



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 1008855-5 B1



(22) Data do Depósito: 03/02/2010

(45) Data de Concessão: 12/05/2020

(54) Título: DERIVADOS DE INDOL, SEU USO COMO AGENTES ANTICÂNCER, SEU PROCESSO PARA PREPARAÇÃO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA QUE OS COMPREENDE

(51) Int.Cl.: C07D 401/12; A61K 31/435; A61K 31/44; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 04/02/2009 EP 09 152089.0.

(73) Titular(es): JANSSEN PHARMACEUTICA NV.

(72) Inventor(es): BRUNO SCHOENTJES; SOPHIE DESCAMPS; NATHALIE CLAUDIE ISABELLE AMBLARD.

(86) Pedido PCT: PCT EP2010051316 de 03/02/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/089327 de 12/08/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 03/08/2011

(57) Resumo: DERIVADOS DE INDOL COMO AGENTES ANTICÂNCER A presente invenção refere-se a compostos de fórmula (I), seu uso para o tratamento de câncer bem como composições farmacêuticas compreendendo os ditos compostos de fórmula (I) .

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"DERIVADOS DE INDOL, SEU USO COMO AGENTES ANTICÂNCER, SEU PROCESSO PARA PREPARAÇÃO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA QUE OS COMPREENDE"**.

5 Campo da invenção

A presente invenção refere-se a compostos de indol e composições contendo os ditos compostos atuando como agentes anticâncer. Além disso, a presente invenção fornece processos para a preparação dos compostos descritos, composições compreendendo métodos de utilização deles, por exemplo, como um remédio, em particular para o tratamento de câncer.

O presente Pedido de Patente reivindica prioridade sobre o pedido de patente Europeia N° 09152089.0, que é incorporado neste pedido por referência. Sem estar ligado a qualquer teoria, acredita-se atualmente que embora MDM2 e p53 representem elementos-chave na biologia celular tumoral e tenham papéis-chave na resposta celular ao insulto celular ou estresse e embora os compostos presentes aumentem a expressão de p53, parece que podem não representar os alvos moleculares primários pelos quais os presentes compostos obtêm sua atividade antitumoral pré-clínica potente demonstrada. A observação inicial aponta para um efeito direto ou indireto sobre síntese de DNA e/ou resposta a estresse replicativo como suporte para a atividade antitumoral pré-clínica observada dos compostos. Os presentes compostos também exibem efeitos antiproliferativos em células tumorais que são destituídas de p53, destituídas de p53 funcional, ou tendo p53 mutante, e além disso, podem sensibilizar células tumorigênicas à quimioterapia e radioterapia.

A p53 é uma proteína supressora de tumor que desempenha um papel fundamental na regulação do equilíbrio entre proliferação celular e impedimento de crescimento celular/apoptose. Sob condições normais, a meia-vida de p53 é muito curta e consequentemente o nível de p53 em células é baixo. Entretanto, em resposta a dano a DNA celular ou estresse celular (por exemplo, ativação de oncogene, corrosão de telômeros, hipoxia), níveis de p53 aumentam. Este aumento nos níveis de p53 leva à ativação da transcrição de diversos genes que dirige a célula no impedimento de crescimento ou nos processos da apoptose. Dessa forma, uma função importante de p53 é

evitar a proliferação descontrolada de células danificadas e dessa forma proteger o organismo do desenvolvimento de câncer. O termo "MDM2" (Murine Double Minute2) é usado neste pedido para significar uma proteína obtida em consequência da expressão do gene *mdm2*. Dentro do significado deste termo, MDM2 engloba todas as proteínas codificadas por *mdm2*, mutantes da mesma, proteínas de degradação alternativa da mesma e proteínas fosforiladas da mesma. Adicionalmente, como usado neste pedido, o termo "MDM2" inclui análogos de MDM2, por exemplo, MDMX, também conhecido como MDM4, e homólogos de MDM2 e análogos de outros animais, por exemplo, o HDM2 homólogo humano ou o HDMX análogo humano. MDM2 é um regulador chave negativo da função de p53. Forma uma alça autorreguladora negativa pela ligação ao domínio de transativação aminoterminal de p53 e dessa forma MDM2 inibe tanto a capacidade de p53 de ativar a transcrição como visa p53 para degradação proteolítica. Sob condições normais, esta alça reguladora é responsável por manter os baixos níveis de p53.

Antecedentes da invenção

JP 11130750 descreve entre outros, derivados substituídos de fenilaminocarbonilindolila como antagonistas de receptor 5-HT.

EP1129074 descreve amidas de ácido antranílico como inibidores dos receptores de fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR) e úteis no tratamento de desordens angiogênicas.

WO01/42224 fornece derivados carboxiamido para o tratamento da doença de Alzheimer. EP1317443 descreve derivados terc-amina tricíclicos, úteis como moduladores CXCR4 ou CCR5 de receptores de quimiocina para tratamento do vírus de imunodeficiência humana e o vírus de imunodeficiência felina.

EP1379239 descreve N-(2-ariletil)benzilaminas como antagonistas do receptor 5-HT₆. WO00/15357 fornece derivados piperazina-4-fenila como inibidores de interação entre MDM2 e p53. EP1137418 fornece compostos tricíclicos para restaurar a estabilidade conformacional de uma proteína da família p53. WO03/040402 fornece compostos que inibem interações entre proteínas, tais como interação entre MDM2 e p53. EP1443937 descre-

ve 1,4-benzodiazepinas substituídas e usos das mesmas como inibidores de interações MDM2-p53. EP1458380 fornece cis-2,4,5-trifenil-imidazolonas que inibem a interação da proteína MDM2 com peptídeos similares a p53 e têm atividade antiproliferativa.

5 EP1519932 descreve compostos de bisarilsulfonamida que se ligam a MDM2 e podem ser usados na terapia de câncer.

WO2006/032631, WO2007/107543, WO2007/107545, WO2009/019274, WO2009/037308 e WO2009/037343 descrevem inibidores de interação entre MDM2 e p53.

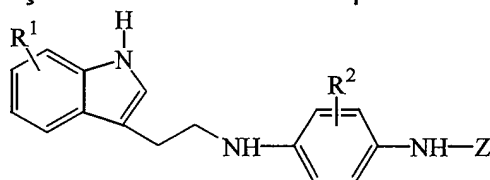
10 Há uma necessidade de pequenas moléculas eficazes que têm efeito inibitório potente contra crescimento celular tumoral, que têm um amplo perfil de segurança e menos efeitos colaterais indesejados.

Os compostos da presente invenção mostram excelente atividade *in vitro* e excelentes efeitos antitumorais *in vivo*. Têm baixa afinidade pelas enzimas P450, reduzindo o risco de interação de fármaco-fármaco adversa permitindo uma margem mais ampla de segurança. Além disso, os compostos da presente invenção têm baixos efeitos neurológicos induzidos por fármaco e têm um perfil cardiovascular melhorado que pode influenciar favoravelmente na toxicidade restritiva de dose dos compostos.

20 Descrição da invenção

A presente invenção fornece compostos, composições e métodos de tratamento de câncer. Além disso, os compostos e composições da presente invenção são úteis no aumento da eficácia de quimioterapia e radioterapia.

25 Esta invenção relaciona-se a compostos de fórmula (I)



(I)

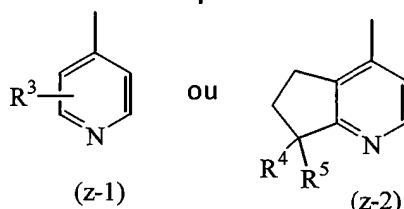
incluindo qualquer forma isomérica estereoquimicamente dos mesmos, em que

R¹ é hidroxialquilaC₁₋₆ ou alquenilaC₂₋₆; contanto que o substituí-

inte R^1 seja colocado na posição 6 ou 7 da porção indol;

R^2 é hidrogênio ou alquila C_{1-4} ;

Z é radical selecionado a partir de



R^3 é hidrogênio ou hidroxialquila C_{1-4} ;

5 R^4 é hidróxi ou alquilóxi C_{1-4} ;

R^5 é hidrogênio ou alquila C_{1-4} ; ou

R^4 e R^5 são tomados em conjunto para formar oxo;

um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo ou um solvato do mesmo.

10 Os compostos de fórmula (I) também podem existir em suas formas tautoméricas. Tais formas embora não explicitamente indicadas na fórmula acima são destinadas a estar incluídas dentro do escopo da presente invenção.

15 A presente invenção também se relaciona ao uso de um composto de fórmula (I) para a produção de um medicamento para tratamento do câncer e a um composto de fórmula (I) para uso no tratamento de câncer.

Diversos termos usados nas definições precedentes e a seguir são explicados abaixo. Estes termos são às vezes usados como tais ou em termos de composição.

20 Alquila C_{1-4} como um grupo ou parte de um grupo define radicais hidrocarboneto saturados de cadeia linear ou ramificada tendo de 1 a 4 átomos de carbono, tais como metila, etila, propila, 1-metiletila, butila; alquila C_{1-6} como um grupo ou parte de um grupo define radicais hidrocarboneto saturados de cadeia linear ou ramificada tendo de 1 a 6 átomos de carbono, tais como o grupo definido para alquila C_{1-4} e pentila, hexila, 2-metilbutila e similares. Alquenila C_{2-6} define radicais hidrocarboneto saturados de cadeia linear ou ramificada contendo uma ligação dupla e tendo de 2 a 6 átomos de carbono tais como, por exemplo, etenila, 2-propenila, 3-butenila, 2-pentenila, 3-

pentenila, 3-metil-2-butenila e similares.

Linhas traçadas a partir de substituintes em sistemas anelares indicam que a ligação pode ser ligada a qualquer dos átomos anelares adequados.

5 Para uso terapêutico, os sais dos compostos de fórmula (I) são aqueles em que o contraíon é farmaceuticamente aceitável. Entretanto, os sais de ácidos e bases que não são farmaceuticamente aceitáveis também podem encontrar uso, por exemplo, na preparação ou purificação de um composto farmaceuticamente aceitável. Todos os sais, se farmaceuticamente
10 te aceitáveis ou não, estão incluídos dentro do âmbito da presente invenção.

Os sais farmaceuticamente aceitáveis como mencionado mais acima ou mais adiante estão destinados a compreender as formas de sal de adição ácida não tóxicas terapeuticamente ativas que os compostos de fórmula (I) são capazes de formar. O último pode ser convenientemente obtido
15 pelo tratamento da forma de base com tais ácidos apropriados como ácidos inorgânicos, por exemplo, ácidos hidrohálicos, por exemplo, hidrocloreto, hidrobrometo e similares; ácido sulfúrico; ácido nítrico; ácido fosfórico e similares; ou ácidos orgânicos, por exemplo, acético, propanoico, hidroxiacético, 2-hidroxipropanoico, 2-oxopropanoico, oxálico, malônico, succínico, maleico, fumárico, málico, tartárico, 2-hidróxi-1,2,3-propanotricarboxílico, metanossulfônico, etanossulfônico, benzenossulfônico, 4-metilbenzenossulfônico, ciclo-hexanossulfônico, 2-hidroxibenzoico, 4-amino-2-hidroxibenzoico e ácidos similares. De modo inverso, a forma de sal pode ser convertida pelo tratamento com álcali na forma de base livre.
20

25 Os compostos de fórmula (I) contendo prótons acídicos podem ser convertidos em seu metal não tóxico terapeuticamente ativo ou formas de sal de adição de amina pelo tratamento com bases orgânicas e inorgânicas apropriadas. Os sais farmaceuticamente aceitáveis como mencionado mais acima ou mais adiante estão destinados a compreender também o metal não tóxico terapeuticamente ativo ou formas de sal de adição de amina
30 (formas de sal de adição de base) que os compostos de fórmula (I) são capazes de formar. As formas de sal de adição de base apropriadas compre-

endem, por exemplo, sais de amônio, sais metálicos alcalinos e alcalinoterrosos, por exemplo, sais de lítio, sódio, potássio, magnésio, cálcio e similares, sais com bases orgânicas, por exemplo, aminas alifáticas e aromáticas primárias, secundárias e terciárias, tais como metilamina, etilamina, propilamina, isopropilamina, quatro isômeros butilamina, dimetilamina, dietilamina, dietanolamina, dipropilamina, di-isopropilamina, di-*n*-butilamina, pirrolidina, piperidina, morfolina, trimetilamina, trietilamina, tripropilamina, quinuclidina, piridina, quinolina e isoquinolina, benzatina, *N*-metil-D-glucamina, 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3 propanodiol, sais de hidrabamina, e sais com aminoácidos tais como, por exemplo, arginina, lisina e similares.

De modo inverso, a forma de sal pode ser convertida pelo tratamento com ácido na forma ácida livre.

O termo sal também compreende os sais de amônio quaternário (aminas quaternárias) que os compostos de fórmula (I) são capazes de formar pela reação entre um nitrogênio básico de um composto de fórmula (I) e um agente quaternizante apropriado, tal como, por exemplo, um alquil-haleto_{C₁₋₆} opcionalmente substituído, aril-haleto, alquilcarbonil-haleto C₁₋₆, arilcarbonil-haleto ou arilalquil-haleto_{C₁₋₆}, por exemplo, metiliodeto ou benziliodeto, em que arila representa fenila não substituída ou substituída. Outros reagentes com bons grupos de saída também podem ser usados, tais como, por exemplo, trifluorometanossulfonatos de alquila_{C₁₋₆}, metanossulfonatos de alquila_{C₁₋₆} e *p*-toluenossulfonatos de alquila_{C₁₋₆}. Uma amina quaternária tem um nitrogênio positivamente carregado. Os contraíons farmacêuticamente aceitáveis incluem cloro, bromo, iodo, trifluoroacetato, acetato, triflato, sulfato, sulfonato. O contraíon de escolha pode ser introduzido usando resinas de troca iônica.

Preferencialmente, o termo sal significa as formas de sal de adição ácida farmacêuticamente aceitáveis e o metal farmacêuticamente aceitável ou formas de sal de adição de amina.

O termo solvato compreende os hidratos e formas de adição de solvente que os compostos de fórmula (I) são capazes de formar, bem como os sais dos mesmos. Exemplos de tais formas são, por exemplo, hidratos,

alcooolatos e similares.

Será apreciado que alguns compostos de fórmula (I) e seus sais, e solvatos podem conter um ou mais centros de quiralidade e existir como formas isoméricas estereoquimicamente.

5 O termo "formas isoméricas estereoquimicamente dos compostos de fórmula (I)", como usado mais acima, define todos os compostos possíveis dos mesmos átomos ligados pela mesma sequência de ligações, mas tendo estruturas tridimensionais diferentes que não são intercambiáveis, que os compostos de fórmula (I) e seus sais farmaceuticamente aceitáveis ou
10 derivados fisiologicamente funcionais podem possuir.

A menos que de outra maneira mencionado ou indicado, a designação química de compostos denota a mistura de todas as formas isoméricas estereoquimicamente possíveis, bem como cada uma das formas isoméricas individuais da fórmula (I) e seus sais ou solvatos, substancialmente
15 livres, isto é, associado com menos de 50%, preferencialmente menos de 20%, mais preferencialmente menos de 10%, mesmo mais preferencialmente menos de 5%, ainda preferencialmente menos de 2% e ainda mais preferencialmente menos de 1% de outro isômero (s). Dessa forma, quando um composto de fórmula (I) é, por exemplo, especificado como R, isto significa
20 que o composto está substancialmente sem o isômero S. Ou se um composto de fórmula (I) é, por exemplo, especificado como E, isto significa que o composto está substancialmente sem o isômero Z.

Em particular, centros estereogênicos podem ter configuração R ou S; os substituintes em radicais cíclicos (parcialmente) saturados bivalentes podem ter configuração *cis* ou *trans*. Os compostos que englobam ligações duplas podem ter uma estereoquímica E (*entgegen*) ou Z (*zusammen*) na dita ligação dupla. Os termos *cis*, *trans*, R, S, E e Z são bem conhecidos pelos versados na técnica.

Formas isoméricas estereoquimicamente dos compostos de
30 fórmula (I) são obviamente destinados a serem englobados dentro dos limites desta invenção.

De interesse especial são aqueles compostos de fórmula (I) que

são estereoquimicamente puros.

As seguintes convenções de nomenclatura CAS, quando dois centros estereogênicos de configuração absoluta conhecidos estão presentes em uma molécula, um descritor *R* ou *S* é designado (baseado na regra de sequência de Cahn-Ingold-Prelog) ao centro quiral de menor número, centro de referência. A configuração do segundo centro estereogênico é indicada usando descritores relativos [*R**,*R**] ou [*R**,*S**], onde *R** sempre é especificado como o centro de referência e [*R**,*R**] indica que centros com a mesma quiralidade e [*R**,*S**] indica centros de quiralidade diferente. Por exemplo, se o centro quiral de menor número na molécula tem uma configuração *S* e o segundo centro é *R*, o descritor estéreo seria especificado como *S*-[*R**,*S**]. Se "α" e "β" são usados: a posição do substituinte de prioridade mais alto no átomo de carbono assimétrico no sistema anelar tendo o número anelar mais baixo, está sempre arbitrariamente na posição "α" do plano médio determinado pelo sistema anelar. A posição do substituinte de prioridade mais alta em outro átomo de carbono assimétrico no sistema anelar em relação à posição do substituinte de prioridade mais alta no átomo de referência é denominada "α", se estiver no mesmo lado do plano médio determinado pelo sistema anelar, ou "β", se estiver no outro lado do plano médio determinado pelo sistema anelar.

Os termos *cis* e *trans* quando usados neste pedido são de acordo com a nomenclatura do Chemical Abstracts (J. Org. Chem. 1970, 35 (9), 2849-2867), e referem-se à posição dos substituintes em uma porção anelar.

Os compostos de (I) podem ser sintetizados na forma de misturas racêmicas de enantiômeros que podem ser separados entre si após procedimentos de resolução conhecidos da técnica. Os compostos racêmicos de fórmula (I) podem ser convertidos nas formas diastereoméricas de sal correspondentes pela reação com um ácido quiral adequado. As ditas formas diastereoméricas de sal são posteriormente separadas, por exemplo, pela cristalização seletiva ou fracionária e os enantiômeros são liberados destes por álcali. Uma maneira alternativa de separar as formas enantioméricas dos compostos de fórmula (I) envolve cromatografia líquida usando

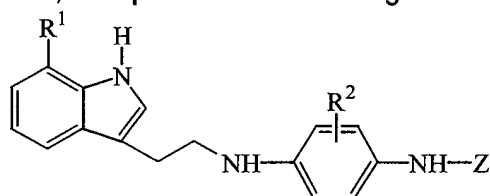
uma fase estacionária quiral. As ditas formas isoméricas estereoquimicamente puras também podem ser derivadas das formas isoméricas estereoquimicamente puras correspondentes dos materiais iniciais apropriados, contanto que a reação ocorra estereoespecificamente. Preferencialmente, se um estereoisômero específico é desejado, o dito composto será sintetizado por métodos estereoespecíficos de preparação. Estes métodos empregarão vantajosamente materiais iniciais puros enantiomericamente.

A presente invenção também é destinada a incluir qualquer isótopo presente de átomos nos compostos da invenção. Por exemplo, os isótopos de hidrogênio incluem trítio e deutério e os isótopos de carbono incluem C-13 e C-14.

Sempre que usado mais abaixo, o termo "compostos de fórmula (I)" ou "os compostos da presente invenção" está destinado a incluir também os sais farmaceuticamente aceitáveis, em particular sais de adição ácida ou básica (metal ou amina), todas as formas estereoisoméricas, solvatos, e todas as formas cristalinas polimórficas ou formas amorfas.

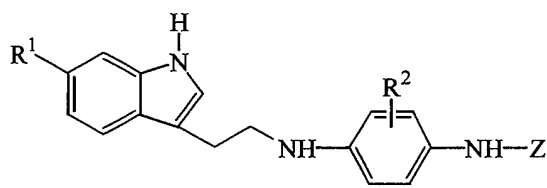
Sempre que usado mais acima ou mais adiante que substituintes podem ser selecionados cada um independentemente fora de uma lista de numerosas definições, todas as combinações possíveis são entendidas sendo quimicamente possíveis.

Uma modalidade interessante da presente invenção são aqueles compostos de fórmula (I) em que o substituinte R^1 é colocado na posição 7 da porção indol. Por isso, compostos tendo a seguinte fórmula



(I-a)

Uma modalidade interessante da presente invenção são aqueles compostos de fórmula (I) em que o substituinte R^1 é colocado na posição 6 da porção indol. Por isso, compostos tendo a seguinte fórmula



(I-b)

Uma modalidade interessante da presente invenção são aqueles compostos de fórmula (I), (I-a) ou (I-b) em que R¹ é hidroxialquilaC₁₋₆, em particular, -CH-OH, -C(CH₃)₂-OH, -CH(CH₃)-OH, -CH₂-CH₂-OH, -CH(CH(CH₃)₂)-OH, -CH₂-CH₂-CHOH-CH₃, mais em particular, -C(CH₃)₂-OH.

5 Uma modalidade interessante da presente invenção são aqueles compostos de fórmula (I), (I-a) ou (I-b) em que R¹ é alquenilaC₂₋₆, em particular, -CH=CH₂, -C(CH₃)=CH₂.

Uma modalidade interessante da presente invenção são aqueles compostos de fórmula (I), (I-a) ou (I-b) ou uma modalidade interessante dos mesmos como indicado acima, em que R² é hidrogênio.

Uma modalidade interessante da presente invenção são aqueles compostos de fórmula (I), (I-a) ou (I-b) ou, sempre que possível, uma modalidade interessante dos mesmos como indicado acima, em que R² é alquilaC₁₋₄, em particular, metila.

15 Uma modalidade interessante da presente invenção são aqueles compostos de fórmula (I), (I-a) ou (I-b) ou, sempre que possível, uma modalidade interessante dos mesmos como indicado acima, em que R³ representa hidrogênio.

Uma modalidade interessante da presente invenção são aqueles compostos de fórmula (I), (I-a) ou (I-b) ou, sempre que possível, uma modalidade interessante dos mesmos como indicado acima, em que R³ representa hidroxialquilaC₁₋₄, em particular, -CH₂-OH. Preferencialmente este substituinte R³ é colocado na posição 2 da porção piridina.

25 Uma modalidade interessante da presente invenção são aqueles compostos de fórmula (I), (I-a) ou (I-b) ou, sempre que possível, uma modalidade interessante dos mesmos como indicado acima, em que R⁴ representa hidróxi.

Uma modalidade interessante da presente invenção são aqueles

compostos de fórmula (I), (I-a) ou (I-b) ou, sempre que possível, uma modalidade interessante dos mesmos como indicado acima, em que R^4 representa alquilóxiC₁₋₄, em particular, metóxi.

5 Uma modalidade interessante da presente invenção são aqueles compostos de fórmula (I), (I-a) ou (I-b) ou, sempre que possível, uma modalidade interessante dos mesmos como indicado acima, em que R^5 representa hidrogênio.

10 Uma modalidade interessante da presente invenção são aqueles compostos de fórmula (I), (I-a) ou (I-b) ou, sempre que possível, uma modalidade interessante dos mesmos como indicado acima, em que R^5 representa alquilaC₁₋₄, em particular, metila.

15 Uma modalidade interessante da presente invenção são aqueles compostos de fórmula (I), (I-a) ou (I-b) ou, sempre que possível, uma modalidade interessante dos mesmos como indicado acima, em que R^4 e R^5 são tomados em conjunto para formar oxo.

20 Uma modalidade interessante da presente invenção são aqueles compostos de fórmula (I), (I-a) ou (I-b) ou, sempre que possível, uma modalidade interessante dos mesmos como indicado acima, em que R^4 é hidroxila e R^5 é hidrogênio.

25 Uma modalidade interessante da presente invenção são aqueles compostos de fórmula (I), (I-a) ou (I-b) ou, sempre que possível, uma modalidade interessante dos mesmos como indicado acima, em que R^4 é hidroxila e R^5 é alquilaC₁₋₄, em particular, metila.

30 Uma modalidade interessante da presente invenção são aqueles compostos de fórmula (I), (I-a) ou (I-b) ou, sempre que possível, uma modalidade interessante dos mesmos como indicado acima, em que R^4 é alquilóxiC₁₋₄ e R^5 é hidrogênio.

35 Uma modalidade interessante da presente invenção são aqueles compostos de fórmula (I), (I-a) ou (I-b) ou, sempre que possível, uma modalidade interessante dos mesmos como indicado acima, em que Z é radical de fórmula (z-1).

Uma modalidade interessante da presente invenção são aqueles

compostos de fórmula (I), (I-a) ou (I-b) ou, sempre que possível, uma modalidade interessante dos mesmos como indicado acima, em que Z é radical de fórmula (z-2).

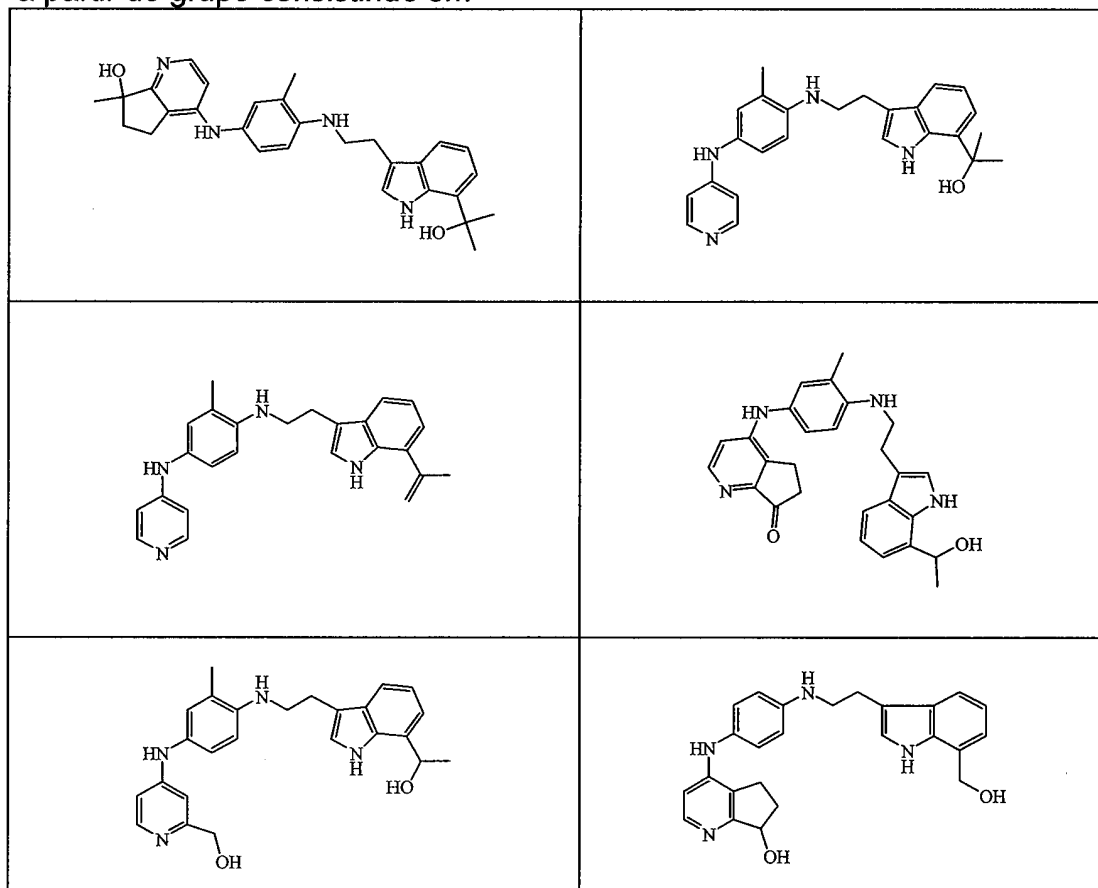
5 Todas as combinações possíveis das modalidades interessantes indicadas acima são consideradas englobadas dentro do escopo desta invenção.

