assim sendo, os compostos que modulam a actividade de quimiocina podem apresentar uma utilização ampla para o tratamento de doenças inflamatórias, alérgicas, auto-imunes, metabólicas, cancro e/ou doenças cardiovasculares. Na publicação da patente de invenção nº WO2005021500 A1 (aqui incorporada por referência e atribuída à presente requerente) encontram-se descritos compostos que modulam a actividade de MCP-1, MCP-2, MCP-3 e MCP-4 através de CCR2. Esta referência também descreve diversos processos para a preparação destes compostos, incluindo sínteses com múltiplos passos que compreendem a introdução e subsequente remoção de grupos protectores.

É desejável encontrar novos compostos com características farmacológicas melhoradas em comparação com moduladores de quimiocinas conhecidos. Por exemplo, é desejável encontrar novos compostos com uma actividade inibitória melhorada para CCR-2 e selectividade para CCR-2 *versus* outros receptores acoplados à proteína G (isto é, receptor 5HT2A). Também é desejável encontrar novos compostos com características vantajosas e melhoradas numa ou em várias das seguintes categorias:

(a) propriedades farmacêuticas (isto é, solubilidade, permeabilidade, capacidade para formulações de liberação prolongada);

(b) requisitos de dosagem (*v.g.*, dosagens inferiores e/ou dosagem uma vez por dia);

(c) factores que diminuam as características de pico da concentração no sangue (isto é, desaparecimento e/ou volume de distribuição);

(d) factores que aumentem a concentração do fármaco activo no receptor (isto é, ligação a proteínas, volume de distribuição);

(e) factores que diminuam a passividade em interacções clínicas fármaco-fármaco (inibição ou indução da enzima P450 citocromo, tal como a inibição de CYP 2D6, veja-se G.K. Dresser, J.D. Spence, D.G. Bailey, Clin. Pharmacokinet. 2000, 38, 41-57, aqui incorporada por referência);

(f) factores que diminuem o potencial para efeitos adversos (v.g., selectividade farmacológica para além dos receptores acoplados à proteína G, reactividade química ou metabólica potencial, penetração limitada no SNC e/ou selectividade do canal de iões).

É particularmente desejável encontrar compostos que possuam uma combinação desejável das características farmacológicas supramencionadas.

#### **DESCRÍÇÃO ABREVIADA DA INVENÇÃO**

A presente invenção proporciona um novo antagonista ou agonista parcial/antagonista da actividade do receptor MCP-1: N-((1R,2S,SR)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, ou um seu sal, solvato ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável, que possui uma combinação inesperada de características farmacológicas desejáveis. Também são proporcionadas formas cristalinas de acordo com a presente invenção. Composições farmacêuticas

que as contêm e a sua utilização como agentes para o tratamento de doenças inflamatórias, alérgicas, auto-imunes, metabólicas, cancro e/ou doenças cardiovasculares também constituem um objecto da presente invenção.

A presente descrição também proporciona a utilização de N-((1R,2S,SR)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, ou um seu sal, solvato ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável, para a produção de um medicamento para o tratamento de doenças inflamatórias, alérgicas, auto-imunes, metabólicas, cancro e/ou doenças cardiovasculares.

#### **DESCRÍÇÃO ABREVIADA DOS DESENHOS**

Figura 1. Padrões em pó experimentais e simulados de N-((1R,2S,SR)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, semi-hidrato, forma H0.5-4.

Figura 2. Padrões em pó experimentais e simulados de N-((1R,2S,SR)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, base livre, forma N-2.

Figura 3. Padrões em pó experimentais e simulados de N-((1R,2S,SR)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, 1,75 moles de H<sub>2</sub>O, forma H1.75-5.

Figura 4. Padrões em pó experimentais e simulados de N-((1R,2S,SR)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-1-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, solvato mono-etanol, forma E-1.

Figura 5. Padrões em pó experimentais e simulados e N-((1R,2S,SR)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, solvato de ácido mono-acético, forma HAC-1.

Figura 6. Padrões em pó experimentais e simulados de N-((1R,2S,SR)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, solvato de mono-R-propileno-glicol, forma RPG-3.

Figura 7. DSC de N-((1R,2S,SR)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, semi-hidrato, forma H0.5-4.

Figura 8. TGA de N-(1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, semi-hidrato, forma H0.5-4.

Figura 9. DSC de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, base livre, forma N-2.

Figura 10. TGA of N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, base livre, forma N-2.

Figura 11. Isotérmica de adsorção/dessorção de vapor de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, base livre, forma N-2 a 25°C.

Figura 12. DSC de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, 1,75 moles de H<sub>2</sub>O, forma H1.75-5.

Figura 13. TGA de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, 1,75 moles de H<sub>2</sub>O, forma H1.75-5.

Figura 14. DSC de N-((1R,2S,SR)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, solvato de ácido mono-acético, forma HAC-1.

Figura 15. TGA de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, solvato de ácido mono-acético, forma HAC-1.

Figura 16. DSC de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, solvato de mono-etanol, forma E-1.

Figura 17. TGA de N-((1R,2S,SR)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, solvato de mono-etanol, forma E-1.

Figura 18. DSC de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, solvato de mono-R-propileno-glicol, forma RPG-3.

Figura 19. TGA de N-((1R,2S,SR)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-

pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, solvato de mono-R-propileno-glicol, forma RPG-3.

Figura 20. Modelo de estímulo intradérmico em macacos cinomolgos: exemplo I inibiu o recrutamento de células mononucleares para a pele.

Figura 21. Peritonite TG de 48 horas em murganhos hCCR2 KI: exemplo 1 inibição da infiltração de monócitos/macrófagos na cavidade peritoneal.

Figura 22. EAE de murganhos hCCR2 KI (encefalomielosite auto-imune experimental): o tratamento com o exemplo 1 reduziu o resultado clínico.

Figura 23. Espectro NMR do protão do exemplo 1, 2<sup>a</sup> preparação alternativa, passo 3 - composto 7.

Figura 24. Espectro NMR do protão do exemplo 1, 2<sup>a</sup> preparação alternativa, passo 4 - composto 8.

Figura 25. Espectro NMR do protão do exemplo 1, 2<sup>a</sup> preparação alternativa, passo 4 - composto 9.

Figura 26. Espectro NMR do protão do exemplo 1, 2<sup>a</sup> preparação alternativa, passo 4 - composto 10.

Figura 27. Espectro NMR do protão do exemplo 1, 2<sup>a</sup> preparação alternativa, passo 5 - composto 11.

#### **DESCRIÇÃO MINUCIOSA**

A presente invenção proporciona um novo antagonista ou agonista parcial/antagonista da actividade do receptor MCP-1: N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, ou um seu sal, solvato ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável, que possui uma combinação inesperada de características farmacológicas desejáveis. Também são proporcionadas formas cristalinas de

acordo com a presente invenção. Composições farmacêuticas que as contêm e a utilização das mesmas como agentes para o tratamento de doenças inflamatórias, alérgicas, auto-imunes, metabólicas, cancro e/ou doenças cardiovasculares também constitui um objecto da presente invenção.

A [N-((1R,2S,SR)-5-(terc-butilamino)-2-((S)2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, demonstrou inesperadamente uma combinação desejável de características farmacológicas, incluindo uma surpreendente biodisponibilidade oral de nível elevado em combinação com indicações de que é extremamente eficaz e que possui um excelente critério de segurança.

Moduladores conhecidos dos receptores CCR2, tais como os descritos na publicação da patente nº WO2005021500, publicada a 10 de Março de 2005 (patente de invenção norte-americana nº 7 163 937, publicada a 16 de Janeiro de 2007, atribuída à requerente do presente pedido) que demonstram um grau adequado de permeabilidade à membrana (que é um factor crítico para a biodisponibilidade oral), não são suficientemente eficazes, conforme determinado pela sua aptidão de ligação a CCR2 (uma determinação de eficácia) e/ou não possuem o critério adequado de segurança, conforme indicado pela selectividade dos canais de iões, conforme determinado por estudos de hERG e do canal do ião  $\text{Na}^+$ .

Pelo contrário, conforme ilustrado pelos dados aqui apresentados na secção intitulada "Características farmacológicas comparativas", *infra*, a molécula relativamente polar, N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, demonstra uma

grau surpreendentemente elevado de permeabilidade à membrana, mantendo também uma aptidão potente de ligação a CCR2, bem como uma excelente selectividade para os canais iónicos.

Assim sendo, a presente invenção proporciona um novo modulador de quimiocinas que possui características farmacológicas melhoradas, que se espera que seja útil para o tratamento de doenças inflamatórias, alérgicas, auto-imunes, metabólicas, cancro e/ou doenças cardiovasculares.

#### **VARIANTES**

De acordo com uma variante, a invenção diz respeito a N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida e seus sais farmaceuticamente aceitáveis.

De acordo com outra variante, a invenção diz respeito a uma forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, base livre.

Uma outra variante diz respeito a uma forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, base livre, em que a forma cristalina é a forma N-2, a qual é caracterizada por (ou por possuir) parâmetros de célula unitária praticamente idênticos aos seguintes:

dimensões da célula:

$$a = 18,7240 \ (4)$$

$$b = 8,0171 \ (2)$$

c = 19,6568 (5)

$\alpha$  = 90

$\beta$  = 114,935 (2)

$\gamma$  = 90

V (Å<sup>3</sup>) = 2675,7 (1)

grupo espacial P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>

moléculas/célula unitária 2

em que o referido cristal se encontra a uma temperatura de cerca de +22°C (TA).

Uma outra variante diz respeito a uma forma N-2 que é caracterizada por (ou por possuir) um padrão de difracção de raio-X no pó que comprehende três ou mais valores 2 $\theta$  (CuK $\alpha$   $\lambda$  = 1,5418 Å) seleccionados entre 5,5, 9,1, 12,1, 14,0 e 19,2, a uma temperatura de cerca de 22°C.

Uma outra variante diz respeito à forma N-2 que é caracterizada por (ou por possuir) um padrão de difracção de raio-X no pó que comprehende ainda quatro ou mais valores 2 $\theta$  (CuK $\alpha$   $\lambda$  = 1,5418 Å) seleccionados entre 5,5, 9,1, 12,1, 14,0 e 19,2, a uma temperatura de cerca de 22°C.

Uma outra variante diz respeito a uma forma N-2 que é caracterizada por (ou por possuir) coordenadas atómicas fraccionais substancialmente como agrupadas no quadro 3.

Uma outra variante diz respeito a uma forma N-2 que é caracterizada por (ou por possuir) um padrão de difracção de raio-X no pó praticamente de acordo com a figura 2.

Uma outra variante diz respeito a uma forma cristalina de N-((1R,2S,SR)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, base livre, que comprehende a forma H 1.75-5 (1,75 moles de água), a qual é caracterizada pelos parâmetros de célula unitária apresentados no quadro 1; 3

ou 4 ou mais valores  $2\theta$  (CuK $\alpha$   $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ) seleccionados entre os apresentados no quadro 9; coordenadas atómicas fraccionais substancialmente como agrupadas no quadro 4 e/ou um padrão de difracção de raio-X no pó substancialmente em conformidade com a figura 3.

Uma outra variante diz respeito a uma forma cristalina de N-((1R,2S,SR)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, base livre, que compreende a forma H0.5-4 (semi-hidrato), a qual é caracterizada pelos parâmetros de célula unitária apresentados no quadro 1; 3 ou 4 ou mais valores  $2\theta$  (CuK $\alpha$   $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ) seleccionados entre os apresentados no quadro 9; coordenadas atómicas fraccionais substancialmente como agrupadas no quadro 2 e/ou um padrão de difracção de raio-X no pó substancialmente em conformidade com a figura 1.

Uma outra variante diz respeito a uma forma cristalina de N-((1R,2S,SR)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, base livre, que compreende a forma E-1 (solvato de mono-ethanol), a qual é caracterizada pelos parâmetros de célula unitária apresentados no quadro 1; 3 ou 4 ou mais valores  $2\theta$  (CuK $\alpha$   $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ) seleccionados entre os apresentados no quadro 9; coordenadas atómicas fraccionais substancialmente como agrupadas no quadro 5 e/ou um padrão de difracção de raio-X no pó substancialmente em conformidade com a figura 4.

Uma outra variante diz respeito a uma forma cristalina de N-((1R,2S,SR)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, base livre, que compreende a forma

HAC-1 (solvato de ácido mono-acético), a qual é caracterizada pelos parâmetros de célula unitária apresentados no quadro 1; 3 ou 4 ou mais valores  $2\theta$  ( $\text{CuK}\alpha \lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ) seleccionados entre os apresentados no quadro 9; coordenadas atómicas fraccionais substancialmente como agrupadas no quadro 6 e/ou um padrão de difracção de raio-X no pó substancialmente em conformidade com a figura 5.

Uma outra variante diz respeito a uma forma cristalina de N-((1R,2S,SR)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, base livre, que compreende a forma IPA-1 (solvato de mono-isopropanol), a qual é caracterizada pelos parâmetros de célula unitária apresentados no quadro 1; 3 ou 4 ou mais valores  $2\theta$  ( $\text{CuK}\alpha \lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ) seleccionados entre os apresentados no quadro 9; coordenadas atómicas fraccionais substancialmente como agrupadas no quadro 7.

Uma outra variante diz respeito a uma forma cristalina de N-((1R,2S,SR)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, base livre, que compreende a forma RPG-3 (solvato de mono-R-propileno-glicol), a qual é caracterizada pelos parâmetros de célula unitária apresentados no quadro 1; 3 ou 4 ou mais valores  $2\theta$  ( $\text{CuK}\alpha \lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ) seleccionados entre os apresentados no quadro 9; coordenadas atómicas fraccionais substancialmente como agrupadas no quadro 8 e/ou um padrão de difracção de raio-X no pó substancialmente em conformidade com a figura 6.

Uma outra variante diz respeito a uma composição farmacêutica que compreende um veículo farmaceuticamente aceitável e um composto dos exemplos.

Uma outra variante diz respeito a um composto dos exemplos, o qual é utilizável num método para a modulação de quimiocinas ou da actividade do receptor de quimiocinas num paciente.

Uma outra variante diz respeito a um composto dos exemplos, o qual é utilizável num método para a modulação da actividade do receptor CCR-2 num paciente.

Uma outra variante diz respeito a um composto dos exemplos, o qual é utilizável num método para a modulação da actividade de MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4 e MCP-5, a qual é mediada pelo receptor CCR2, num paciente.

Uma outra variante diz respeito a um composto dos exemplos, o qual é utilizável num método para a modulação da actividade de MCP-1 num paciente.

Uma outra variante diz respeito a um composto dos exemplos, o qual é utilizável num método para a inibição da actividade de CCR2 e CCR5 num paciente.

Uma outra variante diz respeito a um composto dos exemplos, o qual é utilizável num método para o tratamento de distúrbios num paciente, em que os referidos distúrbios são seleccionados entre diabetes, obesidade, síndrome metabólica, apoplexia, dor neuropática, cardiomiopatia isquémica, psoriase, hipertensão, escleroderma, osteoartrite, aneurisma, febre, doença cardiovascular, doença de Crohn, insuficiência cardíaca congestiva, doenças auto-imunes, infecção por VIH, demência associada ao VIH, psoriase, fibrose pulmonar idiopática, arteriosclerose após transplante, trauma cerebral induzido física ou quimicamente, doença inflamatória do intestino, alveolite, colite, lúpus sistémico eritematoso, nefrite do soro nefrotóxica, glomerulonefrite, asma, esclerose múltipla,

aterosclerose, vasculite, placas vulneráveis, artrite reumatóide, restenose, hiperplasia neointimal venosa, hiperplasia neointimal de enxerto de diálise, hiperplasia intimal de derivação arterio-venosa, transplante de órgãos, nefropatia de aloenxerto crónica e cancro.

Uma outra variante diz respeito a um composto dos exemplos, o qual é utilizável num método para o tratamento de distúrbios num paciente, em que os referidos distúrbios são seleccionados entre diabetes, obesidade, doença de Crohn, psoriase, fibrose pulmonar idiopática, arteriosclerose após transplante, trauma cerebral induzido física ou quimicamente, doença inflamatória do intestino, alveolite, colite, lúpus sistémico eritematoso, nefrite do soro nefrotóxica, glomerulonefrite, asma, esclerose múltipla, aterosclerose, artrite reumatóide, restenose, transplante de órgãos e cancro.

Uma outra variante diz respeito a um composto dos exemplos, o qual é utilizável num método para o tratamento de distúrbios num paciente, em que os referidos distúrbios são seleccionados entre diabetes, obesidade, doença de Crohn, lúpus sistémico eritematoso, glomerulonefrite, esclerose múltipla, aterosclerose, e transplante de órgãos.

Uma outra variante diz respeito a um composto dos exemplos, o qual é utilizável num método para o tratamento de distúrbios num paciente, em que os referidos distúrbios são seleccionados entre esclerose múltipla, doença de Crohn e diabetes.

Uma outra variante diz respeito a um composto dos exemplos, o qual é utilizável num método para o tratamento de distúrbios num paciente, em que os referidos distúrbios

são seleccionados entre restenose, transplante de órgãos e cancro.

Uma outra variante diz respeito a um composto dos exemplos, o qual é utilizável num método para o tratamento de diabetes num paciente.

Uma outra variante diz respeito a um composto dos exemplos, o qual é utilizável num método para o tratamento da doença de Crohn num paciente.

Uma outra variante diz respeito a um composto dos exemplos, o qual é utilizável num método para o tratamento de esclerose múltipla num paciente.

Uma outra variante diz respeito a um composto dos exemplos, o qual é utilizável num método para o tratamento de aterosclerose num paciente.

Uma outra variante diz respeito a um composto dos exemplos, o qual é utilizável num método para o tratamento de restenose num paciente.

Uma outra variante diz respeito a um composto dos exemplos, o qual é utilizável num método para o tratamento de transplante de órgãos num paciente.

Uma outra variante diz respeito a um composto dos exemplos, o qual é utilizável num método para o tratamento de cancro num paciente.

De preferência, o cancro é seleccionado entre cancro da mama, cancro do fígado, cancro da próstata e melanoma.

Uma outra variante diz respeito a um composto dos exemplos, o qual é utilizável num método para o tratamento de doenças inflamatórias, alérgicas, auto-imunes, metabólicas, cancro e/ou doenças cardiovasculares num paciente.

Uma outra variante diz respeito a um composto dos exemplos, o qual é utilizável num método para o tratamento de doenças inflamatórias, alérgicas, auto-imunes, metabólicas, cancro e/ou doenças cardiovasculares, as quais sejam pelo menos parcialmente moduladas por CCR-2, num paciente.

Uma outra variante diz respeito a um composto dos exemplos, o qual é utilizável num método para a modulação da actividade de CCR2 num paciente.

Uma outra variante diz respeito a um composto dos exemplos, o qual é utilizável num método para a modulação da actividade de MIP-1 $\beta$  e de RANTES, a qual é mediada pelo receptor CCR5, num paciente.

Uma outra variante diz respeito à utilização de um composto dos exemplos na preparação de um medicamento para o tratamento de diabetes, obesidade, síndrome metabólica, apoplexia, dor neuropática, cardiomiopatia isquémica, psoriase, hipertensão, escleroderma, osteoartrite, aneurisma, febre, doença cardiovascular, doença de Crohn, insuficiência cardíaca congestiva, doenças auto-imunes, infecção por VIH, demência associada ao VIH, psoriase, fibrose pulmonar idiopática, arteriosclerose após transplante, trauma cerebral induzido física ou quimicamente, doença inflamatória do intestino, alveolite, colite, lúpus sistémico eritematoso, nefrite do soro nefrotóxica, glomerulonefrite, asma, esclerose múltipla, aterosclerose, vasculite, placas vulneráveis, artrite reumatóide, restenose, hiperplasia neointimal venosa, hiperplasia neointimal de enxerto de diálise, hiperplasia intimal de derivação arterio-venosa, transplante de órgãos, nefropatia de aloenxerto crónica e cancro.

Uma outra variante diz respeito a um composto dos exemplos utilizável em terapia.

A invenção pode ser apresentada em outras formas específicas, sem no entanto se afastar do seu espírito ou dos seus atributos essenciais. A presente invenção também abrange todas as combinações de aspectos alternativos e variantes da invenção aqui descrita.

Faz-se observar que todas e quaisquer variantes podem ser consideradas em conjunto com qualquer outra variante para descrever variantes suplementares da presente invenção. Além do mais, quaisquer elementos de uma variante (incluindo os aspectos preferidos) deverão ser combinados com quaisquer outros elementos das variantes para descrever variantes suplementares.

#### **DEFINIÇÕES**

A seguir, são apresentadas definições dos termos utilizados na presente memória descritiva e nas reivindicações anexas. A definição inicial apresentada para um grupo ou termo é aplicada a esse grupo ou termo ao longo da memória descritiva e reivindicações, individualmente ou como parte de um outro grupo, salvo quando indicado de outro modo.

A expressão “farmaceuticamente aceitável”, tal como aqui utilizada, designa aqueles compostos, materiais, composições e/ou formas de dosagem que sejam, no âmbito do campo médico, adequados para utilização em contacto com tecidos de seres humanos e animais sem apresentarem uma toxicidade excessiva, irritação, resposta alérgica, ou outros problemas ou complicações, que proporcionem uma razão benefício/risco aceitável.

Tal como aqui utilizada, a expressão "sais farmaceuticamente aceitáveis" designa derivados dos compostos descritos, em que o composto original é modificado por meio da preparação de seus sais de ácidos ou bases. Como exemplos de sais farmaceuticamente aceitáveis refere-se, mas sem que isso constitua qualquer limitação, sais de ácidos minerais ou orgânicos de resíduos básicos, tais como aminas; sais alcalinos ou orgânicos de resíduos acídicos, tais como ácidos carboxílicos; e semelhantes. Como sais farmaceuticamente aceitáveis refere-se os sais não tóxicos convencionais ou os sais de amónio quaternário do composto original formado, por exemplo, a partir de ácidos inorgânicos ou orgânicos não tóxicos. Como exemplos de tais sais não tóxicos convencionais refere-se os obtidos a partir de ácidos inorgânicos, tais como os ácidos clorídrico, bromídrico, sulfúrico, sulfâmico, fosfórico, nítrico e semelhantes; e os sais preparados a partir de ácidos orgânicos, tais como os ácidos acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamóico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutâmico, benzóico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzóico, fumárico, tolueno-sulfónico, metano-sulfónico, etano-dissulfónico, oxálico, isetiónico e semelhantes.

Os sais farmaceuticamente aceitáveis da presente invenção podem ser sintetizados a partir do composto original que contém um radical básico ou acídico por meio de métodos químicos convencionais. De um modo geral, tais sais podem ser preparados por meio da reacção das formas livres de ácido ou de base destes compostos com uma quantidade estequiométrica da base ou ácido adequados em

água ou num solvente orgânico, ou numa mistura dos dois; de um modo geral, são preferidos meios não aquosos, tais como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol ou acetonitrilo. É possível encontrar listas de sais adequados na obra *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17<sup>a</sup> ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, pág. 1418, cuja descrição se considera aqui incorporada por referência.

Uma vez que se sabe que os pró-fármacos potenciam diversas qualidades desejáveis de compostos farmacêuticos (v.g., solubilidade, biodisponibilidade, preparação, etc.), os compostos da presente invenção podem ser administrados sob a forma de um pró-fármaco. Assim, a presente invenção pretende incluir os pró-fármacos dos compostos presentemente reivindicados, os métodos para a sua administração e as composições que os contêm. O termo "pró-fármacos" pretende incluir quaisquer veículos ligados de um modo covalente que libertem um fármaco original activo da presente invenção *in vivo*, quando tal pró-fármaco é administrado a um sujeito mamífero. Os pró-fármacos da presente invenção são preparados por modificação de grupos funcionais que estão presentes no composto de um modo tal que as modificações são clivadas, quer por manipulação de rotina ou *in vivo*, para se obter o composto original. Como pró-fármacos refere-se compostos da presente invenção em que um grupo hidroxi, amino ou sulfidrilo é ligado a qualquer grupo que, quando o pró-fármaco da presente invenção é administrado a um sujeito mamífero, seja clivado para se formar o grupo hidroxilo livre, amino livre ou sulfidrilo livre, respectivamente. Como exemplos de pró-fármacos refere-se, mas sem que isso constitua qualquer limitação, derivados de acetato, formato e benzoato de

grupos funcionais álcool ou amina nos compostos da presente invenção.

As expressões "composto estável" e "estrutura estável" pretendem designar um composto que é suficientemente robusto para sobreviver ao isolamento até um grau de pureza útil a partir de uma mistura de reacção e subsequente formulação num agente terapeuticamente eficaz. A presente invenção pretende abranger compostos estáveis.

A expressão "quantidade terapeuticamente eficaz" pretende incluir uma quantidade de um composto da presente invenção por si só ou uma quantidade de uma combinação de compostos reivindicados ou uma quantidade de um composto da presente invenção em combinação com outros ingredientes activos que seja eficaz para inibir MCP-1- ou eficaz para tratar ou para prevenir distúrbios.

Tal como aqui utilizado, o termo "tratar" ou "tratamento" compreende o tratamento de um estado de doença num mamífero, em particular num ser humano, e compreende: (a) prevenir que o estado de doença ocorra num mamífero e, em particular, no caso de tal mamífero apresentar uma pré-disposição para esse estado de doença, embora ainda não tenha sido ainda diagnosticado como padecendo dessa doença; (b) inibir o estado de doença, isto é, interromper o seu desenvolvimento e/ou (c) aliviar o estado de doença, isto é, provocar a regressão do estado de doença.

Os nomes aqui utilizados para caracterizar uma forma específica, v.g., "N-2", não deverão ser considerados limitativos no que diz respeito a qualquer outra substância que possua características físicas ou químicas semelhantes ou idênticas, sendo antes estas designações meramente

identificativas que deverão ser interpretadas de acordo com a informação de caracterização também aqui apresentada.

A presente invenção proporciona, pelo menos em parte, formas cristalinas da base livre de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, como um material novo, em particular numa forma farmaceuticamente aceitável.

De acordo com determinadas variantes preferidas, as formas cristalinas da base livre encontram-se substancialmente numa forma pura. Como variantes preferidas de formas cristalinas da base livre refere-se as descritas no exemplo 2 como as formas E-1, HAC-1, IPA-1, N-2, RPG-3, H0,5-4 e H1,75-5,

Tal como aqui utilizado, o termo "polimorfo" designa formas cristalinas que possuem a mesma composição química mas diferentes arranjos espaciais das moléculas, átomos e/ou iões que formam o cristal.

Tal como aqui utilizado, o termo "solvato" designa uma forma cristalina de uma molécula, átomo e/ou iões que contém ainda moléculas de um solvente ou solventes incorporados na estrutura cristalina. As moléculas de solvente no solvato podem estar presentes num arranjo regular e/ou um arranjo não ordenado. O solvato pode compreender uma quantidade estequiométrica ou não estequiométrica das moléculas de solvente. Por exemplo, um solvato com uma quantidade não estequiométrica de moléculas de solvente pode ser obtido por meio da perda parcial de solvente a partir do solvato.

Tal como aqui utilizado, o termo "amorfo" designa uma forma sólida de uma molécula, átomo e/ou iões que não seja

cristalina. Um sólido amorfó não apresenta um padrão definitivo de difracção do raio-X.

Tal como aqui utilizada, a expressão "substancialmente puro", quando utilizada como referência a uma forma cristalina, designa um composto que possui uma pureza superior a 90% em peso, incluindo superior a 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% e 99% em peso, e também incluindo igual a cerca de 100% em peso do composto, com base no peso do composto. O material restante compreende outras formas do composto e/ou impurezas de reacção e/ou impurezas do processo que são obtidas durante a sua preparação. Por exemplo, uma forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida pode ser considerada substancialmente pura se possuir uma pureza superior a 90% em peso, conforme determinado por meios já conhecidos e aceites na especialidade, em que a quantidade restante inferior a 10% em peso de material que compreende outras formas de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida e/ou impurezas de reacção e/ou impurezas de processo.

As amostras das formas cristalinas podem ser obtidas com uma homogeneidade de fase substancialmente pura, indicando a presença de uma quantidade dominante de uma forma cristalina individual e facultativamente quantidades menores de uma ou vários outras formas cristalinas. A presença de mais do que uma forma cristalina numa amostra pode ser determinada por técnicas, tais como a difracção de raio-X no pó (PXRD) ou por espectroscopia de ressonância

magnética nuclear no estado sólido (SSNMR). Por exemplo, a presença de picos extra na comparação do padrão PXRD determinado experimentalmente com um padrão PXRD estimulado pode indicar a presença de mais do que uma forma cristalina na amostra. A PXRD estimulada pode ser calculada a partir de dados de raio-X de um cristal único. Veja-se Smith, D.K., "A FORTRAN Program for Calculating X-Ray Powder Diffraction Patterns", Lawrence Radiation Laboratory, Livermore, California, UCRL-7196 (Abril 1963).

De preferência, a forma cristalina possui uma homogeneidade de fase substancialmente pura conforme indicado por menos de 10%, de preferência menos de 5% e mais preferencialmente menos de 2% da área total do pico no padrão PXRD determinado experimentalmente obtido a partir dos picos extra que estão ausentes do padrão PXRD estimulado. Mais preferencial, é uma forma cristalina que possui uma homogeneidade de fase substancialmente pura com menos de 1% da área total do pico no padrão PXRD medido experimentalmente que resulta dos picos extra que estão ausentes no padrão PXRD estimulado.

Os procedimentos para a preparação de formas cristalinas são conhecidos na especialidade. As formas cristalinas podem ser preparadas por diversos métodos, incluindo, por exemplo, cristalização ou recristalização a partir do solvente adequado, sublimação, crescimento a partir de um material fundido, transformação do estado sólido a partir de outra fase, cristalização a partir de um fluido supercrítico e pulverização por jacto. Como técnicas para a cristalização ou para a recristalização de formas cristalinas a partir de uma mistura de solventes refere-se, por exemplo, evaporação do solvente, diminuição da

temperatura da mistura de solvente, formação de cristais primários numa mistura de solventes supersaturada da molécula e/ou do sal, liofilização da mistura de solvente e adição de anti-solventes (contra-solventes) à mistura de solvente.

As formas podem ser caracterizadas e distinguidas utilizando a difracção de raio-X num cristal único, a qual é baseada na célula unitária e em medições de intensidade de um cristal único de uma forma a uma temperatura analítica determinada. É possível encontrar uma descrição minuciosa de uma célula unitária e da análise de intensidade na obra de Stout & Jensen, *X-Ray Structure Determination: A Practical Guide*, Macmillan Co., New York (1968), Capítulo 3, a qual é aqui incorporada por referência. Em alternativa, o arranjo único de átomos na relação espacial dentro da estrutura cristalina pode ser caracterizada de acordo com as coordenadas atómicas fraccionais observadas. Veja-se a referência Stout & Jensen para a determinação experimental das coordenadas fraccionais para a análise estrutural. Outros meios para a caracterização da estrutura cristalina consistem na análise da difracção de raio-X no pó, na qual o perfil de difracção experimental ou observado é comparado com um perfil estimulado que representa o material puro em pó, à mesma temperatura analítica, e medições para a forma de sujeito caracterizada como um conjunto de valores  $2\theta$  e de intensidades.

A expressão "perda de peso negligenciável", tal como aqui utilizada, conforme caracterizada por TGA, indica a presença de uma forma cristalina pura (não solvatada).

A expressão "% de absorção de água negligenciável", tal como aqui utilizada, conforme caracterizada pela isotérmica de humidade-absorção, indica que a forma testada é não higroscópica.

De acordo com uma variante, a invenção proporciona uma forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida numa forma substancialmente pura. Esta forma cristalina pode ser utilizada em composições farmacêuticas que podem incluir facultativamente um ou vários componentes seleccionados, por exemplo, entre o conjunto constituído por excipientes, veículos e um ou vários outros ingredientes farmaceuticamente activos ou entidades químicas activas de estruturas moleculares diferentes.

De preferência, a forma cristalina possui uma homogeneidade de fase substancialmente pura, conforme indicado por menos de 10%, de preferência menos de 5% e mais preferencialmente menos de 2% da área total do pico no padrão PXDR determinado experimentalmente que resulta dos picos extra que estão ausentes no padrão PXRD estimulado. Mais preferencial, é uma forma cristalina que possui uma homogeneidade de fase substancialmente pura com menos de 1% da área total do pico no padrão PXDR determinado experimentalmente que resulta dos picos extra que estão ausentes no padrão PXRD estimulado.

De acordo com outra variante, a invenção proporciona uma composição constituída essencialmente pelas formas cristalinas de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida. A composição de acordo com

esta variante pode compreender pelo menos 90% em peso da forma, com base no seu peso na composição.

A presença de impurezas de reacção e/ou impurezas de processamento pode ser determinada por técnicas analíticas conhecidas na especialidade, tais como, por exemplo, cromatografia, espectroscopia de ressonância magnética nuclear, espectroscopia de massa ou espectroscopia de infra-vermelhos.

As formas cristalinas podem ser preparadas por diversos métodos, incluindo, por exemplo, cristalização ou recristalização a partir de um solvente adequado, sublimação, crescimento a partir de um material fundido, transformação do estado sólido para outra fase, cristalização a partir de um fluido supercrítico e pulverização por jacto. Como técnicas para cristalização ou para recristalização de formas cristalinas a partir de uma mistura de solvente refere-se, por exemplo, evaporação do solvente, diminuição da temperatura da mistura de solventes, formação de cristais primários numa mistura de solventes supersaturada da molécula e/ou do sal, liofilização da mistura de solvente e adição de anti-solventes (contra-solventes) à mistura de solvente. É possível utilizar técnicas de cristalização com produção elevada para a preparação de formas cristalinas, incluindo polimorfos.

Os cristais de fármacos, incluindo polimorfos, métodos de preparação e caracterização de cristais de fármacos são descritos na obra *Solid-State Chemistry of Drugs*, S.R. Byrn, R.R. Pfeiffer e J.G. Stowell, 2<sup>a</sup> Edição, SSCI, West Lafayette, Indiana (1999).

Para técnicas de cristalização que utilizam solvente, a escolha do solvente ou dos solventes depende tipicamente de um ou mais factores, tais como a solubilidade de um composto, da técnica de cristalização e da pressão de vapor do solvente. Também é possível utilizar combinações de solventes; por exemplo, o composto pode ser solubilizado num primeiro solvente para se obter uma solução, seguindo-se a adição de um anti-solvente para diminuir a solubilidade do composto na solução e proporcionar a formação de cristais. O termo "anti-solvente" designa um solvente no qual o composto possui uma solubilidade baixa. Como solventes adequados para a preparação de cristais refere-se solventes polares e não polares.

De acordo com um método para a preparação dos cristais, coloca-se em suspensão e/ou agita-se N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida num solvente adequado para se obter uma pasta, a qual pode ser aquecida para promover a dissolução. O termo "pasta", tal como aqui utilizado, designa uma solução saturada de base livre, a qual pode conter ainda uma quantidade adicional do composto para se obter uma mistura heterogénea do composto e de um solvente a uma determinada temperatura. Como solventes adequados para este fim refere-se, por exemplo, solventes apróticos polares e solventes próticos polares e misturas de um ou mais destes, conforme aqui descrito.

É possível adicionar cristais primários a qualquer mistura de cristalização para promover a cristalização. Conforme será evidente para os especialistas na matéria, a utilização de cristais primários é usada como meio de

controlar o crescimento de uma forma cristalina particular ou como meio de controlar a distribuição do tamanho de partículas do produto cristalino. Assim sendo, o cálculo da quantidade de cristais primários necessária depende do tamanho do cristal primário disponível e do tamanho desejado de uma partícula média de produto, conforme descrito, por exemplo, na obra "Programmed cooling of batch crystallizers", J.W. Mullin e J. Nyvlt, Chemical Engineering Science 1971, 26, 369-377. De um modo geral, cristais primários com tamanhos pequenos são necessários para controlar eficazmente o crescimento de cristais em lotes. Os cristais primários de tamanho pequeno podem ser obtidos por crivagem, cunhagem ou micronização de cristais maiores, ou por micro-cristalização de soluções. Deverão ser tomadas precauções uma vez que a moagem ou a micronização de cristais não provoca qualquer alteração na cristalinidade da forma de cristal desejada (isto é, alteração para amorfo ou para outro polimorfo).

É possível filtrar uma mistura arrefecida sob uma pressão hipobárica e lavar os sólidos isolados com um solvente adequado, tal como um solvente de recristalização arrefecido, e secar sob uma purga de azoto para se obter a forma cristalina desejada. Os sólidos isolados podem ser analisados por meio de uma técnica espectroscópica ou analítica adequada, tal como SSNMR, DSC, PXRD ou semelhante, para assegurar a formação da forma cristalina preferida do produto. A forma cristalina resultante é tipicamente produzida numa quantidade superior a cerca de 70% em peso de rendimento isolado, mas preferencialmente superior a 90% em peso com base no peso da N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-

quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida utilizada inicialmente no procedimento de cristalização. O produto pode ser co-moído ou passado através de um crivo mesh para desagregar o produto, se necessário.

As formas cristalinas podem ser preparadas directamente a partir o meio de reacção do passo final do processo para a preparação de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida. Tal pode ser alcançado, por exemplo, por meio da utilização no passo final de processo de um solvente ou de uma mistura de solventes a partir da qual a base livre pode ser cristalizada. Em alternativa, as formas cristalinas podem ser obtidas por destilação ou por técnicas de adição de solvente. Como solventes adequados para este fim refere-se qualquer um dos solventes aqui descritos, incluindo solventes polares próticos, tais como álcoois, e solventes polares apróticos, tais como cetonas.

Para fins de linhas gerais, a mistura de reacção podem ser filtrada para remover quaisquer impurezas indesejadas, sais inorgânicos e semelhantes, e subsequente lavagem com solvente de reacção ou de cristalização. A solução resultante pode se concentrada para se remover o excesso de solvente ou constituintes gasosos. No caso de se utilizar destilação, a quantidade final de destilado recolhida pode variar, em função de factores do processo, incluindo, por exemplo, o tamanho do recipiente, a capacidade de agitação e semelhantes. Para fins de linhas gerais, a solução de reacção pode ser destilada até cerca de 1/10 do volume original antes de se efectuar a substituição do solvente. A

reacção pode ser tratada em amostras e ensaiada para se determinar a extensão da reacção e a % em peso de produto, em conformidade com técnicas processuais convencionais. Se desejado, é possível adicionar ou remover uma quantidade suplementar de solvente para optimizar a concentração da mistura de reacção. De preferência, a concentração final é ajustada até cerca de 50% em peso, para o qual se obtém tipicamente uma pasta.

Poderá ser preferível adicionar directamente os solventes ao recipiente de reacção sem efectuar a destilação da mistura de reacção. Como solventes preferidos para este fim refere-se aqueles que podem participar na estrutura cristalina, conforme descrito antes a propósito da permuta de solvente. Embora a concentração final possa variar em função da pureza desejada, da recuperação e semelhantes, a concentração final de base livre em solução está preferencialmente compreendida entre cerca de 4% e cerca de 7%. A mistura de reacção pode ser agitada após a adição de solvente e aquecida em simultâneo. A título ilustrativo, a mistura de reacção pode ser agitada durante cerca de 1 hora, período esse durante o qual é aquecida até cerca de 70°C. De preferência, a mistura é filtrada a quente e lavada com o solvente de reacção, com o solvente adicionado ou com uma sua combinação. Os cristais primários podem ser adicionados a qualquer solução de cristalização para se dar início à cristalização.

As diversas formas aqui descritas podem ser distinguidas entre si por meio da utilização de diversas técnicas analíticas conhecidas pelos especialistas na matéria. Como tais técnicas refere-se, mas sem que isso constitua qualquer limitação, difracção de raio-X no pó

(PXRD) e/ou análise termogravimétrica (TGA). De um modo específico, as formas podem ser caracterizadas e distinguidas utilizando a difracção de raio-X de um cristal único, a qual é baseada em medições da célula unitária de um cristal único de uma determinada forma para uma determinada temperatura analítica. É possível encontrar uma descrição minuciosa de células unitárias na obra de Stout & Jensen, *X-Ray Structure Determination: A Practical Guide*, Macmillan Co., New York (1968), Capítulo 3, a qual se considera aqui incorporada por referência. Em alternativa, o arranjo único de átomos na relação espacial dentro da estrutura cristalina pode ser caracterizada de acordo com as coordenadas atómicas fraccionais observadas. Outros meios para a caracterização da estrutura cristalina consistem na análise da difracção de raio-X no pó, na qual o perfil de difracção é comparado com um perfil estimulado que representa o material puro em pó, realizadas à mesma temperatura analítica, e medições para a forma de sujeito caracterizada como um conjunto de valores  $2\theta$  (normalmente quatro ou mais).

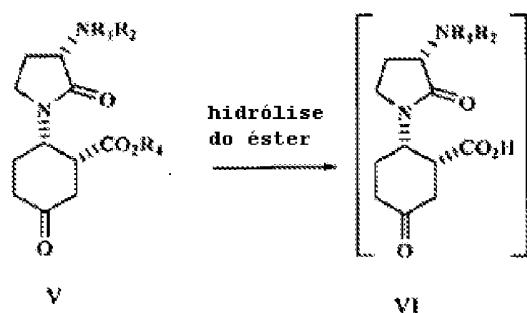
É possível utilizar outros meios para a caracterização da forma, tais como espectroscopia de ressonância magnética nuclear no estado sólido (SSNMR), calorimetria de pesquisa diferencial (DSC), termografia e exame de rotina da morfologia cristalina ou amorfa. Estes parâmetros também podem ser utilizados em combinação para caracterizar a forma pretendida.

Será evidente para um especialista na matéria que um padrão de difracção de raio-X pode ser obtido com um erro de medição que depende das condições de medição utilizadas. Em particular, sabe-se que as intensidades num padrão de

difracção de raio-X podem flutuar em função das condições de medição utilizadas e da forma e morfologia do cristal. Faz-se ainda observar que as intensidades relativas também podem variar em função das condições experimentais e, por tal motivo, da ordem exacta de intensidade não deverá ser considerada. Além do mais, um erro de medição do ângulo de difracção para um padrão convencional de difracção de raio-X é normalmente de cerca de 0,2° ou menos e de preferência de cerca de 0,1° (conforme a seguir descrito), sendo um erro de medição de tal grau tomado em consideração em relação aos ângulos de difracção supramencionados. Assim sendo, faz-se observar que as formas de cristal da presente invenção não estão limitadas as formas de cristal que proporcionam padrões de difracção do raio-X completamente idênticos aos padrões de difracção do raio-X ilustrados nas figuras anexas aqui descritas. Quaisquer formas de cristal que proporcionem padrões de difracção do raio-X praticamente idênticos aos descritos nas figuras anexas são abrangidas pelo âmbito da presente invenção. Um especialista na matéria deverá possuir a aptidão para determinar padrões de difracção do raio-X substancialmente idênticos.

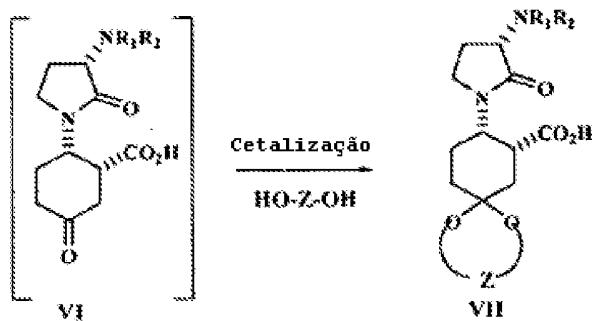
## SÍNTSESE

Esquema 1



Submete-se a hidrólise o cetoéster **V** no seu correspondente cetoácido **VI** por suspensão do composto **V** num solvente orgânico parcialmente miscível com água, tal como éteres acíclicos ou cílicos, incluindo THF, 2-metil-THF, 1,2-dimetoxietano, 1,4-dioxano, sendo preferível o THF, e adição de uma base aquosa, tal como soluções aquosas de hidróxidos de metais alcalinos, MOH, em que o símbolo M representa Li, Na ou K, sendo preferível a base NaOH 1 N, a uma temperatura compreendida entre -5°C e +5°C. Agita-se então a mistura bifásica a uma temperatura ≤ 5°C pelo menos durante uma hora. A temperatura baixa para a adição da base e para a reacção é importante para minimizar a epimerização do átomo de carbono adjacente ao grupo éster. Adiciona-se então um solvente não miscível em água, de preferência éter metil-terc-butílico, e separa-se as camadas. Transfere-se então o produto da solução aquosa novamente para um solvente orgânico, de preferência diclorometano, ajustando o pH com ácido, de preferência HCl 3 N, e utiliza-se o composto **VI** em solução no passo subsequente.

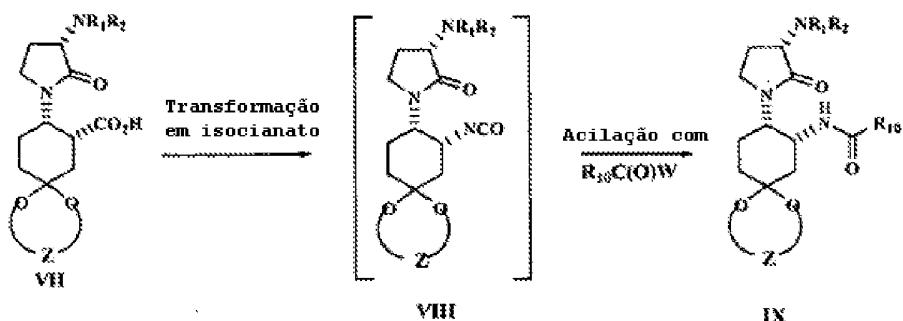
**Esquema 2**  
**Cetalização do cetoácido VI no cetal-ácido VII**



A solução do composto **VI**, de preferência em diclorometano, é permutada por destilação para um solvente não hidroscópico com elevado ponto de ebulição, tal como tolueno, trifluorotolueno, xilenos, ésteres com elevado ponto de ebulição, tais como acetato de n-butilo ou isobutilo, de preferência tolueno. Adiciona-se então um glicol de fórmula geral HO-Z-OH, (em que o símbolo Z possui as significações definidas *supra*), de preferência etileno-glicol (1,2 eq.), e depois uma quantidade catalítica (0,5-2 M%) de um ácido, de preferência ácido p-tolueno-sulfónico, e efectua-se a destilação da mistura à pressão atmosférica até se completar a formação do composto **VII**. O produto **VII** cristaliza durante a adição de acetato de etilo, após arrefecimento aproximadamente até 70°C. Depois de se arrefecer até à temperatura ambiente, o composto **VII** é isolado por filtração e secagem subsequente com um rendimento de cerca de 70% (para HO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH, R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = CBz).

Esquema 3

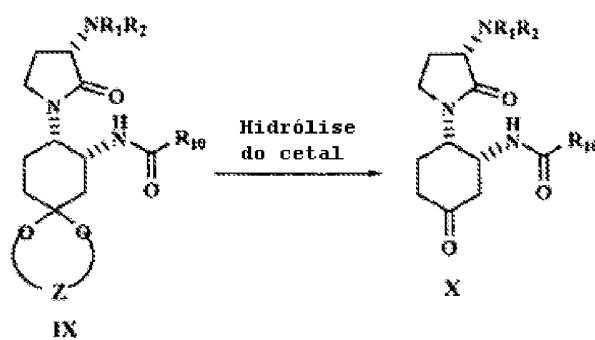
Transformação do cetal-ácido **VII** em isocianato de cetal **VIII** não isolado e depois em cetal-amida **IX** por via de activação com ácido/azidação, rearranjo de Curtius



O cetoácido **VII** é activado em primeiro lugar por meio da sua transformação no seu anidrido mistura, utilizando aminas terciárias, de preferência trietilamina, e haloformatos, de preferência cloroformato de isobutilo, em solventes anidros, tais como tolueno, trifluorotolueno, 1,2-dicloroetano, 1-clorobutano, xilenos, de preferência tolueno anidro, por meio da adição de um haloformato a uma solução pré-arrefecida de **VII** e trialquilamina. A temperatura preferida para a formação do anidro misto está compreendida entre  $-10^{\circ}\text{C}$  e  $0^{\circ}\text{C}$ . Decorridos aproximadamente 30 minutos, adiciona-se uma solução aquosa de azida de um metal alcalino, de preferência azida de sódio a ~30% em peso, e um catalisador de transferência de fase, tal como sais de tetralquilamónio, de preferência brometo de tetrabutil-amónio (5% molar) e agita-se vigorosamente a mistura bifásica durante cerca de 1 hora a uma temperatura compreendida entre  $-10^{\circ}\text{C}$  e  $0^{\circ}\text{C}$ . Separa-se então a fase orgânica e seca-se a solução de azida de acilo resultante,

sendo preferíveis como agentes de secagem os crivos moleculares de 4 Å. O rearranjo de Curtius e ancoragem concomitante do isocianato **VIII** *in situ* com um ácido carboxílico para formar uma cetal-amida **IX** é efectuada em primeiro lugar por adição de um ácido carboxílico, de preferência ácido acético, e o seu correspondente anidrido, de preferência anidrido acético, a uma solução anidra da azida de acilo e subsequente aquecimento da mistura até 80°C-90°C durante 1 a 4 horas. A utilização de um anidrido em conjunto com o ácido carboxílico é importante para minimizar a formação de impurezas. Após a remoção parcial do solvente e do ácido carboxílico por destilação, o produto cristaliza durante o arrefecimento até à temperatura ambiente. O composto **IX** é isolado por filtração e secagem com um rendimento de 65% a 78% (para  $Z = -(CH_2)_2-$ ,  $R_1 = H$ ,  $R_2 = CBz$ ,  $R_{10} = Me$ ).

**Esquema 4**  
**Hidrólise de cetal-amida **IX** em cetoamida **X****

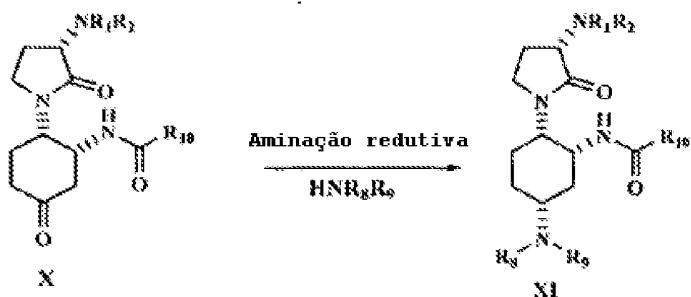


A hidrólise do cetal do composto **IX** em cetoamida **X** é efectuada por aquecimento de uma solução do composto **X** num solvente orgânico miscível em água, de preferência acetona, e uma solução aquosa de um ácido forte, de preferência HCl

1 N, durante 2 a 4 horas. A temperatura preferida para a hidrólise está compreendida entre 45°C e 55°C. Após a remoção de acetona, extrai-se o produto para diclorometano, o qual é substituído por acetato de etilo por destilação. Deixa-se cristalizar o produto **X** a partir de acetato de etilo durante o arrefecimento até à temperatura ambiente e isola-se por filtração e secagem com um rendimento de 85% a 90% (para HO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH, R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = CBz, R<sub>10</sub> = Me).

**Esquema 5**

**Aminação redutiva de cetoamida **X** em aminoamida **XI****



A uma solução anidra do composto **X**, de preferência em diclorometano, adiciona-se uma amina primária ou secundária, de preferência terc-butilamina (5 eq.), e depois um ácido de Lewis, de preferência TiCl<sub>2</sub>(OPr-i)<sub>2</sub> (1,2 eq.), a uma temperatura entre -20°C e 0°C. Aquece-se a mistura de imina resultante até 10°C-20°C e adiciona-se borano (1,1-1,2 eq.) sob a forma de um complexo com sulfureto de dimetilo ou THF, de preferência sulfureto de dimetilo. Agita-se a mistura de reacção durante 4 a 6 horas e adiciona-se então acetato de etilo saturado com água. Remove-se os sais de titânio por filtração e extrai-se o produto **XI** a partir do filtrado orgânico para água, sob a forma do seu sal, com um ácido aquoso, de preferência HCl 1

N. Adiciona-se então diclorometano e depois acrescenta-se uma base aquosa, de preferência hidróxido de amónio concentrado, à mistura bifásica agitada até se ajustar o pH para 8,0-8,5, Separa-se então a fase de diclorometano rica em produto e lava-se duas vezes com uma solução aquosa de cloreto amónio para se remover o isómero trans do composto **XI** indesejável e por último com água. Permuta-se o diclorometano por acetato de etilo por destilação e deixa-se cristalizar o composto **XI** a partir de acetato de etilo durante o arrefecimento e a adição de heptano. Isola-se o composto **XI** por filtração e seca-se com um rendimento de 65% a 70% (para  $R_1 = H$ ,  $R_2 = CBz$ ,  $R_3 = H$ ,  $R_9 = \text{terc-Bu}$ ,  $R_{10} = Me$ ).

### Esquema 6

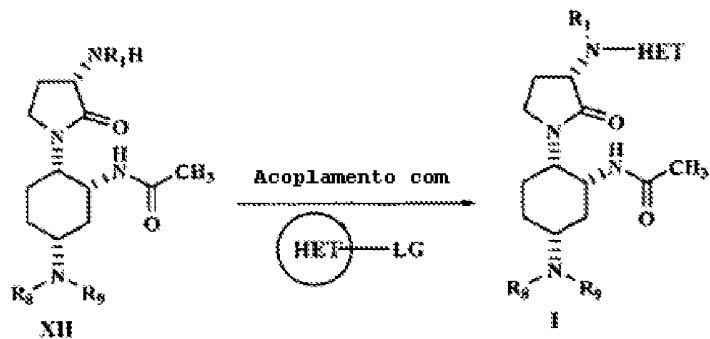


A remoção do grupo protector  $R_2$  de amina, em que o símbolo  $R_2$  representa  $CO_2CH_2Ph$  ou  $CH_2Ph$ , é efectuada por hidrogenação de uma solução do composto **XI** num álcool, de preferência metanol, na presença de um catalisador de Pd, de preferência Pd a 5% em peso/C, durante várias horas. Remove-se então o catalisador por filtração e permuta-se o metanol por acetato de etilo por destilação. Isola-se o

produto **XII**, o qual cristaliza a partir de acetato de etilo durante o arrefecimento e a adição de heptano, por filtração e secagem com um rendimento de 90% a 95% (para  $R_1 = H$ ,  $R_2 = CBz$ ,  $R_3 = H$ ,  $R_4 = \text{terc-Bu}$ ,  $R_{10} = \text{Me}$ ).

**Esquema 7**

**Acoplamento da amina **XII** com um heterociclo que suporte um grupo removível HET-LG**



A síntese do composto **I** é efectuada por acoplamento da pirrolidinilamina **XII** e de um heterociclo que suporte um grupo removível na presença de uma amina terciária, de preferência trietilamina, num solvente compatível, tal como diclorometano, isopropanol ou acetonitrilo, sendo preferível o diclorometano. Assim, todos os componentes são combinados e faz-se reagir a solução durante 24 a 48 horas à temperatura ambiente. Também pode ser utilizada uma solução do componente heterocíclico impuro preparado anteriormente. Depois de se completar a reacção, lava-se o diclorometano com ácido diluído, de preferência ácido acético aquoso a 5% em peso, separa-se a fase aquosa e permute-se então o diclorometano por acetato de etilo por destilação. Isola-se o produto **I**, o qual cristaliza a partir de acetato de etilo durante o arrefecimento e adição

de heptano, por filtração e secagem com um rendimento de 75% a 80% (para  $R_1 = H$ ,  $R_8 = H$ ,  $R_9 = \text{terc-Bu}$ ,  $R_{10} = \text{Me}$ ,  $\text{HET} = 6-(\text{trifluorometil})-\text{quinazolina-4-ilo}$ ).

Para o processo da presente invenção, os materiais de partida encontram-se comercialmente disponíveis ou podem ser facilmente preparados pelos especialistas na matéria. Os solventes, as temperaturas, as pressões, os materiais de partida com os grupos desejados e outras condições de reacção podem ser facilmente seleccionados consoante adequado por um especialista na matéria. O processo pode ser adaptado para preparar quantidades maiores do composto de fórmula estrutural I, tal como numa instalação de produção comercial.

#### **EXEMPLOS**

Os seguintes exemplos ilustram as variantes dos compostos e dos materiais de partida da invenção e não pretendem limitar o âmbito das reivindicações.

Consoante adequado, as reacções foram realizadas sob uma atmosfera de azoto anidro (ou árgon). Para as reacções anidras, foram utilizados solventes Dri-Solv da EM. Para outras reacções, foram utilizados solventes de qualidade de reagentes ou de qualidade de HPLC. Salvo quando indicado de outro modo, todos os reagentes adquiridos comercialmente consoante recebidos.

As medições LC/MS foram obtidas utilizando um sistema híbrido de um espectrómetro de massa quadropolo individual Waters ZQ/HPLC Shimadzu. Os dados para o pico relevante são registados a partir de ionização por pulverização em modo positivo. Os espectros de NMR (ressonância magnética nuclear) foram tipicamente obtidos em instrumentos Bruker

ou JEOL 400 MHz e 500 MHz nos solventes indicados. Todos os desvios químicos são registados em p.p.m. a partir de tetrametilsilano, utilizando a ressonância do solvente como padrão interno. Os dados dos espectros de  $^1\text{H-NMR}$  são tipicamente registados do modo seguinte: desvio químico, multiplicidade (s = singuleto, s lr = singuleto largo, d = dupletos, dd = dupletos de dupletos, t = triploto, q = quarteto, sep = septeto, m = multipleto, ap. = aparente), constantes de acoplamento (Hz) e integração.

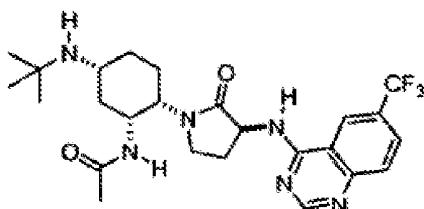
Serão evidentes para um especialista na matéria as abreviaturas convencionais aqui utilizadas ao longo da memória descritiva. Para facilidade de referência, as abreviaturas incluem, mas sem que isso constitua qualquer limitação: sat. = saturado, HPLC = cromatografia líquida de elevado rendimento, AP = percentagem de área, KF = Karl-Fischer, TA = temperatura ambiente, mmol = milímoles, HRMS = espectroscopia de massa de elevada resolução, TBTU = tetrafluoroborato de O-benzotriazol-2-il-N,N,N',N'-tetrametil-urônio, MTBE = TBME = éter terc-butil-metílico, EDAC = cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida, EDC = N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida, TEA = trietilamina, DPPA = difenil-fosforil-azida, IPA = álcool isopropílico, TFA = ácido trifluoroacético, DCM = diclorometano, THF = tetra-hidrofuran, DMF = N,N-dimetil-formamida, BOP = hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)-tris-(dimetilamino)-fosfónio, EtOAc = acetato de etilo, DMSO = dimetilsulfóxido,  $^{\circ}\text{C}$  = graus Celsius, eq. = equivalente ou equivalentes, g = grama ou gramas, mg = miligrama ou miligramas, mL (ou ml) = mililitro ou mililitros, h = hora ou horas, M = molar, N = normal, min =

minuto ou minutos, MHz = megahertz, tlc = cromatografia de camada fina, v/v = proporção volume-volume e ca. = cerca.

Os símbolos “ $\alpha$ ”, “ $\beta$ ”, “ $2R$ ” e “ $S$ ” são designações estereoquímicas que são familiares para os especialistas na matéria.

#### EXEMPLO 1

**N-((1R,2S,5R)-5-(terc-Butilamino-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida**



**Exemplo 1, passo 1:** dissolveu-se 2-benziloxicarbonilamino-7-oxo-6-aza-biciclo[3,2,1]octano-6-carboxilato de (1R,2S,5R)-terc-butilo (89,6 g, 0,24 mol, veja-se: P. H. Carter, et al. pedido de patente de invenção PCT n° WO 2005/021500) em acetato de etilo (1,5 L) e lavou-se a solução resultante com uma solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 0,45 L) e com uma solução saturada de NaCl (1 x 0,45 L). Secou-se a solução (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e depois filtrou-se directamente para um balão de 3 vias, com fundo redondo e com capacidade de 3 L. Purgou-se a solução com injecção directa de azoto e depois carregou-se com Pd a 10%/C (13,65 g), sob uma atmosfera de azoto. Evacuou-se o balão e encheu-se novamente com hidrogénio; repetiu-se este passo mais duas vezes. Fez-se borbulhar hidrogénio através da solução durante 30 minutos e depois agitou-se a mistura de reacção sob 1 atm de H<sub>2</sub> durante 18 horas. Evacuou-se o balão, encheu-se novamente

com azoto e carregou-se com catalisador fresco (6 g de Pd a 10%/C). Fez-se borbulhar hidrogénio através da solução durante 30 minutos e depois agitou-se a mistura de reacção sob 1 atm de H<sub>2</sub> durante 18 horas. Evacuou-se o balão e encheu-se novamente com azoto. Filtrou-se a mistura através de Celite; lavou-se então a camada do filtro com acetato de etilo. Diluiu-se o filtrado (volume ~1,6 L de EtOAc) com acetonitrilo (0,3 L) e carregou-se sequencialmente com *L*-N-Cbz-metionina (68 g, 0,24 mol), TBTU (77 g, 0,24 mol) e N,N-diisopropiletilamina (42 mL, 0,24 mol). Agitou-se a mistura de reacção à temperatura ambiente durante 4 horas, período esse durante o qual esta se alterou de uma suspensão para uma solução límpida. Extinguiu-se a mistura de reacção por meio da adição de uma solução saturada de NH<sub>4</sub>Cl (0,75 L) e de água (0,15 L); diluiu-se a mistura com EtOAc (0,75 L). Misturou-se as fases, separou-se e lavou-se a fase aquosa com uma solução saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 x 0,9 L) e com uma solução saturada de NaCl (1 x 0,75 L). Secou-se a solução (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtrou-se e concentrou-se sob uma pressão hipobárica para se obter o 2-((*S*)-2-(benziloxi-carbonilamino)-4-(metiltio)-butanamido)-7-oxo-6-aza-biciclo-[3,2,1]octano-6-carboxilato de (1*R*,2*S*,5*R*)-terc-butilo com o aspecto de um óleo, o qual foi utilizado no passo subsequente sem mais purificação. LC/MS para o pico principal: [M-Boc+H]<sup>+</sup> = 406,3; [M+Na]<sup>+</sup> = 528,3, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>4</sub>-MeOH): δ 7,36 (m, 5H), 5,11 (s, 2H), 4,32 (m, 1H), 4,2 (m, 1H), 4,0 (m, 1H), 2,5-2,7 (m, 3H), 2,25 (m, 1H), 2,11 (s, 3H), 2,05 (m, 4H), 1,9 (m, 1H), 1,7 (m, 2H), 1,54 (s, 9H). Também está presente EtOAc [1,26 (t), 2,03 (s), 4,12 (q)] e *N,N,N,N*-tetrametilureia [2,83 (s)].

**Exemplo 1, passo 2:** dissolveu-se uma amostra de 2-((S)-2-(benziloxicarbonilamino)-4-(metiltio)-butanamido)-7-oxo-6-azabiciclo[3,2,1]octano-6-carboxilato de (1R,2S,5R)-terc-butilo (assumindo 0,24 mol; veja-se o procedimento anterior) em iodometano (1,250 g) e agitou-se durante 48 horas à temperatura ambiente. Concentrou-se a mistura de reacção sob uma pressão hipobárica. Dissolveu-se o resíduo em diclorometano e concentrou-se sob uma pressão hipobárica. Repetiu-se este passo mais duas vezes. Dissolveu-se a pasta resultante em diclorometano (0,4 L) e verteu-se sobre uma solução agitada rapidamente de MTBE (4,0 L). Recolheu-se os sólidos amarelos resultantes por filtração sob sucção e secou-se sob uma pressão hipobárica elevada para se obter o sal de sulfónio (179 g). Utilizou-se este material no passo subsequente sem mais purificação. LC/MS para o pico principal:  $[M-Me_2S+H^+] = 458,4$ ; [MHz = 520,4,  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $d_4$ -MeOH):  $\delta$  7,35 (m, 5H), 5,09 (s, 2H), 4,33 (m, 1H), 4,28 (m, 1H), 3,98 (m, 1H), 3,3-3,45 (m, 2H), 2,97 (s, 3H), 2,94 (s, 3H), 2,78 (m, 1H), 2,0-2,3 (m, 4H), 1,7 (m, 2H), 1,52 (s, 9H). Também está presente MTBE [1,18 (s), 3,2 (s)] e vestígios de *N,N,N,N*-tetrametilureia [2,81 (s)].

**Exemplo 1, passo 3:** dissolveu-se todo o sal sulfónio do passo anterior (0,24 mol, assumido) em DMSO (2,0 L). Agitou-se a solução resultante sob uma atmosfera de azoto à temperatura ambiente e carregou-se progressivamente com carbonato de célio (216 g). Agitou-se a suspensão à temperatura ambiente durante 3 horas e depois filtrou-se para se remover os sólidos. Dividiu-se a solução em porções de ~0,22 L e processou-se do modo seguinte: diluiu-se a

mistura de reacção (~0,22 L) com acetato de etilo (1,5 L) e lavou-se sucessivamente com água (3 x 0,5 L) e com salmoura (1 x 0,3 L). Secou-se a fase orgânica ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtrou-se e concentrou-se sob uma pressão hipobárica. Obteve-se o 2-((*S*)-3-(benziloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidina-1-il)-7-oxo-6-azabiciclo[3,2,1]octano-6-carboxilato de (1*R*,2*S*,5*R*)-terc-butilo (90,8 g, 83%) com o aspecto de uma espuma cristalina, livre da impureza tetrametil-ureia. LC/MS para o pico principal:  $[\text{M}-\text{Boc}+\text{H}]^+ = 358,4$ ;  $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 480,4$ ,  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $d_4\text{-MeOH}$ ):  $\delta$  7,35 (m, 5H), 5,12 (s, 2H), 4,35 (m, 2H), 4,2 (m, 1H), 3,6 (m, 1H), 3,3 (m, 1H), 2,64 (m, 1H), 2,28–2,42 (m, 2H), 2,15 (m, 1H), 1,7–2,0 (m, 5H), 1,55 (s, 9H). Se desejado, este material pode ser isolado com o aspecto de um sólido por dissolução em MTBE (1 volume), adicionando a heptano (3,3 volumes) e recolhendo o precipitado resultante.

**Exemplo 1, passo 4:** carregou-se uma solução agitada de 2-((*S*)-3-(benziloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidina-1-il)-7-oxo-6-azabiciclo[3,2,1]octano-6-carboxilato de (1*R*,2*S*,5*R*)-terc-butilo (108 g, 0,236 mol) em THF (1 L) com monohidrato de hidróxido de lítio (21,74 g, 0,519 mol). Adicionou-se lentamente água (0,3 L), de um modo tal que a temperatura não excedesse 20°C. Agitou-se a mistura de reacção à temperatura ambiente e removeu-se os materiais voláteis sob uma pressão hipobárica. Ajustou-se o valor de pH até ~4 por meio da adição de HCl 1 N (450 mL) e de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Recolheu-se por filtração os precipitados brancos resultantes e lavou-se com água (2 x 1 L). Dissolveu-se o sólido em diclorometano (1,5 L) e água (~1 L). Secou-se a camada orgânica ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtrou-se e concentrou-se sob

uma pressão hipobárica. Dissolveu-se o resíduo em EtOAc (0,7 L) e aqueceu-se a solução resultante ao refluxo durante 1 hora. Separou-se os sólidos depois de se ter arrefecido até à temperatura ambiente e recolheu-se por filtração. Purificou-se estes sólidos por recristalização a partir de isopropanol para se obter o ácido (1R,2S,5R)-2-((S)-3-(benziloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidina-1-il)-5-(terc-butoxicarbonilamino)-ciclo-hexanocarboxílico com o aspecto de um sólido branco (104,5 g, rendimento de 93%). LC/MS para o pico principal:  $[M-tBu+H]^+ = 420,2$ ;  $[M-Boc+H]^+ = 376,2$ ;  $[M+H]^+ = 476,2$ ;  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $d_6$ -MeOH):  $\delta$  7,35 (m, 5H), 5,11 (s, 2H), 4,35 (m, 2H), 3,71 (m, 1H), 3,45-3,6 (m, 2H), 2,99 (m, 1H), 2,41 (m, 1H), 2,15 (m, 1H), 2,0 (m, 2H), 1,6-1,9 (m, 4H), 1,46 (s, 9H).

**Exemplo 1, passo 5:** carregou-se um balão de fundo redondo de 3 L com ácido (1R,2S,5R)-2-((S)-3-(benziloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidina-1-il)-5-(terc-butoxicarbonilamino)-ciclo-hexanocarboxílico (75,5 g, 0,158 mol), EDC•HCl (33,5 g, 0,175 mol), 1-hidroxibenzotriazole (23,6 g, 0,175 mol) e diclorometano (1 L). Agitou-se a mistura de reacção à temperatura ambiente durante 2 horas, período esse durante o qual se verificou a mudança de uma suspensão branca para uma solução limpida. Fez-se borbulhar amónia (gás) na solução até o valor de pH ser fortemente alcalino (papel) e agitou-se a mistura de reacção durante 10 minutos; repetiu-se esta adição de amónia e agitou-se a mistura de reacção durante mais 10 minutos. Adicionou-se água. Lavou-se a fase orgânica com uma solução saturada de  $NaHCO_3$ , com  $NaH_2PO_4$  e com salmoura e depois concentrou-se sob uma pressão hipobárica. Misturou-se o resíduo com

acetonitrilo (0,5 L) e depois concentrou-se para se obter a (1R,2S,5R)-2-((S)-3-(benziloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidina-1-il)-5-(terc-butoxicarbonilamino)-ciclo-hexanocarboxamida com o aspecto de um sólido branco (75,9 g, ~100%), a qual foi utilizada no passo subsequente sem mais purificação. LC/MS para o pico principal:  $[M-Boc-FH]^+ = 375,3$ ;  $[M+H]^+ = 475,4$ ;  $[M-tBu+H]^+ = 419,3$ ,  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $d_4$ -MeOH):  $\delta$  7,35 (m, 5H), 5,11 (s, 2H), 4,25 (m, 2H), 3,70 (m, 1H), 3,6 (m, 1H), 3,45 (m, 1H), 2,91 (m, 1H), 2,38 (m, 1H), 2,12 (m, 1H), 1,9-2,05 (m, 2H), 1,65-1,9 (m, 4H), 1,46 (s, 9H).

**Exemplo 1, passo 6:** efectuou-se a reacção em três porções iguais e combinou-se para processamento aquoso. Carregou-se um balão de fundo redondo e com uma capacidade de 5 L com (1R,2S,5R)-2-((S)-3-(benziloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidina-1-il)-5-(terc-butoxicarbonilamino)-ciclo-hexanocarboxamida (25,3 g, 53 mmol), acetonitrilo (1,9 L) e 2,6 L de água/gelo. Agitou-se a mistura e arrefeceu-se até 0°C. Adicionou-se diacetato de iodobenzeno (25,77 g, 80 mmol) e agitou-se a mistura de reacção durante 2 horas; adicionou-se mais 0,5 eq. de diacetato de iodobenzeno. Agitou-se a mistura de reacção durante 9 horas (temperatura de reacção < 10°C). Carregou-se a mistura com 8 eq. de N,N-diisopropiletilamina e 2 eq. de anidrido acético. Durante os 30 minutos seguintes, adicionou-se, a cada dez minutos, 4 eq. de N,N-diisopropiletilamina e 2 eq. de anidrido acético, até se considerar a reacção como completa (HPLC). Removeu-se o acetonitrilo sob uma pressão hipobárica; separou-se algum sólido a partir do resíduo e recolheu-se este material por filtração. Extraiu-se o resíduo restante com diclorometano (3 L e depois 1 L). Lavou-se a fase

orgânica sequencialmente com água, com uma solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$  e com salmoura. Adicionou-se os sólidos recolhidos à fase orgânica em conjunto com carvão activado (15 g). Agitou-se a mistura durante 30 minutos a 40°C, depois filtrou-se e concentrou-se sob uma pressão hipobárica. Dissolveu-se o resíduo em EtOAc (1 L), agitou-se a solução resultante a 75°C durante 1 hora e depois deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente. Separou-se um sólido e recolheu-se por filtração. Purificou-se novamente este sólido por recristalização: dissolveu-se em primeiro lugar em 0,5 L de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , depois concentrou-se sob uma pressão hipobárica e depois recristalizou-se novamente a partir de 1 L de EtOAc; repetiu-se este processo três vezes. Os sólidos obtidos a partir das águas-mãe descritas antes foram recristalizados três vezes utilizando o mesmo método. Os sólidos combinados foram recristalizados mais duas vezes a partir de acetonitrilo (0,7 L) para se obter 66 g (84%) de (1R,3R,4S)-3-acetamido-4-((S)-3-(benziloxi-carbonilamino)-2-oxopirrolidina-1-il)-ciclo-hexilcarbamato de terc-butilo (pureza > 99,5% por HPLC). LC/MS para o pico principal:  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 489,4$ ;  $[\text{M}-\text{tBu}+\text{H}]^+ = 433,3$ ,  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $d_4\text{-MeOH}$ ):  $\delta$  7,3-7,4 (m, 5H), 5,11 (s, 2H), 4,35 (m, 1H), 4,15 (m, 1H), 4,04 (m, 1H), 3,8 (m, 1H), 3,6 (m, 2H), 2,44 (m, 1H), 2,12 (m, 1H), 1,87-2,05 (m, 4H), 1,87 (s, 3H), 1,55-1,7 (m, 2H), 1,46 (s, 9H). A fidelidade estereoquímica do rearranjo de Hofmann foi confirmada por análise da estrutura de cristal por raio-X deste composto, conforme ilustrado na figura 1.

**Exemplo 1, passo 7:** a uma solução de (1R,3R,4S)-3-acetamido-4-((S)-3-(benziloxi-carbonilamino)-2-oxopirrolidina-

1-il)-ciclo-hexilcarbamato de terc-butilo (100 g, 0,205 mol) em diclorometano (400 mL) adicionou-se TFA (400 mL) a -20°C. Agitou-se a solução de reacção à temperatura ambiente durante 2 horas. Removeu-se o solvente e a maior parte de TFA sob pressão reduzida e diluiu-se o resíduo com diclorometano (2 L) e com uma solução aquosa de  $K_2CO_3$  (2 L). Ajustou-se o valor de pH até 10 com HCl 1 N. Extraiu-se a camada aquosa com diclorometano (3 x 1 L). Secou-se a camada orgânica combinada sobre  $Na_2SO_4$  e concentrou-se para se obter (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-aminociclo-hexil)-2-oxopirrolidina-3-ilcarbamato de benzilo com o aspecto de um óleo (81 g, rendimento de 100%). Utilizou-se directamente esta amina no passo subsequente se mais purificação.

**Exemplo 1, passo 8:** preparou-se uma solução de (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-aminociclo-hexil)-2-oxopirrolidina-3-ilcarbamato de benzilo (13,3 g, 34 mmol) e 3,5-di-terc-butilciclo-hexa-3,5-dieno-1,2-diona (7,54 g, 34 mmol) em metanol (160 mL) e agitou-se à temperatura ambiente durante 2 horas. Concentrou-se a solução, diluiu-se com acetona (132 mL) e com água (33 mL) e depois adicionou-se Dowex-50WX8-200 (33 g). Agitou-se a mistura de reacção à temperatura ambiente durante 2 horas. Removeu-se o Dowex-50WX8-200 por filtração e lavou-se com diclorometano (300 mL). Concentrou-se o filtrado sob uma pressão hipobárica para se remover a maior parte de acetona. Diluiu-se o resíduo com diclorometano (200 mL) e lavou-se com uma solução aquosa de  $NaHCO_3$  (200 mL) e com salmoura (200 mL). Extraiu-se as camadas aquosas combinadas com diclorometano (2 x 100 mL). Secou-se os extractos orgânicos combinados

sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentrou-se. Obteve-se o produto, (S)-1-((1S,2R)-2-acetamido-4-oxociclo-hexil)-2-oxopirrolidina-3-ilcarbamato de benzilo, com o aspecto de um sólido (12 g, rendimento de 90%) por cristalização em EtOAc (100 mL) e hexano (200 mL).  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  p.p.m. 7,99 (d,  $J$  = 9,35 Hz, 1H), 7,44 (d,  $J$  = 8,80 Hz, 1H), 7,28-7,39 (m, 5H), 5,03 (s, 2H), 4,50 (s, 1H), 4,31 (d,  $J$  = 12,10 Hz, 1H), 4,18 (q,  $J$  = 8,98 Hz, 1H), 3,27 (m, 2H), 2,82 (dd,  $J$  = 15,12, 5,22 Hz, 1H), 2,52-2,65 (m, 1H), 2,40 (dd,  $J$  = 12,92, 4,67 Hz, 1H), 2,15-2,31 (m, 2H), 2,09 (d,  $J$  = 15,40 Hz, 1H), 1,90 (m, 1H), 1,81 (s, 3H), 1,68 (m, 1H).  $m/z$ : 388,46 [M+H].

**Exemplo 1, passo 9:** a uma solução de  $\text{TiCl}_4$  (1 M em diclorometano, 36 mL, 36 mmol) em diclorometano (30 mL), a 0°C, adicionou-se  $\text{Ti(OiPr)}_4$  (10,8 mL, 36 mmol). Agitou-se então a mistura à temperatura ambiente durante 10 minutos. A uma solução de (S)-1-((1S,2R)-2-acetamido-4-oxociclo-hexil)-2-oxopirrolidina-3-ilcarbamato de benzilo (23,25 g, 60 mmol) em diclorometano (600 mL) adicionou-se terc-butilamina (30 mL, 300 mmol) à temperatura ambiente, e depois acrescentou-se a solução de  $\text{TiCl}_4/\text{Ti(OiPr)}_4$  a -50°C. Deixou-se aquecer lentamente a solução até à temperatura ambiente. Deu-se a reacção por completa ao fim de 2 horas (monitorizou-se a reacção através de HPLC por extinção de uma amostra para HPLC com  $\text{NaBH}_4$  em metanol). Arrefeceu-se a solução até 10°C e adicionou-se  $\text{BH}_3\text{-SMe}_2$  (1 M em diclorometano, 66 mL, 66 mmol). Agitou-se a mistura à temperatura ambiente durante 5 horas e depois extinguiu-se com uma solução aquosa de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (300 mL). Removeu-se por filtração o precipitado. Separou-se as duas camadas e

extraiu-se a camada aquosa com diclorometano (600 mL). Extraiu-se duas vezes as camadas combinadas de diclorometano com HCl 1 N (150 mL e 15 mL). (O produto e o isómero trans indesejado estavam ambos na fase acídica aquosa). Neutralizou-se as camadas acídicas aquosas combinadas com uma solução aquosa 12 M de NH<sub>4</sub>OH (12 mL) até pH ~8 e extraiu-se duas vezes com diclorometano (600 mL, 450 mL). (O produto encontrava-se na fase orgânica, ao passo que o isómero trans ainda se encontrava na fase aquosa). Lavou-se três vezes as camadas orgânicas combinadas com uma solução aquosa de NH<sub>4</sub>Cl (3 x 200 mL), até deixar de existir isómero trans na camada orgânica. Secou-se a camada orgânica sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrhou-se. Purificou-se o resíduo por cristalização em EtOAc/hexano (200 mL/800 mL) para se obter o desejado (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(terc-butilamino)ciclo-hexil)-2-oxopirrolidina-3-ilcarbamato de benzilo (20,80 g, rendimento de 78%) com o aspecto de um sólido branco e com uma pureza de 99,5%. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ p.p.m. 8,76 (s, 1H), 7,27-7,46 (m, 6H), 5,03 (m, 2H), 4,14 (m, 1H), 4,07 (q, *J* = 8,80 Hz, 1H), 3,83 (m, 1H), 3,36 (m, 2H), 2,91 (s, 1H), 2,18 (m, 1H), 2,04 (m, 1H), 1,78 (s, 3H), 1,41-1,74 (m, 7H), 1,04 (s, 9H). *m/z*: 445,54 [M+H].

**Exemplo 1, passo 10:** a uma solução de (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(terc-butilamino)-ciclo-hexil)-2-oxopirrolidina-3-ilcarbamato de benzilo (43,3 g, 98 mmol) em metanol (400 mL), adicionou-se Pd húmido a 10%/C (4,34 g). Evacuou-se a mistura e carregou-se novamente com hidrogénio por meio de um balão de hidrogénio. Agitou-se a mistura à temperatura ambiente durante 5 horas. Filtrou-se a mistura, lavou-se

com metanol (500 mL) e concentrhou-se sob uma pressão hipobárica até à secura. Destilou-se o produto impuro obtido com IPA (2 x 100 mL) sob pressão reduzida para se obter o produto N-((1R,2S,5R)-2-((S)-3-amino-2-oxo-pirrolidina-1-il)-5-(terc-butilamino)-ciclo-hexil)-acetamida com o aspecto de um óleo (30 g, rendimento de 98%). Utilizou-se esta amina no passo subsequente sem mais purificação.

**Exemplo 1, passo 11:** a uma solução de N-((1R,2S,5R)-2-((S)-3-amino-2-oxopirrolidina-1-il)-5-(terc-butilamino)-ciclo-hexil)-acetamida (30 g, 97 mmol) em IPA (400 mL) adicionou-se TEA (27 mL, 195 mmol) e 4-cloro-6-(trifluorometil)-quinazolina (25 g, 107 mmol; veja-se P. H. Carter, et al. pedido de patente de invenção PCT nº WO 2005/021500). Agitou-se a mistura à temperatura ambiente de um dia para o outro e depois agitou-se a 70°C durante 1 hora. Concentrou-se a solução resultante sob pressão reduzida até à secura. Dissolveu-se o resíduo em diclorometano (1 L) e extraiu-se duas vezes com uma solução de ácido acético I (preparada por combinação de 700 mL de água e 22,6 mL de ácido acético glacial) (500 mL, 200 mL). Extraiu-se a camada aquosa ácida (pH 4-5) com diclorometano (2 x 300 mL). Extraiu-se a camada de diclorometano com uma solução de ácido acético II (300 mL; preparada por combinação de 300 mL de água com 4 mL de ácido acético glacial). Alcalinizou-se as camadas combinadas de ácido acético com NaOH 1 M até pH > 12 e extraiu-se com diclorometano (3 x 700 mL). Secou-se as camadas combinadas orgânicas e concentrhou-se para se obter um produto impuro com o aspecto de um sólido (45,6 g, rendimento de 93%). Purificou-se o produto impuro por

recristalização a partir de EtOAc (400 mL)/hexano (900 mL) para se obter 42,86 g (88%) de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida com uma pureza de 99,7%.  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  p.p.m. 9,71 (1H, s lr), 9,02 (1H, s), 8,71 (1H, d,  $J$  = 7,97 Hz), 8,59 (1H, s), 8,04 (1H, dd,  $J$  = 8,66, 1,79 Hz), 7,88 (1H, d,  $J$  = 8,52 Hz), 4,91-5,13 (1H, m), 4,30-4,57 (1H, m), 3,86 (1H, dt,  $J$  = 11,89, 3,71, 3,64 Hz), 3,43-3,57 (1H, m), 3,35-3,45 (1H, m), 3,04 (1H, t,  $J$  = 3,85 Hz), 2,23-2,40 (1H, m), 2,05-2,22 (1H, m), 1,90-1,98 (1H, m), 1,86-1,93 (3H, m), 1,50-1,78 (5H, m), 0,98-1,15 (9H, m).  $^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  p.p.m. 171,23, 169,35, 159,54, 156,87, 151,17, 128,97, 128,20, 125,76 (1C, q,  $J$  = 30,52 Hz), 121,55 (1C, s lr), 124,04 (1C, q,  $J$  = 272,11 Hz), 114,31, 53,26, 52,39, 50,81, 47,56, 45,70, 42,77, 34,52, 32,17, 29,14 (3C, s), 26,49, 23,29, 20,30.  $^{19}\text{F-NMR}$  (471 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  p.p.m. -60,34 (s).  $m/z$ : 507,0 [M+H]. Anál. Calc. para C<sub>25</sub>H<sub>33</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>F<sub>3</sub>: C, 59,27; H, 6,56; N, 16,59; F, 11,25. Encontrado: C, 59,44; H, 6,64; N, 16,74; F, 10,99.