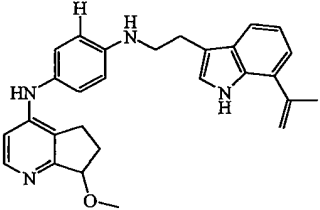
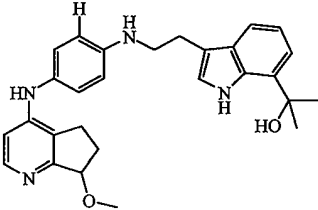
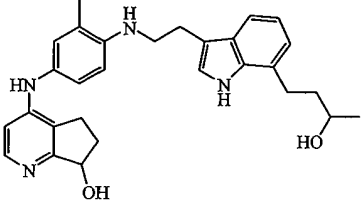
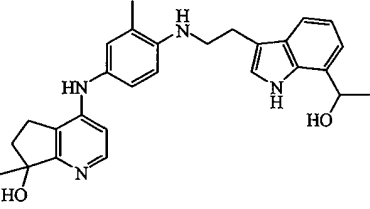
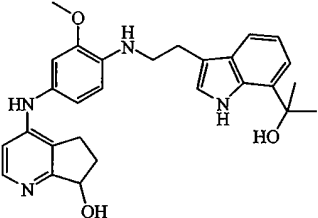
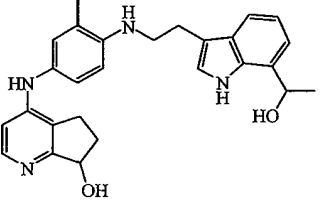
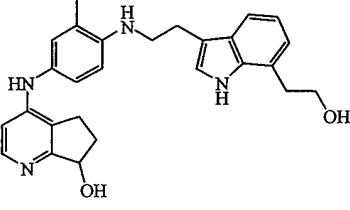
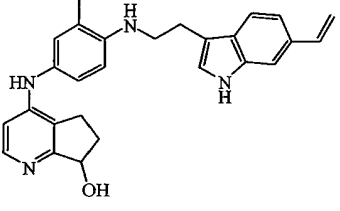
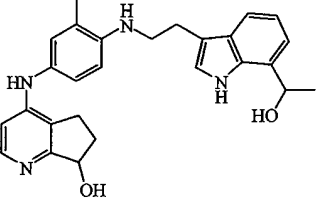
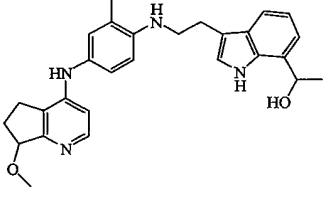
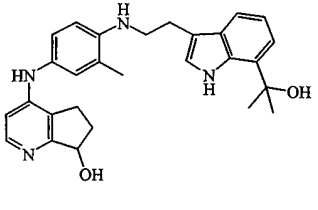
Uma modalidade interessante da presente invenção são aqueles compostos de fórmula (I), (I-a) ou (I-b) em que R¹ é -CH₂-OH, -C(CH₃)₂-OH, -CH(CH₃)-OH, -CH₂-CH₂-OH, -CH(CH(CH₃)₂)-OH, -CH₂-CH₂-CHOH-CH₃, -CH=CH₂ ou C(CH₃)=CH₂; R² é hidrogênio ou metila; R³ é hidrogênio ou -CH-OH; R⁴ é hidróxi ou metilóxi; R⁵ é hidrogênio ou metila, ou R⁴ e R⁵ são tomados em conjunto para formar oxo.

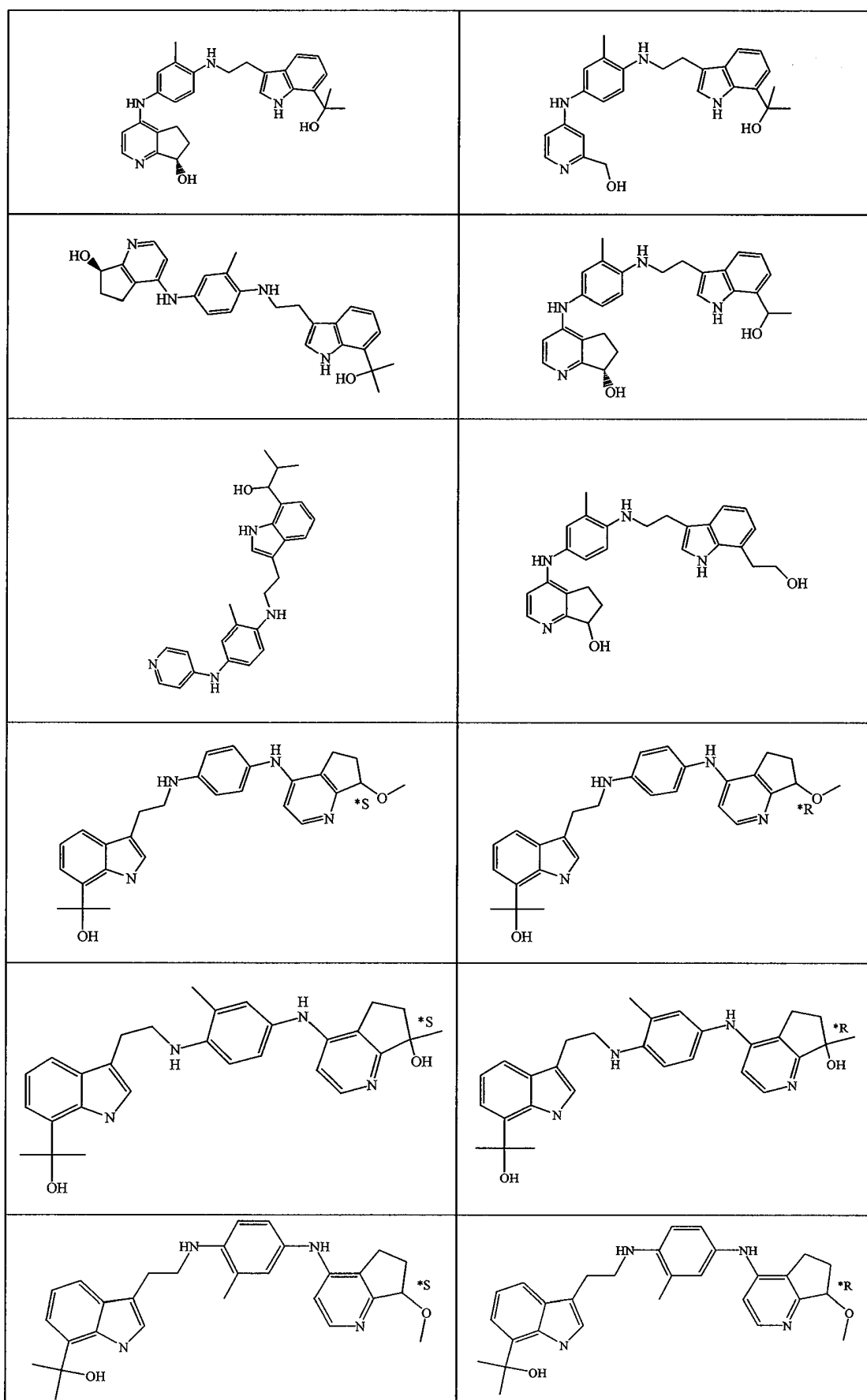
10

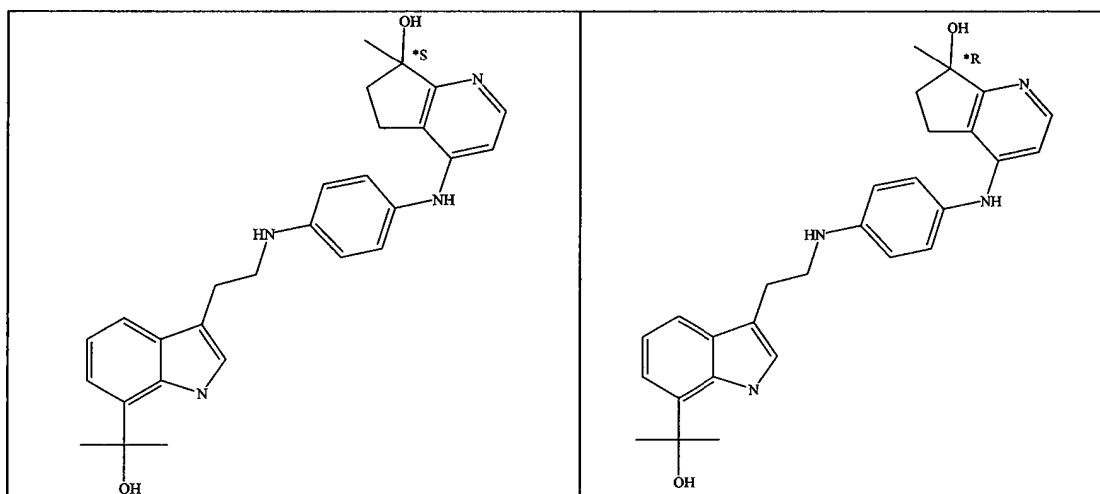
Preferencialmente, os compostos das modalidades interessantes indicadas acima são estereoquimicamente puros.

15 Compostos preferenciais da presente invenção são selecionados a partir do grupo consistindo em





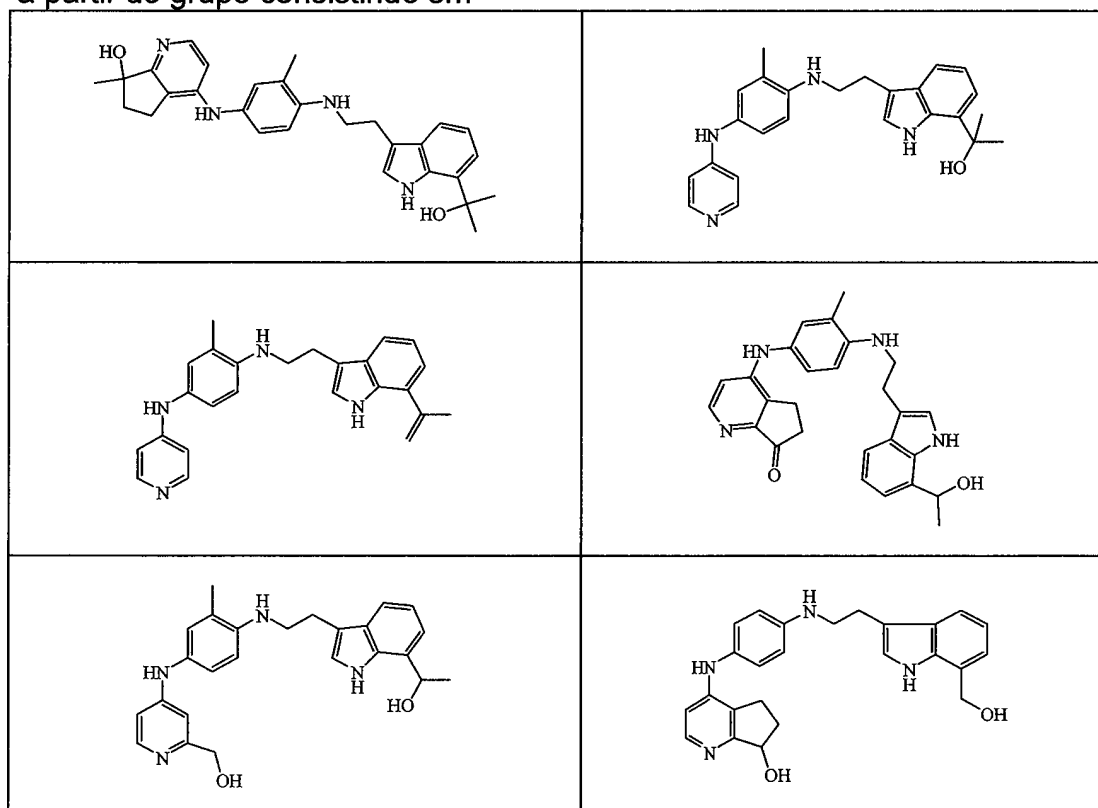


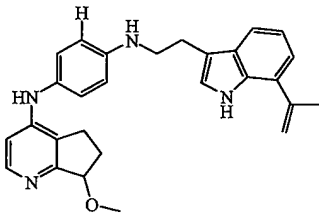
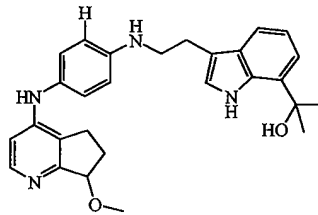
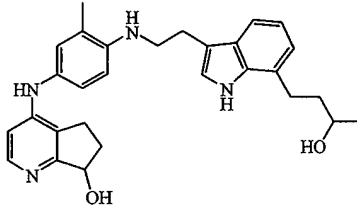
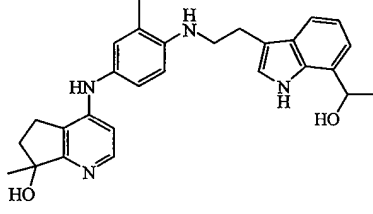
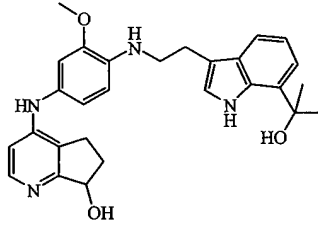
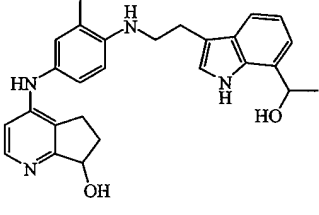
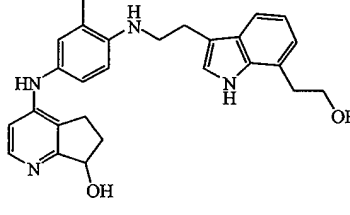
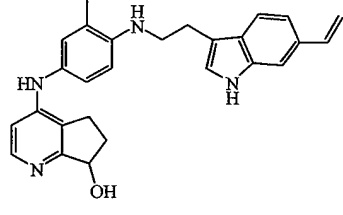
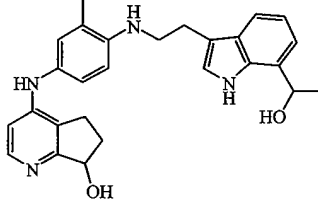
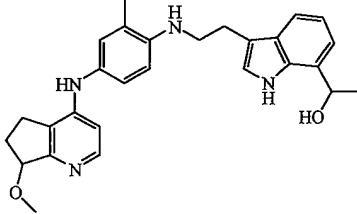
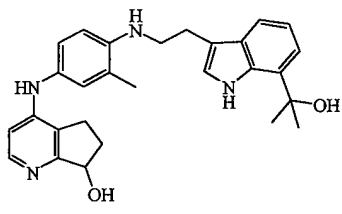
incluindo qualquer forma isomérica estereoquimicamente dos mesmos;

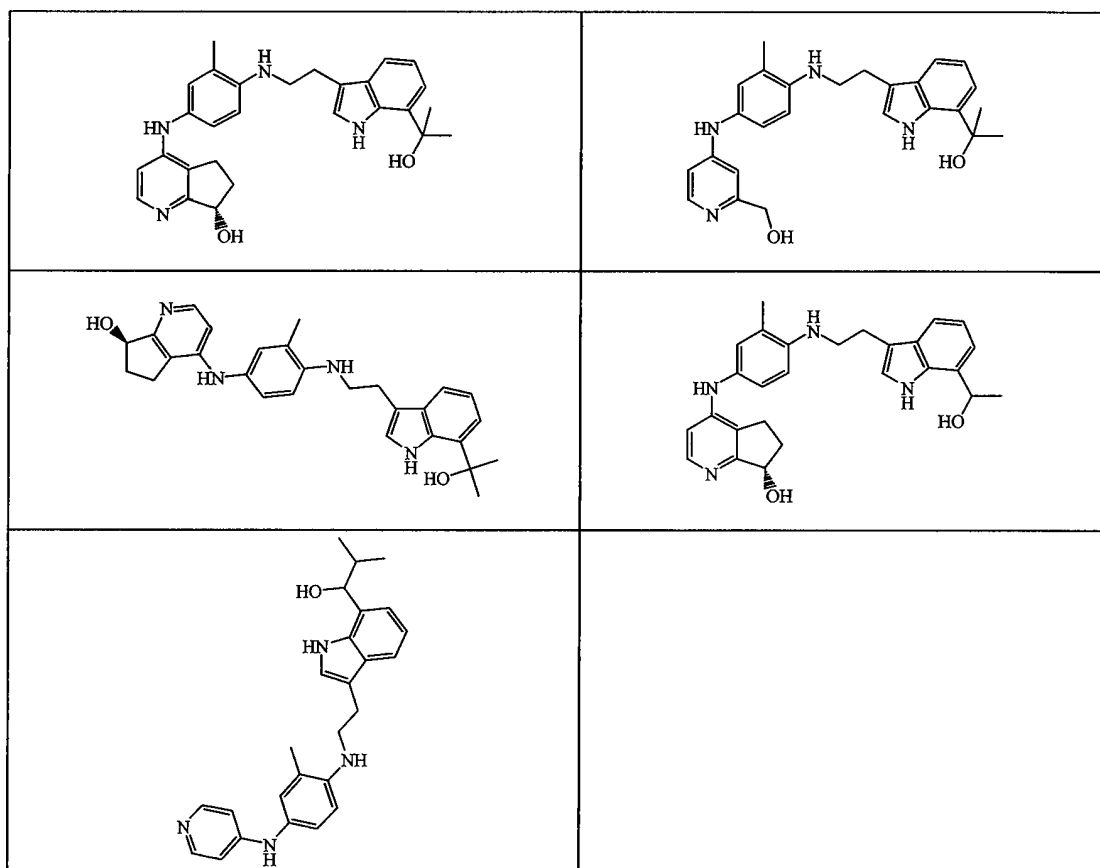
um sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos ou um solvato dos mesmos.

5 (* significa estereoquímica relativa)

Compostos preferenciais da presente invenção são selecionados a partir do grupo consistindo em



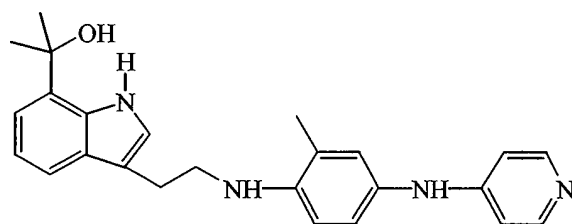
	
	
	
	
	
	



incluindo qualquer forma isomérica estereoquimicamente dos mesmos;

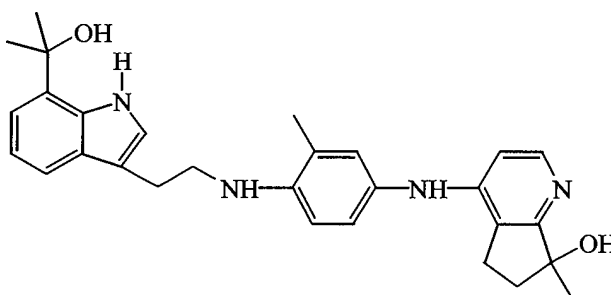
um sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos ou um solvato dos mesmos.

- 5 Um composto preferencial da presente invenção é o composto tendo a seguinte fórmula



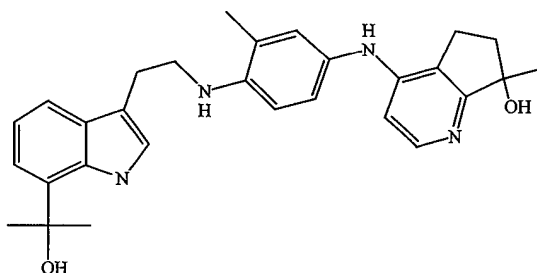
um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo ou um solvato do mesmo.

- 10 Um composto preferencial da presente invenção é o composto tendo a seguinte fórmula



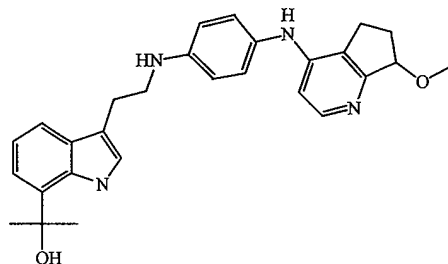
incluindo qualquer forma isomérica estereoquimicamente do
 . mesmo;
 um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo ou um solvato do
 mesmo.

5 Um composto preferencial da presente invenção é o enantiôme-
 tro tendo a seguinte fórmula



e tendo uma rotação levorrotatória medida com luz no compri-
 mento de onda da linha D do sódio (589 nm) a uma temperatura de 20 °C e
 um caminho ótico de célula de 1 dm em clorofórmio em uma concentração
 10 de 8,59 mg/ml; ou
 um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo ou um solvato do
 mesmo.

Um composto preferencial da presente invenção é o enantiôme-
 tro tendo a seguinte fórmula

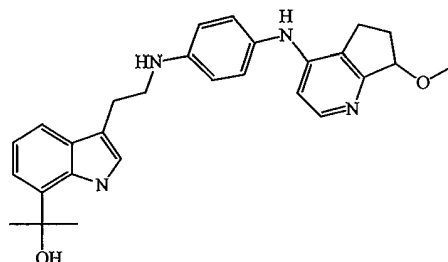


15 e tendo uma rotação dextrorrotatória medida com luz no com-
 primento de onda da linha D do sódio (589 nm) a uma temperatura de 20 °C
 e um caminho ótico de célula de 1 dm em metanol em uma concentração de

10,33 mg/ml; ou

um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo ou um solvato do mesmo.

Um composto preferencial da presente invenção é o enantiômetro tendo a seguinte fórmula



e tendo uma rotação levorrotatória medida com luz no comprimento de onda da linha D do sódio (589 nm) a uma temperatura de 20 °C e um caminho ótico de célula de 1 dm em metanol em uma concentração de 10,74 mg/ml; ou

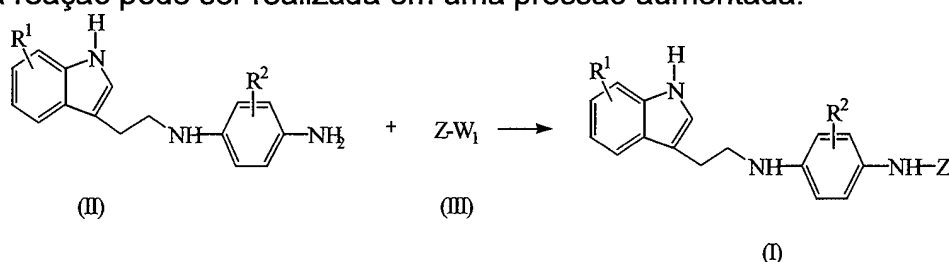
um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo ou um solvato do mesmo.

Os compostos de fórmula (I), seus sais farmaceuticamente aceitáveis e formas isoméricas estereoquimicamente dos mesmos podem ser preparados de maneira convencional. Os materiais iniciais e alguns dos intermediários são compostos conhecidos e estão comercialmente disponíveis ou podem ser preparados de acordo com procedimentos de reação convencionais como conhecido em geral na técnica. Referência neste aspecto também é feita a métodos de síntese descritos no WO2006/032631.

Diversos desses métodos de preparação serão descritos mais adiante em mais detalhes. Outros métodos para obtenção de compostos finais de fórmula (I) são descritos nos exemplos.

Em geral, os compostos de fórmula (I) podem ser preparados pela reação de um intermediário de fórmula (II) com um intermediário de fórmula (III) em que W_1 é um grupo de saída adequado tal como, por exemplo, halo, por exemplo, fluoro, cloro, bromo ou iodo, ou um radical sulfonilóxi, tal como metilsulfonilóxi, 4-metilfenilsulfonilóxi e similares. A reação pode ser realizada em um solvente inerte à reação tal como, por exemplo, um álcool,

por exemplo, metanol, etanol, 2-metóxi-etanol, propanol, butanol e similares; um éter, por exemplo, 1, 4-dioxano preferencialmente na presença de um ácido adequado, tal como, por exemplo, HCl, 1,1'-oxibispropano e similares; uma cetona, por exemplo, 4-metil-2-pentanona; ou N,N-dimetilformamida, nitrobenzeno, acetonitrila e similares. A adição de uma base apropriada tal como, por exemplo, um carbonato metálico alcalino ou alcalinoterroso ou hidrogeno carbonato ou uma base orgânica, por exemplo, N,N-diisopropiletilamina, trietilamina, carbonato de sódio ou carbonato de potássio, pode ser utilizada para capturar o ácido que é liberado durante o curso da reação. Uma pequena quantidade de um iodeto metálico apropriado, por exemplo, iodeto de sódio ou de potássio pode ser adicionado para promover a reação. A agitação pode aumentar a taxa da reação. A reação pode ser convenientemente realizada em uma temperatura que varia entre a temperatura ambiente e a temperatura de refluxo da mistura de reação e, se desejado, a reação pode ser realizada em uma pressão aumentada.

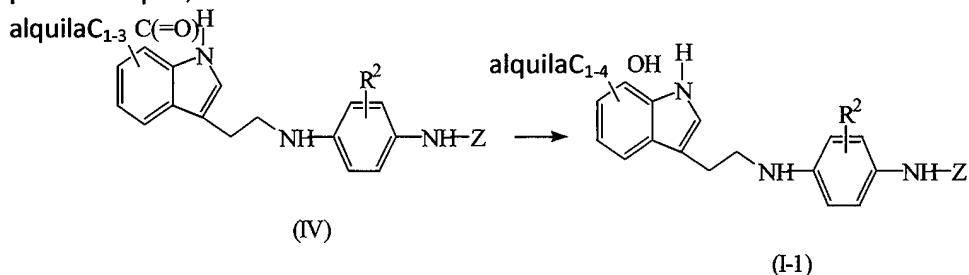


Na reação acima, intermediários de fórmula (II) em que R^1 é $-\text{C}(\text{OH})(\text{CH}_3)_2$ podem resultar no composto final correspondente de fórmula (I) em que R^1 é $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$.

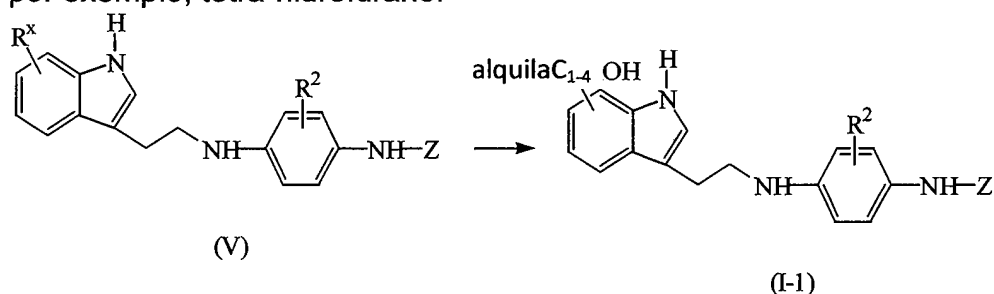
A reação acima de um intermediário de fórmula (III) com um intermediário de fórmula (II) também pode ser realizada na presença de um catalisador adequado, tal como, por exemplo, $\text{Pd}(\text{dba})_2$ (bis[(1,2,4,5-η)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona]-paládio) um ligante adequado, tal como, por exemplo, BINAP (2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftila), uma base adequada, tal como, por exemplo, terc-butóxido de sódio, e um solvente adequado, tal como, por exemplo, tolueno.

Os compostos de fórmula (I) em que R^1 representa hidroxialquila C_{1-4} , os ditos compostos que são representados pela fórmula (I-1), também

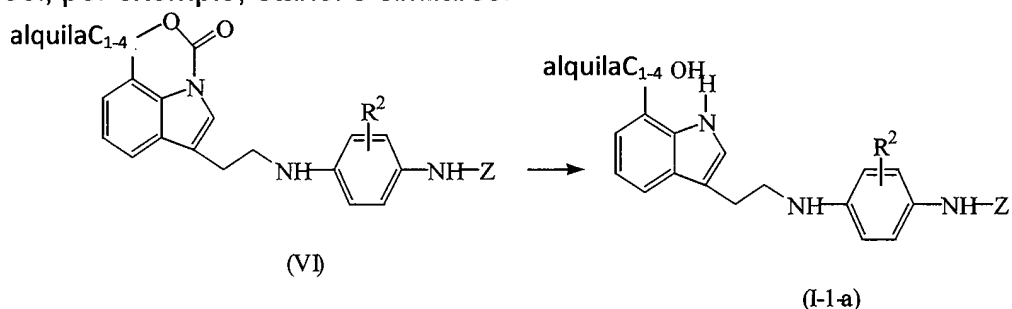
podem ser preparados pela redução do derivado carbonila correspondente de fórmula (IV) na presença de um agente redutor adequado, tal como, por exemplo, NaBH_4 , e um solvente adequado, tal como, por exemplo, um álcool, por exemplo, metanol e similares.



- 5 Os compostos de fórmula (I-1) também podem ser preparados pela redução do derivado éster correspondente de fórmula (V) em que R^x representa $\text{alquilC}_{1-3}\text{C}(=\text{O})\text{alquilOC}_{1-4}$, na presença de um agente redutor adequado, tal como, por exemplo, LiAlH_4 , e um solvente adequado, tal como por exemplo, tetra-hidrofurano.



- 10 Os compostos de fórmula (I-1) em que o R^1 representa hidroxi- alquilaC_{1-4} e dito hidroxialquila C_{1-4} são colocados na posição 7 da porção indol, dito que os compostos que são representados pela fórmula (I-1-a), também podem ser preparados pela hidrólise de um intermediário de fórmula (VI) com uma base adequada, tal como, por exemplo, hidróxido de sódio, e
- 15 um solvente adequado, tal como, por exemplo, tetra-hidrofurano, ou um álcool, por exemplo, etanol e similares.

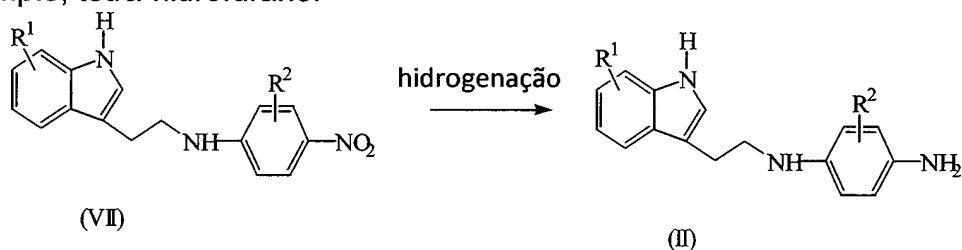


Os compostos de fórmula (I) também podem ser convertidos entre si através de reações conhecidas da técnica ou transformações de grupo funcionais.

Os compostos de fórmula (I) também podem ser convertidos em um sal de adição ácida farmaceuticamente aceitável pela reação com um ácido apropriado, tal como, por exemplo, ácido hidrolórico, em um solvente adequado, tal como, por exemplo, um álcool, por exemplo, 2-propanol, éter de etila, éter de di-isopropil .

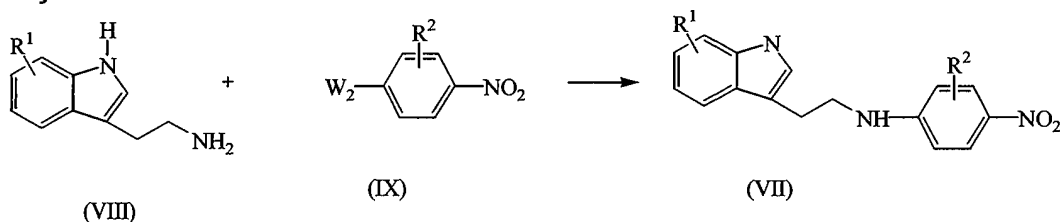
Alguns dos intermediários e materiais iniciais são compostos conhecidos e podem estar comercialmente disponíveis ou pode ser preparados de acordo com os procedimentos conhecidos da técnica.

Em geral, Intermediários de fórmula (II) podem ser preparados por hidrogenação de um intermediário de fórmula (VII) na presença de um catalisador metálico adequado, tal como, por exemplo, níquel Raney, na presença de um solvente adequado, tal como, por exemplo, um álcool, por exemplo, metanol ou etanol e similares; ou platina em carvão, na presença de um veneno de catalisador adequado, tal como uma solução de tiofeno e pentóxido de vanádio, na presença de um solvente adequado, tal como, por exemplo, tetra-hidrofurano.

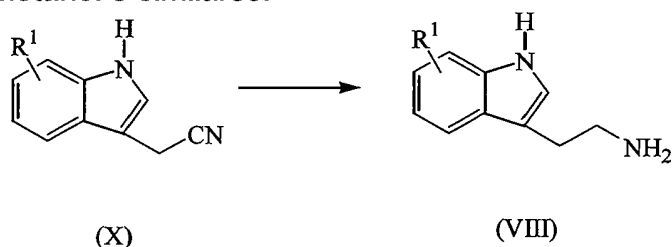


Intermediários de fórmula (VII) podem ser preparados pela reação de um intermediário de fórmula (VIII) com um intermediário de fórmula (IX) em que W_2 representa um grupo de saída adequado, tal como, por exemplo, um átomo de halogênio, por exemplo, cloro, bromo, fluoro e similares, na presença de um solvente adequado, tal como, por exemplo, N,N-dimetilsulfóxido. A adição de uma base apropriada tal como, por exemplo, um carbonato metálico alcalino ou alcalinoterroso ou hidrogeno carbonato ou uma base orgânica, por exemplo, N,N-di-isopropiletilamina, trietilamina, carbonato de sódio, hidrogeno carbonato de sódio, ou carbonato de potássio,

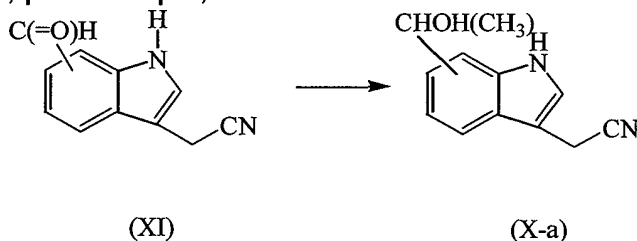
pode ser utilizado para capturar o ácido que é liberado durante o curso da reação.



Intermediários de fórmula (VIII) podem ser preparados do intermediário correspondente de fórmula (X) na presença de Níquel Raney e NH_3 na presença de um solvente adequado, tal como, por exemplo, um álcool, por exemplo, metanol e similares.

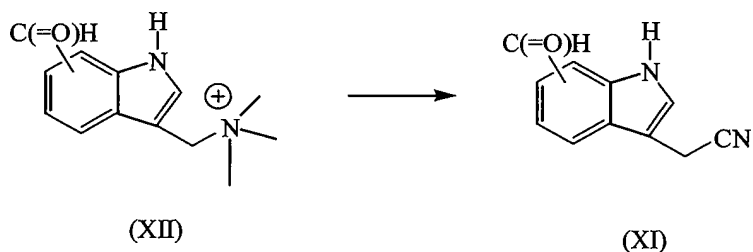


Intermediários de fórmula (X) em que R^1 representa hidroxiálquila C_{1-4} , por exemplo, $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_3)$, os ditos intermediários que são representados pela fórmula (X-a), podem ser preparados de um intermediário de fórmula (XI) pela reação com CH_3MgCl na presença de um solvente adequado, tal como, por exemplo, tetra-hidrofurano.

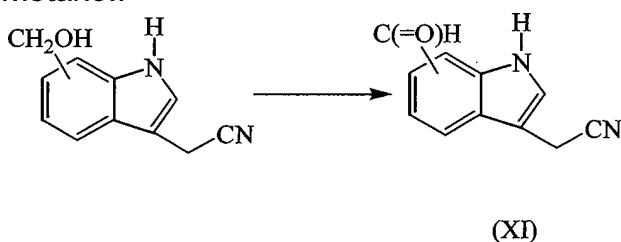


A mesma reação pode ser usada para preparar alternativas de hidroxiálquila C_{1-4} . Por exemplo, os intermediários em que R^1 representa $-\text{C}(\text{OH})(\text{CH}_3)_2$, podem ser preparados do intermediário correspondente com $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3$.

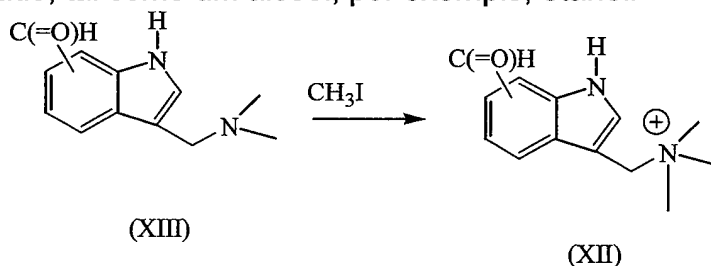
Intermediários de fórmula (XI) podem ser preparados pela reação de um intermediário de fórmula (XII) com cianeto de sódio na presença de um solvente adequado, tal como, por exemplo, N,N-dimetilformamida.



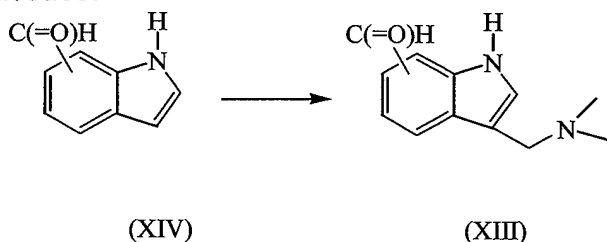
Alternativamente, Intermediários de fórmula (XI) também podem ser preparados pela oxidação do análogo hidroxila correspondente na presença de periodinana de Dess-Martin e um solvente adequado, tal como, por exemplo, diclorometano..



- 5 Intermediários de fórmula (XII) podem ser preparados pela reação de um intermediário de fórmula (XIII) com CH_3I na presença de um solvente adequado, tal como um álcool, por exemplo, etanol.



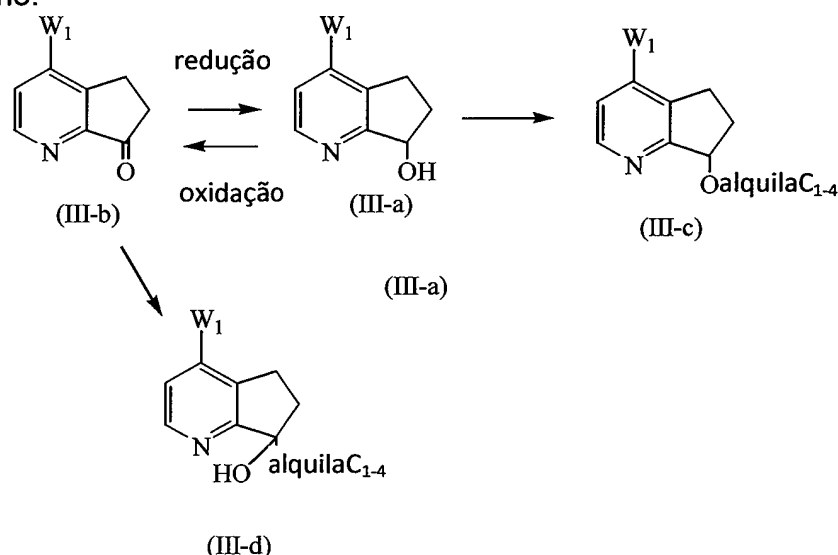
- 10 Intermediários de fórmula (XIII) podem ser preparados pela reação de um intermediário de fórmula (XIV) com sal de Eschenmosser na presença de ácido acético.



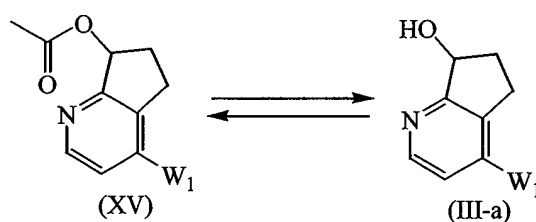
Intermediários de fórmula (XIV) podem ser preparados oxidando o análogo hidroxila correspondente na presença de um agente de oxidação adequado, tal como, por exemplo, MnO_2 , na presença de um solvente adequado, tal como, por exemplo, diclorometano..

Intermediários de fórmula (III) em que Z é radical de fórmula (z-2) e R⁴ é hidroxila, os ditos intermediários que são representados pela fórmula (III-a), podem ser preparados pela redução de um intermediário de fórmula (III-b) com um agente redutor adequado, tal como, por exemplo, Na-BH₄, na presença de um solvente adequado, tal como, por exemplo, um álcool, por exemplo, metanol.

Intermediários de fórmula (III-a) podem ser convertidos em um intermediário de fórmula (III-c) pela reação com iodeto de alquilaC₁₋₄, na presença de uma base adequada, tal como hidreto de sódio, e um solvente adequado, tal como, por exemplo, tetra-hidrofurano. Intermediários de fórmula (III-b) podem ser preparados pela oxidação de um intermediário de fórmula (III-a) pela reação com um agente de oxidação adequado, tal como, por exemplo, MnO₂, na presença de um solvente adequado, tal como, por exemplo, diclorometano. Intermediários de fórmula (III-b) podem ser convertidos em um intermediário de fórmula (III-d) pela reação com alquilaC₁₋₄MgCl na presença de um solvente adequado, tal como, por exemplo, tetra-hidrofurano.



Intermediários de fórmula (III-a) também podem ser preparados pela agitação do intermediário de fórmula (XV) em uma mistura de metanol/NH₃. Se desejado, o intermediário de fórmula (III-a) pode ser convertido no intermediário de fórmula (XV) por agitação em uma mistura de anidrido acético e piridina.

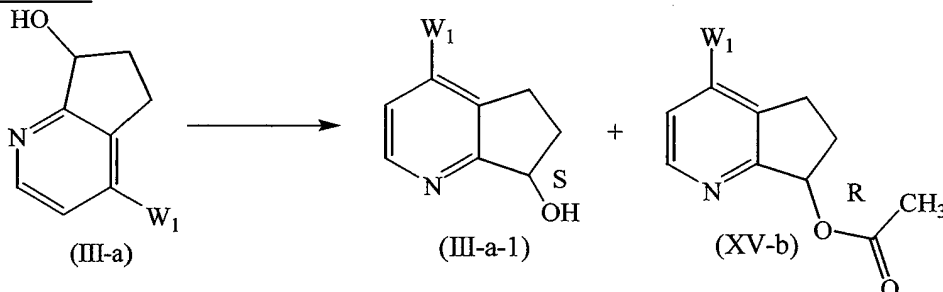


O enantiômetro S do intermediário (III-a), neste pedido referido como o intermediário de fórmula (III-a-1), e o enantiômetro R do intermediário de fórmula (XV), neste pedido referido como o intermediário de fórmula (XV-b), pode ser preparado pela adição de Lipase de *Candida Antartica* B a uma mistura racêmica do intermediário de fórmula (III-a) em um solvente adequado, tal como éster de etenila de ácido acético (ver Esquema 1). Quando desejado o intermediário de fórmula (XV-b) pode ser convertido no enantiômetro R do intermediário (III-a), neste pedido referido como o intermediário de fórmula (III-a-2), pela reação em MeOH/NH₃.

Iniciando da mistura racêmica, este método permite à conversão de um dos enantiômetros em seu acetato com rendimento de ee>99% e rendimento de 58% e o segundo enantiômetro é isolado com ee>99% em rendimento de 42%.

O termo excesso enantiomérico (ee) é bem conhecido pelo versado na stereoquímica. Para uma mistura de enantiômetros (+) e (-), com composição dada como mol ou frações de peso de F(+) e F(-) (onde F(+) + F(-) = 1), o excesso enantiomérico de F(*) é definido como F(+) - F(-), e o excesso enantiomérico percentual como 100 * [F(+) - F(-)].

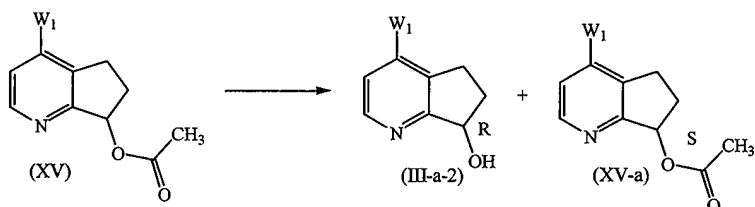
Esquema 1



Alternativamente, o enantiômetro R do intermediário (III-a), neste pedido referido como o intermediário de fórmula (III-a-2), e o enantiômetro S do intermediário de fórmula (XV), neste pedido referido como o intermediário de fórmula (XV-a), pode ser preparado por adição de Lipase de *Candida An-*

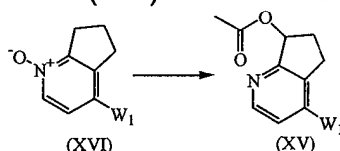
tartica B a uma mistura racêmica do intermediário de fórmula (XV) em água (ver Esquema 2). Quando desejado, o intermediário (XV-a) pode ser convertido no intermediário (III-a-1) pela reação em MeOH/NH₃.

Esquema 2

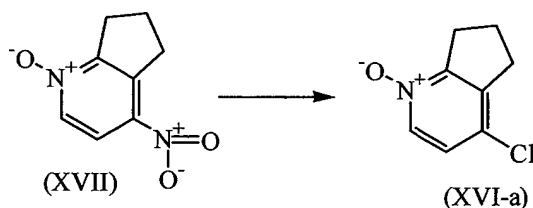


5 Alternativamente, o intermediário de fórmula (III-a) também pode ser separado em seus enantiômeros por cromatografia de coluna quiral.

Intermediários de fórmula (XV) podem ser preparados por agitação do intermediário de fórmula (XVI) em anidrido acético.



10 Intermediários de fórmula (XVI) em que W₁ é cloro, neste pedido referido como o intermediário de fórmula (XVI-a), podem ser preparados pela adição de cloreto de benziltriethylamônio e cloreto de sódio a uma solução do intermediário de fórmula (XVII) em acetonitrila, seguido pela adição de ácido hidrocloreto concentrado.

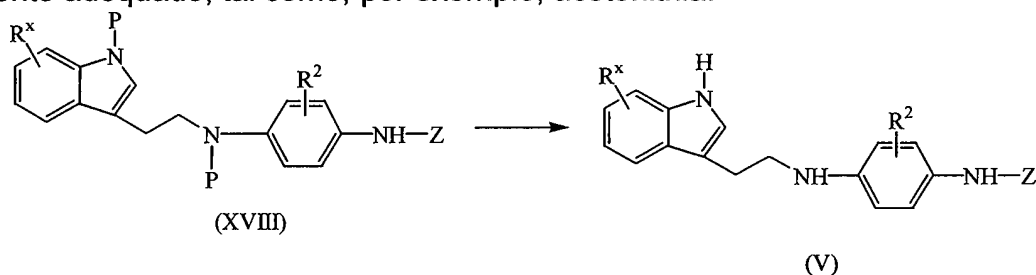


15 Intermediários de fórmula (XVII) podem ser preparados pela adição de ácido nítrico fumegante ao ácido sulfúrico seguido pela adição porção a porção de 1-óxido de 6,7-di-hidro-5H-ciclopenta[b]piridina.

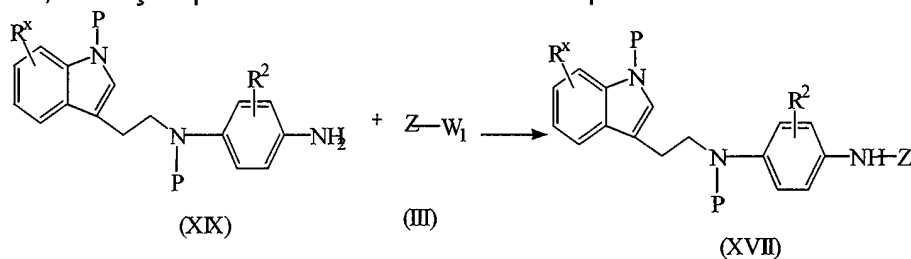
Intermediários de fórmula (IV) podem ser preparados de acordo com os protocolos de reação acima para intermediários de fórmula (II).

20 Intermediários de fórmula (V) podem ser preparados por desproteção de um intermediário de fórmula (XVIII) em que P representa um grupo protetor adequado, tal como, por exemplo, -C(=O)-O-C(CH₃)₃, na presença de um ácido adequado, tal como, por exemplo, ácido hidrocloreto, e um sol-

vente adequado, tal como, por exemplo, acetonitrila.

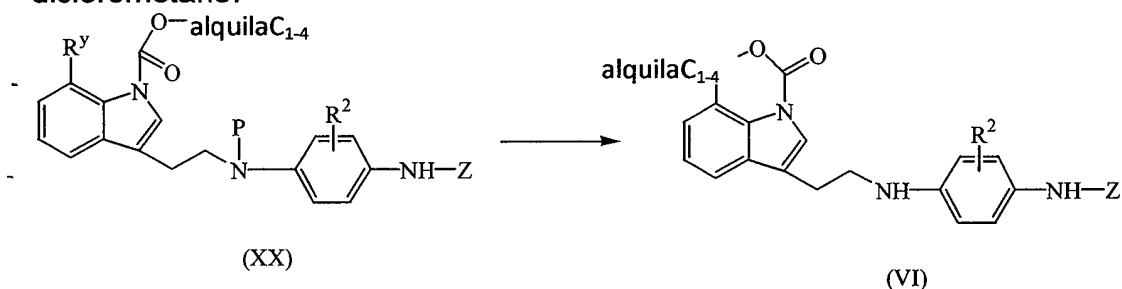


Intermediários de fórmula (XVIII) podem ser preparados pela reação de um intermediário de fórmula (XIX) com um intermediário de fórmula (III) na presença de um solvente inerte à reação tal como, por exemplo, um álcool, por exemplo, metanol, etanol, 2-metóxi-etanol, propanol, isopropanol-butanol e similares; um éter, por exemplo, 1, 4-dioxano preferencialmente na presença de um ácido adequado tal como, por exemplo, HCl, 1,1'-oxibispropano e similares; uma cetona, por exemplo, 4-metil-2-pentanona; ou N,N-dimetilformamida, nitrobenzeno, acetonitrila e similares. A adição de uma base apropriada tal como, por exemplo, um carbonato metálico alcalino ou alcalinoterroso ou hidrogeno carbonato ou uma base orgânica, por exemplo, N,N-di-isopropiletilamina, trietilamina, carbonato de sódio ou carbonato de potássio, pode ser utilizada para capturar o ácido que é liberado durante o curso da reação. Uma pequena quantidade de um iodeto metálico apropriado, por exemplo, iodeto de sódio ou de potássio, pode ser adicionado para promover a reação. A agitação pode aumentar a taxa da reação. A reação pode ser convenientemente realizada em uma temperatura que varia entre a temperatura ambiente e a temperatura de refluxo da mistura de reação e, se desejado, a reação pode ser realizada em uma pressão aumentada.

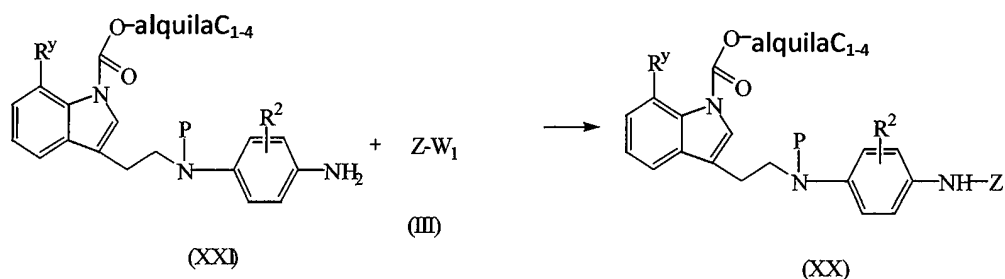


Intermediários de fórmula (XIX) podem ser preparados de acordo com os protocolos de reação descritos acima para intermediários de fórmula (II).

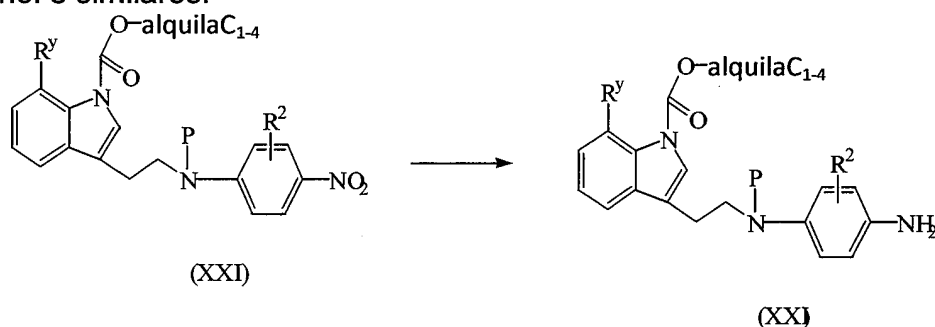
Intermediários de fórmula (VI) podem ser preparados pela reação de um intermediário de fórmula (XX) em que P representa um grupo protetor adequado como definido acima e R^y representa alquila_{C1-4}-O-Si(CH₃)₂C(CH₃)₃, na presença de um ácido adequado, tal como, por exemplo, ácido trifluoroacético, e um solvente adequado, tal como, por exemplo, diclorometano.



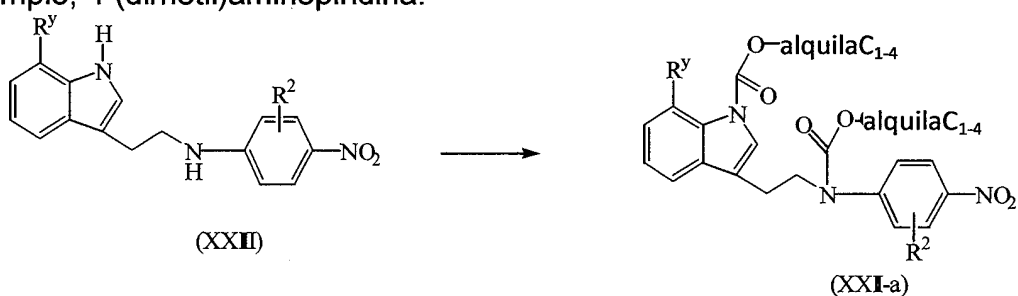
Intermediários de fórmula (XX) podem ser preparados pela reação de um intermediário de fórmula (XXI) com um intermediário de fórmula (III) na presença de um solvente inerte à reação tal como, por exemplo, um álcool, por exemplo, metanol, etanol, 2-metóxi-etanol, propanol, isopropanol, butanol e similares; um éter, por exemplo, 1, 4-dioxano preferencialmente na presença de um ácido adequado tal como, por exemplo, HCl, 1,1'-oxibispropano e similares; uma cetona, por exemplo, 4-metil-2-pentanona; ou N,N-dimetilformamida, nitrobenzeno, acetonitrila e similares. A adição de uma base apropriada tal como, por exemplo, um carbonato metálico alcalino ou alcalinoterroso ou hidrogeno carbonato ou uma base orgânica, por exemplo, N,N-di-isopropiletilamina, trietilamina, carbonato de sódio ou carbonato de potássio, pode ser utilizada para capturar o ácido que é liberado durante o curso da reação. Uma pequena quantidade de um iodeto metálico apropriado, por exemplo, iodeto de sódio ou de potássio, pode ser adicionado para promover a reação. A agitação pode aumentar a taxa da reação. A reação pode ser convenientemente realizada em uma temperatura que varia entre a temperatura ambiente e a temperatura de refluxo da mistura de reação e, se desejado, a reação pode ser realizada em uma pressão aumentada.



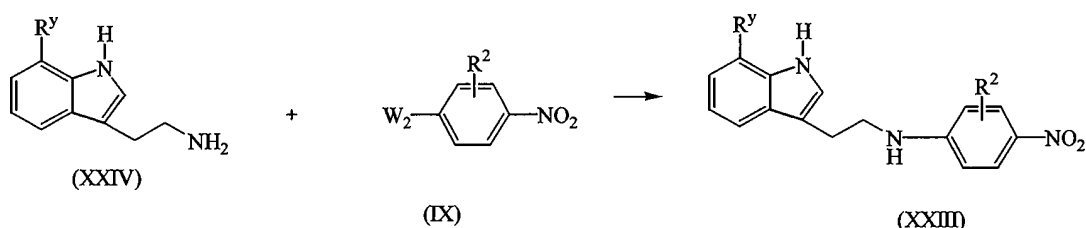
Intermediários de fórmula (XXI) podem ser preparados do intermediário de nitro correspondente da fórmula (XXII) pela hidrogenação na presença de um catalisador adequado, tal como, por exemplo, níquel Raney, e um solvente adequado, tal como, por exemplo, um álcool, por exemplo, metanol e similares.



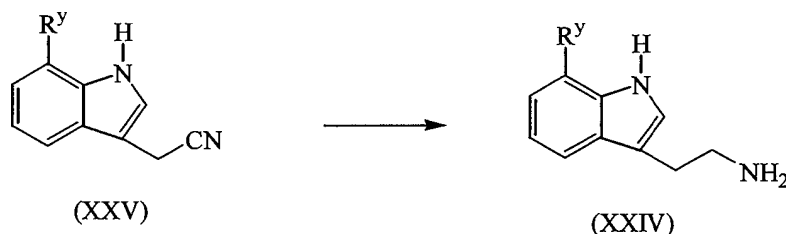
Intermediários de fórmula (XXII) em que P representa -C(=O)-O-alkylC₁₋₄, o dito intermediário que é representado pela fórmula (XXII-a), podem ser preparados pela reação de um intermediário de fórmula (XXIII) com dicarbonato de di-terc-butila na presença de uma base adequada, tal como, por exemplo, trietilamina, e um solvente adequado, tal como, por exemplo, 4-(dimetil)aminopiridina.



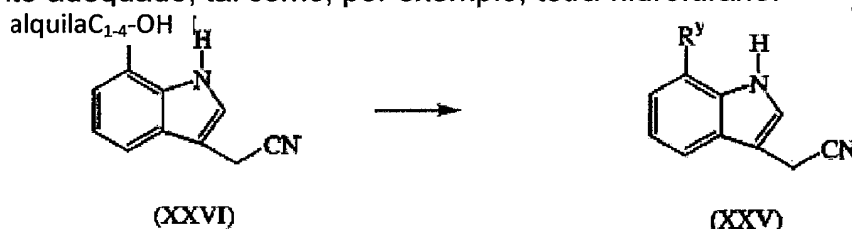
Intermediários de fórmula (XXIII) podem ser preparados pela reação de um intermediário de fórmula (XXIV) com um intermediário de fórmula (IX) na presença de uma base adequada, tal como, por exemplo, bicarbonato de sódio, e um solvente adequado, tal como, por exemplo, N,N-dimetilsulfóxido.



Intermediários de fórmula (XXIV) podem ser preparados pela reação de um intermediário de fórmula (XXV) com NH_3 na presença de um catalisador adequado, tal como, por exemplo, Níquel Raney, na presença de um solvente adequado, tal como, por exemplo, um álcool, por exemplo, metanol e similares.



Intermediários de fórmula (XXV) podem ser preparados pela reação de um intermediário de fórmula (XXVI) com terc-butildimetilsililcloroeto na presença de uma base adequada, tal como, por exemplo, imidazol, e um solvente adequado, tal como, por exemplo, tetra-hidrofurano.