#### **PREPARAÇÃO ALTERNATIVA DO EXEMPLO 1**

**Exemplo 1, preparação alternativa, passo 1:** equipou-se um balão de fundo redondo com 3 vias, seco numa mufla, com uma barra de agitação seca, um condensador de refluxo seco e dois septa. Depois de se arrefecer sob uma atmosfera de N<sub>2</sub>, carregou-se sequencialmente o balão com ácido (1R,2S,5R)-2-((S)-3-(benziloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidina-1-il)-5-(terc-butoxicarbonilamino)-ciclo-hexanocarboxílico (60 g, 126 mmol; veja-se o Exemplo 1, passo 4), acetonitrilo (800

mL), N-metilmorfolina (27,7 mL, 252 mmol) e azida de difenilfosforilo (29,9 mL, 139 mmol). Agitou-se a mistura de reacção à temperatura ambiente durante 1 hora e 40 minutos, período esse ao fim do qual se adicionou 2-trimetilsililetanol (90 mL, 631 mmol). Aqueceu-se a mistura de reacção e atingiu-se o refluxo decorridos 30 minutos. Manteve-se ao refluxo durante 1 hora, depois deixou-se arrefecer gradualmente 50°C e depois arrefeceu-se até 15°C utilizando arrefecimento exterior. Extinguiu-se a mistura de reacção por meio da adição de ácido acético (1,734 mL, 30,3 mmol). Concentrou-se a mistura de reacção sob uma pressão hipobárica e depois dissolveu-se em EtOAc (1,2 L). Lavou-se sequencialmente com água (1 x 0,3 L), com uma solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 0,3 L), com HCl 1 N (1 x 0,3 L) e com salmoura (2 x 0,3 L). Secou-se a fase orgânica (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtrou-se e concentrou-se sob uma pressão hipobárica. No processo de concentração surgiu um sólido, muito no início. Depois de se remover os materiais voláteis, adicionou-se 800 mL de 10% de EtOAc/hexano e agitou-se a mistura de um dia para o outro. Recolheu-se o sólido e secou-se para se obter (1R,3R,4S)-4-((S)-3-benziloxicarbonilamino-2-oxopirrolidina-1-il)-3-((2-trimetilsilil)-etoxicarbonilamino)-ciclo-hexilcarbamato de terc-butilo (60,5 g, 102 mmol, rendimento de 81%). A análise por HPLC revelou que o material apresentava uma pureza de 72%, com duas impurezas de 12%. Utilizou-se este material no passo subsequente sem mais purificação. Depois, concentrou-se o filtrado para se obter mais 4,38 g de produto. Rendimento total = 64,9 g (87%).

**Exemplo 1, preparação alternativa, passo 2:** equipou-se um balão de fundo redondo de 500 mL com uma barra de agitação e carregou-se sequencialmente com (1*R*,3*R*,4*S*)-4-((*S*)-3-benziloxicarbonilamino-2-oxopirrolidina-1-il)-3-((2-trimetilsilyl)-etoxicarbonolamino)-ciclo-hexilcarbamato de terc-butilo (60,5 g), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (180 mL) e uma solução de mono-hidrato do ácido para-tolueno-sulfónico (19,48 g, 102 mmol) em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (120 mL) e metanol (30 mL). Colocou-se a mistura num evaporador rotativo e removeu-se a maior parte do CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (temperatura de banho de cerca de 20°C). Quando se iniciou a formação de espuma na mistura, interrompeu-se o vácuo e aumentou-se a temperatura do banho para 46°C (a temperatura varia entre 44°C e 51°C; controlou-se por meio da adição de gelo externo). Efectuou-se a rotação da mistura a esta temperatura durante exactamente uma hora (ao longo deste passo verificou-se a libertação de gás) e depois diluiu-se com EtOAc (1 L). Lavou-se a fase orgânica com NH<sub>4</sub>OH 0,5 N (2 x 250 mL). Combinou-se as águas de lavagem aquosas e colocou-se à parte. Lavou-se a fase orgânica com uma solução saturada de NH<sub>4</sub>Cl (1 x 250 mL) e com uma solução saturada de NaCl (1 x 250 mL); deitou-se foram estas águas de lavagem aquosas. Extraiu-se novamente as lavagens de NH<sub>4</sub>OH combinadas inicialmente com EtOAc (1 x 250 mL) e lavou-se o extracto orgânico com uma solução saturada de NH<sub>4</sub>Cl (1 x 60 mL) e com uma solução saturada de NaCl (1 x 60 mL). Combinou-se todos os extractos orgânicos, secou-se (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtrou-se e concentrhou-se. Purificou-se o resíduo por eluição através de uma camada de SiO<sub>2</sub> (13 cm de largura x 7,5 cm de altura). O primeiro eluente era EtOAc puro (cerca de 4 L). O segundo eluente era uma mistura a 1:9 de 10% de NH<sub>4</sub>OH em MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (cerca de 5 L).

Juntou-se as fracções que continham o produto desejado e evaporou-se para se obter o (1R,2S,5R)-5-amino-2-((S)-3-benziloxicarbonilamino-2-oxopirrolidina-1-il)-ciclo-hexilcarbamato de 2-(trimetilsilil)-etilo desejado (31,6 g, 64,4 mmol, rendimento de 63%).

**Exemplo 1, preparação alternativa, passo 3:** carregou-se uma solução agitada de (1R,2S,5R)-5-amino-2-((S)-3-benziloxicarbonilamino-2-oxopirrolidina-1-il)-ciclo-hexilcarbamato de 2-(trimetilsilil)-etilo (400 mg, 0,82 mmol) em acetonitrilo (3 mL) sequencialmente com diisopropiletilamina (315,8 mg, 3 eq.) e bromoacetonitrilo (109,5 mg, 1,1 eq.). Agitou-se a mistura a 40°C durante 30 horas. Removeu-se o solvente sob pressão reduzida. Purificou-se o resíduo por cromatografia em coluna através de gel de sílica, utilizando como eluente 1,5% de metanol em diclorometano. Obteve-se o (1R,2S,5R)-2-((S)-3-benziloxicarbonilamino-2-oxopirrolidina-1-il)-5-(ciano-metilamino)-ciclo-hexilcarbamato de 2-(trimetilsilil)-etilo com o aspecto de um sólido branco (400 mg, 93%). LC/MS encontrado  $[M + H]^+ = 530$ .

**Exemplo 1, preparação alternativa, passo 4:** preparou-se uma solução agitada de (1R,2S,SR)-2-((S)-3-benziloxicarbonilamino-2-oxopirrolidina-1-il)-5-(cianometilamino)-ciclohexilcarbamato de 2-(trimetilsilil)-etilo (400 mg, 0,76 mmol) em diclorometano (5 mL), arrefeceu-se até 0°C e carregou-se progressivamente com m-CPBA (372,6 mg, 2,2 eq.). agitou-se a mistura à temperatura ambiente durante 1,5 horas. Adicionou-se uma solução saturada de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (3 mL) e uma solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (3 mL) e agitou-se a mistura

à temperatura ambiente durante 0,5 hora. Diluiu-se a mistura com diclorometano (80 mL), lavou-se com uma solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (20 mL) e com salmoura (20 mL). Secou-se a solução sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, filtrou-se e concentrou-se sob uma pressão hipobárica. Dissolveu-se o resíduo obtido em metanol (5 mL) e carregou-se a solução com  $\text{NH}_2\text{OH}-\text{HCl}$  (262,7 mg, 5 eq.). Agitou-se a mistura a 60°C durante 2,5 horas. Depois de se arrefecer até à temperatura ambiente, diluiu-se a mistura com diclorometano (80 mL) e filtrou-se através de uma camada de celite. Lavou-se o filtrado com uma solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (2 x 20 mL). Extraiu-se as águas de lavagem aquosas com diclorometano (30 mL). Combinou-se as camadas de diclorometano e lavou-se com salmoura (30 mL). Secou-se a solução sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, filtrou-se e concentrou-se sob uma pressão hipobárica para se obter (1R,2S,5R)-2-((S)-3-benziloxicarbonilamino-2-oxopirrolidina-1-il)-5-(hidroxiamino)-ciclo-hexilcarbamato de 2-(trimetilsilil)-etilo (350 mg, 91%). LC/MS encontrado  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 507$ .

**Exemplo 1, preparação alternativa, passo 5:** preparou-se uma solução de (1R,2S,5R)-2-((S)-3-benziloxicarbonilamino-2-oxopirrolidina-1-il)-5-(hidroxiamino)-ciclo-hexilcarbamato de 2-(trimetilsilil)-etilo (350 mg, 0,69 mmol) em acetona (5 mL) e agitou-se à temperatura ambiente durante 16 horas. Concentrou-se a mistura sob uma pressão hipobárica. Dissolveu-se o resíduo em THF anidro (7 mL) e arrefeceu-se até 0°C. Adicionou-se, gota a gota, uma solução de  $\text{MeMgBr}$  (1,1 mL, 3 M em éter dietílico, 5 eq.). Agitou-se a mistura à temperatura ambiente durante 1,5 horas. Extinguiu-se a mistura de reacção com água (5 mL) a 0°C. Diluiu-se a

mistura com acetato de etilo (100 mL) e filtrou-se através de uma camada de celite. Lavou-se o filtrado com salmoura (30 mL). Secou-se a solução sobre  $MgSO_4$  anidro, filtrou-se e concentrou-se sob uma pressão hipobárica. Dissolveu-se o resíduo em 2 mL de acetonitrilo e adicionou-se 1 mL de  $CS_2$ . Agitou-se a mistura à temperatura ambiente durante 1 hora. Removeu-se o solvente e purificou-se o produto impuro por cromatografia em coluna através de gel de sílica, utilizando como eluente 1,5% de metanol em diclorometano, para se obter o (1*R*,2*S*,5*R*)-2-((*S*)-3-benziloxicarbonilamino-2-oxopirrolidina-1-il)-5-(terc-butilamino)-ciclo-hexil-carbamato de 2-(trimetilsilil)-etilo (160 mg, 42%). LC/MS encontrado  $[M + H]^+ = 547$ .

**Exemplo 1, preparação alternativa, passo 6:** preparou-se uma solução agitada de (1*R*,2*S*,5*R*)-2-((*S*)-3-benziloxicarbonilamino-2-oxopirrolidina-1-il)-5-(terc-butilamino)-ciclo-hexil-carbamato de 2-(trimetilsilil)-etilo (100 mg, 0,183 mmol) em diclorometano (3 mL) e carregou-se com ácido trifluoroacético (2 mL). Agitou-se a mistura de reacção durante 2 horas à temperatura ambiente e concentrou-se sob uma pressão hipobárica. Dissolveu-se o resíduo em diclorometano (50 mL) e lavou-se com uma solução saturada de  $NaHCO_3$  (20 mL). Extraiu-se a camada aquosa com diclorometano (3 x 30 mL). Combinou-se as camadas de diclorometano e secou-se sobre  $Na_2SO_4$  anidro, filtrou-se e concentrou-se sob uma pressão hipobárica para se obter (S)-1-((1*S*,2*R*,4*R*)-2-amino-4-(terc-butilamino)-ciclo-hexil)-2-oxopirrolidina-3-ilcarbamato de benzilo (66 mg, 90%). LC/MS encontrado  $[M + H]^+ = 403$ .

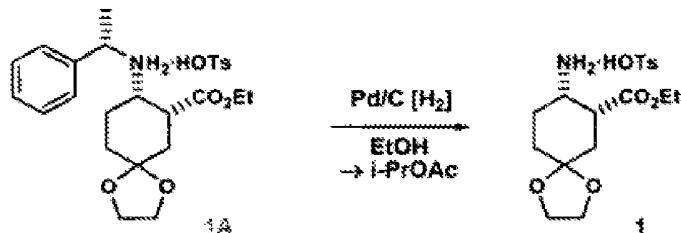
**Exemplo 1, preparação alternativa, passo 7:** preparou-se uma solução de (S)-1-((S,2R,4R)-2-amino-4-(terc-butilamino)-ciclo-hexil)-2-oxopirrolidina-3-ilcarbamato de benzilo (22 mg, 0,055 mmol) em diclorometano (2 mL), carregou-se sequencialmente com trietilamina (11,1 mg, 2 eq) e anidrido acético (6,1 mg, 1,1 eq.). Agitou-se a mistura de reacção durante 1,5 horas à temperatura ambiente, diluiu-se com diclorometano (50 mL) e lavou-se com uma solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (20 mL). Secou-se a fase orgânica sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrou-se e concentrou-se sob uma pressão hipobárica para se obter (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(terc-butilamino)-ciclo-hexil)-2-oxopirrolidina-3-ilcarbamato de benzilo (22 mg, 90%). LC/MS encontrado [M + H]<sup>+</sup> = 445.

**Exemplo 1, preparação alternativa, passo 8:** a uma solução de (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(terc-butilamino)-ciclo-hexil)-2-oxopirrolidina-3-ilcarbamato de benzilo (22 mg, 0,05 mmol) em metanol (2 mL) adicionou-se Pd(OH)<sub>2</sub> (20 mg de catalisador húmido a 50%). Evacuou-se o balão e encheu-se novamente com hidrogénio a partir de um balão de hidrogénio. Agitou-se a mistura à temperatura ambiente durante 1 hora e removeu-se o catalisador por filtração. Concentrou-se o filtrado sob uma pressão hipobárica para se obter N-((1R,2S,5R)-2-((S)-3-amino-2-oxopirrolidina-1-il)-5-(terc-butilamino)-ciclo-hexil)-acetamida (13 mg, 85%). LC/MS encontrado [M + H]<sup>+</sup> = 311.

**Exemplo 1, preparação alternativa, passo 9:** a uma solução de N-((1R,2S,5R)-2-((S)-3-amino-2-oxopirrolidina-1-il)-5-(terc-butilamino)-ciclo-hexil)-acetamida (70 mg, 0,225

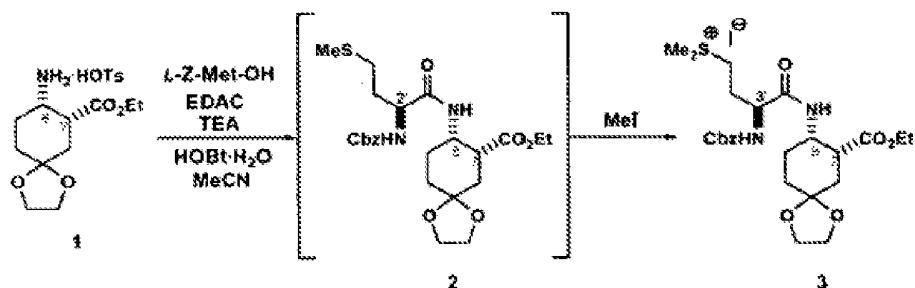
mmol) em isopropanol (3 mL) adicionou-se 4-cloro-6-(trifluorometil)-quinazolina (63 mg, 1,2 eq.) e trietilamina (56,9 mg, 2,5 eq.). Agitou-se a mistura à temperatura ambiente durante 1,5 horas. Removeu-se o solvente sob pressão reduzida. Purificou-se o resíduo por HPLC preparativa para se obter o composto em epígrafe sob a forma do seu sal bis-TFA (110 mg, 67%). LC/MS encontrado  $[M + H]^+ = 507$ .

#### 2<sup>a</sup> PREPARAÇÃO ALTERNATIVA DO EXEMPLO 1



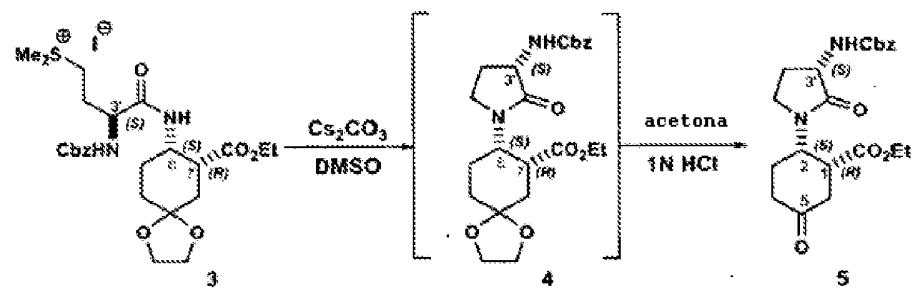
**Exemplo 1, 2<sup>a</sup> preparação alternativa, passo 1a:** num hidrogenador, introduziu-se o sal 4-tolueno-sulfonato (7R,8S)-8-((S)-1-fenil-etylamino)-1,4-dioxa-spiro[4,5]-decano-7-carboxilato de etilo **1A** (1417 g, 2,8 moles, c.f.: WO2004098516, preparada de um modo análogo ao descrito na patente de invenção norte-americana nº 6 835 841), etanol (200 de prova, 11,4 L) e catalisador de Pd a 10%/C (50% a húmido, 284 g). Tornou-se a mistura inerte com azoto, depois pressurizou-se com hidrogénio gasoso (45 psig) e agitou-se vigorosamente aproximadamente a 40°C até se ter consumido o material de partida (HPLC). Arrefeceu-se a suspensão, purgou-se com azoto gasoso e removeu-se o catalisador por filtração enquanto a mistura se encontrava inerte. Lavou-se o catalisador gasto com etanol (4,3 L).

combinou-se o filtrado e as águas de lavagem e concentrou-se sob uma pressão hipobárica até um volume de 2 L a 3 L, mantendo a temperatura do banho entre 40°C e 60°C. Carregou-se com acetato de isopropilo (5 L) e concentrou-se a mistura até um volume de ~2 L, até se ter removido a maior parte do etanol (< 0,5%) e um teor residual de humidade < 1000 p.p.m.. Ajustou-se o volume do lote até ~7,5 L por adição de acetato de isopropilo. Aqueceu-se a mistura até 80°C até ficar límpida e depois arrefeceu-se até 65°C-70°C. Adicionou-se cristais primários de 1 (5 g) e arrefeceu-se o lote até 50°C ao longo de 2 horas, depois arrefeceu-se novamente até 20°C ao longo de 4 horas e manteve-se a esta temperatura durante ~10 horas. Filtrou-se a pasta resultante e lavou-se a pasta com acetato de isopropilo (2 L). Secou-se o produto sob uma pressão hipobárica a ~35°C até se reduzir os materiais voláteis para um valor inferior a ~1% (LOD). Obteve-se o sal 4-tolueno-sulfonato de (7R,8S)-8-amino-1,4-dioxa-espiro[4,5]-decano-7-carboxilate de etilo com o aspecto de um sólido branco cristalino (936 g, rendimento de 83%; pureza por HPLC: 99,8%).  $^1\text{H-NMR}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 8,14-7,89 (s 1r, 3H), 7,75 (d,  $J$  9,0 Hz, 2H), 7,15 (d,  $J$  8,0 Hz, 2H), 4,22-4,04 (m, 2H), 4,01-3,77 (m, 4H), 3,55-3,43 (m, 1H), 3,20-3,13 (m, 1H), 2,40-2,27 (m, 4H), 2,21-1,94 (m, 2H), 1,81-1,51 (m, 3H), 1,23 (t,  $J$  7,0 Hz, 3 H); HPLC: 'Waters Xterra MS C18', 4,6 mm x 150 mm d.i., tamanho de partícula 3,5  $\mu\text{m}$ , 0,05% de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (5% de ACN, 95% de  $\text{H}_2\text{O}$ , solvente A) até 0,05% de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (95% de ACN, 5% de  $\text{H}_2\text{O}$ , solvente B), 5% de B até 20% de B em 10 minutes, depois 95% de B em 25 minutos, depois 5% de B em 1 minuto; 11,1 minutos (aminoéster 1).



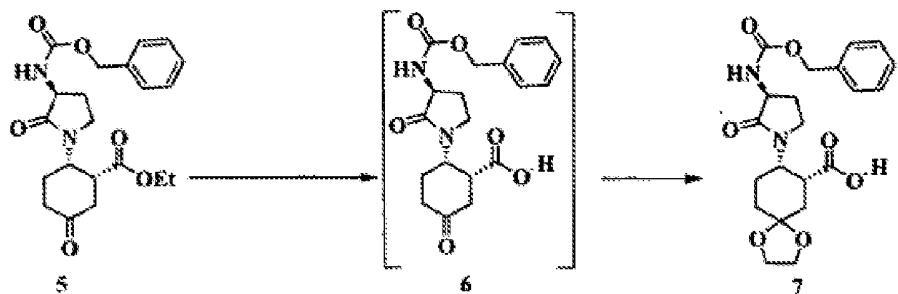
**Exemplo 1, 2<sup>a</sup> preparação alternativa, passo 1b:** combinou-se o sal 4-tolueno-sulfonato de (7R,8S)-8-amino-1,4-dioxa-spiro[4,5]decano-7-carboxilato de etilo **1** (450,1 g; o produto da desprotecção redutiva de um composto conhecido - veja-se R. J. Cherney, WO 2004/098516 e G. V. Delucca & S. S. Ko, WO 2004/110993), com cloridrato de 1-etyl-3-(3-dimetil-amino-propil)-carbodiimida (236,3 g), hidrato 1-hidroxi-benzotriazole (171,9 g), N-carbobenziloxi-L-metionina (333,4 g) e acetonitrilo (3,1 L). A esta mistura agitada adicionou-se trietilamina (249,5 g) a uma temperatura inferior a 30°C. Depois de se completar a reacção (HPLC), diluiu-se a mistura com acetato de etilo (8,2 L) e lavou-se com uma solução aquosa de bicarbonato de potássio a 25% (2 x 4,5 L) e depois com água (4,5 L). Separou-se a fase orgânica e concentrou-se sob pressão reduzida para se obter uma solução de (7R,8S)-8-((S)-2-benziloxicarbonilamino-4-metilsulfanil-butirilamino)-1,4-dioxa-spiro[4,5]decano-7-carboxilato de etilo **2** (1,4 L). Adicionou-se iodeto de metilo (2,39 kg), protegeu-se o recipiente de luz e manteve-se a mistura sob agitação lenta durante cerca de 24 horas. A este precipitado amarelo espesso adicionou-se éter metil-terc-butílico (2,7 L) e manteve-se a mistura durante cerca de 1 hora. Isolou-se o produto por filtração, lavou-se a pasta com éter metil-

terc-butílico (2 x 1,4 L), depois secou-se sob uma pressão hipobárica para se obter iodeto de [(S)-3-benziloxi-carbonilamino-3-((7R,8S)-7-etoxicarbonil-1,4-dioxa-espiro-[4,5]dec-8-il-carbamoil)-propil]-dimetil-sulfónio 3 (671,4 g, rendimento de ~94%) com o aspecto de um sólido esbranquiçado (pureza por HPLC 99,9%).



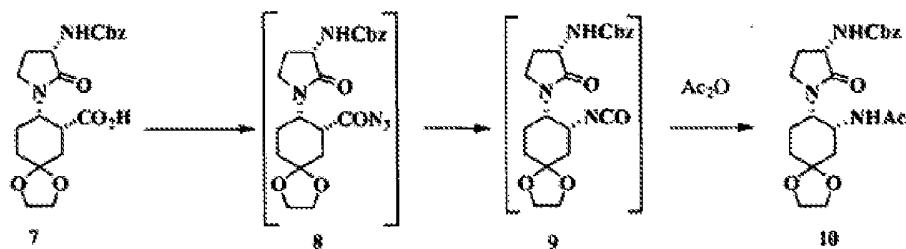
**Exemplo 1, 2<sup>a</sup> preparação alternativa, passo 2:** combinou-se o sal de sulfónio **3** (619,4 g), carbonato de césio (416,8 g) e sulfóxido de dimetilo anidro (6,2 L) num reactor equipado com um depurador para neutralizar os sulfuretos voláteis. Manteve-se sob agitação vigorosa até se obter uma conversão completa (HPLC). Adicionou-se acetato de etilo (12,4 L) e depois salmoura a 20% (3 L). Separou-se a fase orgânica, lavou-se duas vezes com salmoura (2 x 3 L) e evaporou-se para se obter uma solução de (7R,8S)-8-((S)-3-benziloxi-carbonilamino-2-oxo-pirrolidina-1-il)-1,4-dioxa-espiro[4,5]-decano-7-carboxilato de etilo **4** em acetato de etilo (~0,8 L). Adicionou-se acetona (2,55 L) e depois uma solução aquosa de ácido clorídrico 0,5 M (2,3 L). Utilizando uma boa mistura, aqueceu-se a solução até 50°C a 60°C até se completar a conversão do composto **4** em (1R,2S)-2-((S)-3-benziloxi-carbonilamino-2-oxo-pirrolidina-1-il)-5-oxo-ciclo-hexano-carboxilato de etilo **5** (HPLC). Concentrou-se a

mistura sob pressão reduzida, enquanto estava a uma temperatura inferior a 40°C, arrefeceu-se até ~30°C e adicionou-se água (4,1 L). Arrefeceu-se a pasta resultante até uma temperatura entre 5°C e 10°C e agitou-se durante ~1 hora. Filtrou-se o produto e lavou-se a pasta com água (2 x 2,5 L). Secou-se a pasta até um peso constante inferior a uma temperatura inferior a 40°C num forno sob uma pressão hipobárica. Obteve-se a ciclo-hexanona **5** (272 g, rendimento de 70%) (pureza por HPLC 98,7%).



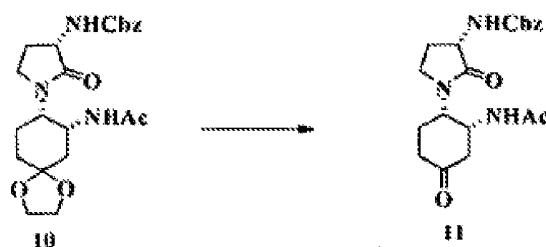
**Exemplo 1, 2<sup>a</sup> preparação alternativa, passo 3:** colocou-se em suspensão ciclo-hexanona **5** (100 g) em THF (500 mL) e arrefeceu-se até 0°C. Adicionou-se NaOH 1 N (271 g) a 0°C-5°C e agitou-se a mistura bifásica a ≤ 5°C pelo menos durante uma hora. Adicionou-se MTBE (500 mL) e separou-se as camadas. Lavou-se a camada aquosa inferior novamente com MTBE (500 mL) e separou-se as camadas. Carregou-se diclorometano (500 mL) na camada aquosa rica em produto e arrefeceu-se a mistura até 0°C. Introduziu-se HCl 3 N (156 g), mantendo a temperatura ≤ 5°C. Depois de se agitar pelo menos durante 10 minutos, aqueceu-se a mistura até 20°C-25°C e separou-se as camadas. Extraiu-se a camada aquosa com diclorometano (100 mL). Combinou-se as camadas orgânicas e permutou-se o solvente para tolueno por meio de

destilação. Ajustou-se o volume da solução de tolueno até cerca de 1 L e adicionou-se mono-hidrato do ácido p-tolueno-sulfónico (0,24 g). Adicionou-se etileno-glicol (16,22 g), destilou-se a mistura à pressão atmosférica até se completar a formação do composto **7** e se obter um volume de cerca de 500 a 700 mL. Arrefeceu-se a solução até cerca de 70°C e adicionou-se acetato de etilo (500 mL), mantendo a temperatura a cerca de 70°C. Arrefeceu-se a mistura e filtrou-se para se obter 73 g (rendimento de 70%) do composto **7**, o ácido (7*R*,8*S*)-8-((3*S*)-3-((benziloxi)-carbonil)-amino)-2-oxo-1-pirrolidinil)-1,4-dioxa-espiro[4,5]-decano-7-carboxílico.



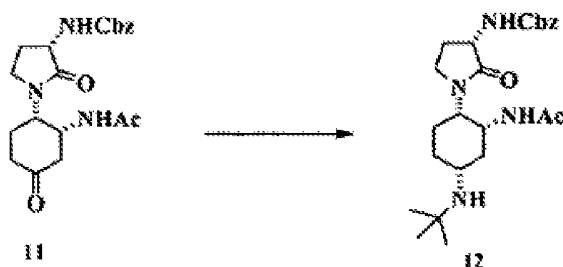
**Exemplo 1, 2<sup>a</sup> preparação alternativa, passo 4:** numa pasta do composto **7** (147 g) em tolueno anidro (370 mL) introduziu-se trietilamina (32,7 g) a 15°C-25°C. Depois da pasta se tornar numa solução após 10 a 15 minutos sob agitação a 25°C, arrefeceu-se o recipiente até -10°C e introduziu-se cloroformato de isobutilo (44,1g) a -10°C-0°C. Agitou-se a mistura a -10°C-0°C durante cerca de 30 minutos. Adicionou-se uma solução de azida de sódio (42 g) e brometo de tetrabutil-amónio (5,2 g) em água (130 mL), a -10°C-0°C. Agitou-se vigorosamente a pasta bifásica pelo menos durante uma hora e adicionou-se tolueno (1750 mL) e depois água (300 mL). Agitou-se as duas fases pelo menos

durante 10 minutos, separou-se a camada orgânica superior e secou-se com crivos moleculares de 4 Å. Adicionou-se anidrido acético (76 mL) e ácido acético (28 mL) e aqueceu-se a solução até 80°C-90°C durante 1 a 4 horas, até se detectar <2 AP do intermediário **9** por HPLC. Removeu-se parcialmente por destilação o solvente até cerca de dois terços do volume inicial sob uma pressão atmosférica, arrefeceu-se a solução até à temperatura ambiente e agitou-se a pasta resultante durante 16 horas. Adicionou-se lentamente heptano (350 mL) e agitou-se a pasta durante 1 hora. Filtrou-se os sólidos, lavou-se com tolueno/heptano a 4:1 (300 mL) secou-se para se obter 109 g (rendimento de 78%) do composto **10**, ((3S)-1-((7R,8S)-7-acetamido-1,4-dioxa-espiro[4,5]dec-8-il)-2-oxo-3-pirrolidinil)-carbamato de benzilo.



**Exemplo 1, 2<sup>a</sup> preparação alternativa, passo 5:** a uma solução do composto **10** (109 g) em acetona (760 mL) adicionou-se HCl 1 N (760 mL). Aqueceu-se a mistura até 50°C durante 2,5 horas. Removeu-se a acetona por destilação sob pressão reduzida e extraiu-se o produto duas vezes com diclorometano 1 x 1 L e 1 x 0,5 L. Combinou-se as camadas de diclorometano e permutou-se o diclorometano para acetato de etilo por destilação, até o ponto de ebulição da mistura atingir 78°C e o volume final ser de cerca de 10 mL/g da

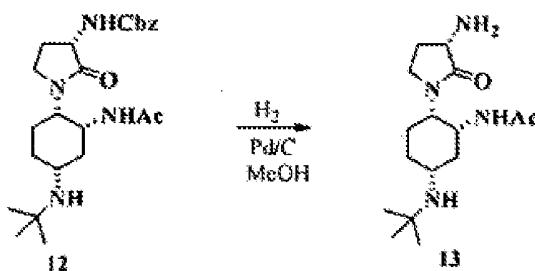
entrada do composto **10**. Arrefeceu-se a pasta de acetato de etilo até à temperatura ambiente, agitou-se durante 16 horas, filtrou-se os sólidos e lavou-se com acetato de etilo (400 mL). Secou-se o sólido para se obter 84 g (rendimento de 87%) do composto **11**, ((3*S*)-1-((1*S*,2*R*)-2-acetamido-4-oxociclo-hexil)-2-oxo-3-pirrolidinil)-carbamato de benzilo.



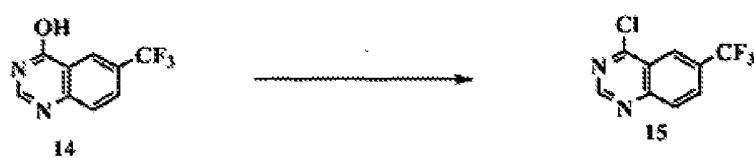
**Exemplo 1, 2<sup>a</sup> preparação alternativa, passo 6:**

O reagente  $TiCl_2(OPri)_2$  foi pré-formado por adição de  $Ti(OiPr)_4$  (11,5 mL) a uma solução de  $TiCl_4$  1 M em diclorometano (39 mL) a 5°C-10°C e subsequente agitação à temperatura ambiente durante 15 minutos. Dissolveu-se o com **11** (25 g) em diclorometano (500 mL) e adicionou-se t-butilamina (34 mL) à temperatura ambiente. Decorridos 10 minutos, arrefeceu-se a solução até -25°C a -20°C e adicionou-se a solução pré-formada de reagente de titânio a uma temperatura inferior a -20°C. Deixou-se aquecer a mistura até à temperatura ambiente e agitou-se durante 1 hora. Retirou-se uma amostra para confirmar a formação completa de imina por mini-extinção com boro-hidrato de sódio em metanol (ausência de álcoois indica o consumo completo da cetona de partida **11**). Adicionou-se então sulfureto de dimetil-borano (7,0 mL) a 0°C-5°C, aqueceu-se a mistura de reacção até à temperatura ambiente e agitou-se

pelo menos durante 5 horas. Evaporou-se parcialmente o diclorometano (cerca de metade) sob pressão reduzida e adicionou-se acetato de etilo húmido (300 mL, pré-formado por agitação de acetato de etilo com água), no intervalo de 30 a 60 minutos. Agitou-se a pasta resultante pelo menos durante 4 horas, filtrou-se os sólidos e lavou-se diversas vezes com diclorometano, até não existir mais de 5% M de produto na pasta de filtração. Combinou-se o filtrado e as águas de lavagem, adicionou-se HCl 1 N (200 mL) e agitou-se a mistura bifásica pelo menos durante 30 minutos (a libertação de gás parou ao fim de ~20 minutos). Separou-se a camada aquosa rica em produto (fase superior) e adicionou-se diclorometano (500 mL). Adicionou-se hidróxido de amónio concentrado à mistura bifásica agitada até se ajustar o valor de pH para 8-8,5 (~15 mL). Separou-se a fase orgânica, lavou-se com 2 x 100 mL de cloreto de amónio a 14% em peso, para se remover o isómero trans indesejado do composto **12**, e por último com água (25 mL). Permutou-se o diclorometano para acetato de etilo por destilação sob uma pressão normal, até o ponto de ebulição da mistura atingir 78°C e o volume final ser cerca de 5 mL/g de entrada de composto **11** (~140 mL). Arrefeceu-se a solução até à temperatura ambiente. Adicionou-se lentamente heptano (250 mL) a 40°C-50°C e verificou-se o início da cristalização do composto **12**. Agitou-se a pasta à temperatura ambiente durante 3 horas, filtrou-se os sólidos, lavou-se com heptano (100 mL) e secou-se para se obter 20,1 g (rendimento de 70%) do composto **12**, ((3S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(terc-butilamino)-ciclo-hexil)-2-oxo-3-pirrolidinil)-carbamato de benzilo, com o aspecto de cristais fofos brancos.

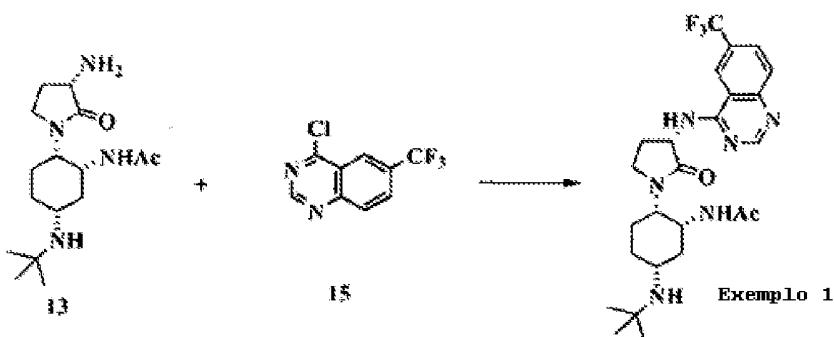


**Exemplo 1, 2<sup>a</sup> preparação alternativa, passo 7:** dissolveu-se o composto **12** (20 g) em metanol (400 mL) e adicionou-se catalisador de Pd a 5%/C (1,8 g, 9% em peso). Submeteu-se a mistura a hidrogenação a 25°C e 25 psig durante 3 horas. Removeu-se o catalisador por filtração e permutoou-se o metanol para acetato de etilo por destilação contínua. Deixou-se cristalizar o produto a partir de acetato de etilo (160 mL), durante o arrefecimento. Adicionou-se heptano (160 mL) a 25°C, agitou-se a pasta durante 1 hora, filtrou-se o produto, lavou-se com heptano e secou-se para se obter 12,8 g (rendimento de 94%) do composto **13**, N-((1R,2S,5R)-2-((3S)-3-amino-2-oxo-1-pirrolidinil)-5-(terc-butilamino)-ciclo-hexil)-acetamida.



**Exemplo 1, 2<sup>a</sup> preparação alternativa, passo 8:** colocou-se em suspensão 6-(trifluorometil)-4-quinazolinol, **14** (5 g; veja-se P. H. Carter, et al. pedido de patente de invenção PCT n° WO 2005/021500) em diclorometano (100 mL). Adicionou-se N,N-diisopropyletilamina (4,2 mL, 1,05 eq.) e DMF (0,4 mL, 0,2 eq.). Adicionou-se então cloreto de

oxalilo (3,0 mL, 1,5 eq.) à pasta agitada a 20°C-25°C, sob arrefecimento (adição exotérmica). Agitou-se a pasta cor-de-laranja a 30°C-35°C durante 2 horas. Observou-se uma libertação controlada de gás ao longo de ~1,5 horas, ao fim do qual a pasta se transformou numa solução cor-de-laranja. Depois de se arrefecer até 20°C, adicionou-se, gota a gota, a solução de reacção a uma solução aquosa de  $K_2HPO_4$  a 20% em peso (50 mL), sob agitação vigorosa e libertação de gás. Separou-se a fase orgânica inferior e lavou-se uma vez mais com uma solução aquosa de  $K_2HPO_4$  a 20% em peso (50 mL). Utilizou-se a solução orgânica tal qual no passo subsequente, num intervalo de 16 horas.



**Exemplo 1, 2<sup>a</sup> preparação alternativa, passo 8:** a uma solução do composto **15** em diclorometano (22 mL, 5,5 mmol) adicionou-se o sólido **13** (1,55 g, 5 mmol) e agitou-se a mistura à temperatura ambiente até se dissolverem os sólidos. Adicionou-se trietilamina (1,4 mL, 11 mmol) e agitou-se a mistura durante 24 horas à temperatura ambiente. Adicionou-se água (10 mL), agitou-se as duas fases durante 10 minutos e separou-se a fase orgânica. Permutou-se o diclorometano para acetato de etilo por destilação contínua, até o ponto de ebulição da mistura

atingir 78°C e o volume final ser cerca de 10 mL/g de entrada do composto **13** (~15 mL). Arrefeceu-se a pasta até à temperatura ambiente, adicionou-se lentamente heptano (15 mL) e agitou-se a pasta durante 16 horas. Filtrou-se os sólidos, lavou-se com heptano/acetato de etilo a 1:1 (5 mL) e secou-se para se obter 1,83 g (rendimento de 72%) de cristais beges (forma N-2 por XRD) de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, Exemplo 1.

#### **EXEMPLO 2**

**Formas de cristal de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-1-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida**

As diversas formas de cristal de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, base livre, foram preparadas e caracterizadas conforme a seguir se descreve.

#### **PROCEDIMENTOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DAS FORMAS**

##### **Dados de um cristal único**

Os dados foram recolhidos num difractómetro Bruker-Nonius (BRUKER AXS, Inc., 5465 East Cheryl Parkway Madison, WI 53711 USA), com o número de série CAD4. Os parâmetros da célula unitária foram obtidos por análise dos mínimos quadráticos das definições experimentais do difractómetro de 25 ângulos de reflexão elevados. As intensidades foram determinadas utilizando radiação Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ) a uma temperatura constante por meio da técnica de pesquisa

variável  $\theta-2\theta$  e foram corrigidos apenas para factores de polarização de Lorentz. As contagens de fundo foram recolhidas para os extremos da pesquisa para metade do tempo da pesquisa. Em alternativa, os dados para o cristal único foram recolhidos num sistema Bruker-Nonius Kappa CCD 2000, utilizando radiação Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ). A indexação e o processamento dos dados de intensidade determinados foram efectuados com o conjunto de programas informáticos HKL2000 (Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997) em Macromolecular Crystallography. eds. Carter, W.C. Jr & Sweet, R.M. (Academic, NY), Vol. 276, págs. 307-326) no conjunto de programas Collect. ('Collect Data collection and processing user interface: Collect: Data collection software, R. Hooft, Nonius B.V., 1998'). Em alternativa, forma recolhidos dados de cristal único num sistema Bruker-AXS APEX2 CCD, utilizando radiação Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ). A indexação e o processamento dos dados de intensidade medidos foram efectuados com o conjunto de programas informáticos APEX2 (APEX2 Data collection and processing user interface: APEX2 User Manual, v1.27; **BRUKER AXS, Inc.**, 5465 East Cheryl Parkway Madison, WI 53711 USA).

Quando indicado, os cristais foram arrefecidos na corrente fria de um sistema de criogeração Oxford (Oxford Cryosystems Cryostream cooler: J. Cosier and A.M. Glazer, J. Appl. Cryst., 1986, 19, 105) durante a recolha de dados.

As estruturas foram determinadas por métodos directos e refinadas com base nas reflexões observadas utilizando um conjunto de programas informáticos SDP (SDP, conjunto informático para a determinação de estruturas, Enraf-Nonius, Bohemia NY 11716, factores de dispersão, incluindo  $f'$  e  $f''$ , no programa informático SDP forma retirados de

"International Tables for Crystallography", Kynoch Press, Birmingham, Inglaterra, 1974; Vol. IV, Tabelas 2,2A e 2,3,1) com pequenas modificações locais ou os programas informáticos cristalográficos MAXUS (programa informático de resolução e refinamento maXus: S. Mackay, C.J. Gilmore, C. Edwards, M. Tremayne, N. Stewart, K. Shankland. maXus: a computer program for the solution and refinement of crystal structures from diffraction data or SHELXTL<sup>4</sup>. Os parâmetros atómicos obtidos (coordenadas e factores de temperatura) foram refinados através de uma análise de mínimos quadráticos de matriz completa. A função minimizada na refinação foi  $\Sigma_w(|F_o| - |F_c|)^2$ , R é definido como  $\Sigma ||F_o| - |F_c|| / \Sigma |F_o|$ , ao passo que  $R_w = [\Sigma_w(|F_o| - |F_c|)^2 / \Sigma_w |F_o|^2]^{1/2}$ , em que w é uma função de pesagem adequada com base em erros nas intensidades observadas. Foram examinados mapas diferentes para todas as etapas de refinamento. Foram introduzidos átomos de hidrogénio em posições idealizadas com factores de temperatura isotrópicos, não se tendo alterado os parâmetros de hidrogénio.