Intermediários de fórmula (XXVI) podem ser preparados como descrito acima para intermediários de fórmula (XI).

Os compostos de fórmula (I) e alguns intermediários na presente invenção podem conter um átomo de carbono assimétrico. Formas isoméricas estereoquimicamente puras dos ditos compostos e dos ditos intermediários podem ser obtidas pela aplicação de procedimentos conhecidos da técnica. Por exemplo, os diastereoisômeros podem ser separados por métodos físicos, tais como cristalização seletiva ou técnicas cromatográficas, por exemplo, distribuição contracorrente, cromatografia líquida e métodos similares. Enantiômeros podem ser obtidos de misturas racêmicas pela primeira

conversão das ditas misturas racêmicas com agentes de resolução adequados tais como, por exemplo, ácidos quirais, a misturas de sais ou compostos diastereoméricos; em seguida separação física das ditas misturas de sais ou compostos diastereoméricos, por exemplo, por cristalização seletiva, cromatografia em fluido supercrítico ou técnicas cromatográficas, por exemplo, cromatografia líquida e métodos similares; e finalmente converter os ditos sais diastereoméricos ou compostos separados nos enantiômetros correspondentes. Formas isoméricas estereoquimicamente puras também podem ser obtidas das formas isoméricas estereoquimicamente puras dos intermediários apropriados e materiais iniciais, contanto que reações intervenientes ocorram estereoespecificamente.

Os compostos de fórmula (I), incluindo qualquer forma isomérica estereoquimicamente dos mesmos, sais farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos ou solvatos dos mesmos têm propriedades farmacológicas valiosas em que aumentam a expressão de p53, mostram potente atividade antiproliferativa, mostram potente atividade antitumoral.

Como indicado antes, os compostos da invenção aumentam a expressão de p53 no ensaio descrito em C.1. Este aumento pode ser causado por, mas não é limitado a, um ou mais dos seguintes mecanismos da ação:

- interações com alvos a montante ou a jusante, por exemplo, quinases, ou atividades enzimáticas envolvidas em ubiquitinação ou modificação de SUMO,
- estabilização direta ou indireta da proteína p53, por exemplo, pela manutenção dela em sua forma estrutural funcional, ou impedindo enovelamento incorreto,
- aumento da expressão de p53 ou expressão de membros da família de p53, por exemplo, p63 e p73,
- aumento da atividade de p53, por exemplo, pelo (mas não limitado a), aumento de sua atividade transcricional e/ou
- aumento de expressão de genes e proteínas da via sinalizadora de p53, por exemplo, (mas não limitado a) p21waf1, cip1, MIC-1 (GDF-

15), PIG-3, Bax, Puma, Noxa, e ATF-3.

Por isso, a presente invenção descreve os compostos de fórmula (I) para o uso como um remédio, em particular, para o tratamento de câncer ou doenças relacionadas, para inibição do crescimento tumoral, para
5 aumento da expressão de p53.

Além disso, a invenção também se relaciona ao uso de um composto para a produção de um medicamento para o tratamento de uma desordem mediada pela expressão reduzida de p53, em particular, para o tratamento de câncer em que o dito composto é um composto de fórmula (I).

10 O termo "tratar" ou "tratamento" como usado neste pedido cobre qualquer tratamento de uma doença e/ou condição em um animal, particularmente um ser humano, e inclui: (i) prevenção de uma doença e/ou condição que ocorre em um indivíduo que pode ser predisposto à doença e/ou condição, mas ainda não foi diagnosticado como a tendo; (ii) inibição da doença e/ou condição, isto é, impedindo seu desenvolvimento; (iii) alívio da
15 doença e/ou condição, isto é, causando regressão da doença e/ou condição.

Com o termo "uma desordem mediada pela expressão reduzida de p53" entende-se qualquer condição indesejada ou prejudicial que pode ser inibida por, na qual o desenvolvimento pode ser detido por, que pode ser
20 aliviada por ou na qual a regressão pode ser causada por apoptose, indução de morte celular, ou regulação do ciclo celular.

Esta invenção também fornece um método para tratamento de uma desordem mediada por uma expressão reduzida de p53, em particular, para tratamento do câncer, pela administração de uma quantidade eficaz de
25 um composto da presente invenção, a um indivíduo, por exemplo, um mamífero (e mais particularmente um ser humano) em necessidade de tal tratamento.

Os compostos da invenção podem ter efeitos antiproliferativos em células tumorais, mesmo se tais células forem destituídas de p53 funcional. Mais especialmente, os compostos da invenção podem ter efeitos antiproliferativos em tumores com p53 selvagem ou mutante e/ou em tumores que superexpressam MDM2. Os compostos podem afetar angiogênese, mi-
30

gração celular tumoral, invasão ou metástase.

Dessa forma, esta invenção também fornece um método para inibição do crescimento tumoral pela administração de uma quantidade eficaz de um composto da presente invenção, a um indivíduo, por exemplo, um mamífero (e mais particularmente um ser humano) em necessidade de tal tratamento.

Exemplos de tumores incluindo malignidades adultas e pediátricas, que podem ser inibidos pelos compostos da presente invenção incluem, mas não são limitados a, câncer de pulmão incluindo câncer de pulmão de células pequenas e câncer de pulmão de não células não pequenas (por exemplo, adenocarcinoma), cânceres pancreáticos, cânceres de cólon (por exemplo, carcinomas colorretais, tais como, por exemplo, adenocarcinoma de cólon e adenoma de cólon), câncer esofágico, carcinoma escamoso oral, carcinoma de língua, carcinoma gástrico, câncer hepático, câncer nasofaríngeal, tumores hematopoiéticos de linhagem linfoide (por exemplo, leucemia linfocítica aguda, linfoma de célula B, linfoma de Burkitt), linfoma não Hodgkin (por exemplo, linfoma de mastócito), doença de Hodgkin, leucemias mieloides (por exemplo, leucemia mielógena aguda (AML) ou leucemia mielógena crônica (CML)), leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crônica (CLL), câncer folicular de tireoide, síndrome mielodisplástica (MDS), tumores de origem mesenquimal, sarcomas de tecido mole, lipossarcomas, sarcomas estromais gastrintestinais, tumores malignos de bainha de nervo periférico (MPNST), sarcomas de Ewing, leiomiossarcomas, condrossarcomas mesenquimais, linfossarcomas, fibrossarcomas, rabdomiossarcomas, melanomas, teratocarcinomas, neuroblastomas, tumores cerebrais, meduloblastoma, gliomas, tumor benigno da pele (por exemplo, ceratoacantomas), carcinoma de mama (por exemplo, câncer de mama avançado), carcinoma de rim, nefroblastoma, carcinoma de ovário, carcinoma cervical, carcinoma endometrial, carcinoma de bexiga, câncer de próstata incluindo doença avançada e câncer de próstata refratário hormonal, cânceres testiculares, osteossarcoma, câncer de cabeça e pescoço, carcinoma epidérmico, mieloma múltiplo (por exemplo, mieloma múltiplo refratário), mesotelioma. Cânceres par-

ticulares que podem ser tratados com os compostos da presente invenção são câncer de mama, câncer colorretal, câncer de pulmão de células não pequenas, leucemia mielógena aguda (AML).

Os compostos da presente invenção também podem ser usados para o tratamento e a prevenção de condições inflamatórias.

Dessa forma, esta invenção também fornece um método para o tratamento e prevenção de condições inflamatórias pela administração de uma quantidade eficaz de um composto da presente invenção, a um indivíduo, por exemplo, um mamífero (e mais particularmente, um ser humano) em necessidade de tal tratamento.

Os compostos da presente invenção também podem ser usados para o tratamento de doenças e condições autoimunes. Com o termo "doenças autoimunes" entende-se qualquer doença na qual o sistema imune de um animal reage adversamente a um autoantígeno. Com o termo "autoantígeno" entende-se qualquer antígeno que é normalmente encontrado no corpo do animal. Doenças autoimunes representativas incluem, mas não são limitadas a: tireoidite de Hashimoto, doença de Graves, esclerose múltipla, anemia perniciosa, doença de Addison, diabetes mellitus dependente de insulina, artrite reumatoide, lúpus sistêmico eritematoso (SLE ou lúpus), dermatomiosite, doença de Crohn, granulomatose de Wegener, Doença Anti-membrana Basal Glomerular, Síndrome do Antifosfolípideo, Dermatite Herpetiforme, Encefalomielite Alérgica, Glomerulonefrite, Glomerulonefrite Membranosa, Síndrome de Goodpasture, Lambert-Eaton, Síndrome Miastênica, Miastenia Gravis, Penfigoide Bolhoso, Poliendocrinopatias, Doença de Reiter, e Síndrome de Stiff-Man.

Dessa forma, esta invenção também fornece um método para o tratamento de doenças e condições autoimunes pela administração de uma quantidade eficaz de um composto da presente invenção, a um indivíduo, por exemplo, um mamífero (e mais particularmente, um ser humano) em necessidade de tal tratamento.

Os compostos da presente invenção também podem ser úteis para o tratamento de doenças associadas com proteínas conformacionais

instáveis ou enoveladas incorretamente.

Exemplos de doenças associadas com proteínas conformacionais instáveis ou enoveladas incorretamente incluem, mas não são limitados a: fibrose cística (CFTR), síndrome de Marfan (fibrilina), Esclerose lateral amiotrófica (superóxido dismutase), escorbuto (colágeno), doença da urina de xarope de bordo (complexo alfa-cetoácido desidrogenase), osteogênese imperfecta (pró-colágeno tipo I pró-alfa), doença de Creutzfeldt-Jakob (príon), doença de Alzheimer (beta-amiloide), amiloidose familiar (lisozima), cataratas (cristalinos), hipercolesterolemia familiar (receptor de LDL), deficiência de antitripsina α I, doença de Tay-Sachs (beta-hexosaminidase), retinite pigmentosa (rodopsina) e leprechaunismo (receptor de insulina).

Dessa forma, esta invenção também fornece um método para o tratamento de doenças associadas a proteínas conformacionais instáveis ou enoveladas incorretamente pela administração de uma quantidade eficaz de um composto da presente invenção, a um indivíduo, por exemplo, um mamífero (e mais particularmente um ser humano) em necessidade de tal tratamento.

Em vista das suas propriedades farmacológicas úteis, os compostos objetos podem ser formulados em várias formas farmacêuticas para fins de administração.

Para preparar as composições farmacêuticas desta invenção, uma quantidade eficaz de um composto da presente invenção, como o ingrediente ativo é combinado em mistura profunda com um veículo farmacêuticamente aceitável, veículo o qual pode tomar uma ampla variedade de formas dependendo da forma de preparação desejada para a administração. Estas composições farmacêuticas estão desejavelmente na forma de dosagem unitária adequada, preferencialmente, para a administração oralmente, retalmente, percutaneamente, ou por injeção parenteral. Por exemplo, na preparação das composições na forma de dosagem oral, qualquer um dos meios farmacêuticos habituais pode ser empregado, tal como, por exemplo, água, glicol, óleos, alcoóis e similares em caso de preparações líquidas orais, tais como suspensões, xaropes, elixires e soluções; ou veículos sólidos,

tais como amidos, açúcares, caulim, lubrificantes, aglutinantes, agentes desintegrantes e similares em caso de pós, pílulas, cápsulas e comprimidos.

Por causa de sua facilidade na administração, comprimidos e cápsulas representam a forma de unidade de dosagem oral mais vantajosa, caso em que os veículos farmacêuticos sólidos são obviamente empregados. Para composições parenterais, o veículo compreenderá normalmente água estéril, pelo menos em grande parte, embora outros ingredientes, para ajudar na solubilidade, por exemplo, possam estar incluídos. Soluções injetáveis, por exemplo, podem ser preparadas nas quais o veículo compreende solução salina, solução de glicose ou uma mistura da solução de glicose e salina. Suspensões injetáveis também podem ser preparadas caso em que os veículos líquidos apropriados, agentes de afastamento e similares podem ser empregados. Nas composições adequadas para administração percutânea, o veículo opcionalmente compreende um agente de aumento de penetração e/ou um agente umidificante adequado, opcionalmente combinado com aditivos adequados de qualquer natureza em proporções menores, que os aditivos não causam um efeito deletério significativo à pele. Os ditos aditivos podem facilitar a administração na pele e/ou podem ser úteis para preparar as composições desejadas. Estas composições podem ser administradas de vários modos, por exemplo, como um adesivo transdérmico, como um spot-on, como uma pomada. É especialmente vantajoso formular as composições farmacêuticas acima mencionadas na forma de unidade de dosagem para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. Forma de unidade de dosagem como usada no relatório descritivo e reivindicações neste pedido refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias, cada unidade contendo uma quantidade determinada do ingrediente ativo calculado para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo farmacêutico necessário. Exemplos de tais formas de unidade de dosagem são comprimidos (incluindo comprimidos marcados ou recobertos), cápsulas, pílulas, pacotes de pó, wafers, soluções ou suspensões injetáveis, colheres de chá cheias, colheres de sopa cheias e similares e múltiplos segregados disso.

É especialmente vantajoso formular as composições farmacêuticas acima mencionadas na forma de unidade de dosagem para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. Forma de unidade de dosagem como usada no relatório descritivo e reivindicações neste pedido refere-se a

5 unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias, cada unidade contendo uma quantidade predeterminada do ingrediente ativo, calculado para produzir o efeito terapêutico desejado, em parceria com o veículo farmacêutico necessário. Exemplos de tais formas de unidade de dosagem são comprimidos (incluindo comprimidos marcados ou cobertos), cápsulas,

10 pílulas, pacotes de pó, wafers, soluções injetáveis ou suspensões, colheres de chá cheias, colheres de sopa cheias e similares, e múltiplos segregados dos mesmos.

O composto da invenção é administrado em uma quantidade suficiente para induzir apoptose, induzir morte celular ou regular o ciclo celular.

15 Dessa forma, o composto da invenção é administrado em uma quantidade suficiente para aumentar a expressão de p53, ou exercer sua atividade antitumoral.

Os versados na técnica podem determinar facilmente a quantidade eficaz dos resultados teste apresentados mais adiante. Em geral é contemplado que uma quantidade terapeuticamente eficaz seria de 0,005 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal, e em particular de 0,005 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal. Pode ser conveniente administrar a dose necessária como

20 única, duas, três, quatro ou mais sub-doses em intervalos apropriados ao longo do dia. As ditas sub-doses podem ser formuladas como formas de dosagem de unidade, por exemplo, contendo 0,5 a 500 mg, em particular 1 mg a 500 mg, mais em particular 10 mg a 500 mg do ingrediente ativo por forma de dosagem de unidade.

25

Dependendo do modo de administração, a composição farmacêutica compreenderá preferencialmente de 0,05 a 99% por peso, mais preferencialmente de 0,1 a 70% por peso, ainda mais preferencialmente de 0,1 a 50% por peso do composto da presente invenção, e, de 1 a 99,95% por peso, mais preferencialmente de 30 a 99,9% por peso, ainda mais preferen-

30

cialmente de 50 a 99,9% por peso de um veículo farmacologicamente aceitável, todas as porcentagens sendo baseadas no peso total da composição.

Como outro aspecto da presente invenção, uma combinação de um composto da presente invenção com outro agente anticâncer é contemplada, especialmente para uso como um remédio, mais especificamente no
5 tratamento de câncer ou doenças relacionadas.

Para o tratamento das condições acima, os compostos da invenção podem ser vantajosamente empregados em combinação com um ou mais agentes medicinais, mais particularmente, com outros agentes anticâncer ou adjuvantes na terapia de câncer. Exemplos de agentes anticâncer ou adjuvantes (agentes auxiliares na terapia) incluem, mas não são limitados a:
10

- compostos de coordenação de platina, por exemplo, cisplatina opcionalmente combinada com amifostina, carboplatina ou oxiplatina;

- compostos de taxano, por exemplo, paclitaxel, partículas ligadas à proteína de paclitaxel (Abraxane®) ou docetaxel;
15

- inibidores de topoisomerase, tais como compostos de camptotecina, por exemplo, irinotecano, SN-38, topotecano, topotecano hcl;

- inibidores de topoisomerase II, tais como epipodofilotoxinas antitumorais ou derivados de podofilotoxina, por exemplo, etoposídeo, fosfato de etoposídeo ou teniposídeo;
20

- alcaloides de vinca antitumorais, por exemplo, vinblastina, vincristina ou vinorelbina;

- derivados de nucleosídeo antitumoral, por exemplo, 5-fluorouracila, leucovorina, gencitabina, gencitabina hcl, capecitabina, cladribina, fludarabina, nelarabina;
25

- agentes alquilantes, tais como mostarda de nitrogênio ou nitrosourea, por exemplo, ciclofosfamida, clorambucila, carmustina, tiotepa, mephalan (melfalano), lomustina, altretamina, bussulfano, dacarbazina, estramustina, ifosfamida opcionalmente em combinação com mesna, pipobromano, procarbazina, estreptozocina, telozolomida, uracila;
30

- derivados de antraciclina antitumoral, por exemplo, daunorrubicina, doxorubicina opcionalmente em combinação com dexrazoxana, doxil,

- idarrubicina, mitoxantrona, epirrubicina, epirrubicina hcl, valrubicina;
- moléculas que visam o receptor IGF-1, por exemplo, picropodofilina;
 - derivados de tetracarcina, por exemplo, tetrocarcina A;
 - glicocorticoides, por exemplo, prednisona;
 - anticorpos, por exemplo, trastuzumabe (anticorpo HER2), rituximabe (anticorpo CD20), gentuzumabe, gentuzumabe ozogamicina, cetuximabe, pertuzumabe, bevacizumabe, alentuzumabe, eculizumabe, ibritumomabe tiuxetano, nofetumomabe, panitumumabe, tositumomabe, CNTO 328;
 - antagonistas de receptor de estrogênio ou moduladores de receptor de estrogênio seletivos ou inibidores de síntese de estrogênio, por exemplo, tamoxifeno, fulvestrant, toremifeno, droloxifeno, faslodex, raloxifeno ou letrozol;
 - inibidores de aromatase, tais como exemestano, anastrozol, letrozol testolactona e vorozol;
 - agentes de diferenciação, tais como retinoides, vitamina D ou ácido retinoico e agentes de bloqueio de metabolismo de ácido retinoico (RAMBA), por exemplo, acutano;
 - inibidores de DNA Metil transferase, por exemplo, azacitidina ou decitabina;
 - antifolatos, por exemplo, premetrexed dissódico;
 - antibióticos, por exemplo, antinomina D, bleomicina, mitomicina C, dactinomicina, carminomicina, daunomicina, levamisol, plicamicina, mitramicina;
 - antimetabólitos, por exemplo, clofarabina, aminopterina, citosina arabinosídeo ou metotrexato, azacitidina, citarabina, floxuridina, pentostatina, tioguanina;
 - agentes de indução de apoptose e agentes antiangiogênicos, tais como inibidores de Bcl-2, por exemplo, YC 137, BH 312, ABT 737, gossypol, HA 14-1, TW 37 ou ácido decanoico;
 - agentes de ligação à tubulina, por exemplo, combrestatina, colchicinas ou nocodazol;

- inibidores de quinase (por exemplo, inibidores de EGFR (receptor de fator de crescimento epitelial), MTKI (inibidores de quinase multialvo), inibidores de mTOR, por exemplo, flavoperidol, mesilato de imatinibe, erlotinibe, gefitinibe, dasatinibe, lapatinibe, ditosilato de lapatinibe, sorafenibe,
- 5 sunitinibe, maleato de sunitinibe, temsirolimus;
 - inibidores de farnesiltransferase, por exemplo, tipifarnibe;
 - inibidores de histona deacetilase (HDAC), por exemplo, butirato de sódio, suberoilânida de ácido de hidroxamida (SAHA), depsipeptídeo (FR 901228), NVP-LAQ824, R306465, JNJ-26481585, tricoestatina A, vorinostat;
 - 10 - Inibidores da via de proteassoma da ubiquitina, por exemplo, PS-341, MLN.41 ou bortezomibe;
 - Yondelis;
 - Inibidores de telomerase, por exemplo, telomestatina;
 - 15 - Inibidores de metaloproteinase de matriz, por exemplo, batimastat, marimastat, prinostat ou metastat.
 - Interleucinas recombinantes, por exemplo, aldesleucina, denileucina diftotox, interferon alfa 2a, interferon alfa 2b, peginterferon alfa 2b
 - Inibidores de MAPK
 - 20 - Retinoides, por exemplo, alitretinoína, bexaroteno, tretinoína
 - Trióxido de arsênico
 - Asparaginase
 - Esteroides, por exemplo, propionato de dromostanolona, acetato de megestrol, nandrolona (decanoato, fempropionato), dexametasona
 - 25 - Agonistas ou antagonistas hormonais liberando gonadotropina, por exemplo, abarelix, acetato de goserelina, acetato de histrelina, acetato de leuprolida
 - Talidomida, lenalidomida
 - Mercaptopurina, mitotano, pamidronato, pegademase, pegaspargase, rasburicase
 - 30 - Miméticos de BH3, por exemplo, ABT-737
 - Inibidores de MEK, por exemplo, PD98059, AZD6244, CI-1040

- análogos de fator estimulante de colônia, por exemplo, filgrastim, pegfilgrastim, sargramostim; eritropoietina ou análogos da mesma (por exemplo, darbepoietina alfa); interleucina 11; oprelvecina; zoledronato, ácido zoledrônico; fentanil; bisfosfonato; palifermin.

5 - um inibidor esteroideal de citocromo P450 17alfa-hidroxilase-17,20-liase (CYP17), por exemplo, abiraterona, acetato de abiraterona.

Como afirmado acima, os compostos da presente invenção também têm aplicações terapêuticas em sensibilizar células tumorais para radioterapia e quimioterapia.

10 Por isso os compostos da presente invenção podem ser usados como "radiossensibilizante" e/ou "quimiossensibilizante" ou podem ser dados em combinação com outro "radiossensibilizante" e/ou "quimiossensibilizante".

15 O termo "radiossensibilizante", como usado neste pedido, é definido como uma molécula, preferencialmente uma molécula de baixo peso molecular, administrada a animais em quantidades terapêuticamente eficazes para aumentar a sensibilidade das células à radiação ionizante e/ou promover o tratamento de doenças que são tratáveis com radiação ionizante.

20 O termo "quimiossensibilizante", como usado neste pedido, é definido como uma molécula, preferencialmente uma molécula de baixo peso molecular, administrada a animais em quantidades terapêuticamente eficazes para aumentar a sensibilidade de células à quimioterapia e/ou promover o tratamento de doenças que são tratáveis com quimioterápicos.

25 Vários mecanismos do modo da ação de radiossensibilizantes foram sugeridos na literatura incluindo: radiossensibilizantes de célula hipóxica (por exemplo, compostos de 2-nitroimidazol, e compostos de dióxido de benzotriazina) mimetizando oxigênio ou alternativamente comportando-se como agentes biorredutores sob hipóxia; radiossensibilizantes de célula não
30 hipóxica (por exemplo, pirimidinas halogenadas) podem ser análogos de bases de DNA e preferencialmente incorporar-se em DNA de células de câncer e por meio disso promover a quebra induzida por radiação de moléculas de

DNA e/ou prevenir os mecanismos de reparo de DNA normais; e vários outros mecanismos potenciais de ação foram hipotetizados para radiosensibilizantes no tratamento da doença.

Muitos protocolos de tratamento de câncer atualmente empregam radiosensibilizantes em conjunto com radiação de raios x. Exemplos de radiosensibilizantes ativados por raios x incluem, mas não são limitados ao seguinte: metronidazol, misonidazol, desmetilmisonidazol, pimonidazol, etanidazol, nimorazol, mitomicina C, RSU 1069, SR 4233, EO9, RB 6145, nicotinamida, 5-bromodesoxiuridina (BUdR), 5-iododesoxiuridina (IUdR), bromodesoxicitidina, fluorodesoxiuridina (FudR), hidroxiureia, cisplatina, e análogos terapeuticamente eficazes e derivados dos mesmos.

Terapia fotodinâmica (PDT) de cânceres emprega luz visível como o ativador de radiação do agente sensibilizante. Exemplos de radiosensibilizantes fotodinâmicos incluem os seguintes, mas não são limitados a: derivados de hematoporfirina, Fotofrina, derivados de benzoporfirina, tin etioporfirina, feoforbida, bacterioclorofila, naftalocianinas, ftalocianinas, zinco ftalocianina, e análogos terapeuticamente eficazes e derivados dos mesmos.

Radiossensibilizantes podem ser administrados em conjunto com uma quantidade terapeuticamente eficaz de um ou mais compostos, incluindo, mas não limitados a: compostos que promovem a incorporação de radiosensibilizantes às células alvo; compostos que controlam o fluxo de terapêuticos, nutrientes, e/ou oxigênio às células alvo; agentes quimioterápicos que atuam sobre o tumor com ou sem radiação adicional; ou outros compostos terapeuticamente eficazes para tratamento do câncer ou outras doenças.

Quimiossensibilizantes podem ser administrados em conjunto com uma quantidade terapeuticamente eficaz de um ou mais compostos, incluindo, mas não limitados a: compostos que promovem a incorporação de quimiossensibilizantes às células alvo; compostos que controlam o fluxo de terapêuticos, nutrientes, e/ou oxigênio às células alvo; agentes quimioterápicos que atuam sobre o tumor ou outros compostos terapeuticamente eficazes para tratamento do câncer ou outra doença. Antagonistas de cálcio, por

exemplo, verapamil, são úteis em combinação com agentes antineoplásicos para estabelecer quimiossensibilidade em células tumorais resistentes a aceitar agentes quimioterápicos e a potencializar a eficácia de tais compostos em malignidades sensíveis ao fármaco.

5 Em vista de suas propriedades farmacológicas úteis, os componentes das combinações de acordo com a invenção, isto é, um ou mais agentes medicinais e o composto de acordo com a presente invenção podem ser formulados em várias formas farmacêuticas para fins de administração. Os componentes podem ser formulados separadamente em composições
10 farmacêuticas individuais ou em uma composição farmacêutica unitária contendo todos os componentes.

 A presente invenção, por isso, também, se relaciona a uma composição farmacêutica compreendendo um ou mais agentes medicinais e o composto de acordo com a presente invenção em conjunto com um veículo
15 farmacêutico.

 A presente invenção ainda se relaciona ao uso de uma combinação de acordo com a invenção na produção de uma composição farmacêutica para inibição do crescimento de células tumorais.

 A presente invenção ainda se relaciona a um produto contendo
20 como ingrediente primeiro ativo um composto de acordo com a invenção e como ingrediente mais ativo um ou mais agentes anticâncer, como uma preparação combinada para uso simultâneo, separado ou sequencial no tratamento de pacientes sofrendo de câncer.

 Um ou mais agentes medicinais e o composto de acordo com a
25 presente invenção podem ser administrados simultaneamente (por exemplo, em composições separadas ou unitárias) ou sequencialmente em qualquer ordem. Em último caso, dois ou mais compostos serão administrados dentro de um período e em uma quantidade e maneira que é suficiente para assegurar que um efeito vantajoso ou sinérgico é alcançado. Será apreciado
30 que o método e ordem preferenciais de administração e as respectivas quantidades de dosagem e regimes de cada componente da combinação dependerão de outro agente medicinal particular e o composto da presente

invenção sendo administrado, sua via de administração, o tumor particular sendo tratado e o hospedeiro particular sendo tratado. O método e ordem ótimos de administração e as quantidades e regime de dosagem podem ser prontamente determinados pelos versados na técnica usando métodos convencionais e em vista da informação estabelecida neste pedido.

A proporção de peso do composto de acordo com a presente invenção e um ou mais agentes anticâncer quando dados como uma combinação pode ser determinada pelo versado na técnica. A dita proporção e a dosagem exata e a frequência de administração dependem do composto particular de acordo com a invenção e outro(s) agente(s) anticâncer usado, a condição particular que é tratada, a severidade da condição que é tratada, a idade, peso, gênero, dieta, tempo de administração e condição física geral do paciente particular, o modo de administração bem como outra medicação que o indivíduo possa estar tomando, como é bem conhecido pelos versados na técnica. Além disso, é evidente que a quantidade diária eficaz pode ser reduzida ou aumentada dependendo da resposta do indivíduo tratado e/ou dependendo da avaliação do médico que prescreve os compostos da invenção imediata. Uma proporção particular de peso do presente composto de fórmula (I) e outro agente anticâncer pode variar de 1/10 a 10/1, mais em particular de 1/5 a 5/1, ainda mais em particular de 1/3 a 3/1.

O composto de coordenação de platina é vantajosamente administrado em uma dosagem de 1 a 500 mg por metro quadrado (mg/m^2) da área de superfície corporal, por exemplo, 50 a 400 mg/m^2 , particularmente para cisplatina em uma dosagem de aproximadamente 75 mg/m^2 e para carboplatina em aproximadamente 300 mg/m^2 por curso do tratamento.

O composto de taxano é vantajosamente administrado em uma dosagem de 50 a 400 mg por metro quadrado (mg/m^2) da área de superfície corporal, por exemplo, 75 a 250 mg/m^2 , particularmente para paclitaxel em uma dosagem de aproximadamente 175 a 250 mg/m^2 e para docetaxel em aproximadamente 75 a 150 mg/m^2 por curso do tratamento.

O composto de camptotecina é vantajosamente administrado em uma dosagem de 0,1 a 400 mg por metro quadrado (mg/m^2) da área de su-

perfície corporal, por exemplo, 1 a 300 mg/m², particularmente para irinotecano em uma dosagem de aproximadamente 100 a 350 mg/m² e para topotecano em aproximadamente 1 a 2 mg/m² por curso do tratamento.

5 O derivado antitumoral de podofilotoxina é vantajosamente administrado em uma dosagem de 30 a 300 mg por metro quadrado (mg/m²) da área de superfície corporal, por exemplo, 50 a 250mg/m², particularmente para etoposídeo em uma dosagem de aproximadamente 35 a 100 mg/m² e para teniposídeo em aproximadamente 50 a 250 mg/m² por curso do tratamento.

10 O alcaloide de vinca antitumoral é vantajosamente administrado em uma dosagem de 2 a 30 mg por metro quadrado (mg/m²) da área de superfície corporal, particularmente para vinblastina em uma dosagem de aproximadamente 3 a 12 mg/m², para vincristina em uma dosagem de aproximadamente 1 a 2 mg/m², e para vinorelbina na dosagem de aproximadamente 10 a 30 mg/m² por curso do tratamento.

O derivado de nucleosídeo antitumoral é vantajosamente administrado em uma dosagem de 200 a 2500 mg por metro quadrado (mg/m²) da área de superfície corporal, por exemplo, 700 a 1500 mg/m², particularmente para 5-FU em uma dosagem de 200 a 500mg/m², para gencitabina 20 em uma dosagem de aproximadamente 800 a 1200 mg/m² e para capecitabina em aproximadamente 1000 a 2500 mg/m² por curso de tratamento.

Os agentes alquilantes, tais como mostarda de nitrogênio ou nitrosourea são vantajosamente administrados em uma dosagem de 100 a 500 mg por metro quadrado (mg/m²) da área de superfície corporal, por exemplo, 120 a 200 mg/m², particularmente para ciclofosfamida em uma dosagem de aproximadamente 100 a 500 mg/m², para clorambucila em uma dosagem de aproximadamente 0,1 a 0,2 mg/kg, para carmustina em uma dosagem de aproximadamente 150 a 200 mg/m², e para lomustina em uma dosagem de aproximadamente 100 a 150 mg/m² por curso do tratamento.

30 O derivado de antraciclina antitumoral é vantajosamente administrado em uma dosagem de 10 a 75 mg por metro quadrado (mg/m²) da área de superfície corporal, por exemplo, 15 a 60 mg/m², particularmente

para doxorrubicina em uma dosagem de aproximadamente 40 a 75 mg/m², para daunorrubicina em uma dosagem de aproximadamente 25 a 45 mg/m², e para idarrubicina em uma dosagem de aproximadamente 10 a 15 mg/m² por curso de tratamento.

5 O agente antiestrogênio é vantajosamente administrado em uma dosagem de aproximadamente 1 a 100 mg diariamente dependendo do agente particular e a condição que é tratada. Tamoxifeno é vantajosamente administrado oralmente em uma dosagem de 5 a 50 mg, preferencialmente 10 a 20 mg duas vezes por dia, continuando a terapia por tempo suficiente
10 para alcançar e manter um efeito terapêutico. Toremifeno é vantajosamente administrado oralmente em uma dosagem de aproximadamente 60 mg uma vez por dia, continuando a terapia por tempo suficiente para alcançar e manter um efeito terapêutico. Anastrozol é vantajosamente administrado oralmente em uma dosagem de aproximadamente 1 mg uma vez por dia. Droloxifeno é vantajosamente administrado oralmente em uma dosagem de aproximadamente 20 a 100mg uma vez por dia. Raloxifeno é vantajosamente administrado oralmente em uma dosagem de aproximadamente 60 mg uma vez por dia. Exemestano é vantajosamente administrado oralmente em uma dosagem de aproximadamente 25 mg uma vez por dia.

20 Anticorpos são vantajosamente administrados em uma dosagem de aproximadamente 1 a 5 mg por metro quadrado (mg/m²) da área de superfície corporal, ou como conhecido na técnica, se diferente. Trastuzumabe é vantajosamente administrado em uma dosagem de 1 a 5 mg por metro quadrado (mg/m²) da área de superfície corporal, particularmente 2 a 4
25 mg/m² por curso de tratamento.

Estas dosagens podem ser administradas, por exemplo, uma vez, duas vezes ou mais por curso do tratamento, que pode ser repetido, por exemplo, a cada 7, 14, 21 ou 28 dias.

Os compostos de fórmula (I), os sais de adição farmacêuticamente aceitáveis, em particular sais de adição ácida farmacêuticamente aceitáveis, e formas estereoisoméricas dos mesmos pode ter propriedades
30 diagnósticas valiosas em que possam ser usados para detecção ou identifi-

cação da formação de um complexo entre um composto marcado e outras moléculas, peptídeos, proteínas, enzimas ou receptores.

A detecção ou identificação de métodos podem usar compostos que são marcados com agentes de marcação, tais como radioisótopos, enzimas, substâncias fluorescentes, substâncias luminosas, etc. Exemplos de radioisótopos incluem ^{125}I , ^{131}I , ^3H e ^{14}C . Enzimas são normalmente tornadas detectáveis pela conjugação a um substrato apropriado que, por sua vez catalisa uma reação detectável. Exemplos destas incluem, por exemplo, beta-galactosidase, beta-glicosidase, fosfatase alcalina, peroxidase e malato desidrogenase, preferencialmente peroxidase de rábano silvestre. As substâncias luminosas incluem, por exemplo, luminol, derivados de luminol, luciferina, aequorina e luciferase.

Amostras biológicas podem ser definidas como tecido corporal ou fluidos corporais. Exemplos de fluidos corporais são fluido cerebrospinal, sangue, plasma, soro, urina, escarro, saliva e similares.

Os seguintes exemplos ilustram a presente invenção.

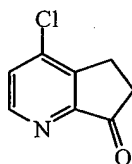
Parte experimental

A seguir, "DMF" é definido como *N,N*-dimetilformamida, "DCM" é definido como diclorometano, "DIPE" é definido como éter de di-isopropila, 'DMSO' é definido como dimetilsulfóxido, "EtOAc" é definido como acetato de etila, "EtOH" é definido como etanol, "MeOH" é definido como metanol e "THF" é definido como tetra-hidrofurano.

A. Preparação dos compostos intermediários

Exemplo A1

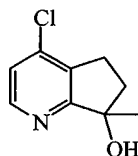
25 a) Preparação de intermediário 1



Óxido de manganês (33,31g, 13Eq, 0,3832 mol) foi adicionado porção a porção a uma solução de 4-cloro-6,7-di-hidro-5H-Ciclopenta[b]piridin-7-ol (intermediário 3) [CAS 126053-15-4] (5g, 1Eq, 0,029 mol) em DCM (50 ml). A mistura foi agitada à temperatura ambiente por 24

horas e em seguida filtrada sobre celite. O solvente foi evaporado, produzindo 3,25g (66%) de **intermediário 1**.

b) Preparação de intermediário 2

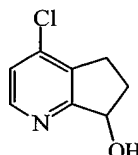


5 Cloreto de metilmagnésio (1,47 ml, 3.2Eq, 0.0,004 mol) foi adicionado gota a gota a uma solução de **intermediário 1** (0,220g, 1Eq, 0,0013 mol) em THF (4 ml) de -5 a 0°C sob fluxo de N₂. A reação foi agitada à temperatura ambiente por 1,5 horas.

Em 0 a 10°C, cloreto de amônio (10% em água) e EtOAc foram adicionados. A mistura foi extraída três vezes com EtOAc e em seguida a
10 camada orgânica foi separada, seca sobre MgSO₄, filtrada e o solvente foi evaporado. O resíduo (0,215 g) foi purificado por cromatografia de coluna sobre sílica-gel (Eluente: ciclo-hexano/EtOAc 50/50). As frações puras foram coletadas e o solvente foi evaporado, produzindo 0,120g (50%) de **intermediário 2**.

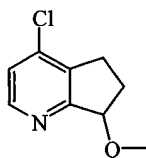
15 Exemplo A2

a) Preparação de intermediário 3



Tetra-hidrobórato de sódio (1,92 g, 50,67 mmols) foi adicionado porção a porção a 5°C a uma solução de **intermediário 1** (7,72 g, 46,06 mmols) em MeOH (80 ml). A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente por 1 noite e em seguida vertida em água. A mistura foi extraída
20 três vezes com EtOAc. A camada orgânica foi lavada com água e solução de NaCl, separada, seca sobre MgSO₄, filtrada e o solvente foi evaporado, produzindo 6,38 g (81,7%) de **intermediário 3** (50/50 mistura RS). Este produto foi usado sem purificação adicional na seguinte etapa.

25 b) Preparação de intermediário 4

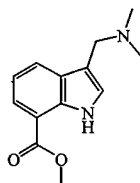


A 0°C e sob atmosfera N₂, hidreto de sódio (1,06 g, 44,22 mmols) foi adicionado porção a porção a uma solução de **intermediário 3** (3,00 g, 17,70 mmols) em THF (anidro, 30 ml). A reação foi agitada por 15 minutos a 0°C. Em seguida a 0°C, iodometano (1,65 ml, 26,53 mmols) foi
 5 adicionado gota a gota à mistura. A reação foi agitada à temperatura ambiente por 1 noite. A mistura foi resfriada à temperatura ambiente e água fria foi adicionada gota a gota. A mistura foi agitada por 1 hora e em seguida foi extraída com EtOAc três vezes. A camada orgânica foi separada, seca sobre MgSO₄, filtrada e o solvente foi evaporado, produzindo 3,10 g (95,4%) de
 10 **intermediário 4**.

Este produto foi usado sem purificação adicional na seguinte etapa.

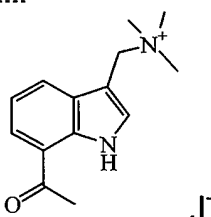
Exemplo A3

a) Preparação de intermediário 5



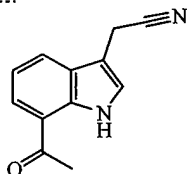
15 Éster de metila de ácido 1H-indol-7-carboxílico, (0,091 mol), sal de Eschenmoser (0,1 mol) em ácido acético (300 ml) foi aquecido a 65°C por 2 horas. O precipitado foi filtrado, dissolvido em DCM e carbonato de potássio 10%. Carbonato de potássio (sólido) foi adicionado e a mistura foi agitada à temperatura ambiente por 1 hora e em seguida extraída. A camada orgânica foi separada, seca sobre MgSO₄, filtrada e o solvente foi evaporado,
 20 produzindo 10g de **intermediário 5**.

b) Preparação de intermediário 6



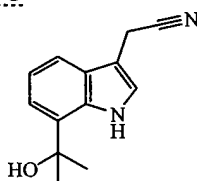
Intermediário 5 (0,043 mol), iometano (0,047 mol) em EtOH (30 ml) foram agitados à temperatura ambiente durante a noite. O precipitado foi filtrado e seco, produzindo 8,3g de **intermediário 6**.

c) Preparação de intermediário 7



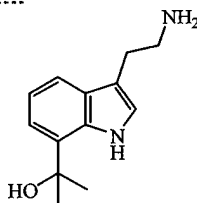
5 **Intermediário 6** (0,023 mol), cianeto de sódio (0,03 mol) em DMF (100 ml) foi aquecido a 110°C por 2 horas. A mistura de reação foi vertida em água gelada, agitada por 1 hora. O precipitado foi filtrado e tomado em DCM. A solução foi extraída, a camada orgânica foi separada, seca sobre MgSO₄, filtrada e evaporada, produzindo 5,1g de **intermediário 7**.

10 d) Preparação de intermediário 8



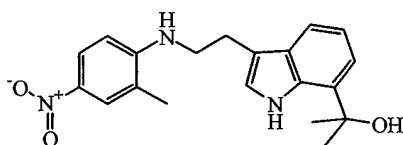
Cloreto de metilmagnésio (0,058 mol) foi adicionado gota a gota a uma solução de **intermediário 7** (0,018 mol) em THF (5 ml) a 5°C sob fluxo de N₂. A mistura de reação foi agitada a 5°C por 1 hora. Cloreto de amônio 10% foi adicionado gota a gota a 5°C. A mistura de reação foi extraída com EtOAc. A camada orgânica foi separada, seca sobre MgSO₄, filtrada e evaporada, produzindo 4g de **intermediário 8**.

e) Preparação de intermediário 9



Intermediário 8 (0,019 mol), níquel Raney (4 g) em MeOH/NH₃ (50 ml) foi hidrogenado à temperatura ambiente sob (3 bars) 300 kPa por 2 horas. A mistura de reação foi filtrada sobre celite, lavada com DCM e o filtrado foi evaporado, produzindo 3,5g de **intermediário 9**.

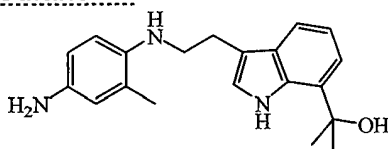
f) Preparação de intermediário 10



Uma mistura de **intermediário 9** (0,016 mol), 2-fluoro-5-nitrotolueno (0,018 mol), ânion carbonato monossódico (0,019 mol) em DM-SO (100 ml) foi aquecida a 60°C durante a noite. A mistura foi resfriada à temperatura ambiente. Água gelada foi adicionada, DCM foi adicionado. A

5 - mistura de reação foi extraída, a camada orgânica foi separada, seca sobre MgSO₄, filtrada e concentrada. O resíduo foi purificado por cromatografia de coluna sobre sílica-gel (eluente: ciclo-hexano/EtOAc 60/40). As frações puras foram coletadas e o solvente foi evaporado, produzindo 2,8g de **intermediário 10**.

10 g) Preparação de intermediário 11



Intermediário 10 (0,0079 mol), óxido de vanádio (0,05 g), solução de tiofeno (4%) em DIPE (1 ml), Pt/C 5% (1,3 g) em THF (50 ml) foram hidrogenados em pressão atmosférica por 1 noite à temperatura ambiente. A reação foi filtrada e o solvente foi evaporado, produzindo **intermediário 11**.

15 Este produto foi usado sem purificação adicional na seguinte etapa.

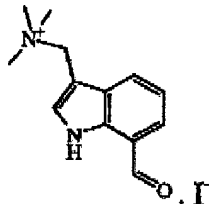
Os seguintes intermediários são feitos de acordo com o método

A3

intermediário N° 44	intermediário N° 45
intermediário N° 46	intermediário N° 47

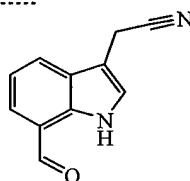
do, produzindo 0,7g de **intermediário 13**.

c) Preparação de intermediário 14



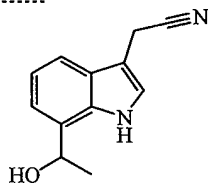
Intermediário 13 (0,13mol), iodometano (0,14mol) em EtOH (300 ml) foram agitados à temperatura ambiente por 2 dias. O precipitado foi
5 filtrado e seco, produzindo 47g de **intermediário 14**.

d) Preparação de intermediário 15



Intermediário 14 (136,5 mmols), cianeto de sódio (177,5 mmols) em DMF (40 ml) foi agitado à temperatura ambiente por 2 horas. Água foi adicionada e a mistura de reação foi extraída com EtOAc. A camada orgânica foi separada, seca sobre MgSO₄, filtrada e evaporada. O resíduo foi purificado por cromatografia líquida de alta performance (SiOH Irregular 20 a 45
10 μm 1000g MATREX). Fase móvel: ciclo-hexano 70%/EtOAc 30%). As frações puras foram coletadas e o solvente foi evaporado, produzindo 11,8g de **intermediário 15**.

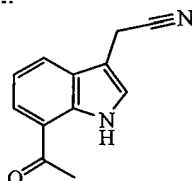
15 e) Preparação de intermediário 16



Cloreto de metilmagnésio (0,07 mol) foi adicionado gota a gota a uma solução de **intermediário 15** (0,022 mol) em THF (50 ml). NH₄Cl 10% e EtOAc foram adicionados. A mistura de reação foi extraída, a camada orgânica foi separada, seca sobre MgSO₄, filtrada e o solvente foi evaporado. O
20 resíduo (2,9 g) foi purificado por cromatografia líquida de alta performance (SiOH Irregular 20 a 45 μm 450g MATREX). Fase móvel : ciclo-hexano

60%/EtOAc 40%). As frações puras foram coletadas e o solvente foi evaporado, produzindo 2g de **intermediário 16**.

f) Preparação de intermediário 7.

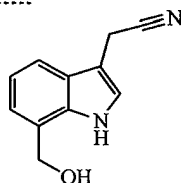


Periodinana de Dess-Martin (24,9 ml) foi adicionada gota a gota à temperatura ambiente a uma solução de **intermediário 16** (10 mmols) em DCM (2 ml). A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente por 1 hora em seguida esvaziada na água de gelo, filtrada sobre celite e o filtrado foi extraído com DCM. A camada orgânica foi separada, seca sobre MgSO₄, filtrada e o solvente foi concentrado. O resíduo (2,8 g) foi purificado por cromatografia de coluna sobre sílica-gel (eluente ciclo-hexano/EtOAc 60/40). As frações puras foram coletadas e o solvente foi evaporado, produzindo 0,8g de **intermediário 7**.

Exemplo A5

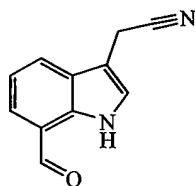
Intermediário 15 também foi alternativamente preparado como se segue.

a) Preparação de intermediário 17



Tetra-hidroaluminato de lítio (0,018 mol, 0,69 g) foi adicionado porção a porção a uma solução de éster de metila de ácido 3-(cianometil)-1H-indol-7-carboxílico, (0,012mol, 2,6 g) em THF (5 ml) a 5°C sob fluxo de N₂. A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente por 30 minutos. Água foi adicionada gota a gota a 5°C e a mistura de reação foi filtrada sobre celite, lavada com EtOAc e extraída. A camada orgânica foi separada, seca sobre MgSO₄, filtrada e concentrada, produzindo 2,4g de **intermediário 17**.

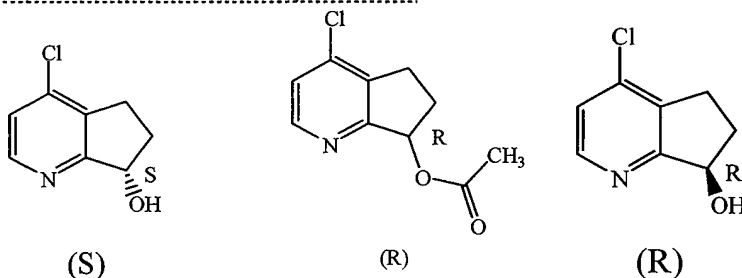
b) Preparação de intermediário 15



Periodinana de Dess-Martin (0,016 mol) foi adicionada gota a gota a 5°C a uma solução de **intermediário 17** (0,0081 mol) em DCM (15 ml). A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente por 2 horas. A mistura de reação foi filtrada sobre celite, o filtrado foi evaporado. O resíduo foi purificado sobre sílica-gel por cromatografia de coluna (eluente ciclohexano/EtOAc 70/30). As frações puras foram coletadas e o solvente foi evaporado, produzindo 0,5g de **intermediário 15**.

Exemplo A6

Preparação de intermediários 18, 19 e 20



intermediário 18 intermediário 19 intermediário 20

Uma mistura de 4-cloro-6,7-di-hidro-5H-ciclopenta[b]piridin-7-ol (5 g, 0,029 mol) e Lipase de Candida Antartica B (2,5 g) em éster de etenila de ácido acético (50 ml) foi agitada à temperatura ambiente por 4 horas. A mistura de reação foi filtrada sobre Celite. O Celite foi lavado com DCM. O solvente do filtrado foi evaporado. O resíduo (6,3 g) foi purificado por cromatografia de coluna sobre sílica-gel (eluente: DCM/MeOH de 100/0 até 98/2; 15 a 40 µm). Duas frações de produto diferentes foram coletadas e o solvente de cada fração de produto foi evaporado, produzindo 2,1 g de **intermediário 18** (42%; enantiômetro **S**), e 3,6 g de **intermediário 19** (58%; enantiômetro **R**). Quando o **intermediário 19** desejado pôde ser convertido no enantiômetro **R** do **intermediário 18** pela reação em MeOH/NH₃, produziu **intermediário 20**.

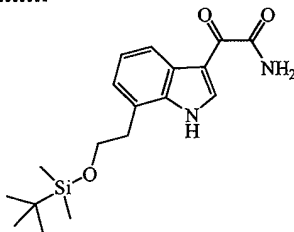
Os intermediários 18 e 20 também foram alternativamente preparados como se segue.

Tetra-hidrobórato de sódio (1,37 g, 36,10 mmols) foi adicionado porção a porção a 5°C a uma solução de **intermediário 1** (5,50 g, 32,82 mmols) em MeOH (50 ml). A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente por 1 noite e em seguida saiu na água e a mistura foi extraída três vezes por EtOAc. A camada orgânica foi lavada por água e solução de NaCl em água, separada, seca sobre MgSO₄, filtrada e o solvente foi evaporado. O resíduo (4,42 g) foi purificado por cromatografia em Fluido supercrítico quiral em CHIRALPAK AD-H 5 µm 250x20 mm. Fase móvel: CO₂ 85%, MeOH 15%.

As frações puras foram coletadas e o solvente foi evaporado, produzindo 1,625 g (29,2%) de **composto 18 (enantiômetro S)** (DMF, 20°C, concentração 0,33 p/v%, 589 nm: -77,58°) e 1,620 g (29,1%) de **composto 20 (enantiômetro R)** (DMF, 20°C, concentração 0,33 p/v%, 589 nm: +76,74°).

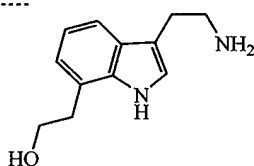
Exemplo A7

Preparação de intermediário 21



Cloreto de oxalila (0,0079 mol) foi adicionado gota a gota a 7-[2-[[[(1,1-dimetiletil)dimetilsilil]óxi]etil]-1*H*-indol (0,0047 mol) em éter de dietila (20 ml) a 5°C. A mistura de reação foi agitada a 5°C por 2 horas. NH₄OH (concentrado, 20 ml) foi adicionado gota a gota à solução a 5°C. A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente durante a noite. Água e EtOAc foram adicionados. A camada orgânica foi separada, seca sobre MgSO₄, filtrada e concentrada, produzindo 1,8g de **intermediário 21**.

Preparação de intermediário 22



Tetra-hidroaluminato de lítio (0,021 mol) foi adicionado porção a

porção a uma solução de **intermediário 21** (0,0052 mol) em THF (5 ml) a 5°C.

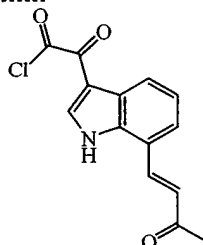
A mistura foi agitada em refluxo durante a noite em seguida resfriada a 5°C sobre banho de gelo.

5 O excesso de tetra-hidroaluminato de lítio foi hidrolisado cuidadosamente com adição de água gota a gota. A mistura foi filtrada sobre celite, lavada com DCM e extraída.

A camada orgânica foi separada, seca sobre MgSO_4 , filtrada e concentrada, produzindo 0,6g de **intermediário 22**.

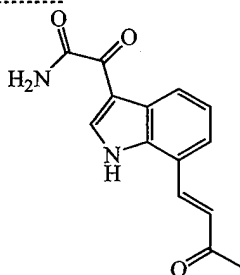
10 Exemplo A8

a) Preparação de intermediário 23



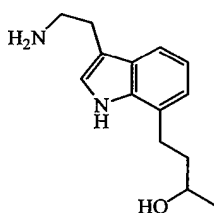
15 Cloreto de oxalila (2,9 mmols) foi adicionado gota a gota a 5°C a uma solução de 4-(1H-indol-7-il)-3-buten-2-ona (2,7 mmols) em éter de dietila (1 ml). O banho frio foi removido e permitiu-se que a reação se aquecesse à temperatura ambiente (1,5 hora). O precipitado foi filtrado e seco, produzindo 0,49g de **intermediário 23**.

b) Preparação de intermediário 24



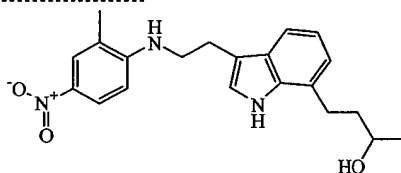
20 Hidróxido de amônio (1 ml) foi adicionado gota a gota a uma solução de **intermediário 23** (0,725 mmol) em éter de dietila (1 ml) a 5°C. A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente durante a noite. O precipitado foi filtrado e seco, produzindo 0,11g de **intermediário 24**.

c) Preparação de intermediário 25



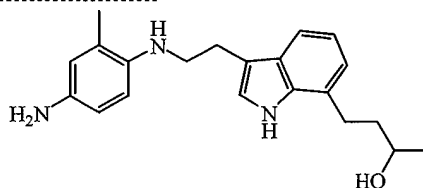
Tetra-hidroaluminato de lítio (39,5 mmols) foi adicionado porção a porção a uma solução de **intermediário 24** (7,9 mmols) em THF (2 ml) a 5°C. A mistura foi agitada a 80°C por 2 horas em seguida resfriada a 5°C sobre banho de gelo. O excesso de tetra-hidroaluminato de lítio foi hidrolisado cautelosamente com adição de água gota a gota. A mistura foi filtrada sobre celite, lavada com DCM e extraída. A camada orgânica foi separada, seca sobre MgSO₄, filtrada e concentrada, produzindo 1g de **intermediário 25**.

d) Preparação de intermediário 26



Uma mistura de **intermediário 25** (4,3mmols), 2-fluoro-5-nitrotolueno (4,7 mmols), ânion carbonato monossódico (5,1 mmols) em DMSO (1 ml) foi aquecida a 60°C durante a noite. A mistura foi resfriada à temperatura ambiente. Água gelada foi adicionada, DCM foi adicionado. A mistura de reação foi extraída, a camada orgânica foi separada, seca sobre MgSO₄, filtrada e evaporada. O resíduo foi purificado por cromatografia de coluna (eluente: DCM/MeOH 97/3). As frações puras foram coletadas e o solvente foi evaporado. O resíduo foi purificado por cromatografia líquida de alta performance (SiOH Irregular 15 a 40 µm 300g MERCK). Fase móvel (NH₄OH 0,1%-diclorometano 99%-MeOH 1%). As frações puras foram coletadas e o solvente foi evaporado, produzindo 200 mg de **intermediário 26**.

e) Preparação de intermediário 27

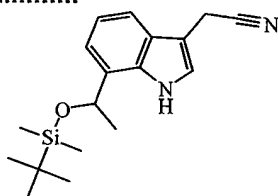


Uma mistura de **intermediário 26** (0,35 mmol), níquel Raney

(200 mg) em MeOH (5 ml) foi hidrogenada sob pressão atmosférica à temperatura ambiente. O resíduo foi filtrado sobre celite, lavado com DCM e o resíduo foi evaporado, produzindo 0,14 g de **intermediário 27**.

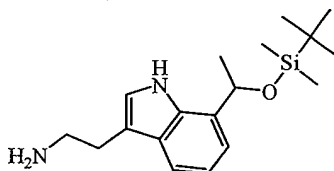
Exemplo A9

5 a) Preparação de intermediário 28



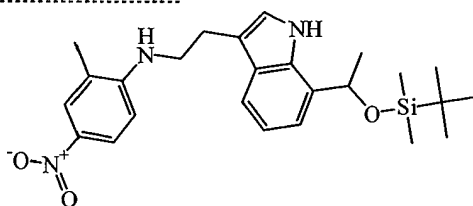
Cloreto de terc-butildimetilsilila (195 mg, 0,91 mmol) foi adicionado a uma solução de **intermediário 16** (162 mg, 0,81 mmol), imidazol (143 mg, 2,1 mmols) em THF (5 ml) à temperatura ambiente. A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente durante a noite. O precipitado foi filtrado e lavado com DCM. O filtrado foi evaporado. O resíduo (365 mg) foi purificado por cromatografia rápida sobre sílica-gel (15 a 40 μ m, 30g, DCM/MeOH:100/0 a 99/1). As frações puras foram coletadas e evaporadas à secua, produzindo 190 mg de **intermediário 28**.

b) Preparação de intermediário 29



15 **Intermediário 28** (190 mg, 0,6 mmol), níquel Raney (0,7 g) em NH_3 em MeOH 7N (10 ml) foram agitados à temperatura ambiente sob 300 kPa de H_2 por 4 horas. A reação foi filtrada sobre celite e o celite foi lavado com DCM/MeOH (90/10) três vezes. O solvente foi evaporado para produzir 147 mg de **intermediário 29**.