#### **Dados de difracção de raio-X no pó (PXRD)**

Os dados de PXRD foram obtidos utilizando um dispositivo Bruker C2 GADDS. A radiação foi de Cu K $\alpha$  (40 KV, 50 mA). A distância amostra-detector foi de 15 cm. As amostras de pó foram colocadas em capilares de vidro fechados estanqueamente com um diâmetro de 1 mm ou inferior; rodou-se a capilaridade durante a recolha de dados. Os dados foram recolhidos para  $3^\circ \leq 2\theta \leq 35^\circ$  com um tempo de exposição de amostra pelo menos de 2000 segundos. Os arcos de difracções bi-dimensionais resultantes foram integrados para criar um padrão PXRD tradicional com 1 dimensão com um

tamanho de passo de 0,02 graus 2 $\theta$  no intervalo compreendida entre 3 e 35 graus 2 $\theta$ .

#### **Calorimetria de pesquisa diferencial (DSC)**

As experiências DSC foram realizadas num dispositivo TA Instruments™, modelo Q1000 ou 2920. Pesou-se a amostra (entre 2 mg e 6 mg) num recipiente de alumínio e registrou-se com exactidão até à centésima de um miligrama, e transferiu-se para o DSC. Purgou-se o instrumento com azoto gasoso a 50 mL/minuto. Os dados foram recolhidos a uma temperatura compreendida entre a temperatura ambiente e 300°C para uma taxa de aquecimento de 10°C/minuto. A representação foi efectuada com os picos endotérmicos a apontar para baixo.

#### **Análise gravimétrica térmica (TGA)**

As experiências de TGA foram realizadas num dispositivo TA Instruments™, modelo Q500 ou 2950. Colocou-se a amostra (cerca de 10 mg a 30 mg) num recipiente de platina previamente tarado. Mediu-se com exactidão o peso da amostra e registrou-se até à centésima de miligrama pelo dispositivo. Purgou-se o forno com azoto gasoso a 100 mL/minuto. Os dados foram recolhidos a uma temperatura compreendida entre a temperatura ambiente e 300°C para uma taxa de aquecimento de 10°C/minuto.

#### **PREPARAÇÃO E ANÁLISE DAS FORMAS**

Os dados da célula unitária e outras propriedades para estes exemplos estão apresentados no quadro 1. Os parâmetros da célula unitária foram obtidos a partir da análise cristalográfica de raio-X de um cristal único. É

possível encontrar uma descrição detalhada das células unitárias no capítulo 3 da obra de Stout & Jensen, *X-Ray Structure Determination: a Practical Guide*, (MacMillian, 1968).

As coordenadas atómicas fraccionais para os exemplos 2a, b, c, d, e, f e g, bem como as condições para as quais foram determinadas são apresentadas nos quadros 2 a 9.

Além disso, as posições características do pico de difracção de raio-X no pó (graus  $2\theta \pm 0,1$ ) à temperatura ambiente para os exemplos 2a, b, c, d, e e f são apresentados no quadro 9, os quais são baseados em padrões de qualidade elevada recolhidos com um difractómetro (CuKa) com uma capilaridade giratória com  $2\theta$  calibrado com um padrão adequado diferente de NIST.

Por último, as figuras 1, 2, 3, 4, 5 e 6 ilustram os padrões de XRPD para os exemplos 2a, b, c, e, d e f, as figuras 8, 10, 13, 15, 17 e 19 descrevem a TGA dos exemplos 2a, b, c, d, e e f, respectivamente. As figuras 7, 9, 12, 14, 16 e 18 descrevem a DSC dos exemplos 2a, b, c, d, e e f, respectivamente, a figura 11 descreve a isotérmica de adsorção/dessorção de vapor do exemplo 2b.

#### **Preparação da forma, caracterização DSC e TGA**

**Exemplo 2a, forma H0,5-4:** dissolveu-se 150 mg de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, base livre, em acetato de n-butilo quente saturado com água. Adicionou-se heptano até se observar uma turvidez persistente. Deixou-se arrefecer a massa até à temperatura ambiente. A forma H0,5-4 é caracterizada por 0,5 mole de água por mole de N-

((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, base livre. A forma H0,5-4 foi caracterizada por um termograma DSC que apresenta um início endotérmico largo no intervalo compreendida entre a temperatura ambiente e cerca de 67°C, em conformidade com a curva TGA; para temperaturas mais elevadas podem ter lugar outros acontecimentos. A forma H0,5-4 foi caracterizada por uma curva térmica TGA que possui uma perda de peso tipicamente compreendida entre cerca de 0,6% e cerca de 1,4%, a cerca de 100°C. A perda de peso teórica para a forma H0,5-4 é de 1,7%, no entanto não é incomum que hidratos instáveis fiquem parcialmente desidratados durante a secagem.

**Exemplo 2b, forma N-2:** dissolveu-se 1 g de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, base livre, em 10 mL de EtOAc isento de água a 77°C. Arrefeceu-se a solução até 70°C. Adicionou-se 10 mg de cristais primários de N-2. A esta pasta adicionou-se 18 mL de n-heptano ao longo de 1 hora com uma bomba de injecção. Arrefeceu-se a pasta até uma temperatura entre 70°C e 20°C ao longo de 1 hora e agitou-se a 20°C de um dia para o outro. Isolou-se o sólido por filtração, lavou-se com 3 mL de n-heptano, secou-se a 50°C num forno sob uma pressão hipobárica de um dia para o outro. A forma N-2 é N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, base livre, uma forma pura (sem moléculas suplementares de água ou

solvente). A forma N-2 foi caracterizada por um termograma DSC que possui um início endotérmico tipicamente compreendido entre cerca de 230°C e cerca de 232°C, como um produto de fusão único sem mais transformações. A forma N-2 foi caracterizada por uma curva TGA com uma perda de peso negligenciável até uma temperatura cerca de 200°C e em conformidade com uma estrutura de cristal único.

**Exemplo 2c, forma H1,75-5:** agitou-se vigorosamente uma pasta de 50 mg de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, base livre, em 1 mL de água durante mais de 16 horas. A forma H1,75-5 é caracterizada por 1,75 moles de água por uma mole de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, base livre. A forma H1,75-5 foi caracterizada por um termograma DSC que possui um início endotérmico tipicamente compreendido entre cerca da temperatura ambiente e cerca de 70°C, em conformidade com a curva TGA; para temperaturas mais elevadas podem ter lugar outros acontecimentos. A forma H1,75-5 foi caracterizada pela curva TGA, possuindo uma perda de peso compreendida entre cerca de 4,3% e cerca de 5,3% para temperaturas até cerca de 100°C. A perda de peso teórica é de cerca de 5,9%, no entanto não é incomum que hidratos instáveis fiquem parcialmente desidratados durante a secagem.

**Exemplo 2d, HAC-1:** dissolveu-se 100 mg de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-

hexil)-acetamida, base livre, em 0,1 mL de HOAc a 80°C. A esta solução adicionou-se 0,2 mL de t-BuOAc e arrefeceu-se a solução até 20°C. Evaporou-se a solução até à secura. Agitou-se o sólido resultante em heptano a 50°C durante 15 horas e depois arrefeceu-se até 20°C. Filtrou-se o HAC-1 e secou-se a 25°C sob uma pressão hipobárica de um dia para o outro. A forma HAC-1 é caracterizada por 1 mole de ácido acético por uma mole de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S))-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, base livre. A forma HAC-1 foi caracterizada por um termograma DSC que possui um início endotérmico tipicamente a cerca de 100°C, em conformidade com a curva TGA; para temperaturas mais elevadas podem ter lugar outros acontecimentos. A forma HAC-1 também foi caracterizada por uma curva TGA que possui uma perda de peso de cerca de 15,3% para uma temperatura até 200°C. A perda de peso teórica é de cerca de 10,5%, no entanto não é incomum que uma quantidade menor de solventes com baixo ponto de ebulição permaneça associada ao sólido. Neste tipo de casos, a PXRD constitui um diagnóstico da forma, mas não é sensível a pequenas quantidades de solvente adventício.

**Exemplo 2e, forma E-1:** dissolveu-se 50 mg de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S))-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, base livre, em < 1 mL de etanol em ebulição. Arrefeceu-se a solução até à temperatura ambiente e deixou-se evaporar lentamente. A forma E-1 é caracterizada por 1 mole de etanol por uma mole de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S))-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, base livre.

fluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, base livre. A forma E-1 foi caracterizada por um termograma DSC que possui um início endotérmico tipicamente de cerca de 100°C, em conformidade com as curvas TGA; para temperaturas mais elevadas podem ter lugar outros acontecimentos. A forma E-1 foi caracterizada por uma curva térmica TGA que possui uma perda de peso compreendida entre cerca de 7,1% e cerca de 7,6% para uma temperatura até cerca de 150°C. A perda de peso teórica é de cerca de 8,3%, no entanto não é incomum que os solvatos instáveis fiquem parcialmente dessolvatados durante a secagem.

**Exemplo 2f, RPG-3:** dissolveu-se 30 mg a 40 mg de N-((1R,2S,SR)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, base livre, em 2 mL de propilenoglicol racémico. Adicionou-se água até se observar turvidez. Deixou-se evaporar lentamente o solvente até à secura. A forma RPG-3 é caracterizada por 1 molécula de R-propilenoglicol por uma molécula de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-5-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina)-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, base livre. A forma RPG-3 foi caracterizada por um termograma DSC que possui um início endotérmico a uma temperatura de cerca de 70°C, em conformidade com a curva TGA, para temperaturas mais elevadas podem ter lugar outros acontecimentos. A forma RPG-3 foi caracterizada por uma curva TGA que possui uma perda de peso de cerca de 16,4% para uma temperatura até cerca de 110°C. A perda de peso teórica é de cerca de 13,1%, no entanto não é incomum que

uma quantidade menor de solventes com elevado ponto de ebulição permaneça associada ao sólido. Neste tipo de casos, a PXRD constitui um diagnóstico da forma, mas não é sensível a pequenas quantidades de solvente adventício

**Exemplo 2g, forma IPA-1:** misturou-se 40 mg de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, base livre, em < 1 mL de álcool isopropílico. Aqueceu-se suavemente a pasta para dissolver o sólido restante. Arrefeceu-se a solução até à temperatura ambiente e deixou-se evaporar lentamente até se observar a formação de cristais. A forma IPA-1 é caracterizada por 1 molé de álcool isopropílico por uma molé de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, base livre.

**QUADRO 1**  
**Parâmetros da célula unitária**

Composto	Forma	T	a (Å)	b (Å)	c (Å)	$\alpha^\circ$	$\beta^\circ$	$\gamma^\circ$	$V$ (Å <sup>3</sup> )
Exp. 2a	H0,5-4	-50	17,7845 (7)	7,6215 (3)	20,9510 (9)	90 (3)	109,062 (3)	90	2684,1 (2)
Exp. 2b	N-2	RT	18,7240 (4)	8,0171 (2)	19,6568 (5)	90 (2)	114,935 (2)	90	2675,7 (1)
Exp. 2c	H1,75-5	-70	12,7648 (2)	34,3194 (7)	12,9659 (2)	90 (1)	99,053 (1)	90	5609,4 (2)
Exp. 2d	HAC-1	RT	7,9766 (7)	11,058 (2)	33,348 (4)	90	90	90	2941,4 (6)
Exp. 2e	E-1	-50	7,9866 (3)	11,2594 (6)	32,680 (2)	90	90	90	2938,7 (2)
Exp. 2f	RPG-3	-50	10,3004 (3)	10,5475 (4)	15,4784 (6)	90,045 (3)	102,476 (2)	109, 083 (2)	1547,0 (1)
Exp. 2g	IPA-1	RT	8,4487 (2)	11,6615 (3)	31,3800 (9)	90	90	90	3091,7 (1)

**QUADRO 1 (continuação)****Parâmetros da célula unitária**

Composto	Z'	Vm	gs	dcalc.
Exp. 2a	2	671	P2 <sub>1</sub>	1,235
Exp. 2b	2	669	P2 <sub>1</sub>	1,258
Exp. 2c	4	701	P2 <sub>1</sub>	1,274
Exp. 2d	1	735	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	1,279
Exp. 2e	1	735	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	1,249
Exp. 2f	2	774	P1	1,257
Exp. 2g	1	773	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	1,217

As variáveis utilizadas no quadro 1 são definidas a seguir:

T = temperatura em graus centígrados para os dados cristalográficos (TA é a temperatura que é de cerca de +22°C)

V = volume da célula unitária

Z' = número de moléculas de fármaco por unidade simétrica

Vm = V (célula unitária) / (Z moléculas de fármaco por célula)

gs = grupo espacial

dcalc. = densidade do cristal calculada

**QUADRO 2**

Coordenadas atómicas para o exemplo 2a, Forma H0,5-4							
Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
F1	0,1718	0,5612	0,2388	F138	0,9730	0,9700	0,6210
F2	0,1576	0,4167	0,1518	F139	1,0220	0,7300	0,6430
F3	0,1277	0,6827	0,1463	F140	0,9470	0,7710	0,5532
N7	0,3729	0,0177	-0,0187	O137	0,5289	1,1320	0,2702
N9	0,3967	0,3613	0,0716	H10	0,3464	0,3422	0,0601

Coordenadas atómicas para o exemplo 2a, Forma H0, 5-4							
Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
N11	0,5034	0,5324	0,1275	H16	0,1889	-0,1347	-0,0192
N12	0,1513	0,3723	-0,0803	H85	0,2780	0,4332	0,1193
N15	0,2070	-0,0340	-0,0258	H88	0,4895	0,3182	0,0357
N18	0,4944	0,7660	0,2016	H90	0,2688	-0,4938	-0,1162
O23	0,3677	0,2704	-0,0786	H91	0,2791	-0,3427	-0,1635
O25	0,2371	0,2420	0,0154	H93	0,2277	0,1128	-0,0967
C82	0,2630	0,6176	0,1822	H95	0,3290	-0,0521	-0,1140
C83	0,4281	0,4888	0,1165	H99	0,3760	-0,3135	-0,0574
C84	0,3027	0,5269	0,1466	H100	0,3100	-0,3067	-0,0228
C86	0,3810	0,5754	0,1513	H102	0,5234	0,0450	0,0773
C87	0,4447	0,251	0,0409	H103	0,4804	0,1033	0,1290
C89	0,2647	-0,3681	-0,1237	H105	0,1184	-0,0766	-0,1500
C92	0,2304	-0,0122	-0,0852	H106	0,1831	-0,0821	-0,1859
C94	0,3163	-0,0776	-0,0729	H110	0,3980	0,9063	0,2542
C96	0,4172	0,7161	0,1933	H112	0,4292	-0,1628	0,0516
C97	0,1821	0,5681	0,1800	H113	0,3692	-0,0449	0,0742
C98	0,3221	-0,2755	-0,0632	H115	0,2715	0,8230	0,2452
C101	0,4735	0,0847	0,0816	H117	0,0540	-0,3914	-0,0071
C104	0,1724	-0,1130	-0,1448	H118	0,1047	-0,5613	-0,0042
C107	0,3915	0,1858	-0,0261	H119	0,0122	-0,5664	-0,0392
C108	0,2116	0,0919	0,0195	H121	0,0157	-0,2070	-0,1065
C109	0,3748	0,8103	0,2276	H122	-0,0438	-0,3568	-0,1418
C111	0,4081	-0,0451	0,0507	H123	0,0156	-0,2818	-0,1762
C114	0,2994	0,7605	0,2220	H126	0,1446	-0,3645	-0,1779
C116	0,0592	-0,4960	-0,0309	H128	0,5835	0,7006	0,1755
C120	0,0087	-0,3106	-0,1338	H130	0,2266	0,0448	0,1189
C124	0,0696	-0,4465	-0,0977	H131	0,1603	-0,0732	0,0701
C125	0,1783	-0,3101	-0,1359	H132	0,1430	0,1249	0,0800
C127	0,5309	0,6696	0,1690	H134	0,0091	-0,6633	-0,1497
C129	0,1827	0,0426	0,0774	H135	0,1005	-0,6984	-0,1175
C133	0,0611	-0,6143	-0,1412	H136	0,0686	-0,5851	-0,1833

Coordenadas atómicas para o exemplo 2a, Forma H0,5-4							
Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
F4	0,9541	0,9380	0,5714	H141	0,1830	-0,4440	-0,0580
F5	0,9826	0,6800	0,5759	H14	0,6945	1,0312	0,5339
F6	1,0259	0,8300	0,6655	H21	0,7741	1,5073	0,4379
N8	0,6040	1,3694	0,4758	H28	0,7049	1,4602	0,3064
N13	0,6631	1,0203	0,5573	H29	0,6130	1,4114	0,2902
N17	0,7581	1,7462	0,3780	H32	0,5464	1,0615	0,5430
N19	0,6266	0,8793	0,6383	H34	0,6724	1,6789	0,4661
N20	0,7501	1,4082	0,4350	H35	0,5807	1,7062	0,4509
N22	0,7080	0,6517	0,7080	H38	0,8152	0,9372	0,5749
O24	0,7581	1,1336	0,4774	H41	0,5545	1,4575	0,3823
O26	0,5442	1,1244	0,4164	H44	0,5540	1,3350	0,5873
C27	0,6643	1,5023	0,3242	H45	0,6406	1,2709	0,6290
C30	0,6817	0,9034	0,6081	H48	0,6272	1,8887	0,3818
C31	0,5921	1,1293	0,5402	H49	0,5627	1,7587	0,3377
C33	0,6205	1,6624	0,4324	H52	0,6566	1,2721	0,3752
C36	0,5758	1,2019	0,4701	H55	0,6234	1,5433	0,5534
C37	0,8201	0,8496	0,6069	H56	0,6965	1,4170	0,5619
C39	0,7568	0,8126	0,6288	H58	0,8887	1,9136	0,4290
C40	0,6067	1,4694	0,4172	H59	0,9292	1,8759	0,3743
C42	0,8902	0,7591	0,6317	H60	0,9085	1,7203	0,4146
C43	0,6042	1,2934	0,5840	H62	0,6632	1,7578	0,2922
C46	0,7651	0,6822	0,6794	H64	0,8824	1,3038	0,5620
C47	0,6162	1,7663	0,3697	H65	0,8870	1,4370	0,5064
C50	0,8099	1,8166	0,3410	H66	0,9097	1,2396	0,5019
C51	0,6689	1,3952	0,3877	H69	0,7263	1,9822	0,2803
C53	0,7895	1,2775	0,4740	H70	0,8132	2,0339	0,2846
C54	0,6389	1,4243	0,5469	H71	0,7823	2,0761	0,3450
C57	0,8917	1,8331	0,3947	H73	0,8374	1,5813	0,3078
C61	0,6751	1,6998	0,3362	H74	0,8486	1,7393	0,2638
C63	0,8750	1,3182	0,5148	H75	0,7629	1,6701	0,2558
C67	0,9615	0,8066	0,6143	H77	0,8443	0,5011	0,7349

Coordenadas atómicas para o exemplo 2a, Forma H0, 5-4							
Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
C68	0,7802	1,9934	0,3099	H79	0,9456	0,5638	0,6960
C72	0,8152	1,6904	0,2872	H81	0,6060	0,7320	0,7067
C76	0,8381	0,5893	0,7029	H142	0,7500	1,8390	0,4090
C78	0,8982	0,6264	0,6799	H143	0,5333	1,1298	0,3123
C80	0,6445	0,7516	0,6862	H144	0,5194	1,0278	0,2538

## QUADRO 3

Coordenadas atómicas para o exemplo 2b, Forma base N-2							
Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
N1	0,7824	1,3195	0,3238	C71	0,9289	1,4591	0,5167
N2	0,1685	0,3056	-0,0178	H72	0,9378	1,4237	0,5668
H3	0,1633	0,1989	-0,0196	H73	0,9764	1,4359	0,5102
N4	0,6223	0,8215	0,1887	C74	0,8719	1,7574	0,6080
N5	0,2627	0,4840	-0,0849	C75	0,6719	1,2862	0,4846
N6	0,6868	0,9765	0,2943	H76	0,6246	1,2933	0,4390
H7	0,7030	0,9877	0,3420	H77	0,6814	1,3914	0,5103
N8	0,4185	0,9718	0,0742	H78	0,6660	1,2009	0,5162
N9	0,0989	0,0258	-0,1003	C79	0,9173	1,6199	0,6639
N10	0,7913	1,3680	0,4754	H80	0,8851	1,5217	0,6541
H11	0,7826	1,4618	0,4918	H81	0,9305	1,6578	0,7142
N12	0,5331	0,6005	0,1R13	H82	0,9647	1,5943	0,6584
N13	0,3353	0,7474	0,0475	C83	0,9176	1,9198	0,6225
H14	0,3028	0,6896	0,0583	H84	0,9680	1,8999	0,6220
N15	0,8501	1,6946	0,5311	H85	0,9252	1,9631	0,6707
N16	0,4567	1,1267	0,1887	H86	0,8887	1,9992	0,5842
O17	0,7470	1,1042	0,4435	C87	0,7960	1,7901	0,6131
O18	0,2114	0,7470	-0,1165	Her	0,7660	1,8705	0,5758
O19	0,2229	0,5239	0,0583	H89	0,8064	1,8325	0,6620
O20	0,8588	1,0890	0,3360	H90	0,7667	1,6881	0,6048
F21	0,5881	0,9034	0,4961	C91	0,2069	0,3753	0,0494
F22	0,4828	0,7754	0,4659	C92	0,1886	0,3981	-0,1294

Coordenadas atómicas para o exemplo 2b, Forma base N-2							
Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
F23	0,5874	0,6500	0,5199	H93	0,1617	0,4641	-0,1751
C24	0,1049	-0,1653	-0,0049	C94	0,1345	0,3960	-0,0889
H25	0,1473	-0,2167	-0,0125	H95	0,1249	0,5115	-0,0787
H26	0,0773	-0,2487	0,0097	C96	0,3636	0,8982	0,1612
H27	0,1257	-0,0826	0,0338	C97	0,0560	0,3169	-0,1396
C28	0,0052	-0,2107	-0,1371	H98	0,0300	0,3865	-0,1836
H29	-0,0334	-0,1565	-0,1806	H99	0,0226	0,3123	-0,1131
H30	-0,0204	-0,2889	-0,1178	C100	0,0655	0,1409	-0,1647
H31	0,0423	-0,2685	-0,1506	H101	0,0138	0,0994	-0,1999
C32	-0,0102	0,0236	-0,0618	C102	0,2651	0,6526	-0,0801
H33	0,0176	0,1111	-0,0276	C103	0,3727	0,8727	0,0930
H34	-0,0371	-0,0447	-0,0399	C104	0,3129	0,8065	0,1831
H35	-0,0478	0,0713	-0,1077	H105	0,2826	0,7213	0,1525
C36	0,6347	0,8573	0,2590	C106	0,4090	1,0275	0,2081
C37	0,7956	1,1614	0,3094	C107	0,1998	0,2249	-0,1544
C38	0,5429	0,6399	0,2526	H108	0,2268	0,1548	-0,1108
C39	0,5969	0,8058	0,3661	H109	0,2321	0,2314	-0,1820
H40	0,6303	0,8901	0,3943	C110	0,0479	-0,0823	-0,0781
C41	0,5928	0,7673	0,2949	C111	0,3943	0,5437	-0,0102
C42	0,7174	1,0886	0,2543	H112	0,4319	0,5306	0,0416
H43	0,7243	1,0288	0,2140	H113	0,4226	0,5469	-0,0417
C44	0,8437	1,4188	0,3R06	C114	0,1202	0,1477	-0,2041
H45	0,8919	1,4020	0,3733	H115	0,0955	0,2128	-0,2496
C46	0,8266	1,6034	0,3730	H116	0,1283	0,0355	-0,2179
H47	0,7791	1,6255	0,3797	C117	0,3076	0,8411	0,2485
H48	0,8177	1,6396	0,3230	C118	0,2292	0,2619	0,1158
C49	0,5524	0,7201	0,3942	H119	0,2846	0,2720	0,1469
C50	0,6668	1,2414	0,2237	H120	0,2172	0,1487	0,0989
H51	0,6690	1,2785	0,1776	H121	0,2001	0,2924	0,1441
H52	0,6125	1,2182	0,2137	C122	0,3349	0,4024	-0,0337
C53	0,8609	1,3569	0,4595	H123	0,3502	0,3144	-0,0588

Coordenadas atómicas para o exemplo 2b, Forma base N-2							
Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
H54	0,8773	1,2398	0,4636	H124	0,3290	0,3556	0,0092
C55	0,4991	0,5496	0,2836	C125	0,3458	0,7009	-0,0200
H56	0,4668	0,4624	0,2569	H126	0,3682	0,7937	-0,037
C57	0,7010	1,3718	0,2841	C127	0,4561	1,0941	0,1233
H58	0,6975	1,4822	0,2628	H128	0,4859	1,1659	0,1085
H59	0,6744	1,3722	0,3171	C129	0,4030	1,0567	0,2762
C60	0,9137	1,6472	0,5099	H130	0,4339	1,1390	0,3084
H61	0,9621	1,7039	0,5438	C131	0,2548	0,7395	0,2713
C62	0,7404	1,2441	0,4666	C132	0,3536	0,9679	0,2955
C63	0,5039	0,5898	0,3526	H133	0,3500	0,9907	0,3403
H64	0,4747	0,5300	0,3726	F134	0,1847	0,7359	0,2156
C65	0,5722	0,6959	0,1556	F135	0,2364	0,8060	0,3220
H66	0,5642	0,6734	0,1065	E136	0,2859	0,5920	0,2960
C67	0,8949	1,7014	0,4308	F137	0,1977	0,8329	0,2710
H68	0,9412	1,6866	0,4211	F138	0,2168	0,6170	0,2301
H69	0,8818	1,8193	0,4256	F139	0,2934	0,6790	0,3395
C70	0,5532	0,7632	0,4678	H140	0,8280	1,7679	05060
				H141	0,1330	-0,0400	-0,1062

## QUADRO 4

Coordenadas atómicas para o exemplo 2c, Forma base H1,75-5							
Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
C1	0,3942	0,1176	0,2183	C51	0,6094	0,0443	-0,0547
C2	0,2287	0,1174	0,0897	C52	0,6750	0,0382	0,0420
N3	0,1192	0,1293	0,0594	C53	0,9963	0,1572	0,4974
N4	0,1798	0,0501	0,1322	C54	0,7176	-0,0005	0,0684
N5	0,3753	0,0509	0,2822	C55	1,1985	0,0503	0,7049
N6	-0,0927	0,1070	-0,1055	C56	1,1539	0,1133	0,4965
N7	-0,3691	0,1154	-0,3165	C57	1,0229	0,1608	0,6162
N8	-0,2260	0,1440	-0,1970	C58	1,0367	0,1185	0,4572
O9	0,1323	0,1298	-0,1137	C59	0,7341	0,1669	0,3280
O10	0,0301	0,0456	0,0130	C60	1,1829	0,1168	0,6162

Coordenadas atómicas para o exemplo 2c, Forma base H1,75-5							
Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
C11	0,0785	0,1332	-0,0419	C61	1,1435	0,1563	0,6496
C12	0,2431	0,0735	0,0697	C62	0,5636	0,1744	0,0306
C13	-0,2272	0,0747	-0,2281	C63	0,6973	0,1581	0,4320
C14	0,0812	0,0382	0,0995	C64	0,7972	0,1517	0,5115
C15	0,4135	0,0738	0,2008	C65	1,3015	0,0605	0,7775
C16	0,2774	0,1283	0,2010	C66	1,2257	0,0279	0,6122
C17	0,3592	0,0623	0,0929	C67	1,1287	0,0258	0,7652
C18	-0,3242	0,0799	-0,2978	C68	0,9017	0,0664	0,4282
C19	-0,1859	-0,0329	-0,2601	C69	0,8592	0,0308	0,4749
C20	-0,3192	0,1441	-0,2671	F70	0,7706	-0,0040	0,1659
C21	-0,1804	0,1091	-0,1748	F71	0,7890	-0,0119	0,0101
C22	-0,1842	0,0372	-0,2149	F72	0,6477	-0,0283	0,0583
C23	0,0394	0,1336	0,1281	N73	0,7366	0,2979	0,1640
C24	-0,3330	0,0112	-0,3340	N74	0,9286	0,2769	0,3415
C25	-0,2347	0,0067	-0,2683	N75	0,9490	0,3548	0,4399
C26	0,0308	0,0146	0,1792	N76	0,6679	0,2686	0,0076
C27	-0,3753	0,0465	-0,3473	N77	0,5468	0,3015	-0,1239
C28	-0,0381	0,1410	-0,0545	N78	1,1302	0,3587	0,6021
C29	0,4391	0,0161	0,3216	O79	0,7689	0,2552	0,3756
C30	0,4331	-0,0152	0,2365	O80	0,8000	0,3561	0,3182
C31	-0,0565	0,1490	0,0571	C81	0,6779	0,3005	0,0685
C32	0,5574	0,0267	0,3640	C82	0,8021	0,2636	0,1953
C33	0,3907	0,0006	0,4127	C83	0,6253	0,3363	0.,330
F34	-0,1107	-0,0374	-0,1835	C84	0,8293	0,2641	0,3145
F35	-0,1514	-0,0419	-0,3469	C85	0,9704	0,2829	0,4523
F36	-0,2560	-0,0605	-0,2519	C86	0,9612	0,3232	0,6101
N37	0,9782	0,0854	0,4895	C87	1,0815	0,3238	0,6395
N38	0,8832	0,1624	0,4564	C88	0,6395	0,3717	0,0871
N39	0,6198	0,1729	0,1273	C89	0,9221	0,3194	0,4932
N40	0,7167	0,1350	0,2533	C90	0,5107	0,3694	-0,1081
N41	0,5429	0,1472	-0,0401	C91	0,5605	0,3350	-0,0649
N42	1,1331	0,0855	0,6708	C92	0,6021	0,2715	-0,0843
O43	0,9140	0,1821	0,2960	C93	0,5266	0,4037	-0,0538
O44	0,8654	0,0771	0,3382	C94	0,9119	0,2659	0,1620

Coordenadas atómicas para o exemplo 2c, Forma base H1,75-5							
Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
C45	0,8542	0,1720	0,3563	C95	0,5911	0,4051	0,0443
C46	0,5876	0,1117	-0,0112	C96	1,1535	0,3924	0,6738
C47	0,6629	0,1387	0,1561	C97	0,6068	0,4429	0,0984
C48	0,6954	0,0688	0,1114	C98	0,8832	0,3710	0,3595
C49	0,6512	0,1060	0,0865	C99	1,0912	0,2839	0,4757
C50	0,5679	0,0801	-0,0813	C100	1,1264	0,2872	0,5933
C101	0,9810	0,2861	0,2520	O151	0,4292	0,1756	0,7593
C102	0,9190	0,4094	0,3235	O152	0,3473	0,1636	0,8339
C103	1,0516	0,4113	0,6921	H153	0,4310	0,1254	0,2979
C104	1,2130	0,3807	0,7821	H154	0,4349	0,1341	0,1645
C105	1,2167	0,4208	0,6206	H155	0,2779	0,1337	0,0447
F106	0,6836	0,4427	0,1806	H156	0,2164	0,0417	0,2100
F107	0,5186	0,4543	0,1375	H157	0,3714	0,0703	0,3474
F108	0,6281	0,4715	0,0364	H158	-0,0576	0,0785	-0,0868
N109	0,3031	0,2523	0,0895	H159	0,2173	0,0675	-0,0123
N110	0,3202	0,3294	0,1970	H160	0,4992	0,0681	0,2061
N111	0,5022	0,3356	0,3522	H161	0,2372	0,1127	0,2569
N112	0,0946	0,2741	-0,0674	H162	0,2676	0,1594	0,2134
N113	-0,0336	0,2377	-0,1697	H163	0,3639	0,0302	0,0854
N114	-0,2016	0,2650	-0,2433	H164	0,4006	0,0751	0,0350
O115	0,1682	0,3314	0,0829	H165	-0,3534	0,1727	-0,2828
O116	0,1499	0,2237	0,1243	H166	-0,1099	0,0321	-0,1626
C117	0,2052	0,2373	0,0644	H167	0,0215	0,1059	0,1611
C118	0,2992	0,2930	0,2475	H168	0,0659	0,1539	0,1907
C119	-0,0515	0,3401	-0,0764	H169	-0,3750	-0,0142	-0,3730
C120	0,3416	0,2960	0,3644	H170	-0,0484	0,0061	0,1467
C121	-0,1222	0,3701	-0,0923	H171	0,0783	-0,0115	0,2000
C122	0,4698	0,2615	0,2174	H172	0,0297	0,0317	0,2489
C123	-0,1737	0,2997	-0,1931	H173	-0,4526	0,0496	-0,3983
C124	-0,0044	0,2713	-0,1206	H174	-0,0573	0,1673	-0,1021
C125	-0,2438	0,331	-0,2090	H175	0,4770	-0,0409	0,2650
C126	-0,0754	0,3040	-0,1278	H176	0,3484	-0,0242	0,2146
C127	0,1701	0,2420	-0,0535	H177	0,0045	-0,0045	0,1679
C128	0,3488	0,2578	0,2007	H178	-0,1282	0,1348	0,0707

**Coordenadas atómicas para o exemplo 2c, Forma base H1,75-5**

Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
C129	0,5097	0,2640	0,3350	H179	-0,0650	0,1804	0,0686
C130	0,4624	0,2986	0,3883	H180	0,5963	-0,0009	0,3924
C131	-0,0968	0,4077	-0,0362	H181	0,5930	0,0381	0,3032
C132	0,3460	0,2683	0,0015	H182	0,5596	0,0461	0,4284
C133	-0,1317	0,2372	-0,2271	H183	0,4332	-0,0251	0,4433
C134	0,5253	0,3677	0,4289	H184	0,3902	0,0220	0,4712
C135	-0,2190	0,3662	-0,1602	H185	0,3084	-0,0081	0,3820
C136	0,2745	0,2511	-0,0941	H186	0,9987	0,0754	0,5691
C137	0,5618	0,4023	0,3689	H187	0,7487	0,1066	0,2786
C138	0,6152	0,3567	0,5186	H188	1,1096	0,0983	0,7400
C139	0,4264	0,3788	0,4754	H189	0,7448	0,0641	0,1858
C140	0,2540	0,3461	0,1186	H190	0,5192	0,0845	-0,1565
C141	0,2900	0,3831	0,0758	H191	0,5930	0,0200	-0,1086
F142	0,0020	0,4176	-0,0257	H192	1,0402	0,1792	0,4633
F143	-0,1497	0,4372	-0,0806	H193	1,1791	0,0849	0,4744
F144	-0,1239	0,4079	0,0550	H194	1,1975	0,1355	0,4619
O145	0,4346	0,1106	0,5123	H195	0,9975	0,1890	0,6409
O146	0,1371	0,2037	0,3256	H196	0,9825	0,1382	0,6530
O147	0,6629	0,2454	0,5702	H197	1,0259	0,1190	0,3726
O148	0,4523	0,2291	0,5970	H198	0,6972	0,1932	0,2915
O149	0,3986	0,3042	0,6776	H199	1,2687	0,1146	0,6366
O150	0,3459	0,1840	0,4326	H200	1,1831	0,1795	0,6123
H201	1,1631	0,1593	0,7328	H251	1,1684	0,4299	0,5453
H202	0,5306	0,2029	0,0082	H252	0,3950	0,3437	0,2241
H203	0,6519	0,1824	0,4545	H253	0,5749	0,3293	0,3230
H204	0,6483	0,1323	0,4245	H254	0,1193	0,3022	-0,0335
H205	0,8029	0,1216	0,5375	H255	0,2147	0,2880	0,2355
H206	0,7957	0,1702	0,5801	H256	0,0233	0,3437	-0,0249
H207	1,3466	0,0340	0,8006	H257	0,3083	0,3215	0,3958
H208	1,3500	0,0795	0,7383	H258	0,3160	0,2703	0,4028
H209	1,2843	0,0747	0,8476	H259	0,5050	0,2366	0,1841
H210	1,2710	0,0024	0,6388	H260	0,4927	0,2878	0,1790
H211	1,1517	0,0185	0,5635	H261	-0,3192	0,3277	-0,2606
H212	1,2687	0,0462	0,5671	H262	0,1323	0,2153	-0,0854

**Coordenadas atómicas para o exemplo 2c, Forma base H1,75-5**

Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
H213	1,1703	-0,0007	0,7926	H263	0,3327	0,2320	0,2439
H214	1,1105	0,0421	0,8313	H264	0,4885	0,2372	0,3700
H215	1,0556	0,0182	0,7149	H265	0,5951	0,2670	0,3470
H216	0,7976	0,0176	0,4203	H266	0,4874	0,2957	0,4712
H217	0,9226	0,0100	0,4973	H267	0,3419	0,2998	0,0019
H218	0,8269	0,0390	0,5453	H268	0,4278	0,2594	0,0040
H219	0,7349	0,3217	0,2190	H269	-0,1537	0,2100	-0,2663
H220	1,0259	0,3684	0,4660	H270	-0,2738	0,3905	-0,1734
H221	1,2052	0,3497	0,5802	H271	0,3087	0,2249	-0,1215
H222	0,7595	0,2370	0,1705	H272	0,2609	0,2719	-0,1576
H223	0,9510	0,2576	0,4964	H273	0,5805	0,4266	0,4203
H224	0,9305	0,2994	0,6498	H274	0,6328	0,3938	0,3368
H225	0,9306	0,3505	0,6365	H275	0,5006	0,4101	0,3051
H226	1,1023	0,3226	0,7234	H276	0,6311	0,3804	0,5741
H227	0,6892	0,3732	0,1634	H277	0,5931	0,3310	0,5600
H228	0,8361	0,3164	0,4802	H278	0,6878	0,3500	0,4880
H229	0,4622	0,3687	-0,1842	H279	0,4455	0,4020	0,5307
H230	0,5955	0,2449	-0,1310	H280	0,3644	0,3877	0,4139
H231	0,4887	0,4301	-0,0865	H281	0,4001	0,3535	0,5147
H232	0,9411	0,2373	0,1483	H282	0,2315	0,3935	0,0139
H233	0,9065	0,2830	0,0906	H283	0,3050	0,4046	0,1373
H234	1,1232	0,2576	0,4474	H284	0,3642	0,3778	0,0457
H235	1,1194	0,3088	0,4371	H297	0,5031	0,1166	0,5720
H236	1,2129	0,2887	0,6081	H298	0,4013	0,1383	0,4827
H237	1,1010	0,2618	0,6307	H291	0,1415	0,2116	0,2456
H238	0,9841	0,3173	0,2399	H292	0,0561	0,1944	0,3301
H239	1,0614	0,2747	0,2630	H285	0,7189	0,2533	0,6386
H240	0,8608	0,4208	0,2603	H286	0,7007	0,2488	0,5014
H241	0,9250	0,4304	0,3884	H287	0,4531	0,2087	0,6605
H242	0,9943	0,4069	0,2987	H288	0,5334	0,2354	0,5869
H243	1,0681	0,4363	0,7411	H289	0,4187	0,2763	0,6478
H244	1,0091	0,4217	0,6147	H290	0,4459	0,3091	0,7532
H245	1,0017	0,3911	0,7227	H293	0,3695	0,2054	0,4921
H246	1,2276	0,4062	0,8315	H294	0,2663	0,1913	0,3921

**Coordenadas atómicas para o exemplo 2c, Forma base H1,75-5**

Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
H247	1,1658	0,3601	0,8194	H295	0,4701	0,1653	0,8329
H248	1,2882	0,3671	0,7752	H296	0,4645	0,1639	0,6962
H249	1,2341	0,4465	0,6673	H299	0,2731	0,1523	0,8513
H250	1,2881	0,4078	0,6030	H300	0,4117	0,1542	0,8909

**QUADRO 5****Coordenadas atómicas para o exemplo 2e, Forma base E-1**

Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
F18	0,2662	0,4002	0,0274	F23	0,0301	0,3722	0,0039
F19	0,0473	0,4191	0,0033	C18	0,1648	0,3165	0,0297
F20	0,1401	0,2386	0,0059	H31	0,2375	0,5477	0,2387
O2	0,3035	0,7582	0,1985	H41	0,5018	0,4R01	0,2585
O28	0,4277	0,5819	0,1087	H42	0,4761	0,3850	0,2161
N1	0,5559	0,6627	0,1978	H51	0,6480	0,5043	0,1733
N6	0,2412	0,4989	0,1766	H52	0,7376	0,5463	0,2204
N8	0,0422	0,3993	0,2139	H61	0,2881	0,5282	0,1472
N10	-0,1606	0,2714	0,1828	H91	-0,1519	0,3157	0,2435
N27	0,6744	0,6813	0,1115	H111	-0,2586	0,1707	0,1140
N29	0,9824	0,8036	0,1064	H121	-0,1207	0,1964	0,0469
C2	0,3877	0,6687	0,2028	H141	0,2343	0,4431	0,0976
C3	0,3235	0,5438	0,2136	H211	0,5921	0,8399	0,1984
C4	0,4822	0,4775	0,2252	N221	0,4827	0,7942	0,1303
C5	0,6231	0,5426	0,2028	H231	0,6846	0,8993	0,0877
C7	0,1130	0,4242	0,1780	H232	0,6444	0,9699	0,1348
C9	-0,0900	0,3261	0,2139	H241	0,9421	0,9813	0,1221
C11	-0,1488	0,2295	0,1107	H251	1,0517	0,8711	0,1826
C12	-0,0761	0,2450	0,0735	H252	0,8644	0,9484	0,1930
C13	0,0600	0,3235	0,0687	H261	0,8551	0,7433	0,2231
C14	0,1243	0,3844	0,1017	H262	0,8872	0,6821	0,1741
C15	-0,0857	0,2914	0,1453	H271	0,8051	0,6804	0,1028
C16	0,0498	0,3680	0,1409	H291	1,0794	0,7695	0,1261