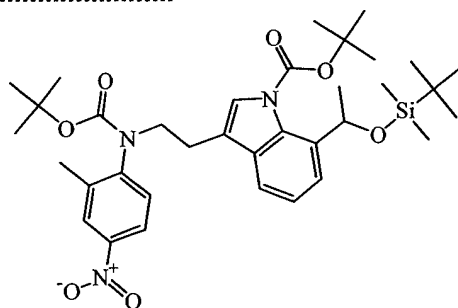
20 c) Preparação de intermediário 30



Uma mistura de **intermediário 29** (147 mg, 0,46 mmol), 1-fluoro-

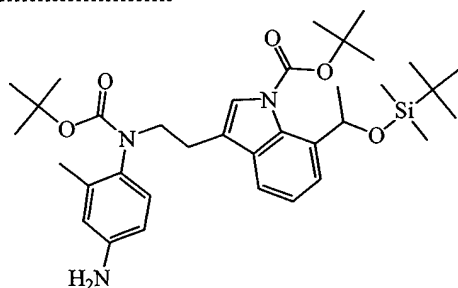
2-metil-4-nitro-benzeno (78 mg, 0,51mmol), sal de sódio de ácido carbônico (1:1) (85 mg, 1 mmol) em DMSO (2 ml) foi aquecida a 65°C por 1 noite. A mistura foi vertida em gelo e agitada por 10 minutos, DCM foi adicionado e a mistura foi extraída com DCM duas vezes. A camada orgânica foi lavada com água em seguida foi seca sobre MgSO₄, filtrada e o solvente foi evaporado. O resíduo foi purificado por cromatografia rápida sobre sílica-gel (15 a 40 µm, 30g, ciclo-hexano/EtOAc 85/15). As frações puras foram coletadas e evaporadas à securo, produzindo 200 mg de **intermediário 30**.

d) Preparação de intermediário 31

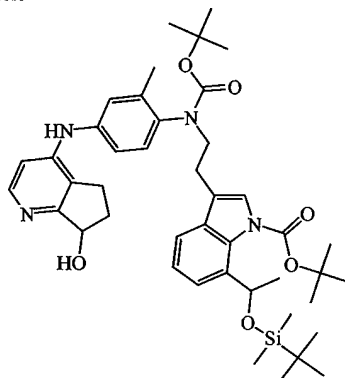


Intermediário 30 (2,8g, 6,17 mmols), di-terc-butil dicarbonato (8g, 37 mmols), 4-dimetilaminopiridina (0,15g, 1,2 mmol) e trietilamina (1,89ml, 13,6 mmols) em THF (5 ml) foram agitados por 24 horas a 60°C. A mistura foi evaporada à securo. O resíduo (7,4 g) foi purificado por cromatografia líquida de alta performance em sílica-gel (Cartucho 15 a 40 µm, 90 g). Fase móvel (ciclo-hexano 50%; diclorometano 50%). As frações puras foram coletadas e o solvente foi evaporado, produzindo 3,3g de **intermediário 31**.

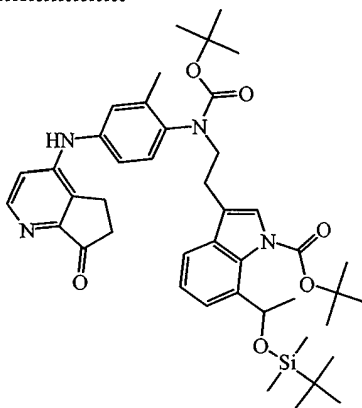
e) Preparação de intermediário 32



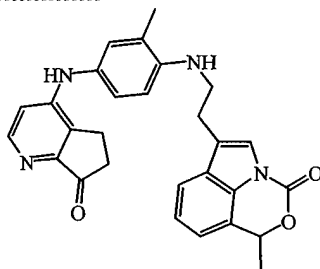
Uma mistura de **intermediário 31** (3,3 g, 5 mmols), níquel Raney (3 g) em MeOH (10 ml) foi hidrogenada em 250 kPa (2,5 bar) por 2 horas. O resíduo foi filtrado sobre celite, lavado com DCM e o resíduo foi evaporado, produzindo 2,7g de **intermediário 32**.

f) Preparação de intermediário 33

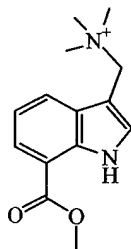
Intermediário 32 (2,6 g, 4,2 mmols), 4-cloro-6,7-di-hidro-5H-ciclopenta [b]piridin-7-ol (0,78g, 4,6 mmols), HCl 4M em dioxano (0,21ml, 0,8 mmol) em acetonitrila (28 ml) e EtOH (7 ml) foram aquecidos a 65°C por 72 horas. Após resfriamento à temperatura ambiente, água e pó de carbonato de potássio foram adicionados e a mistura foi extraída duas vezes com EtO-Ac. A camada orgânica foi lavada com água, seca sobre MgSO₄, filtrada e evaporada. O resíduo foi purificado por cromatografia líquida de alta performance (SiOH Irregular 20 a 45 µm 450g MATREX). Fase móvel (NH₄OH 0,5%; diclorometano 95%; MeOH 5%). As frações puras foram coletadas e o solvente foi evaporado, produzindo 2,35g de **intermediário 33**.

g) Preparação de intermediário 34

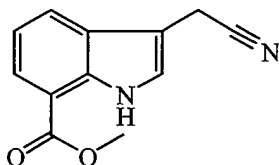
Óxido de manganês (IV) (4,3 g) foi adicionado porção a porção ao **intermediário 33** (2,2 g, 2,9 mmols) e tris(2-(2-metoxietóxi)etil)amina (47 mg, 0,145 mmol) na solução à temperatura ambiente em DCM (5 ml). A mistura foi agitada à temperatura ambiente por 18 horas. A mistura foi filtrada sobre celite. Celite foi lavado com DCM e o solvente evaporado, produzindo 1,84g de **intermediário 34**.

h) Preparação de intermediário 35

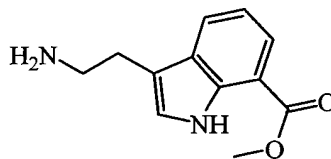
Intermediário 34 (1,2 g, 1,6 mmol) em ácido trifluoroacético (1,2 ml, 15,9 mmols) e DCM (1 ml) foram agitados à temperatura ambiente por 2 dias. Carbonato de potássio 10% foi adicionado e a mistura foi extraída duas vezes com DCM. A camada orgânica foi seca sobre MgSO_4 , filtrada e evaporada para produzir 0,8g de **intermediário 35**, usado sem purificação adicional para a seguinte etapa.

Exemplo A10a) Preparação de intermediário 36

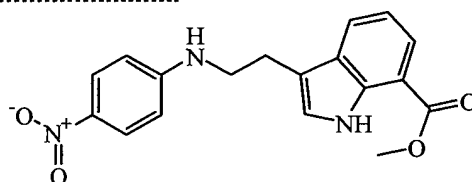
Iodometano (0,024 mol) foi adicionado a uma solução de éster de metila de ácido 3-[(dimetilamino)metil-1*H*-indol-7-carboxílico, 0,022 mol) em EtOH (5 ml). A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante a noite, em seguida concentrada a vácuo até a secura, produzindo 5,6g (68%) de **intermediário 36**.

b) Preparação de intermediário 37

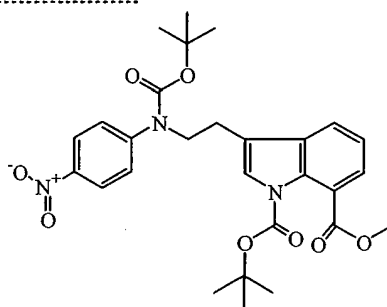
Uma mistura de **intermediário 36** (0,015 mol) e cianeto de sódio (0,019 mol) em DMF (6 ml) foi agitada a 100°C por 2 horas. Água foi adicionada. O precipitado foi filtrado. O filtrado foi evaporado, produzindo 3,5g (100%) de **intermediário 37**.

c) Preparação de intermediário 38

Uma mistura de **intermediário 37** (0,016 mol) e níquel Raney (3 g) em MeOH/NH₃ (5 ml) foi hidrogenada à temperatura ambiente sob uma pressão de 300 kPa, em seguida filtrada sobre celite. O filtrado foi evaporado, produzindo 3,2g (89%) de **intermediário 38**.

d) Preparação de intermediário 39

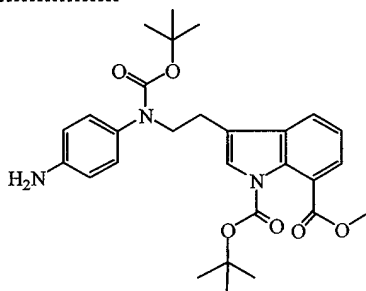
Uma mistura de **intermediário 38** (0,0092 mol), 1-fluoro-4-nitrobenzeno (0,01 mol) e di-isopropiletilamina (0,023 mol) foi agitada a 180°C por 2 horas. Água foi adicionada. A mistura foi extraída com DCM. A camada orgânica foi separada, seca (MgSO₄), filtrada e o solvente foi evaporado. O resíduo (2,6 g) foi purificado por cromatografia de coluna sobre cromasil (e-luente: ciclo-hexano/EtOAc 60/40). As frações puras foram coletadas e o solvente foi evaporado, produzindo 1,4g (45%) de **intermediário 39**.

e) Preparação de intermediário 40

Anidrido de terc-butoxicarbonila (0,015 mol) foi adicionado à temperatura ambiente a uma mistura de **intermediário 39** (0,05 mol) e 4-(dimetilamino)piridina (pouco) em THF (5 ml). A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante a noite. A mistura foi extraída com EtOAc. A camada orgânica foi lavada com água, seca (MgSO₄), filtrada e o solvente foi evaporado. O resíduo (4 g) foi purificado por cromatografia de coluna sobre

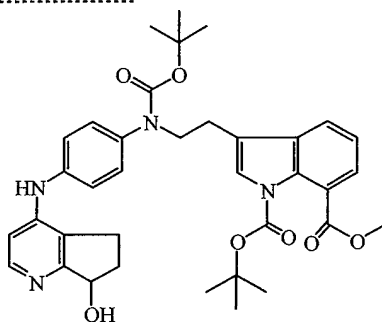
sílica-gel (eluente: ciclo-hexano/EtOAc 60/40). As frações puras foram coletadas e o solvente foi evaporado, produzindo 3,3g (82%) de **intermediário 40**

f) Preparação de intermediário 41



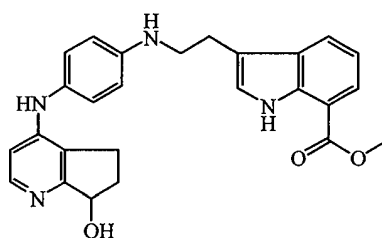
5 Uma mistura de **intermediário 40** (0,0061 mol) e níquel Raney (3,3 g) em MeOH (5 ml) foi hidrogenada à temperatura ambiente sob uma pressão de 300 kPa, em seguida filtrada sobre celite. Celite foi lavado com DCM/MeOH (98/2). O filtrado foi evaporado. O resíduo (2,8 g) foi purificado por cromatografia de coluna sobre sílica-gel (eluente: ciclo-hexano/EtOAc
10 70/30). As frações puras foram coletadas e o solvente foi evaporado, produzindo 1,3g (42%) de **intermediário 41**.

g) Preparação de intermediário 42



Uma mistura de **intermediário 41** (0,0018 mol), 4-cloro-6,7-dihidro-5H-ciclo-penta[b]piridin-7-ol (0,33 g) e HCl/isopropanol (5 gotas) em acetonitrila (2 ml) foi agitada a 65°C por 24 horas. Carbonato de potássio
15 10% foi adicionado. A mistura foi extraída com EtOAc. A camada orgânica foi separada, seca (MgSO₄), filtrada e o solvente foi evaporado. O resíduo (1,1 g) foi purificado por cromatografia de coluna sobre sílica-gel (eluente: DCM/MeOH/NH₄OH 95/5/0,1). As frações puras foram coletadas e o solven-
20 te foi evaporado, produzindo 0,054g de **intermediário 42**.

h) Preparação de intermediário 43

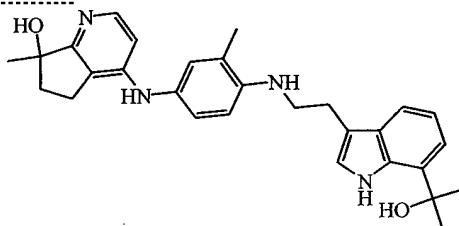


Uma mistura de **intermediário 42** (0,0009 mol) e HCl 3N (0,0039 mol) em acetonitrila (1 ml) foi agitada a 65°C por 3 horas. Carbonato de potássio 10% foi adicionado. A mistura foi extraída com EtOAc. A camada orgânica foi separada, seca (MgSO₄), filtrada e o solvente foi evaporado. O resíduo (0,4g, 100%) foi cristalizado de dietil éter/acetonitrila. O precipitado foi filtrado e seco, produzindo 0,3g de **intermediário 43**, ponto de fusão 164°C.

B. Preparação dos compostos finais

Exemplo B1

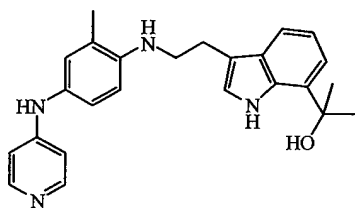
Preparação de composto 1



Intermediário 11 (1,00 g, 3,092 mmols), **intermediário 2** (0,437 g, 2,381 mmols), HCl (0,155 ml, 0,618 mmol) em acetonitrila (10 ml) foram agitados por 5 horas a 65°C. A reação foi resfriada à temperatura ambiente e em seguida basificada por carbonato de potássio (10% em água) e extraída com DCM três vezes. A camada orgânica foi lavada por água, seca sobre MgSO₄, filtrada e o solvente foi evaporado. O resíduo (1,37 g) foi purificado pela Fase normal sobre sílica 5 µm de 150x30,0 mm). Fase móvel (Gradiente de NH₄OH 0%, DCM 100%, MeOH 0% a NH₄OH 0,8%, DCM 92%, MeOH 8%). As frações puras foram coletadas e o solvente foi evaporado. O resíduo (0,350 g) foi tomado em acetonitrila por 1 semana à temperatura ambiente. Este produto cristalizou-se e foi filtrado e seco sob vácuo, produzindo 300 mg (20,8%) de **composto 1**, ponto de fusão 209 °C.

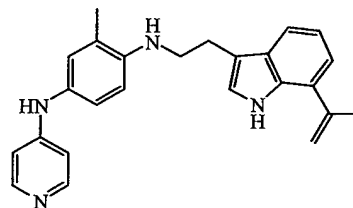
Exemplo B2

Preparação de compostos 2 e 3



composto 2

e

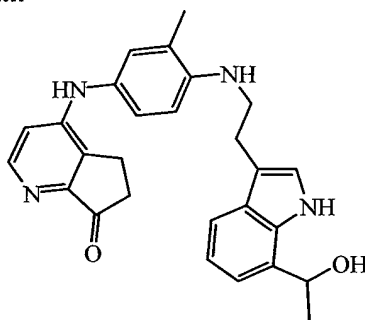


composto 3

Uma solução de **intermediário 11** (0,0031 mol), *N,N*-diisopropiletilamina (0,0028 mol), hidrocloreto de 4-bromopiridina (0,0034 mol) em acetonitrila (2 ml) foi aquecida a 65°C por 6 horas. Carbonato de potássio 10% e EtOAc foram adicionados. A mistura de reação foi extraída, a camada orgânica foi separada, seca sobre MgSO₄, filtrada e concentrada. O resíduo (1,3 g) foi purificado por cromatografia de coluna sobre sílica-gel (e-
 5 luente 95/5/0,5 DCM/MeOH/NH₄OH). Duas frações foram coletadas e o solvente foi evaporado para fornecer 60 mg de **composto 3** e 80 mg de F2. O
 10 resíduo F2 (80 mg) foi purificado por cromatografia em fluido supercrítico (coluna AMINO 150 x 21,2 mm) eluente: MeOH/CO₂ 30/70). As frações puras foram coletadas e o solvente foi evaporado, produzindo 43 mg de **composto 2**.

Exemplo B3

15 Preparação de composto 4

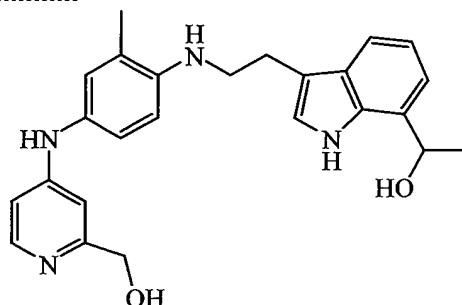


Intermediário 35 (0,8g, 1,7 mmol) e hidróxido de sódio 3N (2,57ml, 2,57 mmols) em EtOH (22 ml) e THF (1 ml) foram agitados à temperatura ambiente por 30 minutos. NH₄Cl 10% e DCM foram adicionados e a mistura foi filtrada sobre Celite. A camada orgânica foi decantada, seca sobre MgSO₄, filtrada e evaporada. O resíduo foi purificado pela Fase normal sobre SiOH Esférico (10 µm 60g PharmPrep MERCK). Fase móvel (NH₄OH 0,1%, DCM 95%, MeOH 5%). As frações puras foram coletadas e o solvente
 20

foi evaporado, produzindo 250 mg de **composto 4**.

Exemplo B4

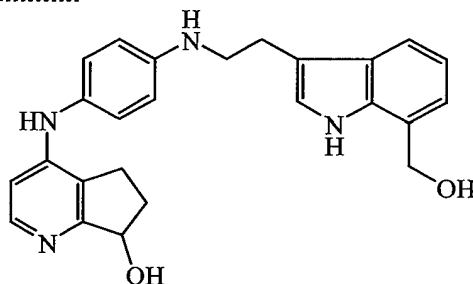
Preparação de composto 5



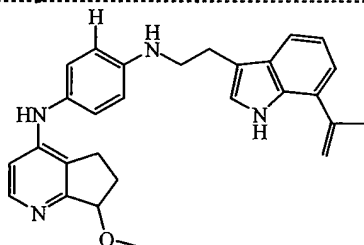
5 Tetra-hidrobórato de sódio (0,69 mmol) foi adicionado a uma so-
 lução de **intermediário 49** (0,46 mmol) em MeOH (5 ml) a 5°C. A mistura de
 reação foi agitada à temperatura ambiente durante a noite. Água foi adicio-
 nada, a mistura de reação foi extraída com EtOAc, a camada orgânica foi
 separada, seca sobre MgSO₄, filtrada e evaporada. O resíduo (0,14 g) foi
 cristalizado em acetonitrila, o precipitado foi filtrado e seco, produzindo 0,1g
 10 de **composto 5**.

Exemplo B5

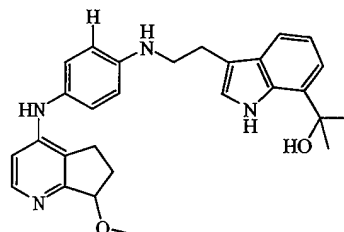
Preparação de composto 6



Tetra-hidroaluminato de lítio (0,0003 mol) foi adicionado porção
 a porção a 5°C a uma solução de **intermediário 43** (0,0002 mol) em THF (4
 15 ml) sob fluxo de N₂. A mistura foi agitada à temperatura ambiente por 2 ho-
 ras. Água foi adicionada. A mistura foi extraída com EtOAc. A camada orgâ-
 nica foi separada, seca (MgSO₄) filtrada e o solvente foi evaporado. O resí-
 duo (0,18 g) foi purificado por cromatografia de coluna sobre cromasil (eluen-
 te: DCM/MeOH/NH₄OH 98/2/0,2 a 85/15/1; 3,5 µm). As frações puras foram
 20 coletadas e o solvente foi evaporado, produzindo 0,066g (70%) de **compos-
 to 6**.

Exemplo B6Preparação de compostos 7 e 8

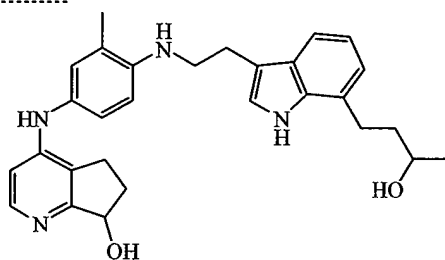
composto 7



composto 8

5 **Intermediário 47** ((1,00 g, 3,23 mmols), **intermediário 4** (0,653 g, 3,55 mmols), HCl/dioxano (0,242 ml, 0,97 mmol) em acetonitrila (15 ml) foram agitados por 1 noite a 70°C. A mistura de reação foi resfriada à temperatura ambiente. Água em seguida carbonato de potássio (10% em água) foram adicionados. A mistura foi extraída três vezes com DCM. A camada orgânica foi separada, seca sobre MgSO₄, filtrada e o solvente foi evaporado.

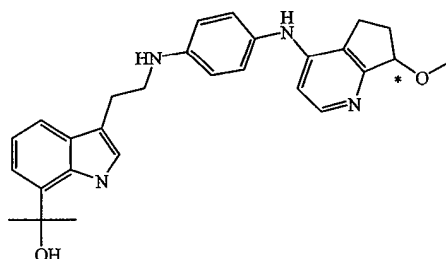
10 O resíduo foi purificado pela Fase normal sobre sílica-gel (Cartucho 15 a 40 µm 30 g). Fase móvel (DCM 96%, MeOH 4%). As frações puras foram coletadas e o solvente foi evaporado, produzindo 0,092 g (6,5%) de **composto 7** e 0,030 g (2,0%) de **composto 8**.

Exemplo B715 Preparação de composto 9

Intermediário 27 (0,41 mmol) e 4-cloro-6,7-di-hidro-5H-ciclopenta[b]piridin-7-ol (0,46 mmol) foram aquecidos a 125°C por 2 horas. O resíduo foi purificado por cromatografia de coluna sobre sílica-gel (eluente 90/10/0,1 DCM/MeOH/NH₄OH). As frações puras foram coletadas e o solvente foi evaporado, produzindo 58 mg de **composto 9**.

20

Exemplo B8Preparação de compostos 24 e 25



Co. N° 24: *S

Co. N° 25: *R

* significa estereoquímica relativa (estereoquímica absoluta não conhecida). Assim se o composto 24 for o enantiômetro S então o composto 25 é o enantiômetro R ou se o composto 24 for o enantiômetro R então o composto 25 é o enantiômetro S

A reação foi realizada sob atmosfera de N₂.

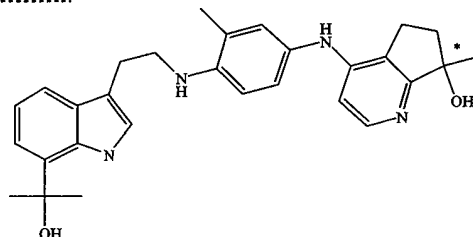
Uma mistura de **intermediário 47** (11,31 mmols), **intermediário 4** (12,44 mmols), Pd(dba)₂ (1,13 mmols), BINAP (1,13 mmol) e tBuONa (22,62 mmols) em tolueno (10 ml) foi agitada em refluxo durante a noite. A mistura foi filtrada, lavada com MeOH e purificada por cromatografia líquida de alta performance (coluna Synergi 50*250 mm, 10 μm; eluente: CH₃CN/H₂O (ácido trifluoroacético 0,1%) gradiente de CH₃CN 15% no tempo 0 min a CH₃CN 40% no tempo 25 min). A fração desejada foi coletada e o solvente foi evaporado a vácuo. O resíduo foi extraído com DCM, lavado com NaHCO₃ aquoso, seco sobre Na₂SO₄, filtrado e evaporado para fornecer composto 8 (3,8 g, pureza de 98%, rendimento de 65%), que foi separado por cromatografia em Fluido Supercrítico Chiralcel OJ, 20μm, 250 mm * 20 mm; CO₂ supercrítico: isopropanol (dietilamina 0,05%), 40:60 v/v, 70ml/min) para fornecer duas frações; 1000,79 mg (19%) de **composto 24**, ponto de fusão 110,5-111,6 °C.

(ee% = 99%, [α]_D²⁰ = + 5,034°, (comprimento de onda=589, 20 °C em metanol, concentração 10,33 mg/ml).

e 939,19 mg (18%) de **composto 25**, ponto de fusão 111,4-113,3 °C.

(ee% = 99%, [α]_D²⁰ = -3,443°, (comprimento de onda =589, 20 °C em MeOH, concentração 10,74 mg/ml).

Exemplo B9

Preparação de compostos

Co. N° 26: *S

Co. N° 27: *R

- * significa estereoquímica relativa (estereoquímica absoluta não conhecida). Assim se o composto 26 for o enantiômetro S então o composto 27 é o enantiômetro R ou se o composto 26 for o enantiômetro R então o composto 27 é o enantiômetro S

A reação foi realizada sob atmosfera de N₂.

- Uma mistura do **intermediário 11** (9,25 mmols), intermediário 2 (9,25 mmols), tBuONa (18,5 mmols), Pd(dba)₂ (0,93 mmol) e BINAP (0,93 mmol) em tolueno (40 ml) foi aquecida em refluxo e misturada por 3 horas. A mistura resultante foi resfriada à temperatura ambiente e filtrada. A filtração foi evaporada a vácuo e o resíduo foi purificado por cromatografia líquida de alto desempenho (coluna Synergi 50*250 mm, 10 µm; eluente: CH₃CN/H₂O (ácido trifluoroacético 0,1%) gradiente de CH₃CN 10% no tempo 0 min a CH₃CN 40% no tempo 25 min). As frações desejadas foram coletadas e ajustadas ao pH>7. O solvente foi concentrado e extraído com acetato de etila (3 vezes 100 ml) e as camadas orgânicas desejadas foram lavadas com salmoura, secas sobre Na₂SO₄, filtradas e o solvente foi evaporado a vácuo para obter 2,5 g (57%) de composto 1 que foi separado por cromatografia em Fluido Supercrítico (AD 250mm*20 mm, 20µm; CO₂ supercrítico: isopropanol (dietilamina 0,05%) 40:60, v/v, 70ml/min) para fornecer 2 frações.

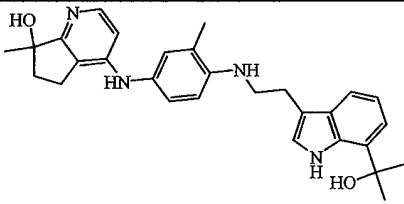
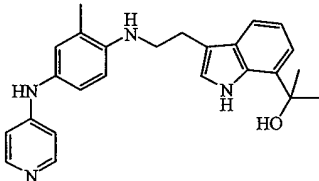
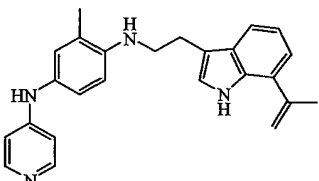
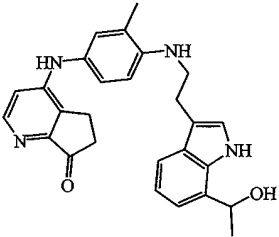
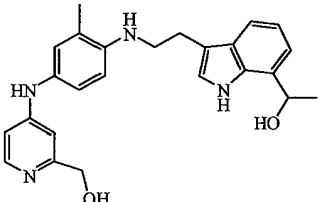
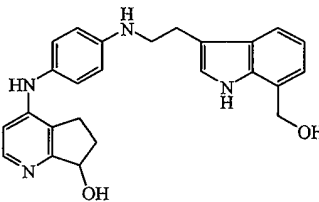
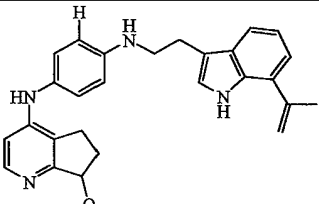
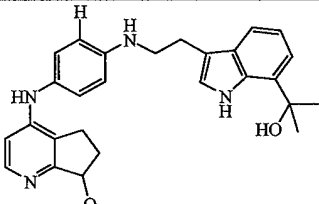
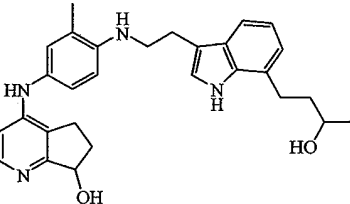
- A fração 1 (1 g) foi ainda purificada por cromatografia líquida de alto desempenho (coluna Synergi 50*250 mm, 10 µm; eluente: CH₃CN/H₂O (ácido trifluoroacético 0,1%) o gradiente de CH₃CN 10% no tempo 0 min a CH₃CN de 40% no tempo 25 min) para fornecer 0,88 g (20%) de **composto N° 26**, ponto de fusão 122,3-124 ° C, (ee=100%).