Coordenadas atómicas para o exemplo 2e, Forma base E-1							
Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
C17	0,1207	0,3503	0,0270	H294	0,7893	0,5312	0,0656
C21	0,6470	0,7650	0,1817	H292	0,6583	0,4189	0,0854
C22	0,6168	0,7817	0,1361	H293	0,5951	0,5011	0,0421
C23	0,7030	0,8953	0,1212	H311	0,9885	0,9169	0,0098
C24	0,8922	0,8952	0,1304	H312	0,8322	0,8277	0,0324
C25	0,9185	0,8727	0,1765	H313	0,8750	0,9701	0,0523
C26	0,8353	0,7590	0,1910	H321	1,2632	0,9515	0,0466
C28	0,5782	0,5936	0,0987	H322	1,1556	1,0063	0,0897
C29	0,6596	0,5024	0,0711	H323	1,2983	0,8878	0,0951
C30	1,0633	0,8393	0,0676	H331	1,1943	0,7459	0,0197
C31	0,9326	0,8931	0,0389	H332	1,2251	0,6857	0,0690
C32	1,2044	0,9276	0,0745	H333	1,0345	0,6616	0,0430
C33	1,1314	0,7245	0,0492	H971	-0,8355	0,1305	0,1615
O99	-0,4402	0,1232	0,1894	H972	-0,7164	0,0043	0,1747
C97	-0,7313	0,0985	0,1797	H973	-0,7551	0,1157	0,2115
C98	-0,5812	0,1608	0,1676	H981	-0,5951	0,2544	0,1716
F21	0,3052	0,3620	0,0283	H982	-0,5565	0,1430	0,1349
F22	0,1907	0,2403	0,0143	H991	-0,3383	0,1855	0,1847

## QUADRO 6

Coordenadas atómicas para o exemplo 2d, Forma base HAC-1							
Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
C1	0,0418	0,3612	0,1413	H32	-0,1504	0,2133	0,0512
N2	-0,1614	0,2566	0,1827	H21	0,2024	0,4361	0,1001
N3	0,5574	0,6476	0,1969	H19	-0,2633	0,1786	0,1141
O4	0,4002	0,5938	0,1104	H15	-0,1260	0,2877	0,2400
N5	0,0480	0,3793	0,2136	H6	0,2703	0,5248	0,1514
N6	0,2349	0,4911	0,1766	H14	0,2507	0,5355	0,2354
N7	0,6581	0,6819	0,1120	H25A	0,5017	0,4595	0,2502
O9	0,3141	0,7518	0,2032	H25B	0,4643	0,3765	0,2131
C10	0,6548	0,7519	0,1823	H22A	0,6302	0,4915	0,1724

Coordenadas atómicas para o exemplo 2d, Forma base HAC-1							
Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
C11	0,1091	0,4116	0,1779	H22B	0,7255	0,5203	0,2124
C12	0,6143	0,7805	0,1389	H10	0,6208	0,8184	0,1990
C13	-0,0977	0,2822	0,1453	H12	0,4961	0,7944	0,1361
C14	0,3251	0,5321	0,2128	H31A	0,7369	0,5221	0,0663
C15	-0,0849	0,3037	0,2135	H31B	0,5607	0,5108	0,0459
C16	0,5496	0,5972	0,0993	H31C	0,6086	0,4250	0,0815
C17	0,8422	0,7397	0,1888	H17A	0,8651	0,7215	0,2164
N18	0,9734	0,7976	0,1050	H17B	0,8826	0,6751	0,1722
C19	-0,1674	0,2302	0,1113	H23A	0,6885	0,9061	0,0978
C20	0,0380	0,3268	0,0698	H23B	0,6640	0,9626	0,1405
C21	0,1085	0,3827	0,1029	H28A	0,8869	0,9177	0,1920
C22	0,6188	0,5229	0,1991	H28B	1,0495	0,8473	0,1796
C23	0,7063	0,8942	0,1260	H27	0,9448	0,9635	0,1263
C24	0,3943	0,6572	0,2042	H18	1,0626	0,7570	0,1189
C25	0,4808	0,4583	0,2218	H39A	1,2479	0,9507	0,0498
C27	0,8951	0,8864	0,1321	H39B	1,2853	0,8792	0,0894
C28	0,9305	0,8535	0,1757	H39C	1,1647	0,9911	0,0903
F29	0,2449	0,4047	0,0277	H38A	0,9706	0,9352	0,0175
C30	1,0501	0,8412	0,0669	H38B	0,8802	0,9740	0,0573
C31	0,6205	0,5052	0,0708	H38C	0,8310	0,8527	0,0360
C32	-0,1018	0,2511	0,0743	H40A	1,1575	0,7492	0,0195
C33	0,1058	0,3467	0,0300	H40B	1,0092	0,6805	0,0403
F36	0,1168	0,2494	0,0085	H40C	1,1861	0,6845	0,0608
F37	0,0041	0,4132	0,0068	H7	0,7708	0,6743	0,1022
C38	0,9217	0,9066	0,0421	H35A	-0,8134	0,1022	0,1656
C39	1,2014	0,9229	0,0747	H35B	-0,7586	0,1045	0,2107
C40	1,1073	0,7290	0,0448	H35C	-0,7035	-0,002	0,1830
O8	-0,4446	0,1296	0,1963	H8	-0,3548	0,1817	0,1876
C26	-0,5724	0,1491	0,1735				
O34	-0,5673	0,2213	0,1458				
C35	-0,7251	0,0824	0,1840				

## QUADRO 7

Coordenadas atómicas para o exemplo 2g, Forma base IPA-1							
Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
F1	0,1519	0,3786	0,0243	H4B	0,8724	0,7912	0,1232
F3	-0,0140	0,2540	-0,0043	H3	0,6171	0,6809	0,1026
F2	0,0260	0,4241	0,0085	H1	0,1162	0,5505	0,1460
N4	0,8062	0,8075	0,1016	H10	0,3362	0,7935	0,1099
N3	0,5159	0,6834	0,1054	H9	0,3991	0,8799	0,1736
N2	0,3481	0,7197	0,1890	H6A	0,4782	0,9618	0,1051
N1	0,0675	0,5440	0,1700	H6B	0,5369	0,8805	0,0686
N5	-0,1311	0,4643	0,2095	H22	0,0665	0,4473	0,0929
N6	-0,2941	0,3121	0,1828	H5	0,7491	0,9735	0,1042
O1	0,1140	0,8031	0,1697	H21	-0,3360	0,1865	0,1167
O2	0,2925	0,5779	0,1031	H12A	0,5507	0,4357	0,0989
C10	0,4463	0,7911	0,1197	H12B	0,6252	0,5211	0,0660
C9	0,4471	0,8051	0,1677	H12C	0,4678	0,4565	0,0549
C4	0,9030	0,8194	0,0629	H8A	0,6698	0,7392	0,17R6
C24	-0,0632	0,3232	0,0669	H8B	0,6137	0,8216	0,2153
C19	-0,0909	0,3946	0,1378	H16	0,0302	0,6334	0,2243
C6	0,5348	0,8912	0,0992	H13A	0,4882	0,6277	0,2283
C20	-0,2139	0,3158	0,1454	H13B	0,4421	0,5607	0,1863
C11	0,4342	0,5879	0,0964	H3B	0,9771	0,9859	0,0712
C22	-0,0159	0,3962	0,0980	H3C	1,0944	0,9144	0,0431
C5	0,7048	0,9021	0,1156	H3D	1,0915	0,8973	0,0926
C17	-0,0508	0,4684	0,1726	H23	-0,2112	0,1922	0,0537
C21	-0,2559	0,2399	0,1123	H18	-0,3052	0,3848	0,2368
C14	0,1869	0,7250	0,1863	H2A	0,7158	0,7853	0,0234
C12	0,5279	0,4917	0,0774	H2B	0,8604	0,8380	-0,0010
C8	0,6155	0,8107	0,1847	H2C	0,7518	0,9169	0,0270
C16	0,1187	0,6161	0,2052	H7A	0,6551	0,9825	0,1718
C13	0,4041	0,6134	0,2080	H7B	0,8129	0,9118	0,1736
C3	1,0281	0,9129	0,0679	H1A	1,0319	0,6803	0,0846

<b>Coordenadas atómicas para o exemplo 2g, Forma base IPA-1</b>							
Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
C23	-0,1824	0,2437	0,0749	H1B	1,0662	0,7077	0,0366
C18	-0,2485	0,3861	0,2114	H1C	0,9087	0,6458	0,0495
C2	0,7981	0,8420	0,0246	H15A	0,2542	0,5916	0,2593
C7	0,7045	0,9108	0,1635	H15B	0,2564	0,4841	0,2288
C1	0,9852	0,7023	0,0579	H3A	-0,4990	0,1985	0,1863
C15	0,2577	0,5672	0,2298	H27	-0,6926	0,2734	0,1759
C25	0,0153	0,3263	0,0246	H26A	-0,7745	0,0861	0,1320
F4	0,1640	0,2980	0,0315	H26B	-0,6492	0,1771	0,1173
F5	-0,0739	0,3770	-0,0036	H26C	-0,8259	0,2136	0,1243
F6	0,0440	0,2214	0,0112	H28A	-0,8028	0,1216	0,2237
O3	-0,5666	0,1486	0,1890	H28B	-0,9203	0,1527	0,1868
C27	-0,7093	0,1903	0,1763	H28C	-0,8515	0,2497	0,2160
C26	-0,7420	0,1648	0,1343				
C28	-0,8290	0,1780	0,2024				
C29	-0,8460	0,1070	0,1744				
C30	-0,6990	0,2550	0,1410				

**QUADRO 8**

<b>Coordenadas atómicas para o exemplo 2f, Forma base RPG-3</b>							
Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
F1	1,4700	0,5720	0,6614	N2	0,6350	0,3813	0,3765
F7	1,4119	0,5575	0,7000	N6	0,2687	0,8628	0,3992
F2	1,4315	0,5398	0,7741	N4	0,3398	0,7349	0,3149
F8	1,5600	0,5336	0,8131	N1	0,8898	0,3354	0,4598
F3	1,6320	0,5630	0,7860	N5	0,0527	0,9107	0,3489
F9	1,6111	0,5864	0,6960	C12	0,4202	0,2078	0,3911
N9	0,7997	-0,0295	0,8348	O1	0,6129	0,7507	0,2839
N8	0,7989	0,1232	0,9974	C10	0,7273	0,4981	0,3447
N11	1,1628	-0,0946	0,6829	C6	0,8597	0,4735	0,3332
N10	1,0937	0,0679	0,7424	C9	0,7661	0,6239	0,4071
N7	0,5331	0,0253	1,0441	C20	0,1173	0,7695	0,2548

Coordenadas atómicas para o exemplo 2f, Forma base RPG-3							
Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
N12	1,3802	-0,0414	0,6342	C19	0,0264	0,8385	0,2716
O3	0,8190	0,0931	0,7142	C5	0,9561	0,4627	0,4193
O4	1,0177	0,2159	0,9737	C17	0,2435	0,7914	0,3234
C34	0,7187	0,1296	0,9094	C8	0,8573	0,6109	0,4957
C45	1,3119	0,1383	0,6926	O2	0,4273	0,3887	0,2980
C37	0,6769	0,0002	0,8509	C24	-0,0460	0,6680	0,1174
C30	0,4799	0,0412	0,9508	C16	0,4606	0,7449	0,3864
C42	1,1869	0,0349	0,7058	C22	0,0802	0,6875	0,1776
C31	0,5850	0,1596	0,9161	C14	0,5786	0,7190	0,3544
C49	1,4737	0,3643	0,7029	C7	0,9892	0,5850	0,4828
C33	0,5750	-0,1179	0,8869	C23	-0,1359	0,7367	0,1342
C47	1,3487	0,2751	0,7153	C18	0,1707	0,9200	0,4061
C40	0,8584	0,0198	0,7679	C25	-0,0848	0,5788	0,0372
C32	0,4447	-0,0846	0,8933	C13	0,5736	0,6259	0,4906
C41	0,9773	-0,0327	0,7663	C21	-0,1010	0,8179	0,2096
C39	1,0115	-0,0750	0,8618	C4	0,9438	0,1985	0,3554
C35	0,9405	0,1730	1,0250	C3	0,9469	0,2256	0,4509
C38	0,8681	-0,1166	0,8863	C15	0,4317	0,6466	0,4565
C28	0,4760	0,0765	1,1130	C2	1,0956	0,2572	0,5066
C43	1,2625	-0,1234	0,6483	C11	0,4953	0,3347	0,3508
C44	1,4064	0,0935	0,6556	C1	0,8466	0,1026	0,4843
C46	1,5338	0,1870	0,6430	F4	-0,1040	0,4554	0,0598
C48	1,5649	0,3202	0,6666	F5	0,0211	0,6100	-0,0030
C36	1,0000	0,1703	1,1211	F6	-0,1869	0,5900	-0,0238
C29	0,5552	0,0482	1,2020	F10	-0,2221	0,5070	0,0190
C27	0,3192	0,0052	1,1006	E11	-0,0370	0,4791	0,0400
C26	0,5156	0,2276	1,1108	F12	-0,0360	0,6334	-0,0302
C50	1,5103	0,5068	0,7292	O7	0,3015	0,5242	0,1820
N3	0,6420	0,6560	0,4169	O8	0,5067	0,7155	0,1016
C55	0,4573	0,5719	0,0792	H12C	0,3410	0,1518	0,3473
C56	0,3131	0,5089	0,0936	H10A	0,6770	0,5138	0,2867

Coordenadas atómicas para o exemplo 2f, Forma base RPG-3							
Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
C54	0,4592	0,5517	-0,0152	H6A	0,8326	0,3912	0,2958
O5	1,1135	0,3136	0,8309	H6B	0,9113	0,5467	0,3027
O6	0,9224	0,3638	0,6775	H9	0,8236	0,6994	0,3801
C52	0,9658	0,4383	0,7607	H95	1,0446	0,4603	0,4067
C53	1,0998	0,4403	0,8150	H8B	0,8035	0,5371	0,5249
C51	0,9706	0,5801	0,7445	H8C	0,8845	0,6928	0,5336
H8	0,7521	0,0843	1,0354	H16	0,4967	0,8363	0,4153
H10	1,1043	0,1515	0,7516	H22	0,1413	0,6448	0,1660
H34	0,7767	0,2034	0,8813	H7A	1,0479	0,6636	0,4601
H37	0,6246	0,0147	0,7931	H77B	1,0425	0,5720	0,5399
H30	0,3926	0,0620	0,9462	H23	-0,2199	0,7261	0,0931
H31A	0,5395	0,1776	0,8580	H18	0,1897	0,9731	0,4584
H31B	0,6110	0,2396	0,9557	H13A	0,6288	0,6865	0,5425
H33A	0,5480	-0,1985	0,8476	H13B	0,5604	0,5340	0,5057
H33B	0,6213	-0,1349	0,9450	H21	-0,1626	0,8605	0,2204
H47	1,2884	0,3066	0,7391	H4A	0,8479	0,1679	0,3217
H32A	0,3953	-0,0742	0,8343	H4B	0,9856	0,1305	0,3502
H32B	0,3818	-0,1587	0,9172	H4C	0,9960	0,2797	0,3330
H41	0,9434	-0,1120	0,7240	H15A	0,3587	0,5626	0,4312
H39A	1,0471	-0,1496	0,8633	H15B	0,4034	0,6838	0,5038
H39B	1,0801	-0,0006	0,9013	H2A	1,1552	0,3410	0,4913
H38A	0,8152	-0,2110	0,8689	H2B	1,1310	0,1867	0,4955
H38B	0,8786	-0,0998	0,9495	H2C	1,0948	0,2640	0,5683
H43	1,2434	-0,2140	0,6327	H1A	0,8496	0,1213	0,5456
H46	1,5955	0,1582	0,6190	H1B	0,8758	0,0261	0,4785
H48	1,6483	0,3822	0,6582	H1C	0,7522	0,0839	0,4497
H36A	1,0650	0,1213	1,1285	H99	0,9009	0,3500	0,5070
H36B	0,9249	0,1270	1,1498	H7	0,3628	0,5029	0,2157
H36C	1,0484	0,2607	1,1471	H8A	0,5335	0,7307	0,1555
H29A	0,5101	-0,0427	1,2144	H55	0,5214	0,5322	0,1164
H29B	0,5546	0,1090	1,2479	H56A	0,2502	0,5475	0,0555

Coordenadas atómicas para o exemplo 2f, Forma base RPG-3							
Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
H29C	0,6509	0,0606	1,1995	H56B	0,2814	0,4136	0,0755
H27A	0,2727	0,0063	1,0399	H54A	0,4034	0,5980	-0,0510
H27B	0,2829	0,0501	1,1386	H54B	0,4208	0,4574	-0,0335
H27C	0,3022	-0,0863	1,1155	H54C	0,5546	0,5867	-0,0221
H26A	0,6150	0,2666	1,1142	H5	1,0835	0,2863	0,8748
H26B	0,4925	0,2636	1,1602	H6	0,9213	0,2865	0,6847
H26C	0,4641	0,2486	1,0564	H52	0,8933	0,3997	0,7941
H100	0,5160	-0,0550	1,0510	H53A	1,1740	0,4907	0,7866
H2	0,6741	0,3386	0,4153	H53B	1,1148	0,4884	0,8717
H4	0,3295	0,6914	0,2656	H51A	1,0458	0,6226	0,7158
H12A	0,3879	0,2319	0,4404	H51B	0,9866	0,6294	0,8002
H12B	0,4843	0,1597	0,4113	H51C	0,8826	0,5788	0,7073

## QUADRO 9

Posições características do pico de difracção de raio-x no pó (grau 2e  $\pm$  0,1) à temperatura ambiente para os exemplos 2a, b, d, c, d, e, f e g, com base num padrão de elevada qualidade obtido num difractómetro (CuK $\alpha$ ), com uma capilaridade giratória, em que 2 $\theta$  é calibrado com um padrão adequado diferente de NIST

Exp 2a	Exp 2b	Exp 2c	Exp 2d	Exp 2e	Exp 2f	Exp 2g
5,2	5,5	5,1	5,3	5,4	6,3	6,9
7,9	9,1	6,9	9,6	9,4	9,0	8,7
7,1	12,1	7,4	13,7	11,2	11,7	9,8
17,6	14,0	10,2	14,7	13,7	15,0	10,3
19,6	19,2	18,0	19,5	19,1	17,6	11,8

#### **CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS COMPARATIVAS**

Os ensaios e os dados de comparação das características farmacológicas do exemplo 1 e dos compostos descritos no documento WO2005021500 (que corresponde à patente de invenção norte-americana nº 7 163 937, atribuída à presente requerente) são a seguir apresentados.

#### **Ligação a células mononucleares de sangue periférico humano ("ligação a CCR2")**

Veja-se, e.g., Yoshimura *et al.* J. Immunol. 1990, 145, 292. O ensaio de ligação a CCR2 humano foi realizado com células mononucleares de sangue periférico humano (hPBMCs), utilizando  $^{125}\text{I}$ -MCP-1 humano como ligando marcador. Isolou-se hPBMCs a partir de 'leucopak' humano (Biological Specialty Inc.), utilizando um protocolo convencional com Ficoll-Hypaque (Mediatech Cellgro). Lavou-se as hPBMCs isoladas e diluiu-se até  $1\times 10^7/\text{mL}$  em tampão de ligação (RPMI-1640, 0,1% de BSA, Hepes 20 mM, pH 7,4). Diluiu-se

$^{125}\text{I}$ -MCP-1 (NEN/Perk Elmer) até 0,45 nM em tampão de ligação. Diluiu-se o composto em tampão de ligação até 3 vezes as concentrações finais utilizadas no ensaio de ligação. O ensaio de ligação foi realizado utilizando uma placa de filtração com 96 poços (Millipore). Avaliou-se a ligação total de  $^{115}\text{I}$ -MCP-1 do modo seguinte: a cada reacção com um volume total de 150  $\mu\text{L}$  adicionou-se  $5 \times 10^5$  células,  $^{125}\text{I}$ -MCP-1 0,15 nM e um composto de um modo tal que a concentração final estivesse compreendida entre 0 e 100 nM. Manteve-se a placa a incubar à temperatura ambiente durante 30 minutos e depois lavou-se três vezes com RPMI-1640, 0,1% de BSA, NaCl 0,4 M, Hepes 20 mM, pH 7,4, utilizando um colector de filtração a vácuo (Millipore). Após a lavagem, secou-se a placa ao ar durante 60 minutos à temperatura ambiente. Depois adicionou-se 25  $\mu\text{L}$  de 'Microscint 20' a cada poço. Fechou-se estanqueamente a placa e efectuou-se a contagem no dispositivo Trilux durante 1 minuto. Determinou-se a ligação não específica na presença de 300 nM de MCP-1 frio (PeproTech Inc.). Calculou-se  $^{115}\text{I}$ -MCP-1 específica como a diferença entre a ligação total e a ligação não específica. Todas as condições foram testadas em duplicado. O valor  $\text{CI}_{50}$  é definido como a concentração do composto competidor necessária para reduzir a ligação específica em 50%.

#### **Fluxo hERG**

Deixou-se desenvolver (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) células HEK293 que expressam de um modo estável os canais de hERG em meio de Eagle modificado de Dulbecco com 10% de soro fetal de bovino Sigma, aminoácidos não essenciais, L-glutamina 2 mM e 500  $\mu\text{g/mL}$  de G418, no incubador. Utilizou-se tampão de

dissociação de células para extrair as células dos recipientes, as quais foram então colocadas em placas limpidas/pretas revestidas com poli-D-lisina, com 384 poços, a uma densidade de  $2 \times 10^4$  células por poço (20  $\mu\text{L}$ ) em meio de soro a 10% e manteve-se a incubar durante 15 a 24 horas a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> num incubador, até se obter uma monocamada confluente de células.

Preparou-se uma solução de reserva 2 mM de corante BTC-AM (Molecular Probes, Eugene, OR) em 100% de DMSO e depois adicionou-se, a 1:1, a ácido plurônico a 10% (p/v) em DMSO no dia do ensaio. Diluiu-se então o corante em tampão de EP externo hERG (NaCl 140 mM, KCl 4,0 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,0 mM, HEPES 10 mM, pH 7,3, e glicose 10 mM; todos os componentes do tampão foram adquiridos a Sigma Chemical). Adicionou-se esta mistura de corante BTC (30  $\mu\text{L}$ ) às células, obtendo-se uma concentração final de carga de 2,5  $\mu\text{M}$ . Manteve-se as células a incubar a 21°C durante 45 minutos.

Diluiu-se os compostos de ensaio até 10 mM de DMSO em 60  $\mu\text{L}$ . Diluiu-se então, em série, estes compostos à razão de 1:2 em DMSO nas colunas 1-10 e 11-20 de uma placa com 384 poços. Criou-se placas prontas para o ensaiar por introdução de 2,5  $\mu\text{L}$  da placa diluída em série de DMSO, a qual tinha sido preparada no dispositivo 'Velocity 11 BioCel'. Criou-se placas aquosas por adição de 48  $\mu\text{L}$  de tampão EP e diluiu-se então 30 a 45 minutos antes de se efectuar a leitura do ensaio no dispositivo FLIPR. Depois de se introduzir o corante, adicionou-se os compostos diluídos com água às células das três placas replicadas (10  $\mu\text{L}$ ), obtendo-se um intervalo de concentrações com dez pontos compreendido entre 80  $\mu\text{M}$  e 0,156 nM. A concentração

final de DMSO no ensaio foi de 1%. Preparou-se placas aquosas prontas para ensaios e diluiu-se num manuseador de líquidos 'Cybio'.

Efectua-se a leitura de células carregadas com corante num dispositivo FLIPR384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), o qual excita o corante utilizando a linha de 488 nm de um laser de árgon. Filtrou-se a emissão utilizando um filtro de passagem de banda  $540 \pm 30$  nm. Os canais de hERG são estimulados a se abrirem por meio da adição de 20  $\mu\text{L}$ /poço de tampão EP que contém  $\text{K}_2\text{SO}_4$  66 mM e  $\text{Tl}_2\text{SO}_4$  1,3 mM (Sigma/Aldrich). Para cada placa, recolheu-se os dados a cada segundo durante um período de 12 segundos, período esse ao fim do qual se adicionou o tampão estimulador que contém  $\text{Tl}^+$ . A recolha de dados procedeu a cada segundo durante 48 segundos e depois continuou a cada 3 segundos durante mais 2 minutos.

O efeito dinâmico do ensaio foi determinado a partir de poços em branco e totais. Os poços totais (colunas 21 e 22) definem a activação hERG máxima para a placa (na ausência de composto de ensaio) e os poços em branco (colunas 23 e 24) definem uma inibição de 100% de hERG. Os poços em branco contêm 400 nM dos inibidores de hERG convencionais, dofetilida (Ficker *et al.*, 1998) ou de E-4031. Os pontos de dados não tratados para cada poço de amostra foram, em primeiro lugar, corrigidos para a variação célula/sinal, para o fundo do controlo negativo (ensaio em branco) e normalizados para os controlos positivos (totais), utilizando o programa informático disponível em rede FLIPR. As curvas de resposta da concentração do composto de ensaio para os dados de fluxo de  $\text{Tl}^+$  hERG foram então ajustadas utilizando a aplicação

'Excel Fit' (ID Business Solutions Limited, Surrey, UK), com uma equação logística para um único local,  $Y = A + ((B-A)/1 + ((C/X)^D))$ , em que A = inibição máxima. Os dados foram analisados por meio do ajuste de amplitudes máximas de alteração na fluorescência para o fluxo de  $Tl^+$  para determinadas condições do composto de ensaio. As potências (valores  $CI_{50}$ ) dos compostos foram calculadas a partir da média dos poços em triplicado.

#### **Ensaio de ligação ao local 2, canal de sódio**

Veja-se também: W. A. Catterall, et al. J. Biol. Chem. 1981, 256, 8922. O tampão de ligação convencional contém HEPES 50 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, cloreto de colina 130 mM, KCl 5,4 mM,  $MgCl_2$  0,8 mM, glicose 5,5 mM, 40  $\mu g/mL$  de LqT. As reacções de ligação tiveram início por meio da adição de sinaptossomas (preparados a partir de cérebro de ratos Wistar) à mistura de reacção que continha  $[^3H]$ -batracotoxina 5 nM num tampão de ligação convencional e o composto que se pretendia testar na concentração desejada. Misturou-se então as amostras e manteve-se a incubar a 37°C durante 60 minutos. Interrompeu-se as reacções por meio da adição de tampão de lavagem arrefecido com gelo que continha HEPES 50 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4,  $CaCl_2$  1,8 mM,  $MgCl_2$  0,8 mM e 1  $mg/mL$  de albumina do soro de bovino. As sinaptossomas foram recolhidas imediatamente para filtros de fibra de vidro e lavadas três vezes com tampões de lavagem. Efectuou-se a contagem da radioactividade de  $[^3H]$ -batracotoxina restante nos filtros utilizando espectrómetros de cintilação líquidos.

**Ensaio de permeabilidade à membrana artificial paralelo (PAMPA)**

O ensaio de permeabilidade à membrana artificial paralelo (PAMPA) é constituído por uma combinação de lípidos à base de lecitina formulados especialmente, designada como lípido do tracto gastrointestinal (GIT). O lípido GIT é utilizado para formar uma membrana numa montagem de placas de tipo sanduíche idêntica à utilizada nos ensaios Caco-2. O lípido GIT possui bastantes semelhanças com a composição e o desempenho da membrana *in vivo*, conforme determinado pelos compostos convencionais dos quais se sabe que são absorvidos passivamente em seres humanos. O PAMPA é amplamente utilizado como modelo *in vitro* para a pesquisa de permeabilidade de novos compostos. A taxa de passagem dos compostos através da membrana do PAMPA é utilizada para terminar um coeficiente de permeabilidade (Pc), o qual pode ser associado à permeabilidade passiva *in vivo* do composto.

O coeficiente de permeabilidade (Pc) de um composto particular é examinado numa preparação dependente do pH, com pH apical e basolateral de 7,4. Todos os ensaios são realizados com medições em triplicado.

Diluiu-se, 1:100, os compostos (soluções de reserva 10 mM em 100% de DMSO) num tampão de poço dador a pH 7,4 (pION nº de CAT. 110151), proporcionando uma solução de ensaio 100 µM em 1% de DMSO. Transferiu-se o composto diluído em tampão de poço dador para uma placa 'Whatman Unifilter' e filtrou-se antes de se introduzir 200 µL para o poço dador da placa de ensaio (pION nº de CAT. 1110163). Formou-se a membrana para PAMPA por pipetagem de 4 µL da solução de lípido (pION nº de CAT. 110169) para uma placa de filtração

(VWR nº. de CAT. 13503). Cobriu-se então a membrana com 200  $\mu$ L de tampão de poço aceitador a pH 7,4 (pION nº. de CAT. 110139). Combinou-se a placa de ensaio para o PAMPA (lado dador e lado aceitador) e deixou-se a incubar à temperatura ambiente durante 4 horas. Desmontou-se então a placa e carregou-se (150  $\mu$ L/poço) placas de espectrofotómetro (VWR nº de CAT. 655801). Efectuou-se a leitura das placas dadora, aceitadora, de referência e em branco no leitor de placas 'SpectraMax UV'. Os dados foram capturados pela aplicação informática pION, a qual analisa o espectro e gera os valores de  $P_c$ .

#### **Quimiotaxia de CCR2**

Efectuou-se o ensaio de quimiotaxia de CCR2 humano com a linhagem celular monocítica humana, THP-1. Em primeiro lugar, marcou-se as células THP-1 com o corante fluorescente Calceína-AM em RPMI-1640 isento de vermelho de fenol e isento de BSA (pH 7,4) a 37°C durante 30 minutos com agitação suave a cada 15 minutos. Lavou-se então as células marcadas e colocou-se novamente em suspensão a  $1 \times 10^5$ /ml em tampão de quimiotaxia (RPMI-1640 isento de vermelho de fenol, 0,1% de BSA, pH 7,4). Diluiu-se o composto de ensaio em tampão de quimiotaxia de um modo tal que a concentração final de ensaio estava compreendida entre 0,01 nM e 1  $\mu$ M. Diluiu-se o ligando MCP-1 (PeproTech Inc.) até 20 nM em tampão de quimiotaxia. Para se efectuar o ensaio, misturou-se um volume igual de diluições de composto de ensaio com um volume igual de células de THP-1 marcadas (mistura 1) e misturou-se um volume igual de diluições de composto de ensaio com um volume igual de ligando MCP-1 diluído (mistura 2). Manteve-se ambas as

misturas a incubar independentemente a 37°C durante 10 minutos e depois agitou-se suavemente. Determinou-se então a quimiotaxia induzida por MCP-1 numa placa de quimiotaxia (Becton Dickinson), colocando 50 µL da mistura 1 na câmara superior e 225 µL da mistura 2 na câmara inferior. Cobriu-se a placa com uma tampa e manteve-se a incubar a 37°C durante 30 minutos. Decorridos 30 minutos, efectuou-se a leitura da placa num dispositivo 'Cytofluor'. Todas as condições foram testadas em duplicado. Para a determinação de sinal para ruído, colocou-se 50 µL de células THP-1 marcadas por si só ( $5 \times 10^4$ /poço) na câmara superior e colocou-se 225 µL de ligando MCP-1 por si só na câmara inferior (concentração final de 10 nM). A inibição alcançada por concentrações determinadas de composto de ensaio foi calculada como a percentagem de controlo de MCP-1 isento de composto. O valor  $CI_{50}$  é definido como a concentração de composto de ensaio necessária para alcançar uma inibição de 50% de quimiotaxia celular.

#### **Iluminação de campo escuro de hERG**

Utilizou-se um microscópio de iluminação de campo escuro na totalidade da célula para medir directamente as correntes em células HEK-293 que expressam estavelmente a subunidade  $\alpha$  do canal de potássio hERG clonado. Testou-se o composto num tampão aquoso com pH 7,4 à temperatura ambiente. Aplicou-se impulsos repetitivos de ensaio (0,05 Hz) a partir de um potencial de suporte de -80 mV a +20 mV durante 2 segundos e provocou-se correntes de cauda após os ensaios de impulso aumentando a voltagem até -65 mV. Os efeitos do composto foram calculados por medição da inibição da corrente de cauda do pico.

**Iluminação de campo escuro do canal de sódio**

Utilizou-se um microscópio de iluminação de campo escuro na totalidade da célula para medir directamente as correntes de sódio para dentro das células HEK-293 que expressam o canal de sódio cardíaco humano, SCN5A. Testou-se o composto com um tampão aquoso isento de proteína. Para determinar a inibição em estado de equilíbrio, provou-se correntes de sódio a cada 5 segundos utilizando o seguinte protocolo de voltagem: manteve-se as células a um potencial de -90 mV e aumentou-se até -20 mV durante 60 ms. Os efeitos foram calculados determinando a inibição da corrente de pico durante o teste de impulso até -20 mV. A inibição dependente da taxa foi testada por estimulação a frequências compreendidas entre 1 Hz e 4 Hz.

**Farmacocinéticas de dose única em ratos**

Utilizou-se ratos machos da estirpe Sprague-Dawley (250 a 300 g) para os estudos farmacocinéticos. Manteve-se os ratos em jejum de um dia para o outro antes de se administrar uma dose PO e alimentou-se 4 horas depois da dose. Foram recolhidas amostras de sangue (~0,3 mL) a partir da veia jugular para tubos que continham K<sub>2</sub>EDTA e depois centrifugadas a 4°C (1500–2000 x g) para se obter plasma. Num estudo de biodisponibilidade oral, 2 grupos de animais (N = 2–3 por grupo) receberam o composto de ensaio por infusão intravenosa (IV) (ao longo de 10 minutos) através da veia jugular ou por alimentação com sonda esofágica oral. Foram obtidas amostras de sangue a 0,17 (apenas para IV), 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 4, 6, 8 e 24 horas após dose. As amostras de plasma, obtidas por centrifugação

a 4°C (1500–2000 x g), foram armazenadas a -20°C até se realizar a análise por LC/MS/MS.

#### **Farmacocinéticas de dose única em macacos**

Avaliou-se a farmacocinética de diversos compostos de ensaio em macacos machos da estirpe *Cynomolgus* com uma concepção cruzada. Manteve-se os macacos em jejum de um dia para o outro antes da dosagem PO e alimentou-se 4 horas após a dose. Um grupo de 1 a 3 animais (3 a 5 kg) recebeu o composto por infusão IV (ao longo de 10 minutos) através da veia femoral e por alimentação com sonda esofágica oral, com uma semana de desmame entre tratamentos. Foram recolhidos conjuntos de amostras de sangue (~0,3 mL) a partir da artéria femoral 0,17 (apenas IV), 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 4, 6, 8 e 24 horas após dose e foram centrifugadas a 4°C (1500–2000 x g) para se obter plasma. As amostras foram armazenadas a -20°C até se efectuar a análise por LC/MS/MS.

#### **Análise dos dados para os ensaios farmacocinéticos**

Os parâmetros farmacocinéticos foram obtidos por análise não comportamental dos dados de concentração no plasma vs. Tempo (aplicação informática KINET1CAT™, Versão 4.2, InnaPhase Corporation, Philadelphia, PA). A concentração do pico (Cmáx) e o tempo para a Cmáx foram registados directamente a partir de observações experimentais. A área sob a curva a partir do instante zero até pelo menos o instante de amostragem (AUC(0-T)) foi calculada utilizando uma combinação de somas lineares e trapezoidais log. A limpeza total no plasma (CLTp), o volume da distribuição em equilíbrio (Vss), eliminação

aparente de semi-vida ( $T_{1/2}$ ) e o tempo de residência médio (MRT) foram estimados após a administração IV. As estimativas de  $T_{1/2}$  forma realizadas utilizando um mínimo de três pontos com concentrações quantificáveis. A biodisponibilidade oral absoluta (F) foi estimada como a proporção entre os valores ASC normalizados para a dose e as doses IV.

A seguir, são apresentados dados para cada composto conforme medidos nos ensaios descritos antes.

**QUADRO 10. Dados *In Vitro* comparativos**

Composto	CIC <sub>50</sub> de ligação a CCR2 (nM)	CIC <sub>50</sub> de fluxo de hERG (nM)	Ligação ao canal de Na <sup>+</sup> (% de inibição)	Permeabilidade PAMPA (nm/segundo)
Exemplo 12as, WO2005021500	0,27(1)	2800	Não disponível	Não disponível
Exemplo 12aj, WO2005021500	0,43 ± 0,06(2)	770	Não disponível	Não disponível
Exemplo 2k, WO2005021500	0,88 ± 0,60(23)	51000	97%, 10,000nM	529 ± 157(9)
Exemplo 12bd, WO2005021500	1,15 ± 0,07(2)	>80000	54%, 10,000nM	392
Exemplo 8a, WO2005021500	1,83 ± 0,80(12)	>80000	3%, 10,000nM 33%, 30,000nM	94 ± 58(10)
Exemplo 8e, WO2005021500	2,20 ± 0,03(2)	>80000	6%, 10,000nM	2 ± 2(2)
Exemplo 9c, WO2005021500	0,96 ± 0,26(19)	>80000	48%, 10,000 nM 75%, 30,000 nM	145 ± 71(8)
Exemplo 1, Presente Invenção	2,74 ± 1,34(15)	>80000	13%, 10,000nM 32%, 30,000 nM	560 ± 86(5)

**QUADRO 11a. Dados *In Vitro* comparativos suplementares**

Composto	Chemotaxis CIC <sub>50</sub> de quimiotaxia de CCR2 (nM)	Iluminação de campo escuro de hERG (% inibição)	Iluminação de campo escuro do canal de Na <sup>+</sup> (% Inibição)
Exemplo 2k, WO2005021500	0,24 ± 0,16(12)	83%, 10000 nM	52%, 10000 nM
Exemplo 8a, WO2005021500	2,63 ± 1,24(4)	4%, 10000 nM	22%, 10000 nM
Exemplo 9c, WO2005021500	0,21	4%, 10000 nM	19%, 10000 nM
Exemplo 1, Presente Invenção	0,75 ± 0,42(16)	12%, 10000 nM 19%, 30000 nM	29%, 30000 nM

**QUADRO 11b. Dados Farmacocinéticos *In Vivo* comparativos em ratos**

Composto	Dose IV/PO (mg/kg)	CI (mL/min/kg)	F%	ASC oral (nM*h)
Exemplo 2k, WO2005021500	2,5/25	40	68	9294
Exemplo 8a, WO2005021500	6/72	42	1,4	690
Exemplo 9c, WO2005021500	4/43	54	14	1855
Exemplo 1, Presente Invenção	2/10	25	79	10169

**QUADRO 11c. Dados Farmacocinéticos *In Vivo* comparativos em macacos**

Composto	Dose IV/PO (mg/kg)	Cl (mL/min/kg)	F%	ASC oral (nM*h)
Exemplo 2k, WO2005021500	1/1,4	25	46	862
Exemplo 8a, WO2005021500	1/11	14	9,4	1896
Exemplo 9c, WO2005021500	1/10	12	26	6763
Exemplo 1, Presente Invenção	1/1	12	95	2352

#### UTILIDADE

Os compostos representativos dos exemplos demonstraram ser moduladores da actividade do receptor de quimiocina, utilizando ensaios conhecidos pelos especialistas na matéria. Desta secção, são descritos tais ensaios e são apresentadas as suas referências na literatura. São aqui descritos mais ensaios na secção intitulada "Características farmacológicas comparativas", *supra*. Ao demonstrarem actividade nestes ensaios de antagonismo contra MCP-1, é esperado que os compostos dos exemplos possam ser úteis para o tratamento de doenças de humanos associadas a quimiocinas e aos seus receptores congéneres. A definição de actividade nestes ensaios é um composto que demonstre um valor  $CI_{50}$  de 30  $\mu$ M ou inferior em concentração, quando medido num ensaio particular.

Antagonismo da ligação de MCP-1 a PBMC humano (Yoshimura et al., J. Immunol. 1990, 145, 292)

Pelo menos um dos compostos descritos nos exemplos possui actividade no antagonismo da ligação de MCP-1 a PBMC

humano (células mononucleares de sangue periférico humano), aqui descrito.

Trata-se placas de filtração Millipore (nº MABVN1250) com 100  $\mu$ L de tampão de ligação (0,5% de albumina de soro de bovino, tampão HEPES 20 mM e cloreto de magnésio 5 mM em meio RPMI 1640) durante trinta minutos à temperatura ambiente. Para se medir a ligação, combina-se 50  $\mu$ L de tampão de ligação, com ou sem uma concentração conhecida de composto, com 50  $\mu$ L de MCP-1 humano marcado com  $^{125}$ I (para se obter uma concentração final de 150 pM de radioligando) e 50  $\mu$ L de tampão de ligação que contém  $5 \times 10^5$  células. As células utilizadas nestes ensaios de ligação podem incluir células mononucleares de sangue periférico humano isoladas por centrifugação em gradiente Ficoll-Hypaque, monócitos humanos (Weiner et al., J. Immunol. Methods. 1980, 36, 89) ou a linhagem celular THP-1 que expressa o receptor endógeno. Mantém-se a incubar a mistura de composto, células e radioligando à temperatura ambiente durante trinta minutos. As placas foram colocadas num coletor a vácuo, aplicou-se uma pressão hipobárica e lavou-se as placas três vezes com tampão de ligação que continha NaCl 0,5 M. Remove-se saia de plástico da placa, deixa-se a placa secar ao ar, remove-se as poços por punção e efectua-se a contagem. Calcula-se a percentagem de inibição da ligação utilizando as contagens totais obtidas na ausência de qualquer composto competitivo e da ligação de fundo determinada pela adição de MCP-1 100 nM em vez do composto de ensaio.

Antagonismo do fluxo de entrada de cálcio induzido por MCP-1  
(Sullivan, et al. Methods Mol. Biol., 114, 125-133 (1999))

Pelo menos um dos compostos descritos nos exemplos possui actividade no antagonismo no ensaio do fluxo de entrada de cálcio induzido por MCP-1, aqui descrito.

A mobilização de cálcio é determinada utilizando o corante indicador fluorescente  $\text{Ca}^{2+}$ , Fluo-3. Mantém-se as células a incubar a  $8 \times 10^5$  células/mL em soluto salino tamponado com fosfato que contém 0,1% de albumina de soro de bovino, tampão HEPES 20 mM, glicose 5 mM, 1% de soro fetal de bovino, Fluo-3 AM 4  $\mu\text{M}$  e probenocid 2,5 mM, durante 60 minutos a 37°C. As células utilizadas para estes ensaios de cálcio podem incluir monócitos humanos isolados conforme descrito por Weiner *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 36, 89-97 (1980) ou linhagens celulares que expressem o receptor de CCR2 endógeno, tais como THP-1 e MonoMac-6. Lava-se então as células três vezes com soluto salino tamponado com fosfato que contém 0,1% de albumina do soro de bovino, HEPES 20 mM, glicose 5 mM e probenocid 2,5 mM. Coloca-se novamente em suspensão as células em soluto salino tamponado com fosfato que contém 0,5% de albumina de soro de bovino, HEPES 20 mM e probenocid 2,5 mM até uma concentração final de  $2-4 \times 10^6$  células/mL. Coloca-se as células em microplacas com paredes negra com 96 poços (100  $\mu\text{L}/\text{poço}$ ) e centrifuga-se as placas a 200 x g durante 5 minutos. Adiciona-se diversas concentrações de composto aos poços (50  $\mu\text{L}/\text{poço}$ ) e, decorridos 5 minutos, adicionou-se 50  $\mu\text{L}/\text{poço}$  de MCP-1 para se obter uma concentração final de 10 nM. Efectua-se a detecção da mobilização de cálcio utilizando um leitor de placas de imagens fluorescentes. Excita-se a monocamada celular com um laser de árgon (488 nM) e mede-se a fluorescência associada às células durante 3 minutos, (a cada segundo para os primeiros 90 segundos e

a cada 10 segundos para os seguintes 90 segundos). Os dados são obtidos como unidades de fluorescência arbitrários e a alteração para cada poço é determinada como o diferencial máximo-mínimo. A inibição dependente do composto é calculada com base na resposta de MCP-1 por si só.