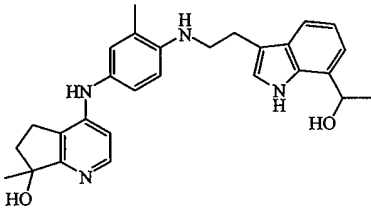
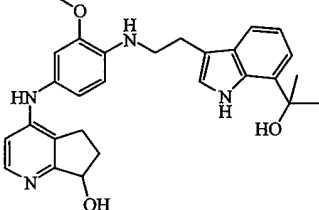
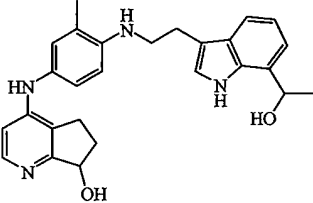
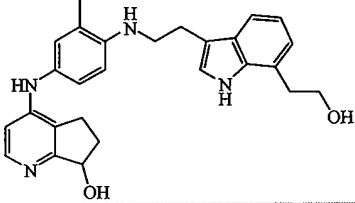
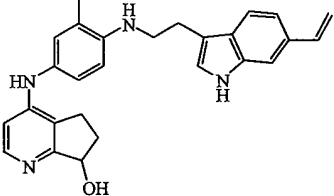
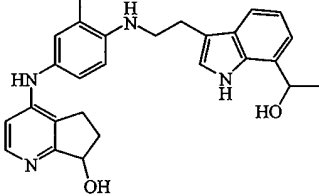
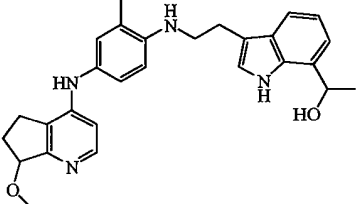
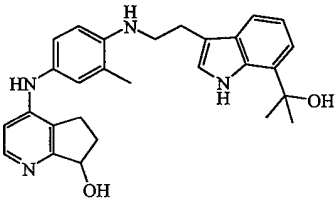
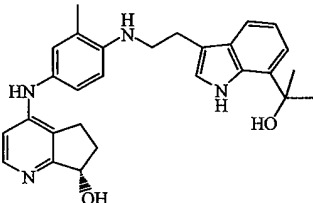
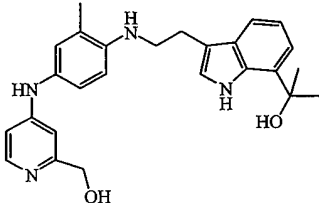
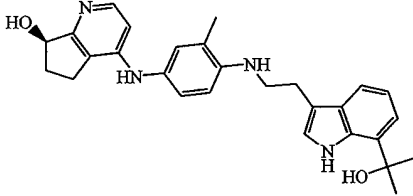
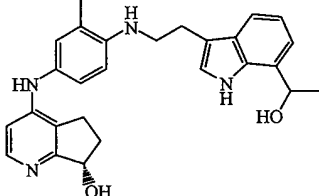
A fração 2 (1 g) foi ainda purificada por cromatografia líquida de

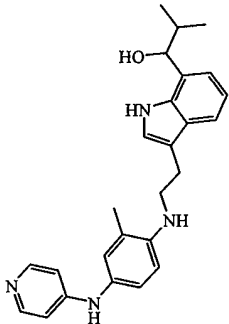
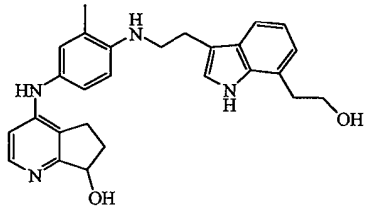
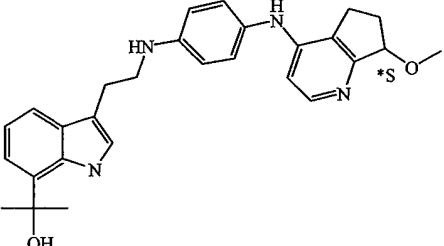
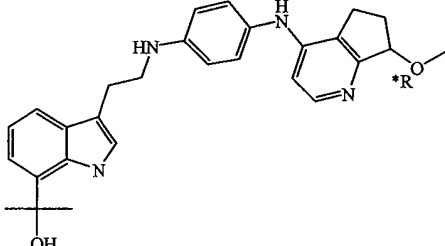
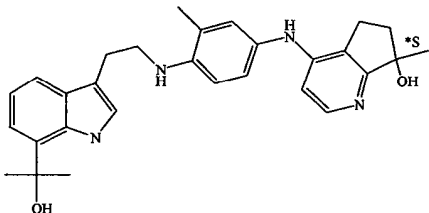
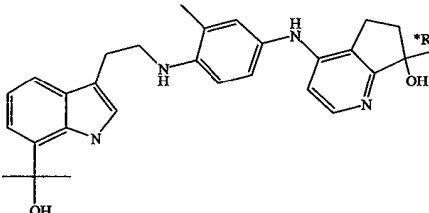
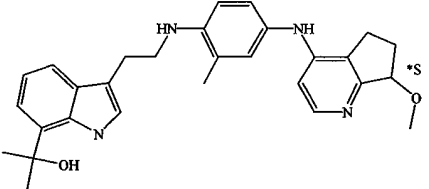
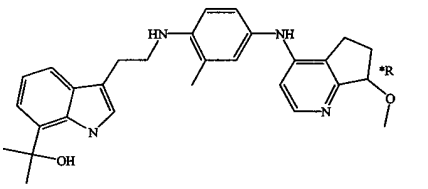
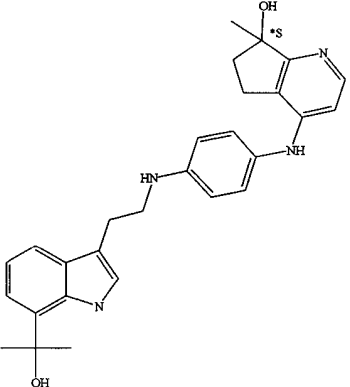
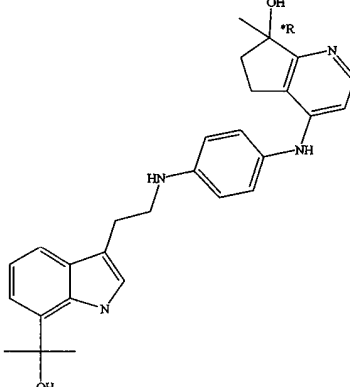
alto desempenho (coluna Synergi 50*250 mm, 10 μ m; eluente: CH₃CN/H₂O (ácido trifluoroacético 0,1%) o gradiente de CH₃CN 10% no tempo 0 min a CH₃CN 40% no tempo 25 min) para fornecer 0,96 g (22%) de **composto 27**, ponto de fusão 121,4-122,6 °C, (ee=99%).

5 A tabela 1 lista os compostos que foram preparados de acordo com o um dos Exemplos acima mencionados.

Tabela 1

	
Co. N° 1; Ex. [B1];	Co. N° 2; Ex. [B2];
	
Co. N° 3; Ex. [B2];	Co. N° 4; Ex. [B3];
	
Co. N° 5; Ex. [B4];	Co. N° 6; Ex. [B5];
	
Co. N° 7; Ex. [B6];	Co. N° 8; Ex. [B6];
	
Co. N° 9; Ex. [B7];	

	
Co. N° 10; Ex. [B1];	Co. N° 11; Ex. [B1];
	
Co. N° 12; Ex. [B1];	Co. N° 13; Ex. [B1];
	
Co. N° 14; Ex. [B1];	Co. N° 15; Ex. [B1];
	
Co. N° 16; Ex. [B1];	Co. N° 17; Ex. [B1];
	
Co. N° 18; Ex. [B1];	Co. N° 19; Ex. [B1];
	
Co. N° 20; Ex. [B1];	Co. N° 21; Ex. [B1];

	
Co. N° 22; Ex. [B2];	Co. N° 23; Ex. [B1];
	
Co. N° 24; Ex. [B8]	Co. N° 25; Ex. [B8]
	
Co. N° 26; Ex. [B9]	Co. N° 27; Ex. [B9]
	
Co. N° 28; Ex. [B8,9]	Co. N° 29; Ex. [B8,9]
	
Co. N° 30; Ex. [B8,9]	Co. N° 31; Ex. [B8,9]

* significa estereoquímica relativa

Caracterização de composto

Pontos de fusão:

Os valores são valores de pico ou faixas de fusão, e foram obtidos com incertezas experimentais que estão associadas comumente a este método analítico.

Kofler

Para o composto 4, o ponto de fusão foi obtido com uma banca-
da quente Kofler, composto de uma placa aquecida com o gradiente de tem-
peratura linear, um ponteiro variável e uma escala de temperatura em graus
centígrados.

WRS-2A

Para o composto 11, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, o ponto de
fusão foi determinado com um aparelho de ponto de fusão WRS-2A que foi
adquirido de Shanghai Precision and Scientific Instrument Co. Ltd. O ponto
de fusão foi medido com um aquecimento linear da taxa de 0,2 a 5,0
°C/minuto. O valor relatado é uma faixa de fusão. A temperatura máxima foi
300 °C.

DSC

Para o composto 1, o ponto de fusão foi determinado com DSC
(calorimetria de varredura diferencial). O ponto de fusão foi medido com um
gradiente de temperatura de 10°C/minuto. A temperatura máxima foi 350 °C.
Os valores são valores de pico.

LCMS

Para caracterização por LCMS dos compostos da presente in-
venção, os seguintes procedimentos foram usados.

Procedimento A geral

A medida por HPLC foi realizada usando um sistema Alliance HT
2795 (Waters) compreendendo uma bomba quaternária com degaseificador,
um autoamostrador, um detector de matriz de díodo (DAD) e uma coluna
como especificado nos respectivos métodos abaixo, a coluna é mantida em
uma temperatura de 30°C. O fluxo da coluna foi repartido com um espectrô-
metro de MS. O detector de MS foi configurado com uma fonte de ionização

de eletropulverização. A voltagem de agulha capilar foi 3 kV e a temperatura de fonte foi mantida a 100 °C em LCT (espectrômetro de massa de Tempo de Voo Zspray® de Waters). Nitrogênio foi usado como o gás nebulizador. Aquisição de dados foi realizada com um sistema de dados de Waters-

5 Micromass MassLynx-Openlynx.

Procedimento geral B

A medida por LC foi realizada usando um sistema UPLC (Cromatografia Líquida de Extremo Desempenho) Acquity (Waters) compreendendo uma bomba binária com degaseificador, um autoamostrador, um detector de matriz de díodo (DAD) e uma coluna como especificado nos respectivos métodos abaixo, a coluna é mantida a uma temperatura de 40°C. O fluxo da coluna foi trazido para um detector de MS. O detector de MS foi configurado com uma fonte de ionização de eletropulverização. A voltagem de agulha capilar foi 3 kV e a temperatura de fonte foi mantida a 130 °C no Quattro (espectrômetro de massa quadrupolo triplo de Waters). Nitrogênio foi usado como o gás nebulizador. A aquisição de dados foi realizada com um sistema de dados de Waters-Micromass MassLynx-Openlynx.

Procedimento geral C

A medida por HPLC foi realizada usando um módulo de Agilent 1100 compreendendo uma bomba, um detector de matriz de díodo (DAD) (comprimento de onda usado 220 nm), um aquecedor de coluna e uma coluna como especificado nos respectivos métodos abaixo. O fluxo da coluna foi repartido para um Agilent MSD Series G1946C e G1956A. O detector de MS foi configurado com API-ES (ionização por eletropulverização à pressão atmosférica). Os espectros de massa foram adquiridos por varredura de 100 a 1000. A voltagem da agulha capilar foi 2500 V para o modo de ionização positivo e 3000 V para o modo de ionização negativo. A voltagem de fragmentação foi 50 V. Temperatura do gás de secagem foi mantida a 350 °C em um fluxo de 10 l/min.

Método 1

Além do procedimento A geral: HPLC de fase reversa foi realizada em uma coluna Xterra-MS C18 (5 µm, 4.6 x 150 mm) com uma taxa de

fluxo de 1,0 ml/min. Duas fases móveis (fase A móvel: 100% acetato de amônio 7 mM; fase móvel B: acetonitrila 100%; foram empregados para correr uma condição de gradiente de 85% A, 15% B (mantida por 3 minutos) a 20% A, 80% B por 5 minutos, mantida em 20% A e 80% B por 6 minutos e reequilibrada com as condições iniciais por 3 minutos. Um volume de injeção de 20 µl foi usado. A voltagem de cone foi 20 V para o modo de ionização positivo e 20 V para o modo de ionização negativo. Os espectros de massa foram obtidos pela varredura de 100 a 900 em 0,8 segundo usando um retardo de intervarredura de 0,08 segundo.

10 Método 2

Além do procedimento geral B: UPLC de fase reversa foi realizada em uma coluna C18 Waters Acquity BEH (híbrido etilsiloxano/sílica em ponte) (1,7 µm, 2,1 x 100 mm) com uma taxa de fluxo de 0,35 ml/min. Duas fases móveis (fase A móvel: acetato de amônio 7 mM 95% / acetonitrila 5%; fase móvel B: acetonitrila 100%) foram empregadas para correr uma condição de gradiente de 90% A e 10% B (mantida por 0,5 minuto) a 8% A e 92% B por 3,5 minutos, mantida por 2 min e retorno às condições iniciais em 0,5 min, mantidas por 1,5 minuto. Um volume de injeção de 2 µl foi usado. A voltagem de cone foi 20 V para o modo de ionização positivo e negativo. Os espectros de massa foram obtidos pela varredura de 100 a 1000 em 0,2 segundo usando um retardo de intervarredura de 0,1 segundo.

Método 3

Além do procedimento geral C: HPLC de fase reversa foi realizada em uma coluna YMC-Pack ODS-AQ, 50x2,0 mm 5µm com uma taxa de fluxo de 0,8 ml/min. Duas fases móveis (fase A móvel: água com TFA 0,1%; fase móvel B: acetonitrila com TFA 0,05%) foram usadas. Em primeiro lugar, 90% A e 10% B foram mantidos por 0,8 minuto. Em seguida, um gradiente foi aplicado para A 20% e B 80% por 3,7 minutos e mantido por 3 minutos. Volumes de injeção típicos de 2 µl foram usados. A temperatura de forno foi 50 °C. (Polaridade de MS: positivo)

Tabela 2: dados de LCMS e pontos de fusão (tempo de Retenção: R_t durante minutos), (MH)⁺ pico, o procedimento de LCMS refere-se ao método usado para LCMS.

Comp. Nº		LCMS		Pontos de fusão
	R_t	(MH) ⁺	Procedimento	
1	3,39	471	2	209°C
2	3,35	401	2	
4	3,19	441	2	121°C
5	2,97	417	2	
6	7,47	415	1	
7	3,94	439	2	
8	3,45	457	2	
9	8,51	471	1	
10	3,05	457	2	
11	3,01	473	3	221,0-222,5°C
12	3,07	443	2	
13	3,00	443	2	
14	3,49	425	2	
15	8,22	443	1	
16	3,34	457	2	
17	3,32	457	2	
18	8,68	457	1	
20	8,62	457	1	
21	8,2	443	1	
22	8,95	415	1	
23	2,93	443	3	
24				110,5-111,6°C
25				111,4-113,3°C
26				122,3-124°C

27				121,4-122,6°C
28				98,3-100°C
29				96,8-99°C
30				111,5-112,3°C
31				112,7-113,6°C

Rotação ótica

A rotação ótica foi medida usando um polarímetro. $[\alpha]_D^{20}$ indica a rotação ótica medida com luz no comprimento de onda da linha D do sódio (589 nm) a uma temperatura de 20 °C. A caminho ótico de célula é 1 dm.

- 5 Atrás do valor real, a concentração e o solvente da solução que foram usados para medir a rotação ótica são mencionados.

Tabela 3: rotação ótica

Comp. N°	$[\alpha]_D^{20}$	concentração	solvente
18	-37,4°	0,516 p/v%	DMF
20	+36,87°	0,575 p/v%	DMF
21	-39,68°	0,378 p/v%	DMF
24	+5,03°	10,30 mg/ml	MeOH
25	-3,44°	10,70 mg/ml	MeOH
26	-13,74	8,59 mg/ml	Clorofórmio
27	+11,89	9,00 mg/ml	Clorofórmio
30	-5,25	4,00mg/ml	MeOH
31	+7,99	4,00mg/ml	MeOH
28	-4,90	10,00mg/ml	MeOH
29	+5,69	9,89mg/ml	MeOH

C. Exemplo farmacológico:

- 10 A capacidade dos compostos presentes de conservar p53 em células A2780 foi medida com o ensaio imunoabsorvente ligado à enzima p53. O ensaio de p53 é um imunoensaio de enzima "sanduíche" que emprega dois anticorpos policlonais. Um anticorpo policlonal, específico para a proteína p53, foi imobilizado na superfície dos poços plásticos. Qualquer p53 presente na amostra a ser analisada se ligará ao anticorpo de captura. O

anticorpo policlonal detector biotinilado também reconhece a proteína p53, e se ligará a qualquer p53, que foi retida pelo anticorpo de captura. O anticorpo detector, por sua vez, está ligado por peroxidase de rábano silvestre conjugada à estreptavidina. A peroxidase de rábano silvestre catalisa a conversão do substrato cromogênico o-fenileno diamina, a intensidade do qual é proporcional à quantidade de ligação de proteína p53 à placa. O produto de reação colorido é quantificado usando um espectrofotômetro. Quantificação é alcançada pela construção de uma curva-padrão usando concentrações conhecidas de proteína p53 marcada com HIS recombinante purificada (ver exemplo C.1.).

C.1. ELISA p53

As células A2780 (ATCC) foram cultivadas em RPMI 1640 suplementadas com soro fetal de bezerro 10% (FCS), L-glutamina 2 mM e gentamicina a 37 ° C em uma incubadora umedecida com CO₂ 5%.

As células A2780 foram semeadas em 20.000 células por poço em uma placa de 96 poços, cultivadas por 24 horas e tratadas com o composto por 16 horas a 37°C em uma incubadora umedecida. Após incubação, as células foram lavadas uma vez com salina tamponada por fosfato e 30 µl, por poço, tampão RIPA de baixo sal (tris 20 mM, pH 7,0, EDTA 0,5 mM, Nonidet P40 1%, DOC 0,5%, SDS 0,05%, PMSF 1 mM, aprotinina 1 µg/ml e leupeptina 0,5 µ/ml) foram adicionados. As placas foram colocadas em gelo por 30 minutos para completar a lise. Proteína p53 foi detectada em lisados usando o sanduíche ELISA, descrito abaixo.

Placas de 96 poços EIA/RIA de poliestireno de alta ligação (Costar 9018) foram recobertas com anticorpo de captura pAb1801 (Abcam ab28-100) em uma concentração de 1 µg/ml em tampão de revestimento (NaHCO₃ 0,1 M pH 8,2), 50 µl por poço. Permitiu-se que o anticorpo aderisse durante a noite a 4°C. As placas recobertas foram lavadas uma vez com salina tamponada por fosfato (PBS) / Tween 20 0,05% e 300 µl de tampão de bloqueio (PBS, albuminas de soro bovino 1% (BSA)) foram adicionados, durante um período de incubação de 2 horas à temperatura ambiente. Diluições da proteína p53 marcada com HIS purificada recombinante, nos limites

de 3 a 200 ng/ml, foram feitas no tampão de bloqueio e usadas como padrões.

As placas foram lavadas duas vezes com PBS / Tween 20 0,05% e tampão de bloqueio ou padrões foram adicionados em 80 µl / poço. Aos padrões, 20 µl de tampão de lise foram adicionados. As amostras foram adicionadas a outros poços em 20 µl lisado / poço. Após uma incubação noturna a 4°C, as placas foram lavadas duas vezes com PBS / Tween 20 0,05%. Alíquotas de 100 µl de anticorpo policlonal secundário p53(FL-393) (Tebubio, sc-6243) em uma concentração de 1 µg/ml no de tampão bloqueio foram adicionados a cada um dos poços e permitidos aderir por 2 horas à temperatura ambiente. As placas foram lavadas três vezes com PBS / Tween 20 0,05%. Anticorpo anticoelho de detecção HRP (sc-2004, Tebubio) em 0,04 µg/ml em PBS / BSA 1% foi adicionado e incubado por 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas três vezes com PBS / Tween 20 0,05% e 100 µl do tampão de substrato foram adicionados (tampão de substrato foi preparado pouco antes do uso pela adição de 1 comprimido de 10 mg o-fenileno diamina (OPD) de Sigma e 125 µl de H₂O₂ 3% a 25 ml de tampão OPD: ácido cítrico 35 mM, Na₂HPO₄ 66 mM, pH 5,6). Após 5 a 10 minutos, a reação colorida foi parada pela adição de 50 µl de tampão de parada (H₂SO₄ 1 M) por poço. A absorvância em comprimentos de onda duais de 490/655 nm foi medida usando um leitor de microplaca Biorad e os resultados então foram analisados.

Para cada experimento, controles (não contendo fármaco) e uma incubação em branco (não contendo célula ou fármacos) foram corridos em paralela. O valor em branco foi subtraído de todo valores controle e de amostra. Para cada amostra, o valor de p53 (em unidades de absorvância) foi expresso como a porcentagem do valor da p53 presente no controle. Preservação de porcentagem mais alta do que 140% foi definida como significativa. Neste pedido, os efeitos de compostos teste são expressos como a dose mais baixa que fornece pelo menos 140% do valor da p53 presente no controle (LAD) (ver Tabela 4.).

Em alguns experimentos o ensaio foi adaptado e usado em pla-

cas de cultura de 384 poços.

Tabela 4: Resultados dos compostos que foram testados no protocolo ELISA p53 acima (células A2780)

Comp. N°	p53-elisa LAD [microM]
6	1,0
17	0,10
12	0,10
13	1,00
19	0,10
2	0,10
5	0,10
22	3,00
15	0,10
20	0,03
18	0,03
21	1,0
9	1,0
11	0,30
14	1,0
4	0,10
10	1,0
7	0,30
8	0,10
16	0,30
23	3,00
1	0,10
27	0,10
24	0,03
25	0,10
31	0,10

26	0,10
30	0,10
29	0,03
28	0,10

C.2 Ensaio de Proliferação

As células de câncer ovarianas A2780 humanas foram um presente gentil do doutor T.C. Hamilton (Fox Chase Cancer Centre, Pensilvânia, U.S.A.). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com

5 L-glutamina 2 mM, gentamicina 50 µg/ml e soro fetal de bezerro 10%.

Reagentes usados no ensaio Alamar Blue

Resazurina foi adquirida de Aldrich (Prod. N° 199303). Ferrocianeto de potássio, ferricianeto de potássio, KH_2PO_4 e K_2HPO_4 foi adquirido de Sigma (Prod. Nos. P9387, P8131, P5655 e P8281, respectivamente).

10 Tampão de Fosfato de Potássio 0,1 M (PPB) foi feito como se segue: 2,72 gramas de KH_2PO_4 e 13,86 gramas de K_2HPO_4 foram dissolvidos em 500 ml H_2O milli-Q, o pH foi ajustado ao pH 7,4 e o volume foi trazido a 1 litro com H_2O milli-Q; o tampão foi esterilizado em filtro e armazenado à temperatura ambiente. A solução estoque de Resazurina (PPB-A) foi pre-

15 parada recentemente pela dissolução de 45 mg de resazurina em 15 ml de PBS. Ferricianeto de potássio 30 mM (PPB-B) foi preparado pela dissolução de 0,987 grama de ferricianeto de potássio em 100 ml de PPB. Ferrocianeto de potássio 30 mM (PPB-C) foi preparado pela dissolução de 1,266 grama de ferrocianeto de potássio em 100 ml de PPB.

20 Mistura de PPB-A, PPB-B e PPB-C foi preparada pela mistura de volumes iguais das respectivas soluções. Solução de trabalho de resazurina (neste pedido denominada solução "Alamar Blue") foi preparada pela diluição da dita mistura 20x (vol/vol) em PPB e esterilização em filtro; a solução Alamar Blue pode ser guardada a 4°C para um máximo de 2 semanas.

25 *Procedimento do ensaio Alamar Blue*

Já que os experimentos em placas de 384 poços, as células foram semeadas em uma densidade de 5×10^3 células/ml em placas de cultura de 384 poços Falcon (Life Technologies, Merelbeke, Bélgica), pretas com

fundo claro, em 45 µl de meio de cultura. Permitiu-se que células aderissem ao plástico por 24 horas. O composto testado foi pré-diluído (1/50 em meio de cultura) e 5 µl de composto pré-diluído foi adicionado aos poços. Após incubação por 4 dias, 10 µl da solução Alamar Blue foram adicionados a cada um dos poços e as células foram ainda incubadas por 5 horas (A2780) a 37°C. A intensidade de fluorescência foi medida para cada um dos poços com um leitor de placa de Fluorescência (Fluorskan, Labsystems, excitação 540 nm e emissão 590 nm)

A atividade antiproliferativa foi calculada como porcentagem de células viáveis remanescentes em condições tratadas *versus* controle (células não tratadas). Dentro de um experimento, o resultado de cada condição experimental é a média de 3 poços em replicata. Quando apropriado, os experimentos foram repetidos para estabelecer curvas de concentração-resposta completas. Quando apropriado, valores de IC₅₀ (concentração do fármaco, necessária para reduzir o crescimento celular a 50% do controle) foram computados usando análise probit para dados graduados (Finney, D.J., Probit Analysis, 2nd Ed. Chapter 10, Graded Responses, Cambridge University Press, Cambridge 1962). Neste pedido, os efeitos de compostos teste são expressos como pIC₅₀ (o valor de log negativo do valor de IC₅₀ (M) (ver Tabela 5A).

Tabela 5A: Resultados dos compostos que foram testados no protocolo de proliferação celular acima (células A2780)

Comp. N°	A2780 inibição de proliferação celular pIC ₅₀
6	6,67
17	7,40
12	7,20
13	6,90
19	7,34
2	7,38
5	7,28
22	6,26

Comp. N°	A2780 inibição de proliferação celular pIC₅₀
15	7,27
20	7,29
18	7,47
21	6,85
9	6,85
11	6,55
14	6,43
4	6,74
10	6,70
7	6,96
8	7,06
16	6,87
23	6,52
1	6,94
27	6,85
24	7,18
31	6,84
26	7,11
30	7,04
29	7,14
28	6,89

Os compostos também foram testados de acordo com o protocolo acima, mas usando outras linhagens celulares: linhagem celular de câncer colorretal HCT116, linhagem celular de câncer de pulmão de não pequenas células H1299, linhagem celular de câncer de próstata humana DU145. Os resultados são relatados na Tabela 5B.

Tabela 5B

Comp. N°	HCT116 inibição de proliferação celular pIC ₅₀	H1299 inibição de proliferação celular pIC ₅₀	DU145 inibição de proliferação celular pIC ₅₀
6	5,39	5,03	
17	7,05	6,18	6,17
12	6,06	5,2	
13	5,61	<5	
19		5,46	5,74
2		5,94	6,16
5	6,46	5,23	5,56
22		5,09	5,07
15	6,69	5,82	
20		5,72	5,73
18	7,27	6,38	6,40
21	6,83	6,12	5,22
9	6,02	5,17	5,26
11	6,67	5,81	6,21
14	<5	5,40	5,14
4	6,00	5,43	5,29
10	6,47	5,68	5,65
7	7,00	6,39	6,60
8	7,06		
16	6,68	6,73	5,98
23	5,53	5,61	5
1	6,82	6,06	5,92
27	7,08	5,99	6,00
24	7,42	6,63	6,53
31	6,94	5,84	6,04
26	7,26	6,27	6,18
30	7,19	6,02	6,14
29	7,37	6,67	6,58
28	7,11	6,73	6,52

C.3.. Ensaio de P450

As proteínas CYP P450 (expressas em E.coli) (3A4, 2D6, 2C9, 1A2 & 2C19) convertem seus substratos específicos em uma molécula fluorescente ^{1 2}. A molécula fluorescente é medida usando um leitor de placa fluorescente. Os compostos que inibem a reação enzimática resultarão em

uma redução do sinal fluorescente.

Conversões mediadas pelas respectivas isoenzimas citocromo P450 expressas a partir do cDNA

Substrato	enzima	molécula fluorescente
CEC	CYP1A2	CHC
MFC	CYP2C9	7-HFC
CEC	CYP2C19	CHC
AMMC	CYP2D6	AHMC
BFC	CYP3A4	7-HFC
DBF	CYP3A4	1 Fluoresceína
7-BQ	CYP3A4	Quinolinol

Abreviações:

- 5 CEC: 7-etóxi-3-cianocumarina; CHC: 3-ciano-7-hidroxycumarina,
 MFC: 7-Metóxi-4-trifluorometil cumarina; 7-HFC: 7- Hidróxi -trifluorometil cumarina,
 CEC: 7-etóxi-3-cianocumarina; CHC: 3-ciano-7-hidroxycumarina,
 AMMC: 3-[2-(N,N-dietil-N-metilamino)etil]-7-metóxi-4-metilcumarina;
 10 AHMC: hidrocloreto de 3-[2-(N,N-dietilamino)etil]-7-hidróxi-4-metilcumarina,
 BFC: 7-Benzilóxi-trifluorometil cumarina;
 DBF: Dibenzilfluoresceína, 7-BQ: Benziloxiquinolina.