Antagonismo da quimiotaxia de PBMC humanas induzida por MCP-1 (Bacon et al., Brit. J. Pharmacol. 1988, 95, 966)

Pelo menos um dos compostos descrito nos exemplos possui actividade no ensaio de antagonismo de quimiotaxia de PBMC humanas induzida por MCP-1, aqui descrito.

Num incubador a 37°C, aquece-se uma câmara de quimiotaxia com 96 poços 'Neuroprobe MBA96', placas com 96 poços 'Polyfiltrronics MPC' e filtros de 8 micron PDF5 de policarbonato isento de polivinilpirrolidona 'Neuroprobe'. As células mononucleares de sangue periférico humanas (PBMC) (Boyum et al., Scand. J. Clin. Lab Invest. Suppl. 1968, 97, 31), recentemente isoladas por meio do método de separação convencional por densidade ficoll, são colocadas em suspensão em DMEM a  $1 \times 10^7$  células/mL e aquecidas a 37°C. Aquece-se também uma solução a 60 nM de MCP-1 humano a 37°C. Efectua-se diluições dos compostos de ensaios até 2 x a concentração necessária em DMEM. Mistura a 1:1 a suspensão de PBMC e a solução a 60 nM de MCP-1 em tubos de propileno com DMEM pré-aquecido, com ou sem diluição dos compostos de ensaio. Aquece-se a 37°C estas misturas num aquecedor de tubos. Para se dar início ao ensaio, adiciona-se a mistura de MCP-1/composto aos poços da placa com 96 poços 'Polyfiltrronics MPC', a qual tinha sido colocada na parte inferior da câmara de quimiotaxia 'Neuroprobe'. Adiciona-se um volume de cerca de 400  $\mu$ L a cada poço e

observa-se um menisco positivo após a adição. Coloca-se gentilmente o filtro de 8 micron no topo da placa com 96 poços, coloca-se uma junta de borracha na parte inferior da câmara superior e monta-se a câmara. Adiciona-se um volume de 200  $\mu$ L da suspensão de células/mistura de composto aos poços adequados da câmara superior. Cobre-se a câmara superior com um medidor de placas e coloca-se a unidade montada num incubador a 37°C durante 45 minutos. Após a incubação, remove-se o medidor de placas e remove-se por aspiração toda a suspensão de células restante. Desmonta-se a câmara e remove-se gentilmente o filtro. Mantendo o filtro num ângulo de 90 graus, lava-se as células que não tinham migrado utilizando uma corrente suave de soluto salino tamponado com fosfato e lava-se o topo do filtro com um rodo de borracha. Repete-se esta lavagem mais duas vezes. Seca-se ao ar o filtro e depois submerge-se completamente em corante Wright Geimsa durante 45 segundos. Lava-se então o filtro por enxaguamento em água destilada durante 7 minutos e depois efectua-se uma lavagem suplementar durante 15 segundos com água destilada fresca. Seca-se novamente o filtro ao ar. Quantifica-se as células migradas no filtro por microscopia visual.

Os receptores de quimiocina de mamíferos proporcionam um alvo para interferir com ou para promover um funcionamento imune de célula num mamífero, tal como um ser humano. Os compostos que inibem ou promovem a função do receptor de quimiocina são particularmente úteis para a modulação da função imune de célula para fins terapêuticos. Assim sendo, a presente invenção diz respeito a compostos que são úteis para a prevenção e/ou para o tratamento de diversas doenças e distúrbios inflamatórios, infecciosos e

imuno-regulatórios, incluindo asma e doenças alérgicas, infecção com micróbios patogénicos (os quais, por definição, incluem vírus), bem como patologias auto-imunes, tais como artrite reumatóide e aterosclerose.

Por exemplo, um composto da presente invenção que inibe uma ou várias funções de um receptor de quimiocina de mamíferos (v.g., um receptor de quimiocina humano) pode ser administrado para inibir (isto é, reduzir ou prevenir) estados de inflamação ou uma doença infecciosa. Assim, é possível inibir um ou vários processos inflamatórios, tais como emigração de leucócitos, adesão, quimiotaxia, exocitose (v.g., de enzimas, histamina) ou libertação de mediadores inflamatórios.

De igual modo, um composto da presente invenção que promova uma ou várias funções do receptor de quimiocina de um mamífero (v.g., uma quimiocina humana) quando administrado para estimular (induzir ou potenciar) uma resposta imune ou inflamatória, tal como emigração de leucócitos, adesão, quimiotaxia, exocitose (v.g., de enzimas, histamina) ou a libertação de um mediador inflamatório, que resulte num estímulo benéfico dos processos inflamatórios. Por exemplo, é possível recrutar eosinófilos para combater infecções parasíticas. Além do mais, o tratamento das doenças inflamatórias, alérgicas e auto-imunes supramencionadas também pode ser contemplado para um composto da presente invenção que promova uma ou várias funções do receptor de quimiocina de mamíferos, se contemplarmos a administração de composto suficiente para provocar a perda da expressão do receptor em células através da indução da internalização do receptor de

quimiocina ou da administração de composto de um modo tal que resulte na direcção errada da migração de células.

Para além dos primatas, tais como os seres humanos, também é possível tratar diversos outros mamíferos de acordo com o método da presente invenção. Por exemplo, é possível tratar mamíferos, incluindo, mas sem que isso constitua qualquer limitação, vacas, ovelhas, cabras, cavalos, cães, gatos, cobaias, ratos ou outras espécies de bovinos, ovinos, equinos, caninos, felinos, roedores ou murinos. No entanto, o método também pode ser aplicado em outras espécies, tais como espécies de aves. O sujeito tratado pelos métodos anteriores é um mamífero, macho ou fêmea, para o qual a modulação da actividade do receptor de quimiocina é desejável. O termo "modulação", tal como aqui utilizado, pretende abranger o antagonismo, agonismo, antagonismo parcial e/ou agonismo parcial.

#### Ligaçāo a CCR5 e ensaios funcionais

##### Derivação celular e cultura de células

Desenvolveu-se um conjunto de células HT 1080 que expressam de um modo estável o receptor 5 de quimiocina CC endógena 5 (CCR5), utilizando os métodos descritos por Harrington, Sherf e Rundlett (veja-se as patentes de invenção norte-americanas n°s US 6 361 972 e US 6 410 266). Isolou-se os clones com a expressão mais elevada utilizando citometria de fluxo repetitiva e subsequente sub-clonagem. Depois, desenvolveu-se estas células em cultura em discos

com 6 poços a  $3 \times 10^5$  células/poço e transfecção com um vector de ADN que contém a proteína G quimérica marcada com HA, Gqi5 (Molecular Devices; utilizou-se 5 microgramas do vector de ADN linearizado em 15  $\mu\text{L}$  de Ex-Gen da Fermentes para a transfeção). Dois dias após a transfeção, combinou-se as poços e colocou-se em placas P100. Sete dias após a colocação em placas, seleccionou-se colónias, expandiu-se e analisou-se quanto ao teor em Gqi5 por Western blot. Seleccionou-se um clone (designado por 3559.1.6) que possuía a expressão mais elevada de Gqi5 (da transfeção) e de CCR5 (endógeno) e utilizou-se para as experiências a seguir descritas. Desenvolveu-se em cultura células HT1080 (clone 3559.1.6) com  $\alpha$ -MEM suplementado com 10% de soro fetal de bovino dialisado, 2% de penicilina/estreptomicina/ /glutamina e 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de higromicina B (concentração final) a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> numa atmosfera húmida.

#### Preparação de membrana

Colocou-se novamente em suspensão um pellet de células que continha  $1 \times 10^8$  células HT1080 (clone 3559.1.6) em 5 mL de tampão de preparação de membranas arrefecido com gelo (HEPES 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM) e homogeneizou-se a velocidade elevada num homogeneizador 'Polytron' durante 20 segundos em gelo. Diluiu-se o homogenado com mais 25 mL de tampão de preparação de membranas e centrifugou-se durante 12 minutos (48,000 x g a 4°C). Colocou-se novamente em suspensão o pellet de células em 5 mL de tampão de preparação de membranas e depois homogeneizou-se novamente

conforme descrito antes. Diluiu-se o homogenado com 5 mL de tampão de preparação de membrana e testou-se quando à concentração de proteína CCR5.

#### Ensaio de ligação

Diluiu-se o homogenado preparado recentemente, descrito antes na preparação de membrana, em tampão de ligação (HEPES 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, 0,1% de BSA; adicionou-se antes do ensaio um comprimido completo de inibidor de protease) para se atingir uma concentração final em proteína de 10 µg/poço (placas sólidas brancas com 96 poços provenientes de Coming, Inc.). Misturou-se esta preparação de membrana com esférulas de WGA-SPA (Amerhsam; pré-molhadas em tampão de ligação) para se obter uma concentração de 200 µg/poço. Adicionou-se então a mistura de membrana/esférulas de SPA (100 µL/poço) à placa, na qual se tinha já introduzido 2 µL de DMSO que continha diversas concentrações dos artigos em teste (DMSO puro para o controlo negativo; diversas concentrações dos compostos dos exemplos da presente invenção para os artigos de teste; MIP-1 beta 500 nM como controlo positivo). Deu-se início ao ensaio de ligação por meio da adição de 50 µL de [<sup>125</sup>I]-MIP-1 beta (Perkin Elmer; diluiu-se o material em tampão de ligação, de um modo tal que a adição de 50 µL/poço proporcione uma concentração final de 0,1 nM de [<sup>125</sup>I]-MIP-1 beta). Fechou-se estanqueamente a placa e manteve-se em repouso à temperatura ambiente durante 4 a 6 horas e depois efectuou-se a contagem num dispositivo 'Packard TopCount'. Calculou-se a percentagem de ligação para o artigo testado, utilizando os controlos negativo e positivo para definir o intervalo para cada experiência.

Ensaio funcional com base no leitor de placas de imagens fluorométricas (FLIPR)

Colocou-se células HT1080 (clone 3559.1.6) à razão de 10000 células/poço (30 µL) em placas com 384 poços (pretas/fundo límpido, Biocoat PDL, Beckton Dickinson) e carregou-se com 30 µL/poço de corante fluorescente Fluro-4 AM (preparado por dissolução de 1 mg de Fluro-4 AM em 440 µL de DMSO, diluição com 100 µL de solução plurónica e nova diluição com 10 mL de tampão de Hanks). Manteve-se as células a incubar a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> durante 30 minutos, depois lavou-se três vezes e colocou-se em suspensão em tampão de ensaio (HEPES 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Probenocid 2,5 mM, 0,5% de BSA, 1 x Hanks). Diluiu-se em série o artigo de teste em DMSO, depois diluiu-se a 1:10 com tampão de ensaio e depois adicionou-se às células (10 µL/poço). Utilizando FLIPR, leu-se as placas (10 a 70 segundos) quanto à indução de fluxo (isto é, actividade agonista). Carregou-se então as células com uma solução agonista (30 µL/poço; preparada por diluição de 30 µL de MIP-1 beta 100 µM em 100 mL de tampão de ensaio; este protocolo proporciona uma concentração final de 5 nM de MIP-1 beta no ensaio) e leu-se as placas utilizando FLIPR durante 1 minuto. Determinou-se a actividade antagonista do artigo de teste em relação ao controlo negativo, 0,4% de DMSO/tampão.

Pelo menos um composto da presente invenção é um inibidor de CCR2 e de CCR5 e pode ser utilizado para o tratamento de doenças associadas a qualquer uma das quimiocinas. Os compostos da presente invenção são considerados antagonistas duais.

As doenças e patologias de seres humanos ou de outras espécies que é possível tratar com os inibidores da função do receptor de quimiocina, compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, doenças e patologias inflamatórias e alérgicas, incluindo doenças alérgicas respiratórias, tais como asma, rinite alérgica, doenças de hipersensibilidade pulmonar, pneumonite hiperssensível, celulite eosinofílica (v.g., síndrome de Well), pneumonias eosinofílicas (v.g., síndrome de Loeffler, pneumonia eosinofílica crónica), fascite eosinofílica (v.g., síndrome de Shulman), hipersensibilidade do tipo retardado, doenças pulmonares intersticiais (ILD) (v.g., fibrose pulmonar idiopática ou ILD associada a artrite reumatóide, lúpus sistémico eritematoso, espondilite anquilosante, esclerose sistémica, síndrome de Sjogren, polimiosite ou dermatomiosite); anafilaxia sistémica ou respostas hipersensíveis, alergias a fármacos (v.g., à penicilina, cefalosporinas), síndrome de mialgia eosinófila devido à ingestão de triptofano contaminado, alergias a picadas de insectos; doenças auto-imunes, tais como artrite reumatóide, artrite psoriática, esclerose múltipla, lúpus sistémico eritematoso, miastenia grave, diabetes com início juvenil; glomerulonefrite, tiroidite auto-imune, doença de Behcet; rejeição a enxertos (v.g., em transplantes), incluindo rejeição de aloenxertos ou doença de enxerto-versus-hosperdeiro; doenças inflamatórias do intestino, tais como doença de Crohn e colite ulcerativa; espondiloartropatias; escleroderma; psoriase (incluindo psoriase mediada por células T) e dermatoses inflamatórias, tais como dermatite, eczema, dermatite atópica, dermatite de contacto alérgico, urticária; vasculite (v.g., vasculite

necronizante, cutânea e hipersensível); miosite eosinofílica, fasciite eosinofílica; cancros com infiltração de leucócitos da pele ou dos órgãos. É possível tratar outras doenças ou patologias em que se pretende inibir as respostas inflamatórias indesejáveis, incluindo, mas sem que isso constitua qualquer limitação, vasculite, placas vulneráveis, hiperplasia neointimal venosa de lesão de reperfusão, hiperplasia neointimal de diálise-enxerto, hiperplasia intimal de derivação arterio-venosa, aterosclerose, determinadas doenças hematológicas, toxicidade induzida por citoquinas (v.g., choque séptico, choque endotóxico), polimiosite, dermatomiosite. Como outras doenças ou patologias infecciosas de seres humanos ou de outras espécies que é possível tratar com inibidores da função do receptor de quimiocina refere-se, mas sem que isso constitua qualquer limitação, VIH.

Como doenças ou patologias de seres humanos ou de outras espécies que é possível tratar com promotores da função do receptor de quimiocina refere-se, mas sem que isso constitua qualquer limitação: imuno-supressão, tal como a observada em indivíduos com síndromes de imuno-deficiência, tais como SIDA ou outras infecções virais, indivíduos que estão a ser submetidos a terapia com radiação, quimioterapia, terapia para doenças auto-imunes ou terapia com fármacos (v.g., terapia com corticosteróides), os quais causam imuno-supressão; imuno-supressão provocada por uma deficiência congénita na função do receptor ou outras causas; e doenças infecciosas, tais como doenças parasíticas, incluindo, mas sem que isso constitua qualquer limitação, infecções com helmintas, tais como nemátodos; (Trichuriasis, Enterobiasis, Ascariasis,

Hookworm, Strongyloidiasis, Trichinosis, filariasis); tremátodos (fascíolas) (Schistosomiasis, Clonorchiasis), cestódos (Echinococcosis, Taeniasis saginata, Cysticercosis); vermes viscerais, enxaquecas de larvas viscerais (v.g., Toxocara), gastroenterite eosinofílica (v.g., *Anisaki* sp., *Phocanema* sp.), enxaquecas de larvas cutâneas (*Ancylostoma braziliense*, *Ancylostoma caninum*). Os compostos da presente invenção são assim úteis para a prevenção e para o tratamento de diversas doenças ou distúrbios inflamatórios, infecciosos e imuno-regulatórios.

Além disso, o tratamento das doenças inflamatórias, alérgicas e auto-imunes supramencionadas também pode ser contemplado para promotores da função do receptor de quimiocina, no caso de se administrar composto suficiente para provocar a perda da expressão do receptor em células através da indução da internalização do receptor de quimiocina ou administração de um composto de um modo tal que provoque um mau direcccionamento da migração de células.

De acordo com outro aspecto, a presente invenção pode ser utilizada para avaliar agonistas ou antagonistas específicos putativos de um receptor acoplado a uma proteína G. A presente invenção diz respeito à utilização destes compostos para a preparação e realização de ensaios de pesquisa de compostos que modulem a actividade dos receptores de quimiocina. Além do mais, os compostos da presente invenção são úteis para estabelecer ou para determinar o local de ligação de outros compostos aos receptores de quimiocinas, v.g., por meio de inibição competitiva ou como referência num ensaio para comparar a sua actividade conhecida com um composto com actividade desconhecida. No desenvolvimento de novos ensaios ou

protocolos, os compostos de acordo com a presente invenção podem ser utilizados para testar a sua eficácia. Em particular, tais compostos podem ser disponibilizados num estojo comercial, por exemplo, para utilização na pesquisa farmacêutica das doenças supramencionadas. Os compostos da presente invenção também são úteis para a avaliação de moduladores específicos putativos dos receptores de quimiocina. Além do mais, é possível utilizar os compostos da presente invenção para examinar a especificidade dos receptores acoplados à proteína G que não se pense que são receptores de quimiocina, quer como exemplos de compostos que não se ligam ou como variantes estruturais de compostos activos nestes receptores que podem ajudar na definição de locais específicos de interacção.

Os compostos aqui descritos são úteis para o tratamento ou para a prevenção de distúrbios seleccionados entre artrite reumatóide, osteoartrite, choque séptico, aterosclerose, aneurisma, febre, efeitos cardiovasculares, choque hemodinâmico, síndrome de sépsis, lesão de reperfusão pós-isquémica, malária, doença de Crohn, doenças inflamatórias do intestino, infecção micobacteriana, meningite, psoriase, insuficiência cardíaca congestiva, doenças fibróticas, caquecia, rejeição de enxertos, doença auto-imune, doenças inflamatórias da pele, esclerose múltipla, lesões por radiação, lesão alveolar hiperóxica, VIH, demência associada a VIH, diabetes mellitus não dependente de insulina, asma, rinite alérgica, dermatite atópica, fibrose pulmonar idiopática, penfigóide bolhoso, infecções parasíticas helmínticas, colite alérgica, eczema, conjuntivite, transplante, eosinofilia familiar, celulite eosinofílica, pneumonias eosinofílicas, fasciite

eosinofílica, gastroenterite eosinofílica, cosinofilia induzida por fármacos, fibrose cística, síndrome de Churg-Strauss, linfoma, doença de Hodgkin, carcinoma do cólon, síndrome de Felty, sarcoidose, uveíte, Alzheimer, glomerulonefrite, lúpus sistémico eritematoso, carcinoma das células escamosas esofágicas, dor neuropática e obesidade.

De acordo com outro aspecto, os compostos são úteis para o tratamento ou para a prevenção de distúrbios inflamatórios seleccionados entre artrite reumatóide, osteoartrite, ateroscleroze, doença de aneurisma, febre, efeitos cardiovasculares, doença de Crohn, doenças inflamatórias do intestino, psoriase, insuficiência cardíaca congestiva, escleroze múltipla, doenças auto-imunes e doenças inflamatórias da pele.

De acordo com outro aspecto, os compostos são úteis para o tratamento ou para a prevenção de distúrbios inflamatórios seleccionados entre artrite reumatóide, osteoartrite, ateroscleroze, doença de Crohn, doenças inflamatórias do intestino e escleroze múltipla.

De acordo com outro aspecto, os exemplos aqui descritos podem ser úteis para o tratamento de diversos cancros, incluindo, mas sem que isso constitua qualquer limitação, os seguintes:

carcinoma, incluindo carcinoma da bexiga (incluindo cancro da bexiga acelerado ou metastático), da mama, do cólon (incluindo cancro colorrectal), do rim, do fígado, do pulmão (incluindo o cancro de células pequenas e não pequenas do pulmão e adenocarcinoma do pulmão), do ovário, da próstata, do testículo, do tracto genito-urinário, do sistema linfático, do recto, da laringe, do pâncreas

(incluindo carcinoma pancreático exócrino), do esófago, do estômago, da vesícula biliar, do colo do útero, da tiróide e da pele (incluindo o carcinoma de células escamosas);

tumores hematopoiéticos de linhagem linfóide, incluindo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma não Hodgkin, linfoma das células pilosas, linfoma histiocítico e linfoma de Burkitts;

tumores hematopoiéticos de linhagem mielóide, incluindo leucemias mielógenas agudas e crónicas, síndrome mielodisplásicas, leucemia mielóide e leucemia promielocítica;

tumores do sistema nervoso central e periférico, incluindo astrocitoma, neuroblastoma, glioma e schwannomas;

tumores de origem mesenquimal, incluindo fibrossarcoma, abdomiossarcoma e osteossarcoma e

outros tumores, incluindo melanoma, xenoderma pigmentoso, ceratoactantoma, seminoma, cancro folicular da tiróide e teratocarcinoma.

De acordo com outra variante, os compostos podem ser utilizados para o tratamento de cancro, em que o cancro é seleccionado entre o cancro da mama, o cancro do fígado, o cancro da próstata e melanoma. Além disso, os compostos aqui descritos podem ser úteis para o tratamento de cancro do ovário e mielomas múltiplos.

A presente invenção proporciona compostos utilizáveis em métodos para o tratamento de diversas doenças proliferativas não cancerígenas.

A terapia de combinação para a prevenção e para o tratamento de distúrbios e doenças inflamatórias,

infecciosas e imuno-regulatórias, incluindo asma e doenças alérgicas, bem como de patologias auto-imunes, tais como artrite reumatóide e aterosclerose, e também as patologias referidas antes é ilustrada pela combinação de compostos da presente invenção com outros compostos que são conhecidos para uma tal utilidade. Por exemplo, para o tratamento ou para a prevenção de inflamação, os compostos da presente invenção podem ser utilizados em conjunto com um agente anti-inflamatório ou analgésico, tal como um agente opiáceo, um inibidor de lipoxigenase, um inibidor de ciclooxygenase-2, um inibidor de interleucina, tal como um inibidor de interleucina 1, um inibidor do factor d necrose tumoral, um antagonista de NMDA, um inibidor e óxido nítrico ou um inibidor da síntese de óxido nítrico, um agente anti-inflamatório não esteroidal, um inibidor de fosfodiesterase ou um agente anti-inflamatório supressor de citoquina, por exemplo, com um composto, tal como acetaminofeno, aspirina, codeína, fentanilo, ibuprofeno, indometacina, cеторолак, morfina, naproxeno, fenacetina, piroxicam, um analgésico esteroidal, sufentanilo, sunlindac, interferão  $\alpha$  e semelhantes. De igual modo, os compostos da presente invenção podem ser administrados com um agente para o alívio de dor; um potenciador, tal como cafeína, um antagonista H<sub>2</sub>, simeticona, hidróxido de alumínio ou magnésio; um descongestionante, tal como fenilefrina, fenilpropanolamina, pseudofedrina, oximetazolina, efinefrina, nafazolina, xilometazolina, propil-hedrina ou levodesoxi-efedrina; e um agente antitussico, tal como codeína, hidrocodona, caramifeno, carbetapentano ou dextrametorfano; um diurético; e um anti-histamina sedativo ou não sedativo. De igual modo, os

compostos aqui descritos podem ser utilizados em combinação com outros fármacos que sejam utilizados para o tratamento/prevenção/supressão ou melhoria das doenças ou patologias para as quais o composto da presente invenção é útil. Esses outros fármacos podem ser administrados por uma via e numa quantidade normalmente utilizada, em simultâneo ou sequencialmente com um composto da presente invenção. No caso de um composto ser utilizado em simultâneo com um ou vários outros fármacos, então é possível utilizar uma composição farmacêutica que contém esses outros fármacos para além do composto da presente invenção. Assim sendo, as composições farmacêuticas incluem aquelas que também compreendem um ou vários outros ingredientes activos, para além de um composto da presente invenção.

Como exemplos de outros ingredientes activos que é possível combinar com um composto da presente invenção, quer por administração em separado quer nas mesmas composições farmacêuticas, refere-se, mas sem que isso constitua qualquer limitação: (a) antagonistas de integrina, tais como aqueles para selectinas, ICAM e VLA-4; (b) esteróides, tais como beclometasona, metilprednisolona, betametasona, prednisona, dexametasona e hidrocortisona; (c) imuno-supressores, tais como ciclosporina, tacrolimus, rapamicina e outros imuno-supressores do tipo FK-506; (d) anti-histaminas (antagonistas de histamina H1), tais como bromofeniramina, clorofeniramina, dexclorofeniramina, triprolidina, clemastina, difenildramina, difenilpiralina, tripelenamina, hidroxizina, metdilazina, prometazina, trimeprazina, azatadina, cipro-heptadina, antazolina, feniramina, pirilamina, astemizole, terfenadina, loratadina, cetirizina, fexofenadina, descarboetoxiloratadina e

semelhantes; (e) anti-asmáticos não esteróidais, tais como agonistas  $\beta_2$  (terbutalina, metaproterenol, fenoterol, isoetarina, albuteral, bitolterol e pirbuterol), teofilina, cromolino de sódio, atropina, brometo de ipratrópio, antagonistas de leucotrieno (zafirlukast, montelukast, pranlukast, irlukast, poblukast, SKB-102,203), inibidores da biossíntese de leucotrieno (zileuton, BAY-1005); (f) agentes anti-inflamatórios não esteróidais (NSAID), tais como derivados do ácido propiónico (alminoprofeno, benzaprofeno, ácido buclóxico, carprofeno, fenbufeno, fenoprofeno, fluprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indoprofeno, cetoprofeno, miroprofeno, naproxeno, oxaprozina, pirprofeno, pranoprofeno, suprofeno, ácido tiaprofénico e tioxaprofeno), derivados do ácido acético (indometacina, acemetacina, alclofenac, clidanac, diclofenac, fenclofenac, ácido fenclóxico, fentiazac, furofenac, ibufenac, isoxepac, oxpinaç, sulindac, tiopinac, tolmetina, zidometacina e zomepirac), derivados do ácido fenâmico (ácido flufenâmico, ácido meclofenâmico, mefenâmico, ácido niflúmico e ácido tolfenâmico), derivados do ácido bifenilcarboxílico (diflunisal e flufenisal), oxicam (isoxicam, piroxicam, sudoxicam e tenoxicam), salicilatos (ácido acetil-salicílico, sulfa-salazina) e pirazolonas (apazona, bezpiperilona, feprazona, mofebutazona, oxifenbutazona, fenilbutazona); (g) inibidores de ciclooxygenase-2 (COX-2); (h) inibidores de fosfodiesterase de tipo IV (PDE-IV); (i) outros antagonistas dos receptores de quimiocina; (j) agentes para a diminuição do colesterol, tais como inibidores da HMG-COA-reductase (lovastatina, simvastatina e pravastatina, fluvastatina, atorvastatina e outras estatinas), sequestrantes

(colestiramina e colesterol), ácido nicotínico, derivados do ácido fenofíbrico (gemfibrozilo, clofibrat, fenofibrato e benzafibrato), e probucol; (k) agentes anti-diabéticos, tais como insulina, sulfonilureias, biguanidas (metformina), inibidores de a-glucosidase (acarbose) e glitazonas (troglitazona e pioglitazona); (l) preparações de interferões (interferão  $\alpha$ -2a, interferão-2B, interferão  $\alpha$ -N3, interferão  $\beta$ -1a, interferão  $\beta$ -1b, interferão  $\gamma$ -1b); (m) compostos antivirais, tais como efavirenz, nevirapina, indinavir, ganciclovir, lamivudina, famciclovir e zalcitabina; (o) outros compostos, tais como ácido 5-amino-salicílico e seus pró-fármacos, antimetabolitos, tais como azatioprina e 6-mercaptopurina, e agentes quimioterapêuticos citotóxicos para o cancro. A proporção em peso entre o composto da presente invenção e o segundo ingrediente activo pode variar e irá depender das doses eficazes para cada ingrediente.

De um modo geral, será utilizada uma dose eficaz de cada composto. Assim, por exemplo, no caso de um composto ser combinado com um NSAID, a proporção em peso entre o composto da presente invenção e o NSAID irá normalmente estar compreendida entre cerca de 1000:1 e cerca de 1:1000 ou, em alternativa, entre cerca de 240:1 e cerca de 1:200. As combinações de um composto da presente invenção com outro ingrediente activo também irão estar normalmente no intervalo referido, embora, para cada caso, deverá ser utilizada uma dose eficaz para cada ingrediente activo.

Para o tratamento de cancro, é muitas vezes vantajosa uma combinação de agentes quimioterapêuticos e/ou outros tratamentos (v.g., terapia com radiação). O segundo (ou terceiro) agente por possuir um mecanismo de acção igual ou

diferente em relação ao agente terapêutico principal. Poderá ser particularmente útil utilizar combinações de fármacos citotóxicos em que dois ou mais fármacos administrados actuam de modos diferentes ou em fases diferentes do ciclo celular, e/ou em que dois ou mais fármacos possuem toxicidades ou efeitos secundários sobreponíveis, e/ou em que cada um dos fármacos combinados tenha demonstrado eficácia para o tratamento de uma doença particular, manifestada pelo paciente.

Assim sendo, os compostos aqui descritos (ou outras fórmulas gerais aqui descritas) podem ser administrados em combinação com outros agentes anti-cancro, agentes citotóxicos e tratamentos úteis para o tratamento de cancro ou outras doenças proliferativas. A invenção compreende ainda a utilização dos compostos (ou outras fórmulas gerais aqui descritas) para a preparação de medicamentos para o tratamento de cancro e/ou compreende o empacotamento dos compostos da presente invenção em conjunto com instruções para que os compostos sejam utilizados em combinação com outros agentes anti-cancro e citotóxicos e tratamentos para o tratamento de cancro. A presente invenção compreende ainda combinações dos compostos com um ou vários outros agentes sob a forma de um estojo, *v.g.*, no qual são embalados em conjunto ou colocados em embalagens em separado para a sua comercialização conjunta como um estojo ou são embalados para serem formulados em conjunto.

O segundo (ou superior) agente anti-cancro pode ser seleccionado entre qualquer um dos agentes seguintes:

agentes alquilantes (incluindo mostardas de azoto, sulfonatos de alquilo, nitroso-ureias, derivados de etilenimina e triazenos); anti-angiogénicos (incluindo

inibidores de metaloproteinase de matriz); antimetabolitos (incluindo inibidores de denosina-desaminase, antagonistas de ácido fólico, análogos de purina e análogos de pirimidina); antibióticos ou anticorpos (incluindo anticorpos monoclonais, anticorpos CTLA-4, antraciclinas); inibidores de aromatase;

modificadores da resposta do ciclo celular; enzimas; inibidores de farnesil-transferase proteica;

agentes hormonais e anti-hormonais e esteróides (incluindo análogos sintéticos, glucocorticóides, estrogénios/anti-estrogénios [e.g., SERM], androgénicos/anti-androgénios, progestinas, agonistas do receptor de progesterona e agonistas e antagonistas da libertação da hormona luteinizante [LHRH]); moduladores do sistema factor de crescimento do tipo insulina (IGF)/receptor do factor de crescimento tipo insulina (IGFR) (incluindo inibidores de IGFR1); inibidores da sinalização de integrina; inibidores de cinase (incluindo inibidores multi-cinase e/ou inibidores de Src cinase ou Src/abl, inibidores de cinase dependente de ciclina [CDK], panHer, anticorpos Her-1 e Her-2, inibidores de VEGF, incluindo anticorpos anti-VEGF, inibidores de EGFR, inibidores de proteína activada com mitogénios [MAP], inibidores de MEK, inibidores de aurora-cinase, inibidores de PDGF e outros inibidores de tirosina-cinase ou inibidores de serina/treonina-cinase;

agentes perturbadores de microtúbulos, tais como ecteinascidinas ou seus análogos e derivados; agentes estabilizadores de microtúbulos, tais como taxanos, e epotilonas que ocorrem naturalmente e seus análogos sintéticos e semi-sintéticos;

agentes destabilizadores da ligação de microtúbulos (incluindo alcalóides vinca) e

inibidores de topoisomerase; inibidores de prenil-transferase proteica; complexos de coordenação de platina; inibidores da transdução de sinal e outros agentes utilizados como agentes anti-cancro e citotóxicos, tais como modificadores da resposta biológica, factores de crescimento e imuno-moduladores.

Além disso, os compostos da presente invenção podem ser formulados ou co-administrados com outros agentes terapêuticos, os quais são seleccionados devido à sua utilidade particular em termos de efeitos secundários associados com as patologias supracitadas. Por exemplo, os compostos da invenção podem ser formulados com agentes para a prevenção de náuseas, hipersensibilidade e irritação gástrica, tais como anti-eméticos, e anti-histamínicos  $H_1$  e  $H_2$ .

Os outros agentes terapêuticos referidos antes, quando utilizados em combinação com os compostos da presente invenção, podem ser utilizados, por exemplo, nas quantidades indicadas na obra *Physicians' Desk Reference* (PDR) ou numa outra qualquer quantidade determinada pelos especialistas na matéria.

Os compostos são administrados a um mamífero numa quantidade terapeuticamente eficaz. A expressão "quantidade terapeuticamente eficaz" designa uma quantidade de um composto da presente invenção que, quando administrado por si só ou em combinação com um agente terapêutico suplementar a um mamífero, seja eficaz para prevenir ou para melhorar a doença ou a progressão da doença.

**DOSAGEM E FORMULAÇÃO**

Os compostos da presente invenção podem ser administrados em formas de dosagem oral, tais como comprimidos, cápsulas (cada uma das quais compreende formulações de libertação prolongada ou controlada), pílulas, pós, grânulos, elixires, tinturas, suspensões, xaropes e emulsões. Também podem ser administradas por via intravenosa (bolus ou infusão), intraperitoneal, subcutânea ou intramuscular, todas utilizando formas de dosagem bem conhecidas pelos especialistas na arte farmacêutica. Podem ser administrados por si só, mas são normalmente administrados com um veículo farmacêutico seleccionado com base na via de administração seleccionada e nas práticas farmacêuticas convencionais.

O regime de dosagem para os compostos da presente invenção irá, evidentemente, variar em, função de factores conhecidos, tais como as características farmacodinâmicas do agente particular e o seu modo e via de administração; da espécie, idade, sexo, estado de saúde, condição médica e peso do recipiente; da natureza e da extensão dos sintomas; de tipo de tratamentos em simultâneo; da frequência de tratamento; da via de administração, da função renal e hepática do paciente e do efeito desejado. Um médico ou um veterinário poderão determinar e prescrever a quantidade efectiva de fármaco necessária para prevenir, contrariar ou parar a progressão do distúrbio.

A título de linhas gerais, a dosagem oral diária para cada ingrediente activo, quando utilizada para os efeitos indicados, irá estar compreendida entre cerca de 0,001 e 1000 mg/kg de massa corporal ou entre cerca de 0,01 e 100 mg/kg de massa corporal por dia ou, em alternativa, entre

cerca de 1,0 e 20 mg/kg/dia. Por via intravenosa, as doses irão estar compreendidas entre cerca de 1 e cerca de 10 mg/kg/minuto durante uma taxa de infusão constante. Os compostos da presente invenção podem ser administrados como dose diária única ou a dosagem total diária podem ser administrada em doses divididas de duas, três ou quatro vezes ao dia. De acordo com uma variante, a dosagem oral diária do ingrediente activo está compreendida entre 3 e 600 mg, administrada uma vez ao dia ou administrada em doses divididas duas vezes ao dia. Em alternativa, o ingrediente activo pode ser administrado em doses compreendidas entre 10 e 20 mg administradas duas vezes ao dia ou entre 40 e 100 mg administrada uma vez ao dia. Em alternativa, o ingrediente activo pode ser administrado numa dose de 12,5 mg duas vezes ao dia ou de 75 mg uma vez ao dia. Em alternativa, o ingrediente activo pode ser administrado em doses de 3, 10, 30, 100, 300 e 600 mg, uma vez ou duas vezes ao dia.

Os compostos da presente invenção podem ser administrados sob uma forma intranasal por meio da utilização tópica de veículos intranasais adequados ou por vias transdérmicas utilizando adesivos transdérmicos para a pele. Quando administrados sob a forma de um sistema de administração transdérmico, a administração da dosagem irá ser, evidentemente, contínua em vez de intermitente ao longo do regime de dosagem.

De um modo típico, os compostos são administrados em mistura com diluentes, excipientes ou veículos farmaceuticamente aceitáveis (colectivamente designados aqui como veículos farmacêuticos) seleccionados adequadamente com base na forma de administração pretendida, isto é,

comprimidos, cápsulas, elixires, xaropes orais e semelhantes, sendo consistentes com as práticas farmacêuticas convencionais.

Por exemplo, para a administração por via oral sob a forma de um comprimido ou cápsula, o componente activo do fármaco pode ser combinado com um veículo inerte, farmaceuticamente aceitável, não tóxico, oral, tal como lactose, amido, sacarose, glicose, metil-celulose, estearato de magnésio, fosfato dicálcico, sulfato de cálcio, manitol, sorbitol e semelhantes; para a administração por via oral sob a forma de um líquido, os componentes de fármaco oral podem ser combinados com um qualquer veículo inerte farmaceuticamente aceitável, não tóxico, oral, tal como etanol, glicerol, água e semelhantes. Além do mais, se desejado ou se necessário, também é possível incorporar aglutinantes, agentes desintegrantes ou corantes adequados na mistura. Como aglutinantes adequados refere-se amido, gelatina, açúcares naturais, tais como glicose ou  $\beta$ -lactose, edulcorantes de milho, gomas naturais e sintéticas, tais como acácia, adragante ou alginato de sódio, carboximetil-celulose, polietileno-glicol, ceras e semelhantes. Como lubrificantes utilizados nestas formas de dosagem refere-se oleato de sódio, estearato de sódio, estearato de magnésio, benzoato de sódio, acetato de sódio, cloreto de sódio e semelhantes. Como desintegrantes refere-se, mas sem que isso constitua qualquer limitação, amido, metil-celulose, ágar-ágar, bentonite, goma de xantano e semelhantes.

Os compostos da presente invenção também podem ser administrados sob a forma de sistemas de administração em lipossomas, tais como vesículas unilamelares pequenas,

vesículas unilamelares grandes e vesículas multilamelares. Os lipossomas podem ser formados a partir de diversos fosfolípidos, tais como colesterol, estearilamina ou fosfatidilcolinas.

Os compostos da presente invenção também podem ser acoplados com polímeros solúveis enquanto veículos de fármacos dirigidos. Tais polímeros podem incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, poli-hidroxipropilmetacrilamida-fenol, poli-hidroxietilaspartamida-fenol ou polietileno-óxido-polilisina substituído com resíduos palmitoílo. Além do mais, os compostos da presente invenção podem ser acoplados com uma classe de polímeros biodegradáveis úteis para se atingir uma libertação controlada de um fármaco, por exemplo, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros dos ácidos poliláctico e poliglicólico, poli- $\epsilon$ -caprolactona, ácido poli-hidroxibutírico, poliortoésteres, poliacetais, poli-di-hidropiranos, policianoaclatos e copolímeros de blocos reticulados ou anfipáticos de hidrogéis.

As formas de dosagem (composições farmacêuticas) adequadas para administração podem conter entre cerca de 1 miligrama e cerca de 100 miligramas de ingrediente activo por unidade de dosagem. Nestas composições farmacêuticas o ingrediente activo irá estar normalmente presente numa quantidade compreendida entre cerca de 0,55 e 95% em peso com base no peso total da composição.

As cápsulas de gelatina podem conter o ingrediente activo e os veículos em pó, tais como lactose, amido, derivados de celulose, estearato de magnésio, ácido esteárico e semelhantes. É possível utilizar diluentes semelhantes para a preparação de comprimidos obtidos por

compressão. Tanto os comprimidos como as cápsulas podem ser preparados com produtos de libertação prolongada para proporcionar uma libertação contínua de medicação ao longo de um período de horas. Os comprimidos obtidos por compressão podem ser revestidos com açúcar ou revestidos com película para disfarçar qualquer sabor desagradável e proteger o comprimido da atmosfera, ou entericamente revestidos para a desintegração selectiva no tracto gastrointestinal.

As formas líquidas de dosagem para administração por via oral podem conter agentes corantes ou aromatizantes para aumentar a aceitação por parte dos pacientes.

De um modo geral, como veículos adequados para soluções parentéricas refere-se água, um óleo adequado, soluto salino, dextrose aquosa (glicose) e soluções de açúcar associadas e glicoïds, tais como propileno-glicol ou polietileno-glicol. As soluções para administração por via parentérica podem conter um sal solúvel em água do ingrediente activo, agentes de estabilização adequados e, se necessário, substâncias tampão. Como agentes de estabilização adequados refere-se os agentes anti-oxidantes, tais como bissulfito de sódio, sulfito de sódio ou ácido ascórbico, por si sós ou em combinação. Também é possível utilizar ácido cítrico, e os seus sais, e EDTA de sódio. Além disso, as soluções parentéricas podem conter conservantes, tais como cloreto de benzalcónio, metil-parabeno ou propil-parabeno e clorobutanol.

Como veículos farmacêuticos adequados refere-se os descritos na obra *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, um texto de referência convencional nesta área.

As formas de dosagem farmacêuticas representativas úteis para administração dos compostos da presente invenção podem ser ilustradas pelas a seguir apresentadas.

#### **Cápsulas**

É possível preparar um número elevado de cápsulas unitárias por enchimento de cápsulas duras de gelatina de duas peças convencionais, cada uma das quais com 100 miligramas de ingrediente activo em pó, 150 miligramas de lactose, 50 miligramas de celulose e 6 miligramas de estearato de magnésio.

#### **Cápsulas de gelatina mole**

É possível preparar uma mistura do ingrediente activo num óleo comestível, tal como óleo de soja, óleo de algodão ou azeite, e injectar por meio de uma bomba de deslocamento positivo numa gelatina para formar cápsulas de gelatina mole que contêm 100 miligramas de ingrediente activo. As cápsulas deverão ser lavadas e secas.

#### **Comprimidos**

Os comprimidos podem ser preparados por procedimentos convencionais de um modo tal que a unidade de dosagem possua 100 miligrana de ingrediente activo, 0,2 miligramas de dióxido de silício coloidal, 5 miligramas de estearato de magnésio, 275 miligramas de celulose microcristalina, 11 miligramas de amido e 98,8 miligramas de lactose. É possível aplicar os revestimentos adequados para aumentar o palato ou para atrasar a absorção.

#### **Injectáveis**

É possível preparar uma composição parentérica adequada para administração por injecção agitando 1,5% em peso de ingrediente activo em 100% em volume de propilenoglicol e água. A solução deverá ser tornada isotónica com cloreto de sódio e esterilizada.

### **Suspensão**

É possível preparar uma suspensão aquosa para administração por via oral de um modo tal que cada 5 mL contenham 100 mg de ingrediente activo finamente dividido, 200 mg de carboximetil-celulose de sódio, 5 mg de benzoato de sódio, 1,0 g de solução de sorbitol, U.S.P., e 0,025 mL de vanilina.

No caso dos compostos da presente invenção serem combinados com outros agentes anti-coagulantes, por exemplo, a dosagem diária pode estar compreendida entre cerca de 0,1 e 100 miligramas do composto de fórmula estrutural I e cerca de 1 e 7,5 miligramas do segundo anti-coagulante, por quilograma de massa corporal do paciente. Para uma forma de dosagem em comprimido, os compostos da presente invenção irão estar normalmente presentes numa quantidade compreendida entre cerca de 5 e 10 miligramas por unidade de dosagem e o segundo anti-coagulante numa quantidade compreendida entre cerca de 1 e 5 miligramas por unidade de dosagem.

No caso de se administrar dois ou mais dos referidos segundos agentes terapêuticos com o composto dos exemplos, então a quantidade de cada componente numa dosagem diária típica e numa forma de dosagem típica pode ser reduzida em relação às dosagens usuais do agente quando administrado por si só, uma vez que deverá ser considerado o efeito

aditivo ou sinérgico dos agentes terapêuticos quando administrados em combinação.

Em particular, no caso de serem proporcionados como unidade de dosagem individual, existe potencial para uma interacção química entre os ingredientes activos combinados. Por este motivo, no caso de o composto dos exemplos e um segundo agente terapêutico serem combinados numa unidade de dosagem individual, então são formulados de um modo tal que embora os ingredientes activos sejam combinados numa unidade de dosagem individual, o contacto físico entre os ingredientes activos seja minimizado (isto é, reduzido). Por exemplo, um ingrediente activo pode ser revestido entericamente. Por meio do revestimento entérico de um dos ingredientes activos, é possível minimizar o contacto entre os ingredientes activos combinados e também controlar a libertação de um desses componentes no tracto gastrointestinal, de um modo tal que um desses componentes não seja libertado no estômago mas antes que seja libertado nos intestinos. Um dos ingredientes activos também pode ser revestido com um material que proporcione uma libertação prolongada ao longo do tracto gastrointestinal e que sirva para minimizar o contacto físico entre os ingredientes activos combinados. Além do mais, o componente de libertação prolongada pode ser ainda entericamente revestido de um modo tal que a libertação deste componente ocorra apenas no intestino. Ainda de acordo com uma outra abordagem que envolve a formulação de um produto de combinação, no qual um componente é revestido com um polímero de libertação prolongada e/ou entérico e o outro componente também é revestido com um polímero, tal como hidroxipropilmeti-celulose (HPMC) com uma classificação de

viscosidade baixa ou outros materiais adequados conhecidos na especialidade, para separar ainda mais os componentes activos. O revestimento com polímero serve para formar uma barreira suplementar à interacção com o outro componente.

Esta bem como outras maneiras de minimizar o contacto entre os componentes de produtos de combinação da presente invenção, quer sejam administrados numa forma de dosagem individual quer sejam administrados em formas separadas mas em simultâneo e do mesmo modo, serão evidentes para os especialistas na matéria, após leitura da presente descrição.

Além disso, há determinados compostos aqui descritos que podem ser úteis como metabolitos de outros compostos. Assim sendo, de acordo com uma variante, os compostos podem ser úteis como um composto substancialmente puro, o qual pode então ser incorporado numa composição farmacêutica, ou então podem ser úteis como metabolito, o qual é gerado após a administração do pró-fármaco desse composto. De acordo com uma variante, um composto pode ser útil como metabolito, sendo útil para o tratamento dos distúrbios aqui descritos.

A expressão "substancialmente puro", tal como aqui utilizada, pretende incluir um composto que possui uma pureza superior a cerca de 90% em peso, incluindo cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% e 100%.

Com exemplo, um composto aqui descrito pode ser substancialmente puro quando possui uma pureza superior a cerca de 90% (em peso), em que os restantes 10% ou inferior de material compreende outros metabolitos do composto, um pró-fármaco do composto e/ou impurezas de reacção e/ou impurezas de processamento que surgem durante a sua preparação.

De um modo óbvio, é possível efectuar diversas modificações e variações da presente invenção à luz do descrito antes. Assim sendo, faz-se observar que no âmbito das reivindicações anexas, a invenção pode ser realizada de um modo diferente ao especificamente aqui descrito.

#### **ENSAIOS *IN VIVO* E EFICÁCIA**

Avaliou-se a N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida (também designada como "composto do exemplo 1") nos seguintes ensaios *in vivo*, conforme a seguir se descreve.

#### **Secção 1. O composto do exemplo 1 bloqueou o recrutamento de células mononucleares para a pele, após estímulo intradérmico (ID) com MCP-1 em macacos *Cynomolgus*.**

A injecção intradérmica de MCP-1 provoca a infiltração de células mononucleares no local de injecção. Este modelo foi inicialmente desenvolvido para avaliar o efeito inibitório de antagonistas de CCR2 sobre a infiltração de células mononucleares no tecido da pele injectado com MCP-1 humano. O infiltrado celular pode ser determinado de um modo semi-quantitativo por meio de classificação histológica.

#### **Métodos**

A cada macaco administrou-se uma dose do composto do exemplo 1 ou do seu veículo de controlo (HCl 0,05 N HCl), uma vez ao dia, durante três dias. O composto do exemplo 1

foi administrado por via oral em doses de 0, 5, 10 ou 20 mg/kg a grupos de 4 macacos *Cynomolgus* (2 por sexo por grupo). Imediatamente após a administração da dosagem no dia 3, todos os animais receberam 2 injecções intradérmicas de 10 µg (50 µL/injecção) de MCP-1 humano (R & D Systems) e 2 injecções intradérmicas do seu controlo DPBS (50 µL/injecção), em locais separados no tórax dorsal. Foram obtidas biopsias dermais de todos os locais aproximadamente 18 horas após o estímulo com MCP-1 (ou DPBS). Processou-se as biopsias para a avaliação semi-quantitativa histológica. As secções representativas das amostras de pele foram examinadas por microscopia com luz; foram observadas lesões microscópicas e infiltração celular e as suas incidências foram registadas num quadro.

Para além da análise por biopsia, recolheu-se sangue e avaliou-se quando a contagens completas de sangue e diferenciais celulares. Também foram avaliadas amostras de plasma quanto a concentrações de composto (e metabolito) e amostras de soro para os níveis de MCP-1 sistémico.

### **Resultados**

O recrutamento de células mononucleares para a pele dos animais de controlo tratados com veículo em resposta ao estímulo com MCP-1 foi significativo (resultado médio histológico de 2,0 com um intervalo de 1 a 3, quadro 10). O composto do exemplo 1 a 5, 10 e 20 mg/kg inibiu esta infiltração dérmica de células mononucleares em 75%, 95% e 95%, respectivamente (quadro 10 e figura 20). O composto também bloqueou a infiltração de outros tipos de células, tais como eosinófilos e neutrófilos (quadro 12). As concentrações no plasma do composto do exemplo 1 às 18

horas e a sua relação com os níveis de inibição e com os valores de CI90 de quimiotaxia Cyno encontram-se agrupados no quadro 12. Com base no valor CI50 de  $7,1 \pm 2,7$  nM para o composto do exemplo 1 no ensaio de quimiotaxia cyno, as doses 5, 10 e 20 mg/kg proporcionaram concentrações em plasma livre de 0,8, 2,1 e 4,3 vezes o valor CI90 de quimiotaxia às 18 horas após a dosagem (quadro 12).

**Quadro 12**

Resumo dos efeitos do composto do exemplo 1 na infiltração de células mononucleares e outros tipos de células em resposta ao estímulo com MCP-1 em macacos <i>Cynomolgus</i> <sup>a,b</sup>						
Doses mg/kg	Concentração livre no plasma (nM)	Vezes o CI90 de quimiotaxia	Resultado de células mononucleares (intervalo) (% inibição)	Resultado PMN <sup>c</sup> (intervalo)	Resultado Eos <sup>d</sup> (intervalo)	Resultado de células totais (intervalo)
0	0	0	2,0 (1-3) (0%)	0,3 (0-1)	1,5 (0,5-3)	4,0 (2-6 <sup>e</sup> )
5	99	0,8	0,5 (0-1) (75%)	0,1 (0-0,5)	1,4 (1-2)	2,0 (1-3)
10	248	2,1	0,1 (0-0,5) (95%)	0,1 (0-0,5)	0,8 (0,5-1)	1,0 (0,5-2)
20	512	4,3	0,1 (0-0,5) (95%)	0 (0-0)	0,8 (0,5-1)	0,9 (0,5-1)

Resumo dos efeitos do composto do exemplo 1 na infiltração de células mononucleares e outros tipos de células em resposta ao estímulo com MCP-1 em macacos <i>Cynomolgus</i> <sup>a,b</sup>						
Doses mg/kg	Concentração livre no plasma (nM)	Vezes o CI90 de quimiotaxia	Resultado de células mononucleares (intervalo) (% inibição)	Resultado PMN <sup>c</sup> (intervalo)	Resultado Eos <sup>d</sup> (intervalo)	Resultado de células totais (intervalo)

<sup>a</sup> Foi utilizado um sistema de escalonamento arbitrário entre 0 e 4, em que cada número representa uma designação particular do infiltrado inflamatório, tal como a seguir se descreve: 0, número não significativo de células inflamatórias; 0,5, vestígios; 1, mínimo; 2, suave; 3, moderado; 4, infiltração notória.

<sup>b</sup> Valores médios são uma média de 8 biopsias no local de MCP-1, que representam 2 biopsias separadas a partir de 4 macacos por grupo. Os intervalos representam a variação da média dos resultados histológicos para as 2 biopsias por animal.

<sup>c</sup> PMN designa células polimorfonucleares (neutrófilos).

<sup>d</sup> Eos é uma abreviatura para eosinófilos.

<sup>e</sup> Resultado total é a soma matemática dos valores médios para cada tipo de células que apresentam uma resposta à dose.

A avaliação das alterações nos mediadores inflamatórios no soro revelou um aumento (aproximadamente 3 a 4 vezes) no nível de MCP-1 nos grupos tratados com o composto do exemplo 1 em relação ao veículo de controlo. Além disso, a análise de contagem completa de sangue (CBC) revelou um aumento (~2 vezes) em neutrófilos nos grupos tratados com o composto do exemplo 1, em relação ao veículo de controlo, às 18 horas do dia 4 após os três dias de dosagem.

Para refinar a resposta à dose (concentração) do composto do exemplo 1 de um modo mais facilmente quantificável, utilizou-se murganhos hCCR2 KI para avaliar o efeito do composto do exemplo 1 na infiltração de monócitos/macrófagos num modelo de peritonite induzida com tioglicolato (TG), utilizando uma metodologia com base em citometria de fluxo.

**Secção 2. O composto do exemplo 1 inibiu a infiltração de monócitos/macrófagos num modelo de peritonite induzida com TG de 48 horas em murganhos hCCR2 K1**

Utilizou-se o modelo de peritonite induzida por TG como modelo do recrutamento de monócitos/macrófagos para o local de inflamação. Estudos a decorrer e estudos publicados demonstraram que o recrutamento de monócitos/macrófagos neste modelo é dependente de CCR2. Veja-se, Boring L. et al., Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout-mice. *J Clin Invest.*, 100 (10): 2552-61. (1997); e Kuziel, W.A. et al., Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94 (22): 12053-8 (1997).

**Métodos**

Para o estudo de peritonite induzida por TG de 48 horas, administrou-se uma dose do composto do exemplo 1, duas vezes ao dia, sendo a primeira dose administrada uma hora antes da injecção com TG. Foram obtidas contagens totais de células peritoneais em células isoladas por meio de um contador de células. Também se recolheu sangue em heparina a partir do seio retro-orbital no final de cada estudo para citometria de fluxo e em EDTA para se determinar a concentração de fármaco.

Para a análise citométrica de fluxo, lavou-se células exudadas peritoneais ( $1 \times 10^6$ ) uma vez com tampão FACS (PBS/0,5% de BSA) e colocou-se novamente em suspensão em tampão FACS. Manteve-se as células a incubar com um anticorpo bloqueador de Fc (BD Pharmingen) em gelo durante

15 minutos e depois adicionou-se os anticorpos seguintes (BD Pharmingen): anti-F4/80 conjugado com PE, anti-Ly6C conjugado com FITC e anti-hCCR2 conjugado com Alexa 647. Após 45 minutos em gelo, fixou-se as células por meio de 'BD Cytofix' durante 15 minutos em gelo, lavou-se duas vezes com tampão FACS e colocou-se novamente em suspensão em 200 µL de tampão FACS. Adquiriu-se os eventos celulares (40000) para cada amostra e analisou-se os dados utilizando a aplicação informática FJoJo (TreeStar). Ficou-se um intervalo FSC/SSC para incluir todos os monócitos (SSC baixo, FSC elevado), excluindo os granulócitos da análise. Esta população limitada foi então analisada quanto à expressão de Ly6C (FITC), F4/80 (PE). Determinou-se os números de monócitos/macrófagos peritoneais por multiplicação das contagens totais peritoneais obtidas pelo contador de células com a percentagem de monócitos/macrófagos identificados pelas células F4/80<sup>+</sup> da citometria de fluxo. Analisou-se o significado estatístico das diferenças entre médias utilizando o teste de duas-caudas emparelhado com a significância fixada para valores de p inferiores a 0,05.

### **Resultados**

Avaliou-se o composto do exemplo 1 num modelo de peritonite induzida por TG em murganhos hCCR2 KI para se determinar o seu valor CE50 na inibição da infiltração de monócitos/macrófagos. Administrou-se aos murganhos tioglicolato e administrou-se por via oral o composto do exemplo 1 a 1, 25 ou 100 mg/kg BID. Quarenta e oito horas após o tratamento com TG, obtiveram-se os fluidos

peritoneais para a análise do infiltrado celular por citometria de fluxo.

Para se distinguir entre os monócitos/macrófagos recrutados *versus* macrófagos e granulócitos residentes, manchou-se os marcadores de superfície de monócitos/macrófagos F4/80 e Ly6C para se definir os monócitos/macrófagos recrutados. Observou-se uma inibição dependente da dose na infiltração de monócitos/macrófagos (figura 21). As doses de 1, 25 e 100 mg/kg proporcionaram uma inibição de 24%, 74% e 78%, respectivamente. Em três estudos separados com doses múltiplas, os valores médios de CE50 para a inibição da infiltração de monócitos/macrófagos por esta análise foram estimados como sendo 3,9 nM.

Para se avaliar o nível *in vivo* de ocupação do receptor pelo composto do exemplo 1 no modelo de peritonite induzida por tioglicolato de 48 horas em murganhos hCCR2 KI, foram determinados os níveis no plasma de composto do exemplo 1 e de MCP-1 de murganho. A precaução com esta estimativa é que apenas o CCR2 e o seu ligando principal, MCP-1, foram tomados em consideração. A ocupação do receptor de um ligando na presença de um inibidor competitivo é definida pela equação de Gaddum:

$$\frac{[RL]}{[R]} = \frac{I}{I + (K_d/[L]) (1 + [I]/K_i)}$$

Uma vez que o composto do exemplo 1 é um inibidor competitivo da ligação de MCP-1 a CCR2, é possível determinar as quantidades de complexo MCP-1 de murganho/receptor CCR2 e de complexo do composto do exemplo 1/receptor CCR2 utilizando os níveis no soro de MCP-1 de murganho e do compostos do exemplo 1 não ligados à proteína no plasma. O valor de  $K_d$  para a ligação de MCP-1 de

murganho a hCCR2 é de  $0,91 \pm 0,08$  nM ( $n=8$ ), o qual foi determinado em experiências de ligação competitiva de ligando frio, utilizando  $^{125}\text{I}$ -MCP-1 humano. O valor médio de  $K_i$  para a ligação do composto do exemplo 1 a hCCR2 é de 1,3 nM. A fracção de complexos de MCP-1 de murganho/receptor CCR2 é determinada utilizando a forma da equação descrita antes. Para se determinar a fracção de complexos do composto do exemplo 1/CCR2 define-se novamente a equação com:

$$\frac{[R]}{[R]} = \frac{1}{1 + (K_i/[I])(1 + [L]/K_d)}$$

Por último, a quantidade de CCR2 livre é determinada a partir de:

$$[\text{CCR2}]_{\text{total}} = [\text{CCR2}]_{\text{livre}} + [\text{MCP-1 de murganho/CCR2}] + [\text{composto do exemplo 1/CCR2}]$$

Conforme ilustrado no quadro 13, a percentagem de inibição da infiltração de monócitos/macrófagos no peritoneu após 48 horas reflecte a percentagem do complexo do composto do exemplo 1/receptor CCR2.

#### QUADRO 13

Determinação da ocupação do receptor *in vivo* do composto do exemplo 1 em sangue de murganhos hCCR2 KI no modelo de peritonite induzida por TG após 48 horas

Dose (mg/kg)	Concentração de MCP-1 de morganho no plasma (nM)	Concentração dos compostos dos exemplos 1 livre no plasma (nM) (vezes C190 para a ligação a CCR2)	% de MCP-1 de morganho ligada a CCR2	% de composto do exemplo 1 ligada a CCR2	% de CCR2 livre	% de inibição da infiltração de monócitos/macrófagos <sup>a</sup>
100	0,015	53 (1,8)	0,04	97,6	2,4	78
25	0,017	14 (0,5)	0,16	91,2	8,6	74
1	0,005	1,4 (0,05)	0,26	51,4	48,3	24
0 (veículo)	0	0	0	0	100	0

### Secção 3. Estudos de eficácia crónica

#### Métodos de encefalomielite auto-imune experimental (EAE)

Para se avaliar o efeito do composto do exemplo 1 em modelos crónicos de doenças, utilizou-se o modelo EAE de esclerose múltipla em morganhos hCCR2 KI. Para se estudar o efeito do composto do exemplo 1 no modelo de EAE, foram utilizados 10 morganhos por grupo. No dia 0, imunizou-se por via subcutânea morganhos hCCR2 KI com um total de 200 µL de 300 µg de glicoproteína oligodendrócita de mielina (MOG) 35-55 (Genemed Synthesis), misturada a 1:1 com 300 µg de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra) (Becton-Dickinson) em adjuvante incompleto de Freund (IFA) (Sigma-Aldrich). No dia 0 (duas horas após imunização) e no dia 2, injectou-se por via intraperitoneal os morganhos com 100 µL de 400 ng de toxina de tosse convulsa. A determinação dos resultados clínicos teve início no dia 10, manteve-se três vezes por semana ao longo do estudo e teve por base uma escala de 0 a 5: 0, sem sinais da doença; 0,5, fraqueza parcial da cauda; 1, claudicação da cauda ou marcha cambaleante com tonicidade na cauda; 1,5, marcha cambaleante com fraqueza

parcial na cauda; 2, marcha cambaleante com claudicação da cauda (ataxia); 2,5 (ataxia com paralisia parcial dos membros); 3, paralisia total de um membro; 3,5, paralisia total de um membro com paralisia parcial de um segundo membro; 4, paralisia total dos dois membros; 4,5, moribundo; 5, morte. A dosagem oral do composto do exemplo 1 a 25 mg/kg e 55 mg/kg (BID) teve início no dia 1.

### **Resultados**

O composto do exemplo 1, para ambas as doses, reduziu a área sob a curva (ASC) do resultado clínico em 49% ( $p < 0,05$ ) (figura 22). O valor de CI50 é de 3,7 nM para o composto do exemplo 1 na ligação de  $^{125}\text{I}$ -MCP-1 de murganho a células que expressam hCCR2, hPBMC (imitando as definições de hCCR2 KI). Com base neste valor de CI50, as doses de 25 e 55 mg/kg proporcionaram uma concentração em plasma livre 1 a 3 vezes a ligação CI90. A avaliação histológica da medula espinal no dia 22 não demonstrou uma diferença significativa em infiltrados celulares inflamatórios entre os murganhos tratados com o composto do exemplo 1 versus veículo. Observou-se um marcado infiltrado de neutrófilos nos murganhos tratados com o composto.

**REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO**

A presente listagem de referências citadas pela requerente é apresentada meramente por razões de conveniência para o leitor. Não faz parte da patente de invenção europeia. Embora se tenha tomado todo o cuidado durante a compilação das referências, não é possível excluir a existência de erros ou omissões, pelos quais o EPO não assume nenhuma responsabilidade.

**Patentes de invenção citadas na descrição**

- US 0069123 A **[0007]**
- WO 2006013427 A2 **[0009]**
- WO 110376 A **[0023]**
- WO 9946991 A **[0025]**
- WO 2005021500 A1 **[0029]**
- WO 2005021500 A **[0062] [0155] [0165] [0184] [0206] [0223]**
- US 7163937 B **[0062] [0206]**
- WO 2004098516 A **[0176] [0177]**
- US 6835841 B **[0176]**
- WO 2004110993 A **[0177]**
- US 6361972 B **[0237]**
- US 6410266 B **[0237]**

**Literatura não relacionada com patentes, citada na descrição**

- **Charo ; Rasonhoff.** *New Eng. J. Med.*, 2006, vol. 354, 610-621 **[0003] [0006]**
- **Luster.** *New Eng. J. Med.*, 1998, vol. 338, 436-445 **[0003] [0004]**
- **Rollins.** *Blood*, 1997, vol. 90, 909-928 **[0003]**
- **Horuk.** *Trends Pharm. Sci.*, 1994, vol. 15, 159-165 **[0004]**

Con formato: Inglês (Estados Unidos)

- **Zlotnik ; Oshie.** *Immunity*, 2000, vol. 12, 121 [0004]
- **Ben-Barruch.** *Cell*, 1993, vol. 72, 415-425 [0004]
- **Charo et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 2752-2756 [0004]
- **Luster.** *New Eng. J. Med.*, 1998, vol. 338, 436-445 [0004]
- **Combadiere et al.** *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 16491-16494 [0004]
- **Power et al.** *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 19495-19500 [0004]
- **Sanson et al.** *Biochemistry*, 1996, vol. 35, 3362-3367 [0004]
- **Baba et al.** *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, 14893-14898 [0004]
- **Yoshie et al.** *J. Leukoc. Biol.*, 1997, vol. 62, 634-644 [0004]
- **Napolitano et al.** *J. Immunol.*, 1996, vol. 157, 2759-2763 [0004]
- **Bonini et al.** *DNA and Cell Biol.*, 1997, vol. 16, 1249-1256 [0004]
- **Schweickert et al.** *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, 90550 [0004]
- **Wells ; Schwartz.** *Curr. Opin. Biotech.*, 1997, vol. 8, 741-748 [0005]
- **Z. Gao ; W. A. Metz.** *Chem. Rev.*, 2003, vol. 103, 3733 [0006]
- **P. H. Carter.** *Current Opinion in Chemical Biology*, 2002, vol. 6, 510 [0006]
- **Trivedi et al.** *Ann. Reports Med. Chem.*, 2000, vol. 35, 191 [0006]
- **Saunders ; Tarby.** *Drug Disc. Today*, 1999, vol. 4, 80 [0006]

**Con formato:** Español (España, internacional)

**Con formato:** Inglés (Estados Unidos)

- **Prcmack ; Schall.** *Nature Medicine*, 1996, vol. 2, 1174 [0006]
- **Bao Lu et al.** *J. Exp. Med.*, 1998, vol. 187, 601 [0006] [0013]
- **William A. Kuziel et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, 12053 [0006]
- **Takao Kurihara et al.** *J. Exp. Med.*, 1997, vol. 186, 1757 [0006]
- **M. Feria ; F. Díaz-González.** *Exp. Opin. Ther. Patents*, 2006, vol. 16, 49 [0006]
- **J. Dawson ; W. Miltz ; C. Wiessner.** *C. Exp. Opin. Ther. Targets*, 2003, vol. 7, 35 [0006]
- **Alisa Koch et al.** *J. Clin. Invest.*, 1992, vol. 90, 772-779 [0007]
- **Sawsan Youssef et al.** *J. Clin. Invest.*, 2000, vol. 106, 361 [0007]
- **Hiroomi Ogata et al.** *J. Pathol.*, 1997, vol. 182, 106 [0007]
- **Ralph C. Schimmer et al.** *J. Immunol.*, 1998, vol. 160, 1466 [0007]
- **Jiang-Hong Gong et al.** *J. Exp. Med.*, 1997, vol. 186, 131 [0007]
- **C. M. Brodmerkel et al.** *J. Immunol.*, 2005, vol. 175, 5370 [0007] [0011]
- **H. Bruhl et al.** *J. Immunol.*, 2004, vol. 172, 890 [0007]
- **M. P. Quinones et al.** *J. Clin. Invest.*, 2004, vol. 113, 856 [0007]
- **M. P. Quinones et al.** *J. Mol. Med.*, 2006, vol. 84, 503 [0007]
- **Abdolreza Rezaie-Majd et al.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2002, vol. 22, 1194-1199 [0008]

Con formato: Español (España, internacional)

Con formato: Español (España, internacional)

Con formato: Español (España, internacional)

- **Long Gu et al.** *Mol. Cell*, 1998, vol. 2, 275 **[0008]**
- **Jennifa Gosling et al.** *J. Clin. Invest.*, 1999, vol. 103, 773 **[0008]**
- **Landin Boring et al.** *Nature*, 1998, vol. 394, 894 **[0008]**
- **T. C. Dawson et al.** *Atherosclerosis*, 1999, vol. 143, 205 **[0008]**
- **W. Ni et al.** *Circulation*, 2001, vol. 103, 2096–2101 **[0008]**
- **J. Guo et al.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2003, vol. 23, 447 **[0008]**
- **J. Guo et al.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2005, vol. 25, 1014 **[0008]**
- **Eckel et al.** *Lancet*, 2005, vol. 365, 1415 **[0009]**
- **Chen.** *Pharmacological Research*, 2006, vol. 53, 469 **[0009]**
- **Neels ; Olefsky.** *J. Clin. Invest.*, 2006, vol. 116, 33 **[0009]**
- **Danadona ; Aljada.** *Am J Cardiol.*, 2002, vol. 90, 27G–33G **[0009]**
- **Pickup ; Crook.** *Diabetologia*, 1998, vol. 41, 1241 **[0009]**
- **Gerhardt.** *Mol. Cell. Endocrinology*, 2001, vol. 175, 81 **[0009]**
- **P. Sartipy ; D. Loskutoff.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96, 6902 **[0009]**
- **J. M. Bruun et al.** *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2005, vol. 90, 2282 **[0009]**
- **Sartipy ; Loskutoff.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, vol. 100, 7265 **[0009]**
- **H. Xu et al.** *J. Clin. Invest.*, 2003, vol. 112, 1821 **[0009]**
- **H. Kanda et al.** *J. Clin. Invest.*, 2006, vol. 116, 1494 **[0009]**

**Con formato:** Inglés (Estados Unidos)

**Con formato:** Inglés (Estados Unidos)

**Con formato:** Inglés (Estados Unidos)

**Con formato:** Español (España, internacional)

**Con formato:** Inglés (Estados Unidos)

**Con formato:** Inglés (Estados Unidos)

**Con formato:** Español (España, internacional)

- **N. Kamei.** *J. Biol. Chem.*, 2006, vol. 281, 26602 **[0009]**
- **C. L. Tsou et al.** *J. Clin. Invest.*, 2007, vol. 117, 902 **[0009]**
- **F. Tacke et al.** *J. Clin. Invest.*, 2007, vol. 117, 185 **[0009]**
- **C. N. Lumeng et al.** *Diabetes*, 2007, vol. 56, 16 **[0009]**
- **C. N. Lumeng et al.** *J. Clin. Invest.*, 2007, vol. 117, 175 **[0009]**
- **S. P. Weisberg et al.** *J. Clin. Invest.*, 2006, vol. 776, 115 **[0009]**
- **S. P. Weisberg et al.** *J. Clin. Invest.*, 2006, vol. 116, 115 **[0009]**
- **E Bush et al.** *Hypertension*, 2000, vol. 36, 360 **[0010]**
- **M Ishibashi et al.** *Circ. Res.*, 2004, vol. 94, 1203 **[0010]**
- **Carla Larlori et al.** *J. Neuroimmunol.*, 2002, vol. 123, 170-179 **[0011]**
- **K. J. Kennedy et al.** *J. Neuroimmunol.*, 1998, vol. 92, 98 **[0011]**
- **B. T. Fife et al.** *J. Exp. Med.*, 2000, vol. 192, 899 **[0011]**
- **L. Izikson et al.** *J. Exp. Med.*, 2000, vol. 192, 1075 **[0011]**
- **S. Gaupp et al.** *Am. J. Pathol.*, 2003, vol. 162, 139 **[0011]**
- **Martine Reynaud-Gaubert et al.** *J. of Heart and Lung Transplant.*, 2002, vol. 21, 721-730 **[0012]**
- **John Belperio et al.** *J. Clin. Invest.*, 2001, vol. 108, 547-556 **[0012]**
- **I Lee et al.** *J Immunol*, 2003, vol. , 171, 6929 **[0012]**
- **R Abdi et al.** *J Immunol*, 2004, vol. , 172, 767 **[0012]**

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

- **K Horiguchi et al.** *J Heart Lung Transplant.*, 2002, vol. 21, 1090 [0012]
- **A Saiura et al.** *Artherioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, vol. 24, 1886 [0012]
- **H Tatewaki et al.** *J Vasc Surg.*, 2007, vol. 45, 1236 [0012]
- **Jose-Angel Gonzalo et al.** *J. Exp. Med.*, 1998, vol. 188, 157 [0013]
- **Nicholas W. Lukacs et al.** *J. Immunol.*, 1997, vol. 158, 4398 [0013]
- **Clare M. Lloyd et al.** *J. Exp. Med.*, 1997, vol. 185, 1371 [0014]
- **Gregory H. Tesch et al.** *J. Clin. Invest.*, 1999, vol. 103, 73 [0014]
- **G. Perez de Lema et al.** *J. Am. Soc. Neph.*, 2005, vol. 16, 3592 [0015]
- **S. Shimizu et al.** *Rheumatology (Oxford)*, 2004, vol. , 43, 1121 [0015]
- **Gregory H. Tesch et al.** *J. Exp. Med.*, 1999, vol. 190, 1813 [0015]
- **H. Hasegawa et al.** *Arthritis & Rheumatism*, 2003, vol. 48, 2555 [0015]
- **S. J. Connor et al.** *Gut*, 2004, vol. 53, 1287 [0016]
- **Pietro G. Andres et al.** *J. Immunol.*, 2000, vol. 164, 6303 [0016]
- **H. Tokuyama et al.** *Int. Immunol.*, 2005, vol. 17, 1023 [0016]
- **W. I. Khan et al.** *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2006, vol. 291, G803 [0016]
- **Michael L. Jones et al.** *J. Immunol.*, 1992, vol. 149, 2147 [0019]

Con formato: Español (España, internacional)

- **M. J. Craig ; R. D. Loberg.** *Cancer Metastasis Rev.*, 2006, vol. 25, 611 [0020]
- **I. Conti ; B. Rollins.** *Seminars in Cancer Biology*, 2004, vol. 14, 149 [0020]
- **R. Giles ; R. D. Loberg.** *Curr. Cancer Drug Targets*, 2006, vol. , 6, 659 [0020]
- **Rosalba Salcedo et al.** *Blood*, 2000, vol. 96, 34-40 [0020]
- **Y. Lu et al.** *J. Cell. Biochem.*, 2007, vol. 101, 676 [0020]
- **Y. Lu.** *Prostate*, 2006, vol. 66, 1311 [0020]
- **Y. Lu.** *Cancer Res.*, 2007, vol. 67, 3646 [0020]
- **Merce Roque et al.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2002, vol. 22, 554 [0021]
- **A. Schober et al.** *Circ. Res.*, 2004, vol. 95, 1125 [0021]
- **W. J. Kim et al.** *Biochem Biophys Res Commun.*, 2003, vol. 310, 936 [0021]
- **K. Egashira et al.** *Circ. Res.*, 2002, vol. 90, 1167 [0021]
- **C. Horvath et al.** *Circ. Res.*, 2002, vol. 90, 488 [0021]
- **J. S. King et al.** *J. Neuroimmunol.*, 1994, vol. 56, 127 [0022]
- **Joan W. Berman et al.** *J. Immunol.*, 1996, vol. 156, 3017 [0022]
- **O. B. Dimitrijevic et al.** *Stroke*, 2007, vol. 38, 1345 [0022]
- **P. M. Hughes et al.** *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2002, vol. 22, 308 [0022]
- **Liu T ; van Rooijen N ; Tracey DJ.** *Pain*, 2000, vol. 86, 25 [0023]
- **C. Abbadie et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2003, vol. 100, 7947 [0023]

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

- **Mary E. Russell et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6086 **[0025]**
- **Harry N. Antoniades et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 5371 **[0025]**
- **M. Deleuran et al.** *J. Dermatol. Sci.*, 1996, vol. 13, 228 **[0025]**
- **R. Gillitzer et al.** *J. Invest. Dermatol.*, 1993, vol. 101, 127 **[0025]**
- **C. Vestergaard et al.** *Acta Derm. Venerol.*, 2004, vol. 84, 353 **[0025]**
- **P. Spagnolo et al.** *Am J Respir Crit Care Med.*, 2003, vol. 168, 1162 **[0026]**
- **B. J. Doranz et al.** *Cell*, 1996, vol. 85, 1149 **[0027]**
- **Ruth I. Connor et al.** *J. Exp. Med.*, 1997, vol. 185, 621 **[0027]**
- **Michael W. Smith et al.** *Science*, 1997, vol. 277, 959 **[0027]**
- **Luster.** *New Eng. J. Med.*, 1998, vol. 338, 436-445 **[0028]**
- **G.K. Dresser ; J.D. Spence ; D.G. Bailey.** *Clin. Pharmacokinet.*, 2000, vol. 38, 41-57 **[0030]**
- **J.W. Mullin ; J. Nyvlt.** Programmed cooling of batch crystallizers. *Chemical Engineering Science*, 1971, vol. 26, 369-377 **[0132]**
- **Otwinowski, Z. ; Minor, W.** *Macromolecular Crystallography*. Academic, 1997, vol. 276, 307-326 **[0187]**
- **Yoshimura et al.** *J. Immunol.*, 1990, vol. 145, 292 **[0207]** **[0225]**
- **Weiner et al.** *J. Immunol. Methods*, 1980, vol. 36, 89 **[0227]**

**Con formato:** Inglés (Estados Unidos)**Con formato:** Francés (Francia)**Con formato:** Español (España, internacional)

- **Sullivan et al.** *Methods Mol. Biol.*, 1999, vol. 114, 125-133 **[0228]**
- **Weiner et al.** *J. Immunol. Methods*, 1980, vol. 36, 89-97 **[0230]**
- **Boring L. et al.** Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout-mice. *J Clin Invest.*, 1997, vol. 100 (10), 2552-61 **[0294]**
- **Kuziel, W.A. et al.** Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1997, vol. 94 (22), 12053-8 **[0294]**

REIVINDICAÇÕES

1. Composto que é N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.
2. Composto de acordo com a reivindicação 1, o qual é uma forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexil)-acetamida, ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.
3. Forma cristalina de acordo com as reivindicações 1 a 2, **caracterizada pelo facto de** os parâmetros da célula unitária serem praticamente iguais aos seguintes:  
dimensões da célula:  
 $a = 18,7240$  (4)  
 $b = 8,0171$  (2)  
 $c = 19,6568$  (5)  
 $\alpha = 90$   
 $\beta = 114,935$  (2)  
 $\gamma = 90$   
 $V (\text{\AA}^3) = 2675,7$  (1)  
grupo espacial  $P2_12_12_1$   
moléculas/célula unitária 2  
em que o referido cristal se encontra a uma temperatura de cerca de  $+22^\circ\text{C}$  (TA).

4. Forma cristalina de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 3, **caracterizada por um** padrão de

difracção do raio-X no pó que compreende três ou mais dos valores  $2\theta$  (CuK $\alpha$   $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ) seleccionados entre 5,5, 9,1, 12,1, 14,0 e 19,2, a uma temperatura de cerca de 22°C.

5. Forma cristalina de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 4, **caracterizada por um** padrão de difracção do raio-X no pó que compreende quatro ou mais dos valores  $2\theta$  (CuK $\alpha$   $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ) seleccionados entre 5,5, 9,1, 12,1, 14,0 e 19,2, a uma temperatura de cerca de 22°C.

6. Forma cristalina de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 5, **caracterizado pelo facto de** possuir as coordenadas atómicas fraccionais praticamente conforme apresentadas no quadro 3.

7. Forma cristalina de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 6, que possui um padrão de difracção de raio-X no pó praticamente de acordo com a figura 2.

8. Composição farmacêutica que compreende um composto de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 7 e um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável.

9. Composto de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 8, utilizável para o tratamento de uma doença num mamífero, em que a doença é seleccionada entre diabetes, obesidade, síndrome metabólica, apoplexia, dor neuropática, cardiomiopatia isquémica, psoriase, hipertensão, escleroderma, osteoartrite, aneurisma, febre, doença cardiovascular, doença de Crohn, insuficiência cardíaca congestiva, doenças auto-imunes, infecção por VIH, demência

associada ao VIH, psoriase, fibrose pulmonar idiopática, arteriosclerose após transplante, trauma cerebral induzido física ou quimicamente, doença inflamatória do intestino, alveolite, colite, lúpus sistémico eritematoso, nefrite do soro nefrotóxica, glomerulonefrite, asma, esclerose múltipla, aterosclerose, vasculite, placas vulneráveis, artrite reumatóide, restenose, hiperplasia neointimal venosa, hiperplasia neointimal de enxerto de diálise, hiperplasia intimal de derivação arterio-venosa, transplante de órgãos, nefropatia de aloenxerto crónica e cancro.

10. Composto de acordo com a reivindicação 9, em que a doença é seleccionada entre diabetes, obesidade, doença de Crohn, lúpus sistémico eritematoso, glomerulonefrite, esclerose múltipla, aterosclerose, restenose e transplante de órgãos.

11. Composto de acordo com uma qualquer das reivindicações 9 a 10, em que a doença é seleccionada entre esclerose múltipla, aterosclerose, doença de Crohn e diabetes.

12. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 8, a qual comprehende ainda um ou vários outros ingredientes activos.

FIG. 1

**Padrões no pó experimentais e simulados de N-((1R,2s,5r)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometilo)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexilo)-cetamida, hemi-hidrato, Forma H0,5-4**

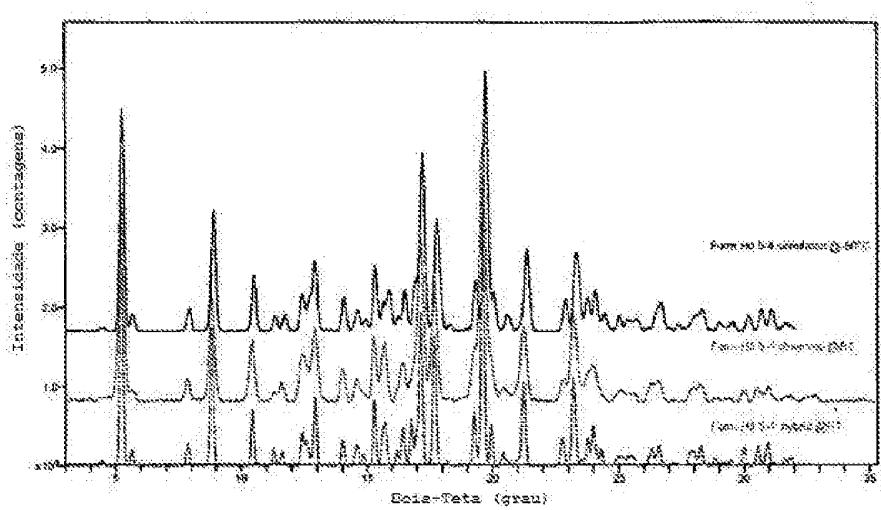


FIG. 2

Padrões no pó experimentais e simulados de N-((1R, 2S, 5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometilo)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexilo)-acetamida, base livre, Forma N-2

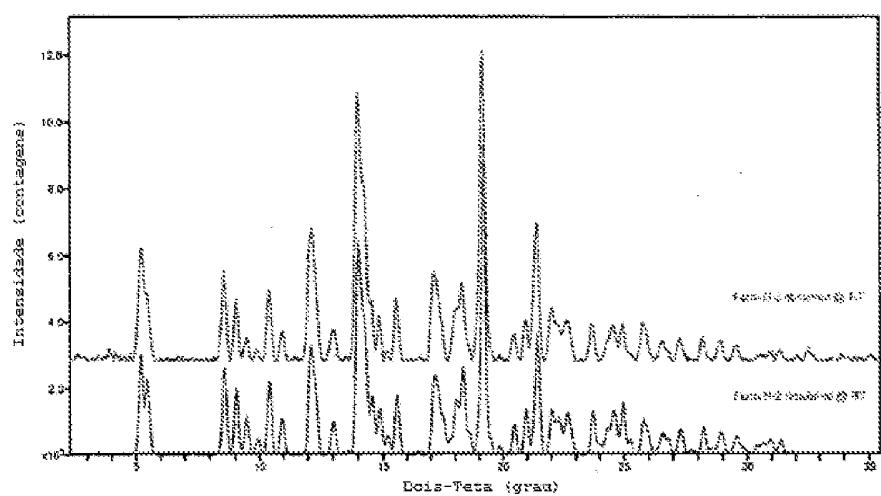


FIG. 3

**Padrões no pó experimentais e simulados de N-((1R, 2S, 5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(trifluorometilo)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexilo)-acetamida, 1,75 moles H<sub>2</sub>O, Forma H1, 75-5**

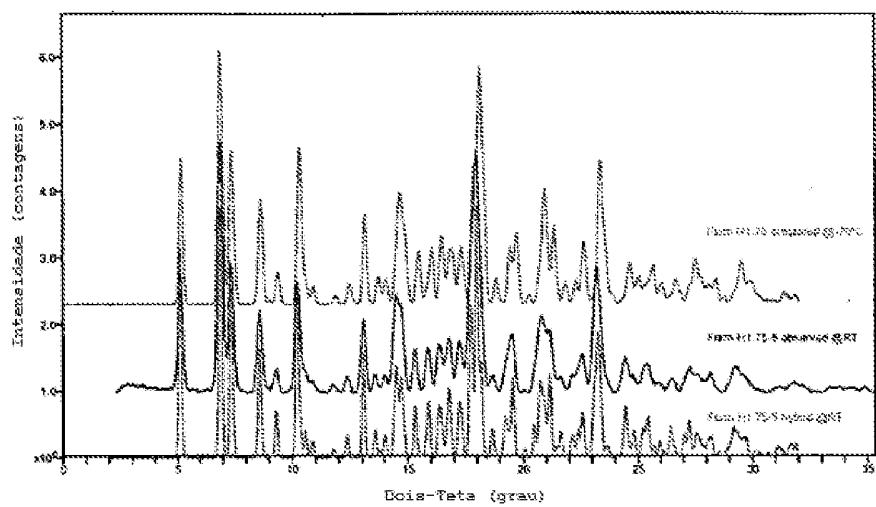


FIG. 4

Padrões no pó experimentais e simulados de N-((1R, 2S, 5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometilo)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexilo)-acetamida, solvato de mono-ethanol, Forma E-1

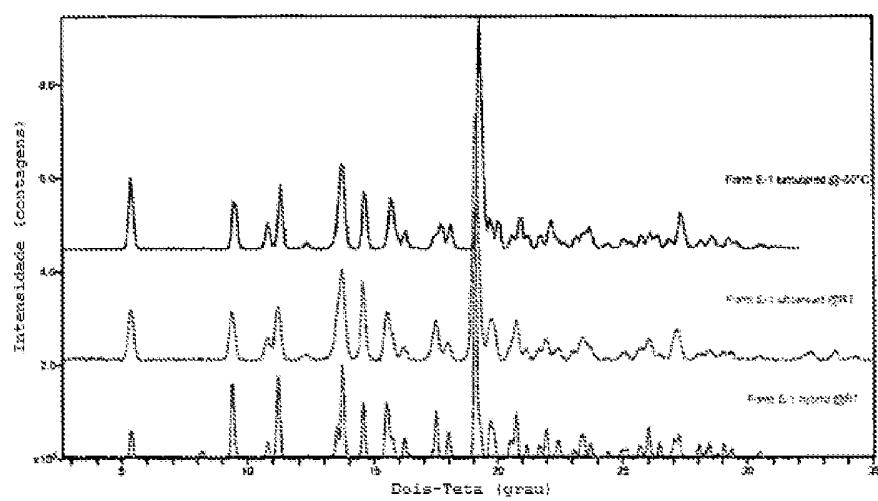


FIG. 5

Padrões no pó experimentais e simulados de N-((1R, 2S, 5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometilo)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexilo)-acetamida, solvato do ácido mono-acético, Forma HAC-1

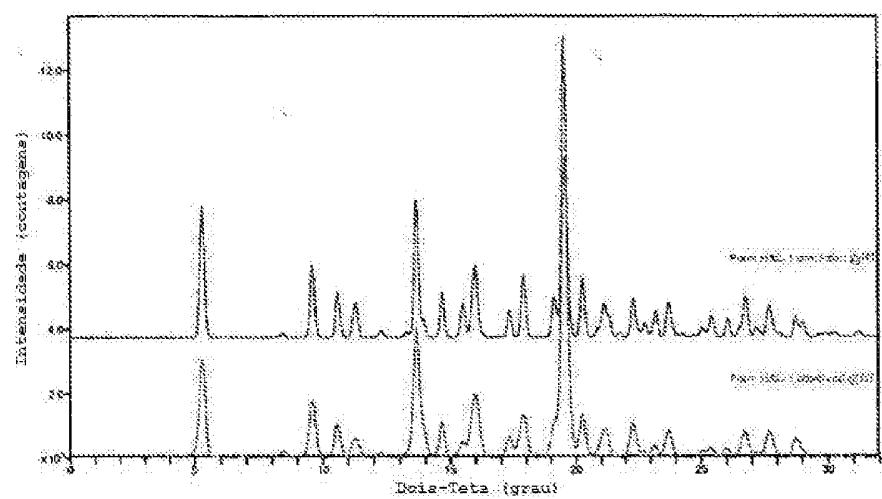


FIG. 6

Padrões no pó experimentais e simulados de N-((1R, 2S, 5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometilo)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexilo)-acetamida, solvato do ácido mono-R-propileno-glicol, Forma RPG-3

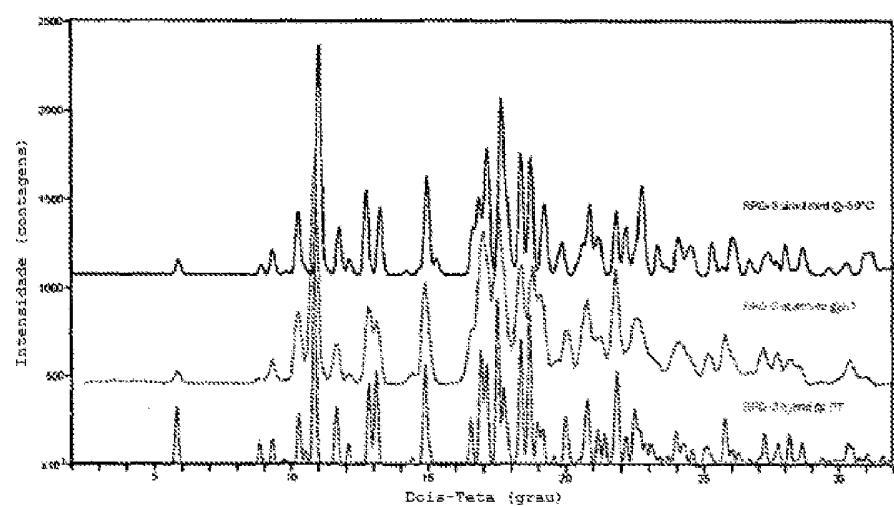


FIG. 7

DSC de N-((1R, 2S, 5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometilo)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexilo)-acetamida, hemi-hidrato, Forma H0,5-4

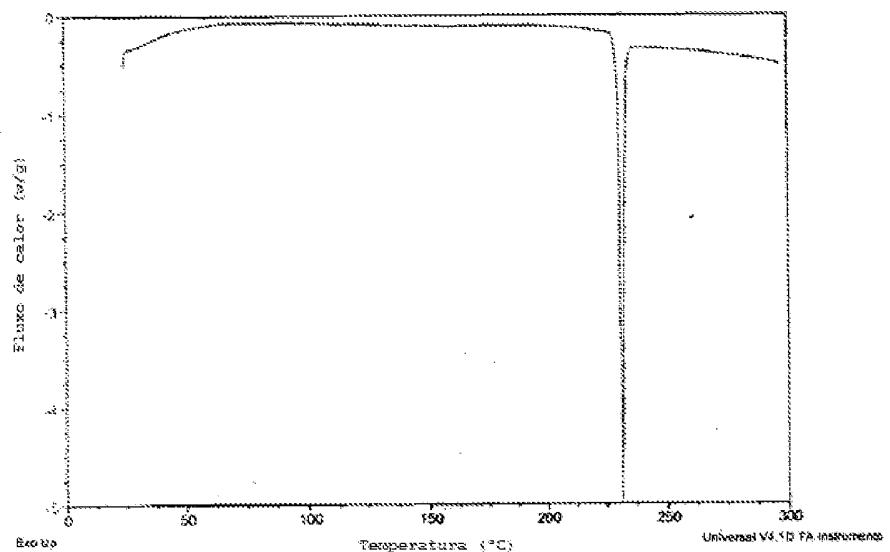


FIG. 8

TGA de N-((1R, 2S, 5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometilo)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexilo)-acetamida, hemi-hidrato, Forma H0, 5-4

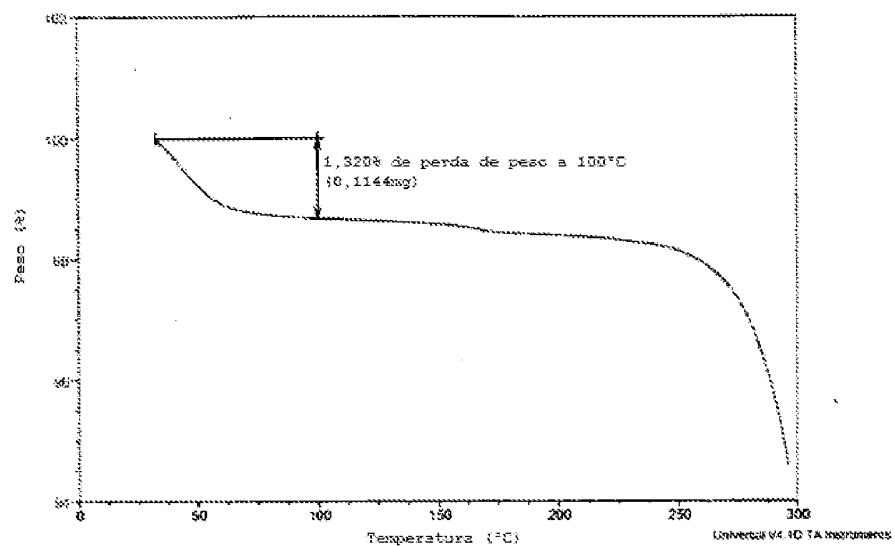


FIG. 9

DSC de N-((1R, 2S, 5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometilo)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexilo)-acetamida, base livre, Forma N-2

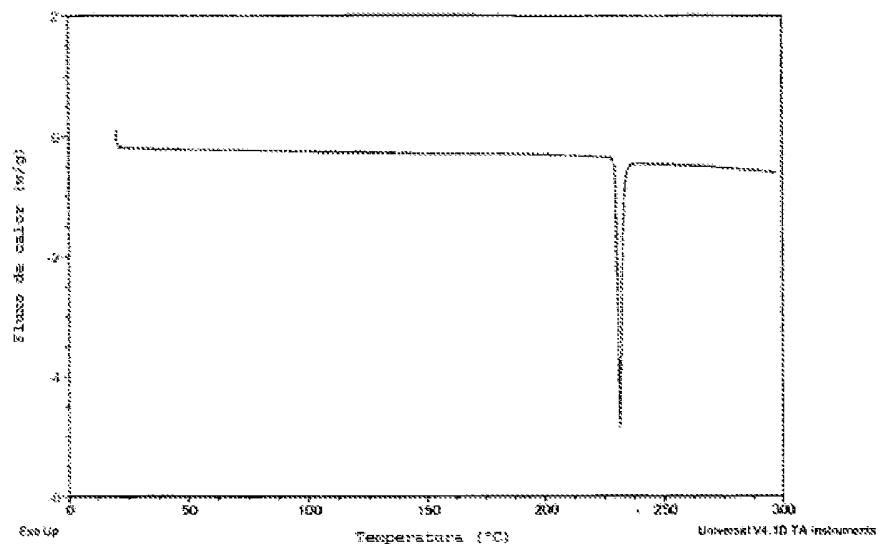


FIG. 10

TGA de N-((1R, 2S, 5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometilo)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexilo)-acetamida, base livre, Forma N-2

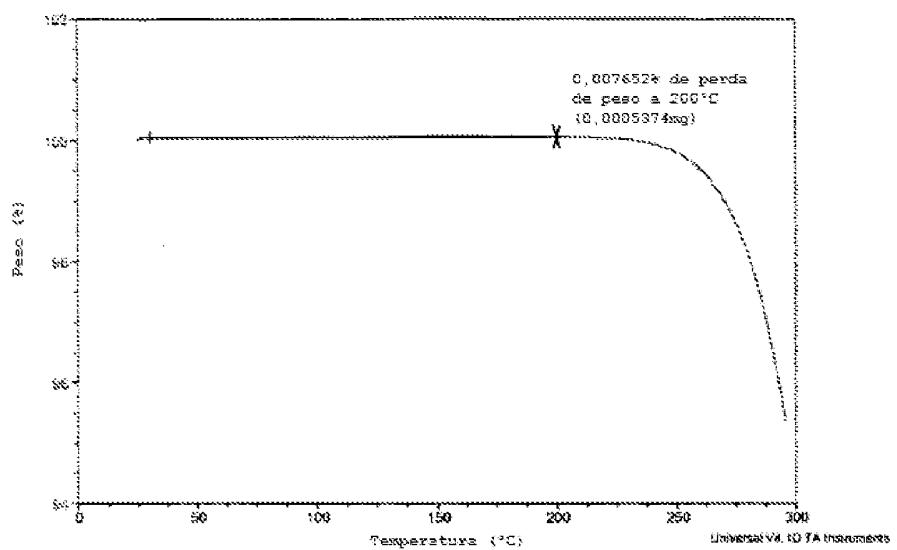


FIG. 11

Isotérmica de adsorção/dessorção de vapor de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometilo)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexilo)-acetamida, base livre, Forma N-2 a 25°C

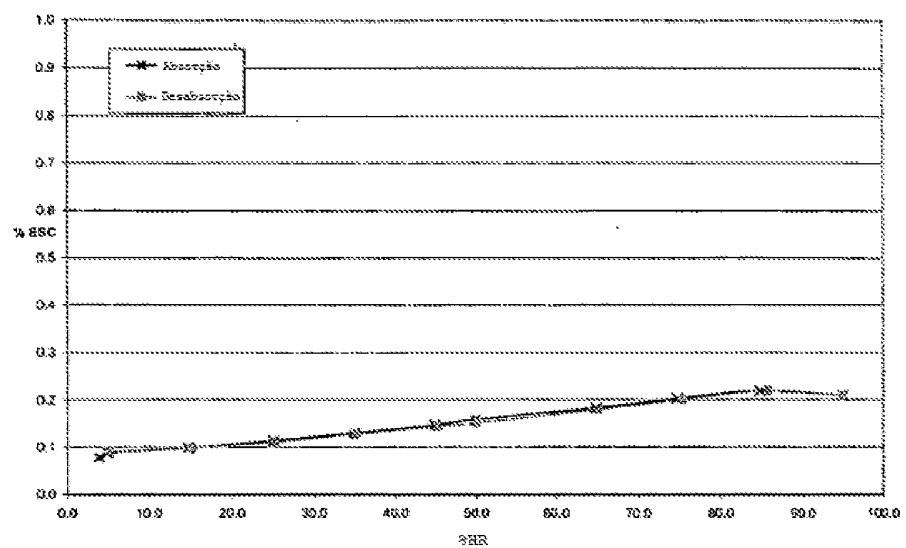


FIG. 12

DSC de N-((1R, 2S, 5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometilo)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexilo)-acetamida, 1,75 moles de H<sub>2</sub>O, Forma H1, 75-5

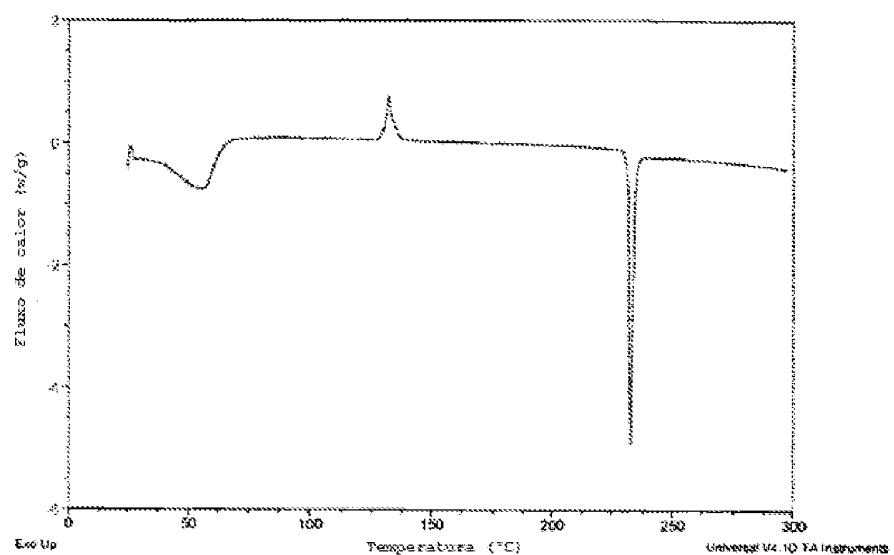


FIG. 13

TGA de N-((1R, 2S, 5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometilo)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexilo)-acetamida, 1,75 moles de H<sub>2</sub>O, Forma H1, 75-5

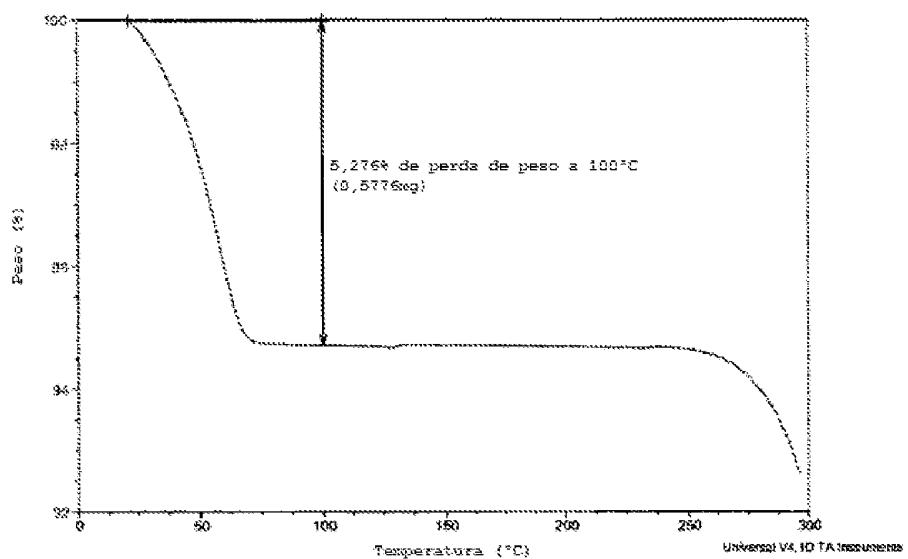


FIG. 14

DSC de N-((1R, 2S, 5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometilo)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexilo)-acetamida, solvato de ácido mono-acético,  
Forma HAC-1

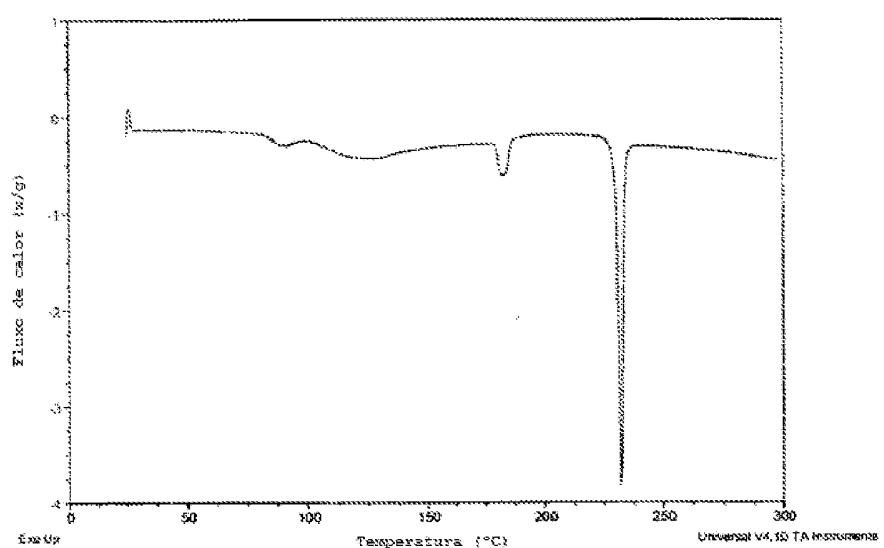


FIG. 15

TGA de N-((1R, 2S, 5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometilo)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexilo)-acetamida, solvato de ácido mono-acético,  
Forma HAC-1

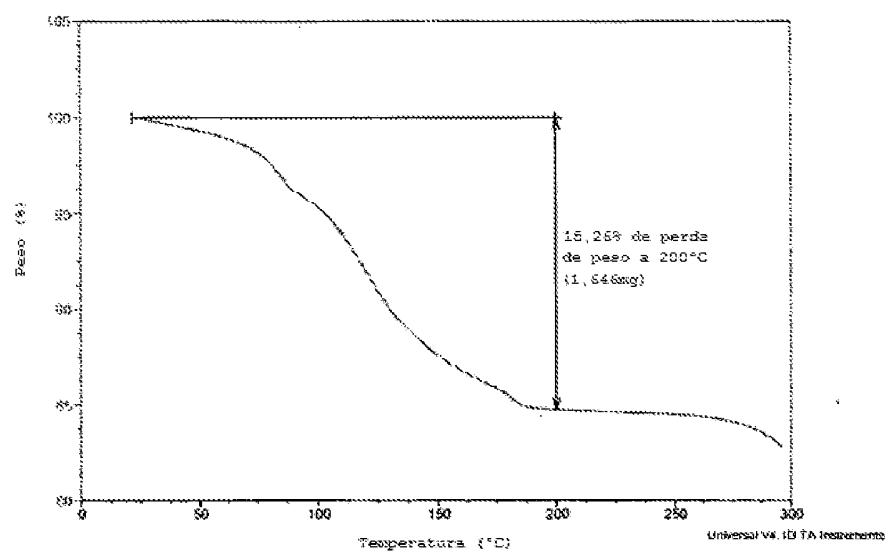


FIG. 16

DSC de N-((1R, 2S, 5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometilo)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexilo)-acetamida, solvato de mono-etanol, Forma E-1

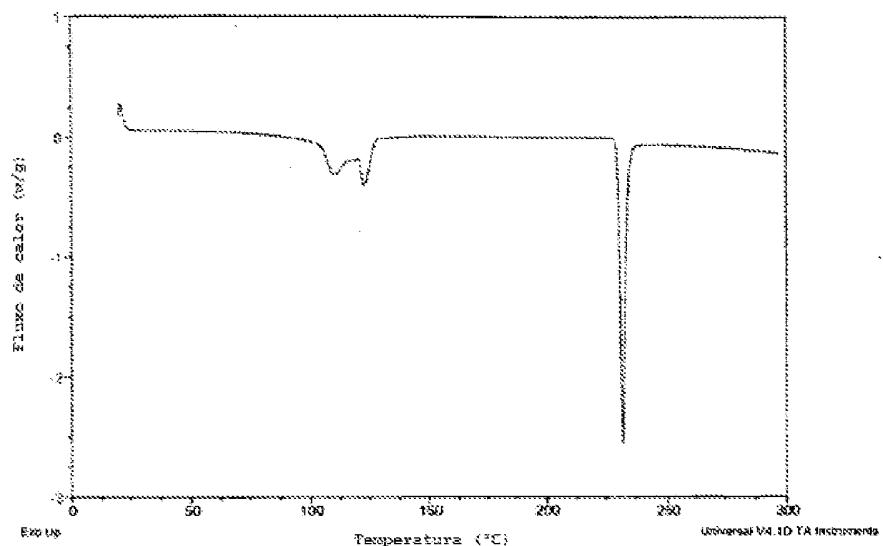


FIG. 17

TGA de N-((1R, 2S, 5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometilo)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexilo)-acetamida, solvato de mono-etanol, Forma E-1

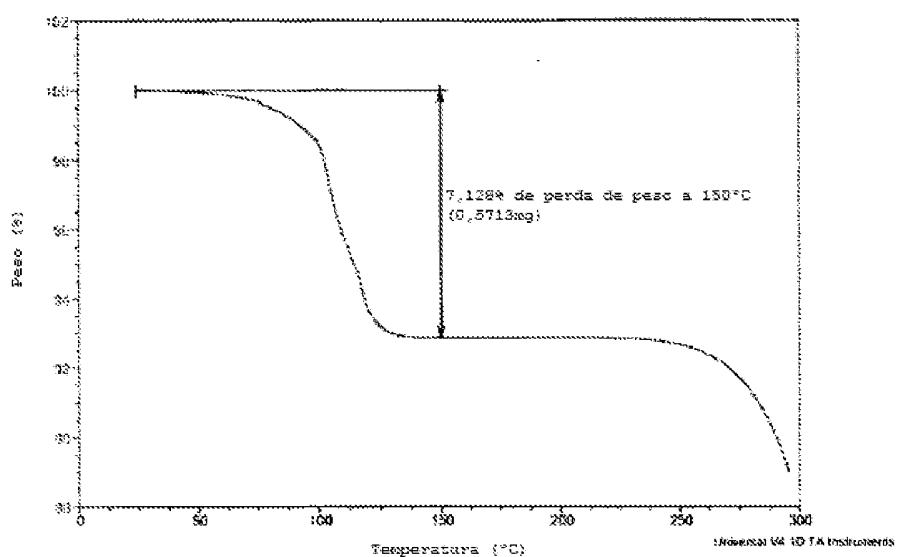


FIG. 18

DSC de N-((1R, 2S, 5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometilo)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexilo)-acetamida, solvato de mono-R-propileno-glicol, Forma RPG-3

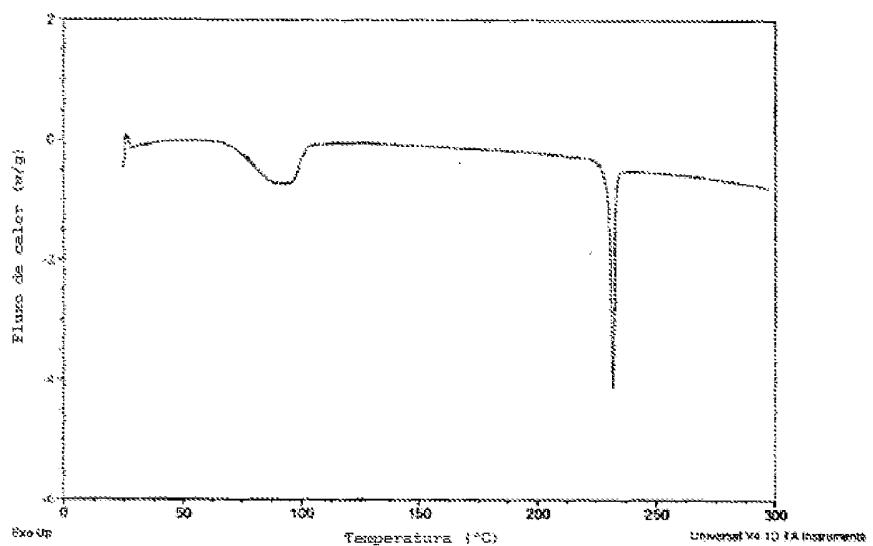


FIG. 19

TGA de N-((1R, 2S, 5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometilo)-quinazolina-4-ilamino)-pirrolidina-1-il)-ciclo-hexilo)-acetamida, solvato de mono-R-propileno-glicol, Forma RPG-3

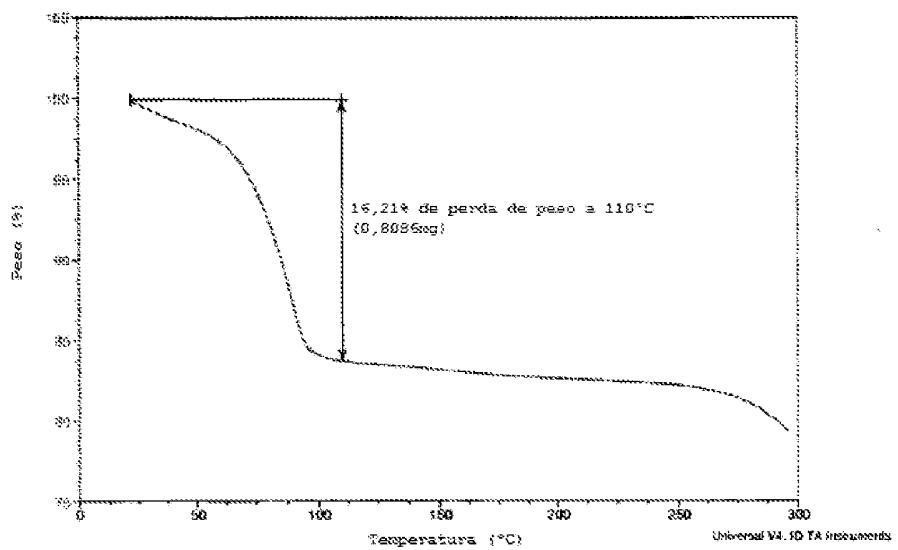


FIG. 20

**Modelo de estímulo intradérmico em macacos *Cynomolgus*: O composto do exemplo 1 inibiu o recrutamento de células mononucleares à pele**

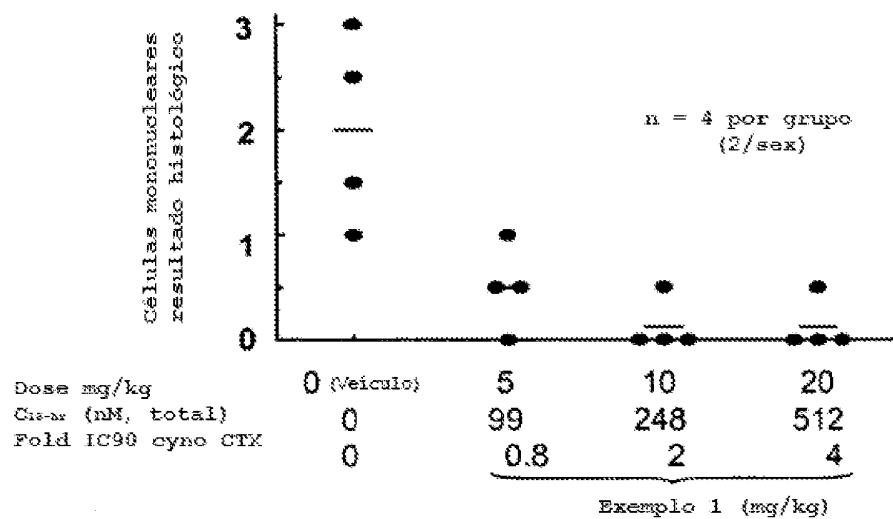


FIG. 21

Peritonite TG, 48 horas, em murganhos hCCR2 KI: O composto do exemplo 1 inibiu a infiltração de monócitos/macrófagos para a cavidade peritoneal

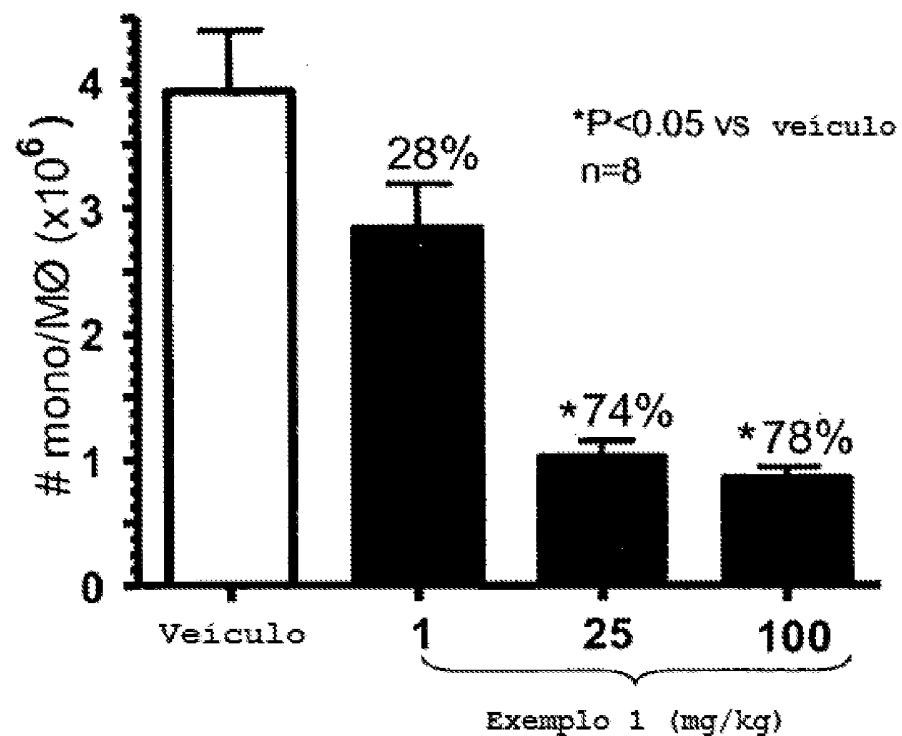


FIG. 22

**EAE de murganhos hCCR2 KI: O tratamento com o composto do exemplo 1 reduziu o resultado clínico**

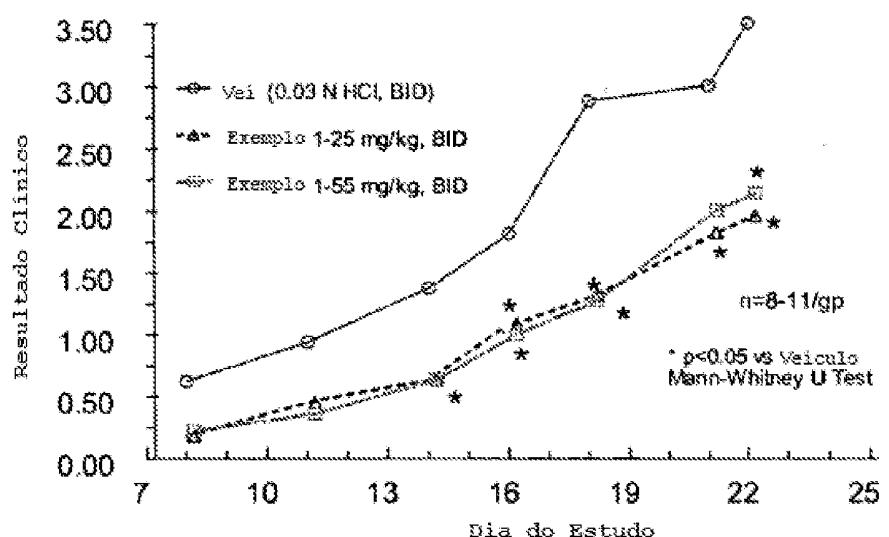


FIG. 23

**Espectro de NMR do protão do exemplo 1, 2º preparação  
alternativa, passo 3 - Composto 7**

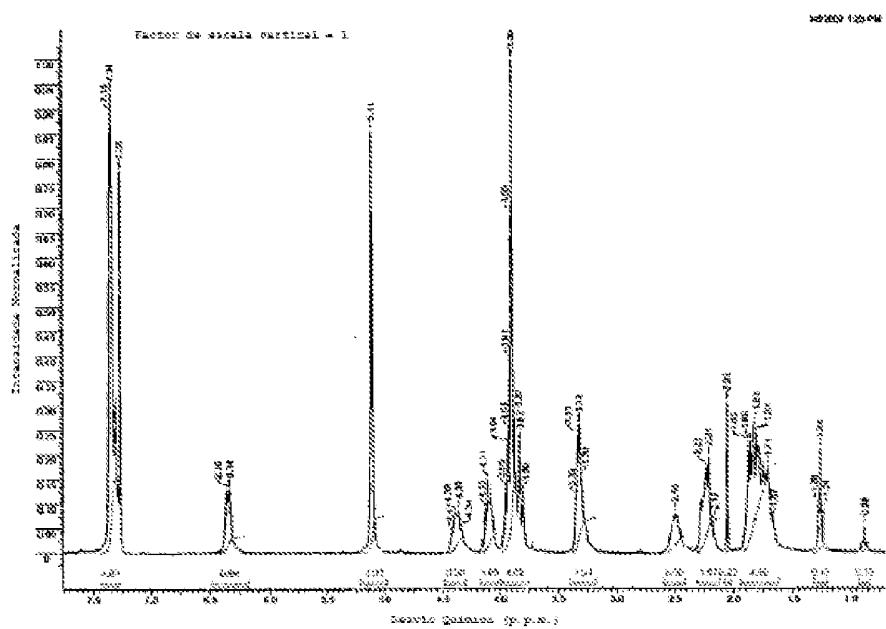


FIG. 24

Espectro de NMR do protão do exemplo 1, 2º preparação  
alternativa, passo 4 - Composto 8

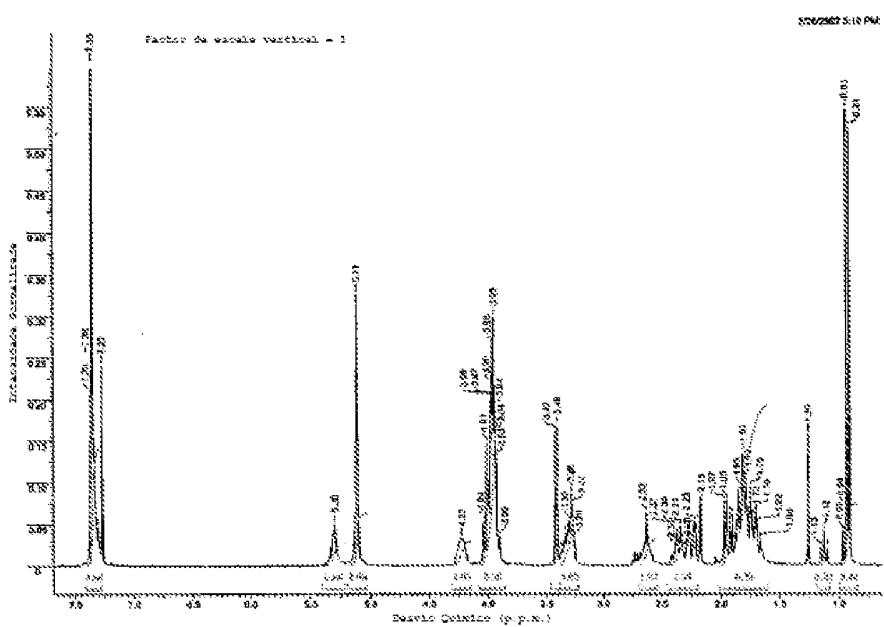


FIG. 25

**Espectro de NMR do protão do exemplo 1, 2º preparação  
alternativa, passo 4 - Composto 9**

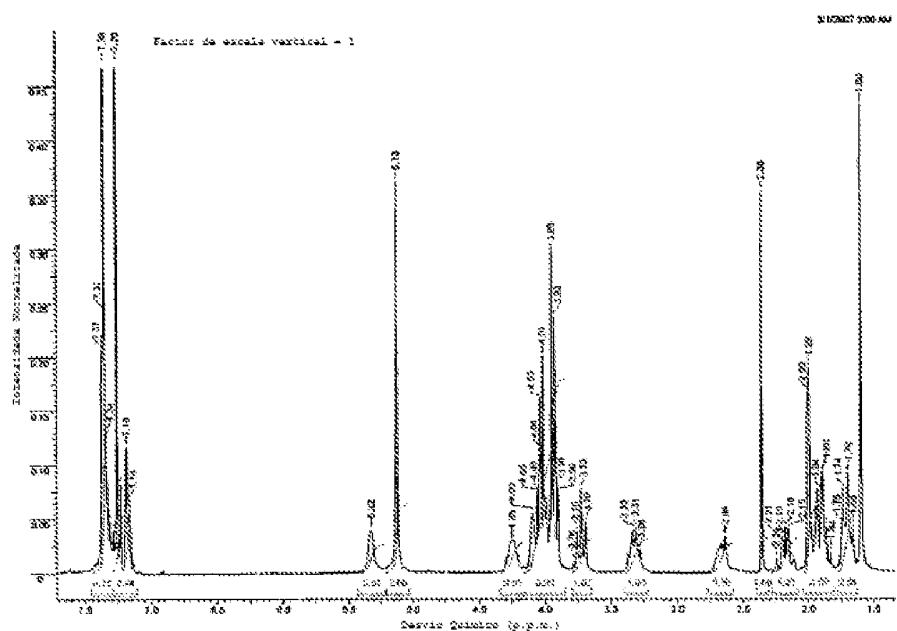


FIG. 26

Espectro de NMR do protão do exemplo 1, 2º preparação  
alternativa, passo 4 - Composto 10

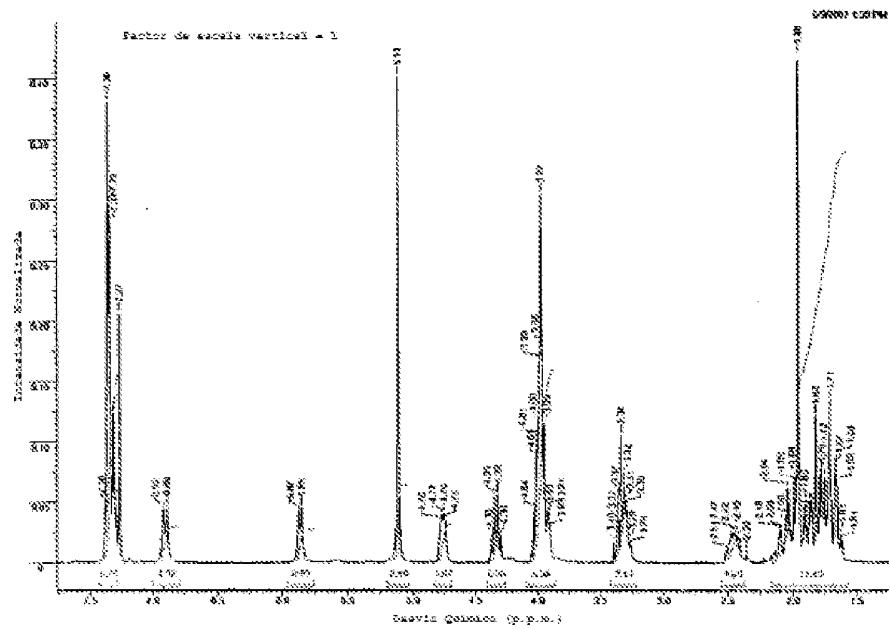


FIG. 27

Espectro de NMR do protão do exemplo 1, 2º preparação  
alternativa, passo 5 - Composto 11