Mistura de Cofator: (para todas as enzimas CYP exceto para CYP 2D6)

	solução de uso		concentração final
G-6-P	8.25 mM	25.10 mg	3.3 mM
G-6-P-DH	1 U/ml	14.29 µl	0.4 U/ml
0.5M MgCl ₂ .6H ₂ O	8.25 mM	165.0 µl	3.3 mM
NADP	3.25 mM	25.59 mg	1.3 mM
dissolvido em um tampão Na-K-fosfato 0,1 M		10 ml	

- 15 Abreviações: G-6-P: glicose-6-fosfato; G-6-P-DH: glicose-6-fosfato-desidrogenase.

Mistura de Cofator: (para CYP2D6)

	solução de uso		concentração final
G-6-P	1.025 mM	3.12 mg	0.41 mM
G-6-P-DH	1 U/ml	14.29 µl	0.4 U/ml
0.5M MgCl ₂ .6H ₂ O	1.025 mM	20.5 µl	0.41 mM
NADP	20.5 µM	0.161 mg	8.2 µM
dissolvido em um tampão Na-K-fosfato 0,1 M	10 ml		

Soluções de enzima CYP P450:

<u>CYP1A2:</u>	(CEC)	: concentração final	pmol P450/ml
<u>CYP2C9:</u>	(MFC)	concentração final	60 pmol P450/ml
<u>CYP2C19:</u>	(CEC)	concentração final	2.5 pmol P450/ml
<u>CYP2D6:</u>	(AMMC)	concentração final	42 pmol P450/ml
<u>CYP3A4:</u>	(BFC)	concentração final	83 pmol P450/ml
	(DBF)	:concentração final	5 pmol P450/ml
	(7-BQ)	:concentração final	20 pmol P450/ml

Todas as enzimas CYP foram dissolvidas em tampão Na-K-fosfato 0,01 M + KCl 1,15% e mantidas em gelo até o uso. As enzimas CYP
5 P450 foram armazenadas a -80°C.

Composto e diluição de inibidor de referência:

Compostos e inibidores de referência foram entregues ao departamento como uma solução 5 mM em DMSO. Uma solução de trabalho de $5 \cdot 10^{-4}$ M foi feita por diluição serial usando acetonitrila. A concentração de
10 composto final foi 10^{-5} M para o rastreamento primário, e a concentração de solvente final a 2%. Após um rastreamento primário em uma concentração de 10^{-5} M, os valores de IC₅₀ de potentes inibidores selecionados foram testados em uma faixa de concentração de $3 \cdot 10^{-9}$ a 10^{-5} M. No rastreamento primário, todos os compostos foram testados em triplicata.

15 Os inibidores de referência foram testados em uma faixa de concentração de 10^{-9} a 10^{-4} M.

Firafilina:	(Ultra Fine Chemicals)	para CYP1A2
Sulfafenazol:	caseiro	para CYP2C9
Tranilcipromina:	caseiro	para CYP2C19
Quinidina:	caseiro	para CYP2D6
Cetoconazol:	caseiro	para CYP3A4

Inibidores de referência:Soluções de substrato:

As soluções de estoque de substrato foram dissolvidas em acetnitrila, e armazenadas a -20°C. A solução de trabalho final foi dissolvida em tampão de Na-K-fosfato 0,1 M pH 7,4, e esta solução era sempre preparada recentemente antes de começar o ensaio.

CEC	(substrato de CYP1A2)	6,25 µl solução CEC 20 mM /5 ml de volume total	5 µM
MFC	(substrato de CYP2C9)	200 µl solução MFC 25 mM /5 ml de volume total	200 µM
CEC	(substrato de CYP2C19)	31,25 µl solução CEC 20 mM/5 ml de volume total	25 µM
AMMC	(substrato de CYP2D6)	150 µl solução AMMC 0,5 mM/5 ml de volume total	3 µM
BFC	(substrato de CYP3A4)	750 µl solução BFC 5 mM/5 ml de volume total	150 µM
DBF	(substrato de CYP3A4)	12,5 µl solução DBF 2mM/5 ml de volume total	1 µM
7-BQ	(substrato de CYP3A4)	60 µl solução 7-BQ 25 mM/5 ml de volume total	60 µM

Análise de dados

Preparação da placa, vinculação de dados, análise de dados, validação & aprovação de resultados e dados transferidos foram realizados semiautomaticamente pelo programa de Lexis-Laplace (Laplace-DLM-RVAM)

A fórmula usada nos cálculos é:

atividade % = $(100 / (\text{controle positivo médio} - \text{controle negativo médio})) \times (\text{amostra média} - \text{controle negativo médio})$.

% inibição = 100 - atividade %

Quando calculado, o valor de IC₅₀ foi automaticamente gerado pela extrapolação gráfica em RVAM, baseado na intersecção com 50% do eixo de controle.

Método

O ensaio foi realizado em uma placa de 96 poços pretos Costar. Por poço, o ensaio compreende: 40 µl de solução de enzima CYP P450 (nas amostras de controle negativo 40 µl de Na-K-fosfato tamponado 0,1 M pH 7,4 sem enzima foram adicionados); 40 µl de mistura de cofator; 2 µl de composto ou inibidor de referência de amostras de controle negativo ou solvente de amostras de controle positivo. Após pré-incubação por 5 min a

37°C em uma incubadora de agitação, 20 µl de solução de substrato foram adicionados. As placas foram incubadas a 37°C por 10 min (CYP3A4/DBF), 15 min (CYP1A2), 30 min (CYP2C9, CYP3A4/BFC e CYP3A4 / 7-BQ & CYP2C19) e 45 min (CYP2D6). A reação foi parada pela adição de 200 µl de acetonitrila. Para CYP3A4/DBF, a reação foi parada pela adição de 200 µl de NaOH 2M. Já para CYP3A4/7-BQ, a reação foi parada pela adição de 40 µl de Tris/acetonitrila (1:5) (V:V, seguido por uma centrifugação por 10 minutos em 2000 rpm). O sinal fluorescente foi detectado por um leitor fluorescente Victor2 (Wallac) ou Fluoroskan (Labsystems). O comprimento de onda de excitação e de emissão de enzimas diferentes e seu substrato específico são mencionados na Tabela 6.

Tabela 6: Comprimentos de onda de excitação e emissão

Enzima	Substrato	Comprimento de onda de excitação	Comprimento de onda de emissão
CYP1A2	CEC	410 nm	460 nm
CYP3A4	BFC	405 nm	535 nm
CYP3A4	DBF	485 nm	538 nm
CYP3A4	7-BQ	405 nm	535 nm
CYP2C9	MFC	405 nm	535 nm
CYP2C19	CEC	410 nm	460 nm
CYP2D6	AMMC	390 nm	460 nm

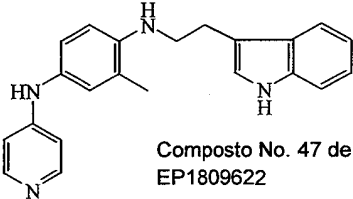
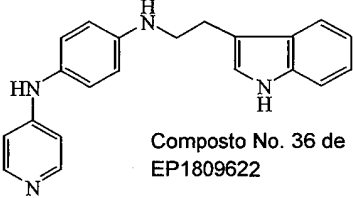
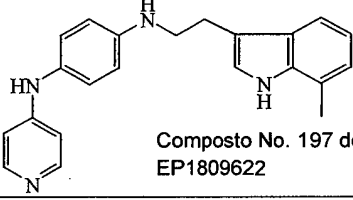
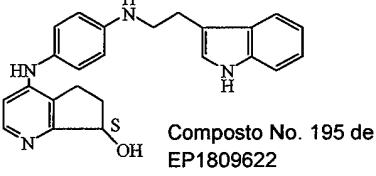
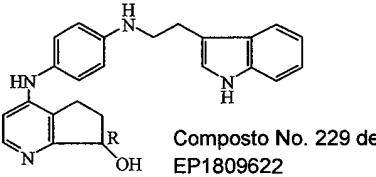
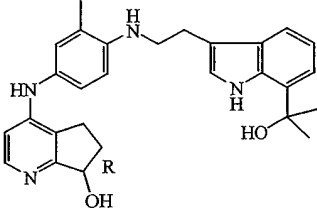
Referências

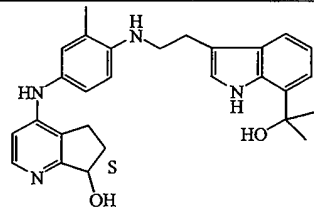
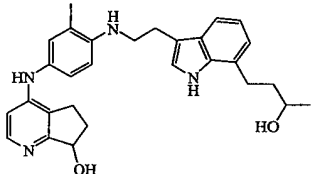
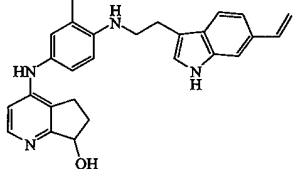
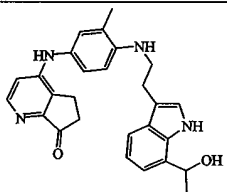
- Microtiter Plate Assays for Inhibition of Human, Drug-Metabolizing Cytochromes P450
- Charles L. Crespi, Vaughn P. Miller, Bruce W. Penman (Gentest)
Analytical Biochemistry 248, 188-190 (1997) Article n° AB972145
Novel High Throughput fluorescent P450 assays
V.P. Miller, J. Ackermann, D.M. Stresser, C.L. Crespi
- Gentest Internet site.

A tabela 7 fornece dados dos compostos da presente invenção (compostos n° 18, 20, 9, 14 e 4) testados nos sete testes ao comparar com compostos da técnica anterior. Como descrito acima, cinco enzimas P450

foram testadas, uma delas em três substratos diferentes (dessa forma sete testes no total). Na tabela 7 é indicado em quantos testes de P450 um composto mostrou uma atividade inibitória com uma $IC_{50} < 1,00E-06$.

Tabela 7: dados comparativos sobre inibição CYP

composto	Efeitos de P450 IC_{50}
 Composto No. 47 de EP1809622	7 vezes < 1,00E-06
 Composto No. 36 de EP1809622	3 vezes < 1,00E-06
 Composto No. 197 de EP1809622	7 vezes < 1,00E-06
 Composto No. 195 de EP1809622	0 vezes < 1,00E-06
 Composto No. 229 de EP1809622	0 vezes < 1,00E-06
 Composto N° 20	0 vezes < 1,00E-06

composto	Efeitos de P450 IC ₅₀
 Composto N° 18	0 vezes < 1,00E-06
 Composto N° 9	0 vezes < 1,00E-06
 Composto N° 14	1 time < 1,00E-06
 Composto N° 4	0 vezes < 1,00E-06

C.4. Antagonismo de Ro-4-1284 em camundongos ^{3,4,5}

O teste é uma modificação de um procedimento descrito por Colpaert et al. (1975).³ Camundongos NMRI machos (22 ± 3 g) foram alojados em jaulas de observação macrolon (L x W x H: 11 x 12 x 17 cm; n = 3 por jaula). No início dos experimentos imediatamente antes da administração do composto teste, a temperatura corporal inicial dos camundongos foi medida com uma precisão de 0,1 °C inserindo a sonda termossensível (diâmetro de 1,0 mm) de um termômetro elétrico (Comark) a uma profundidade constante de 3 cm no esôfago até que uma leitura estável fosse obtida. O diâmetro da pupila do olho direito foi medido com um microscópio graduado e expresso em unidades de 1/24 mm. Quinze min após administração do composto teste, os camundongos foram desafiados com Ro-4-1284 (10 mg/kg, s.c.) . Ro-4-1284 é um inibidor de transporte de monoamina vesicular similar à reserpina (VMAT-2), que rapidamente depleta vesículas secretórias

^{3, 4} Quinze, 30 e 60 min após o desafio, os camundongos foram classificados

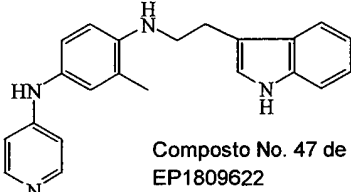
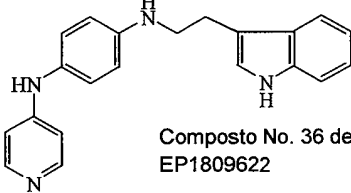
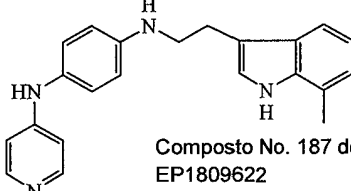
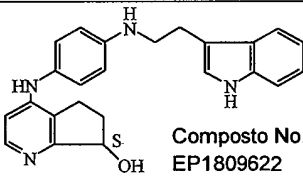
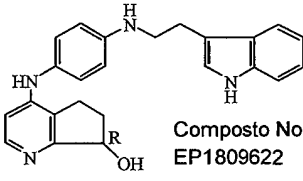
pela abertura de pálpebra (0, 1, 2, 3, 4, 5) e atividade locomotora (-1, 0, 1, 2, 3). No intervalo de 60 min, imediatamente após classificação de comportamento observável, o diâmetro da pupila do olho direito e a temperatura esofágica foram medidos novamente. Fenômenos anormais, tais como farejar intensivo, mastigação, empinamento, hiperemia, piloereção, salivação, tremores, convulsões e morte foram observados (os últimos fenômenos também foram observados ocorrendo antes da administração de Ro-4-1284). Critérios de efeitos induzidos pelo fármaco: reversão de ptose: classificação de abertura de pálpebra > 1 em 15, 30 ou 60 min (controles falso-positivos 2,7, 0,5 e 0%, respectivamente; n> 350); indução de prostração: classificação -1 para locomoção em 15, 30 ou 60 min (nunca observado em controles); reversão de hipomotilidade: classificação > 0 para a locomoção em 15, 30 e 60 min (controles falso-positivos 2,2, 0,8 e 0%, respectivamente); reversão de miose: diâmetro de pupila > 5 unidades em 60 min (falso-positivos 0,8%); potenciação de hipotermia: redução de temperatura (ao longo do intervalo de tempo de 1h) > 9,0 °C (falso-positivos 1,4%); reversão de hipotermia: redução de temperatura <3,0 °C (falso-positivos 1,8%).

De acordo com o procedimento padrão, R0-4-1284 é injetado 15 min após administração subcutânea ou oral e observação começa 15 min depois. As doses são inicialmente dadas a 3 animais. Quando pelo menos 2 de 3 animais mostram atividade de pelo menos uma das observações, o composto é considerado ativo. Em outros casos, o composto é considerado inativo no regime particular tempo-via-dose e classificado como terminado.

Composto N° 20, 18, 1, 27, 24, 25, 31, 30, 7, 29, 28, 26 e 17 foram cada um testados em 3 animais em uma concentração de 80 mg/kg após administração oral e não mostraram atividade sobre reversão de miose, reversão de ptose, reversão de hipomotilidade. Os 4 compostos somente foram testados em 40 mg/kg e não mostraram atividade sobre reversão de miose, reversão de ptose, reversão de hipomotilidade.

Os compostos de EP 1809622 também foram testados no mesmo teste e os resultados são mostrados na Tabela 8 abaixo.

Tabela 8: dados comparativos

composto	Efeitos colaterais neurológicos induzidos por drogas
 Composto No. 47 de EP1809622	sim
 Composto No. 36 de EP1809622	sim
 Composto No. 187 de EP1809622	sim
 Composto No. 195 de EP1809622	sim
 Composto No. 229 de EP1809622	sim

Referências

- Colpaert, F.C., Lenaerts, F.M., Niemegeers, C.J.E., Janssen, P.A.J.: "A critical study on Ro-4-1284 antagonism in mice.", Arch. Int. Pharmacodyn. 215 40-90 (1975).
- 5 Colzi, A., D'Agostini, R., Cesura, A.M., Borroni, E., Da Prada, M.: "Monoamine oxidase A inhibitors and dopamine metabolism in rat caudatus: evidence that an increased cytosolic level of dopamina displaces reversible monoamine oxidase-A inhibitors in vivo.", J. Pharmacol. Exp. Ther. 265 103-111 (1993).
- 10 Filinger, E.J.: "Effect of a reserpine-like agent on the release and metabolism of [^{3} H]NA in cell bodies and terminals.", Gen. Pharmacol. 25

1039-1043 (1994).

C.5 Teste de inibição da corrente de K⁺ mediada por HERG em células HEK293 por patch-clamp

Experimentos foram realizados usando células HEK293 que expressam estavelmente o canal de potássio HERG. Células foram cultivadas a 37°C e CO₂ 5% em frascos de cultura em Meio MEM suplementado com soro bovino fetal 10% inativado por calor, solução 1% de L-Glutamina-Penicilina-Estreptomicina, aminoácidos não essenciais 1% (100x), piruvato de sódio 1% (100 mM) e Geneticina 0,8% (50 mg/ml). Antes do uso, as células foram subcultivadas em meio MEM em ausência de 5 ml de L-Glutamina-Penicilina-Estreptomicina. Para o uso no sistema de patch-clamp automatizado PatchXpress 7000A (Axon Instruments) as células foram coletadas para obter a suspensão celular de células únicas.

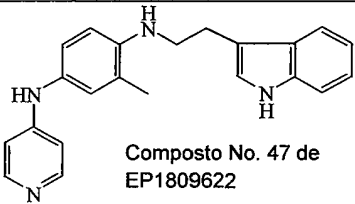
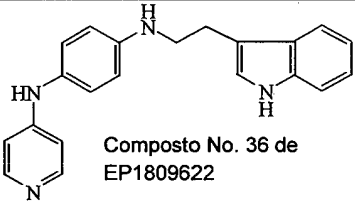
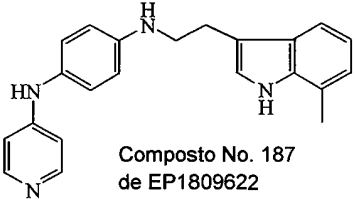
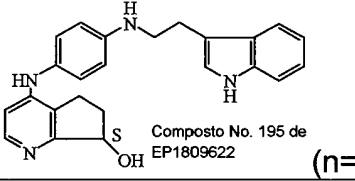
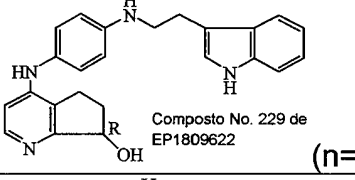
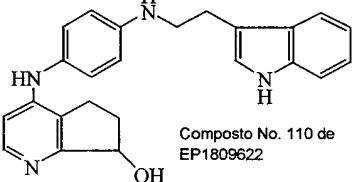
Solução extracelular contém (mM): NaCl 150, KCl 4, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1,8, HEPES 10, Glicose 5 (pH 7,4 com NaOH). A solução de pipeta continha (mM): KCl 120, HEPES 10, EGTA 5, ATP-Mg₂ 4, MgCl₂ 2, CaCl₂ 0,5 (pH 7,2 com KOH).

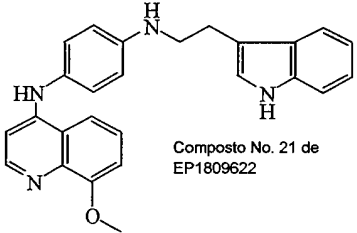
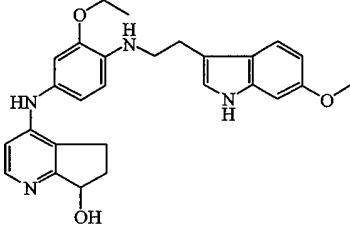
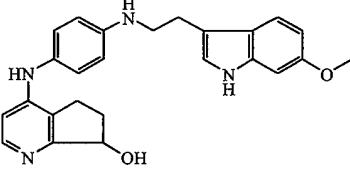
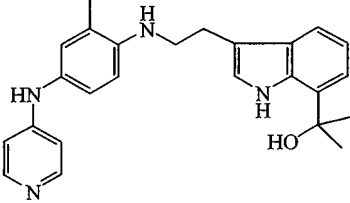
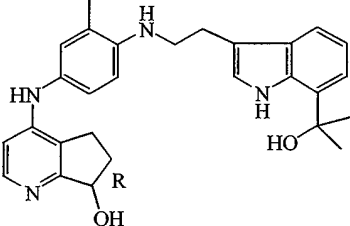
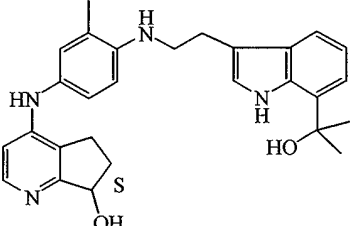
Os experimentos de patch-clamp foram realizados no modo de voltagem fixa e a corrente das células inteiras foram registradas com um ensaio de patch-clamp automatizado que utiliza o PatchXpress 7000A sistema (Axon Instruments). Os sinais atuais foram amplificados e digitalizados por um amplificador Multiclamp, armazenados e analisados usando PatchXpress, programa DataXpress e Igor 5.0 (Wavemetrics).

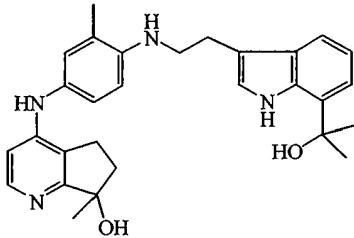
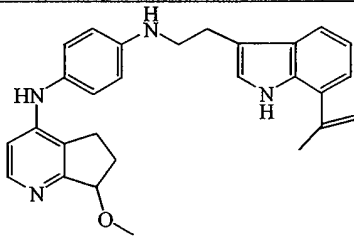
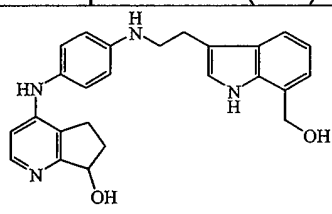
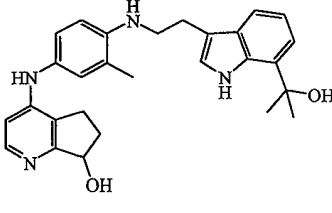
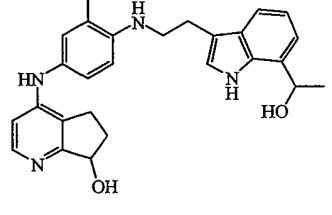
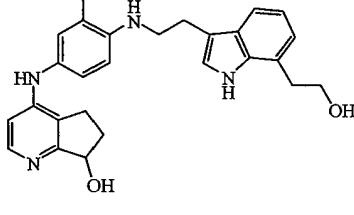
O potencial de manutenção foi -80 mV. A corrente HERG (corrente seletiva K⁺ exterior) foi determinada como a corrente de cauda máxima em -40 mV após uma depolarização de 2 segundos a +60 mV. Taxa de ciclo de pulso foi 15 s. Antes de cada pulso teste, um pulso curto (0,5 s) do potencial de manutenção a -60 mV foi dado para determinar a corrente de vazamento (linear). Após estabelecer configuração de célula inteira e um período de estabilidade, o veículo foi aplicado por 5 minutos seguidos pela substância teste pelo aumento das concentrações de 10⁻⁷ M, 3 x 10⁻⁷ M e 3 x 10⁻⁶ M. Cada concentração da substância teste foi aplicada duas vezes. O

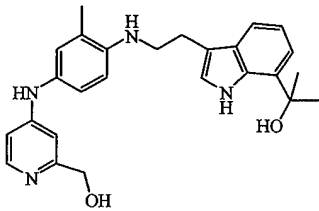
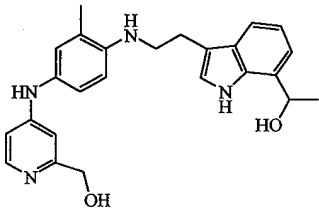
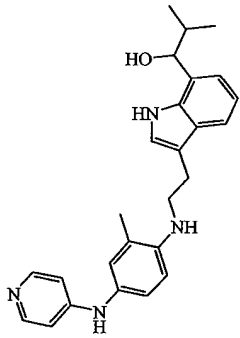
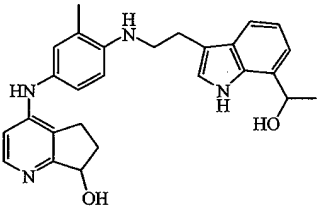
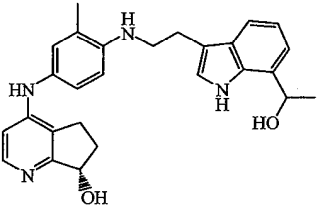
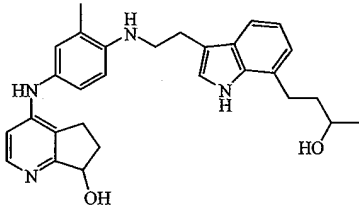
efeito de cada concentração foi determinado após 5 min como uma corrente média de 3 pulsos de voltagem sequenciais. Para determinar a extensão do bloco, a corrente residual foi comparada com o pré-tratamento de veículo. Dados (Tabela 9) são apresentados como valores médios ($\pm$ erro padrão da média (SEM) se disponível) de inibição de porcentagem comparado ao controle (controle é 100%) (n=número de experimentos).

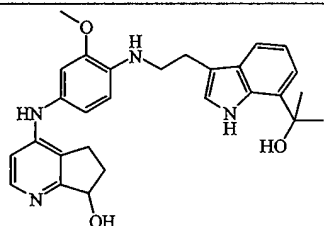
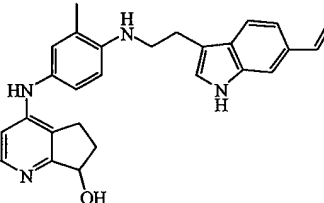
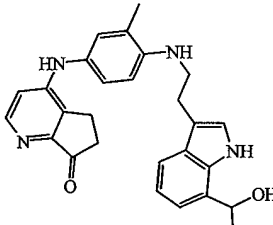
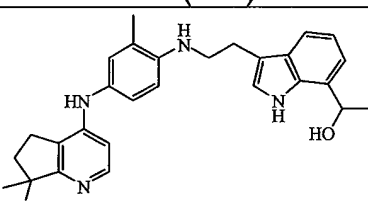
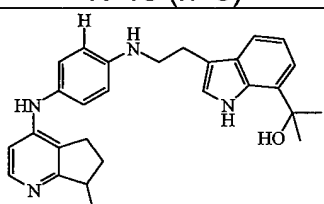
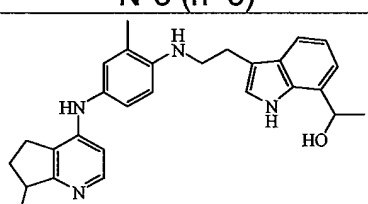
Tabela 9: Inibição de corrente K^+ mediada por HERG em células HEK293

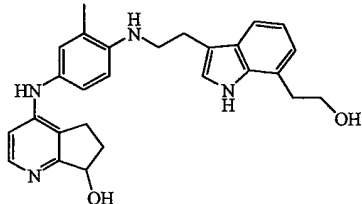
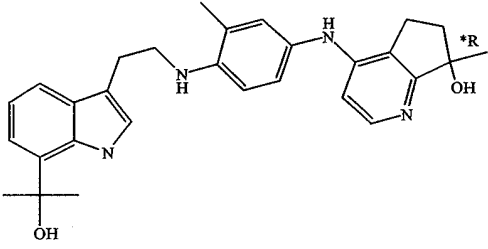
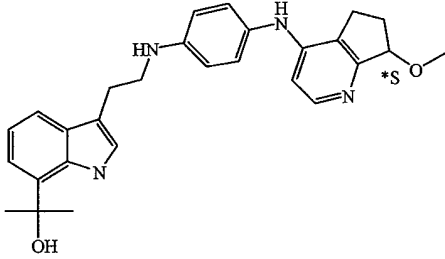
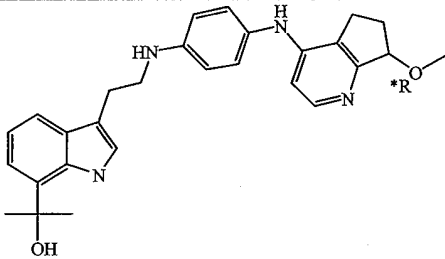
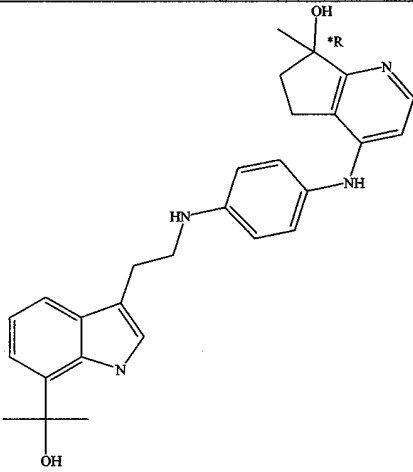
Composto	$1,10^{-7}$ M	$3,10^{-7}$ M	$3,10^{-6}$ M
 Composto No. 47 de EP1809622 (n=3)	$76 \pm 1,6$	$58 \pm 2,7$	$13 \pm 3,1$
 Composto No. 36 de EP1809622 (n=3)	$68 \pm 3,5$	$41 \pm 2,9$	$5 \pm 0,33$
 Composto No. 187 de EP1809622 (n=3)	$68 \pm 3,2$	$36 \pm 6,1$	5 ± 1
 Composto No. 195 de EP1809622 (n=3)	$80 \pm 3,7$	65 ± 2	$19 \pm 0,4$
 Composto No. 229 de EP1809622 (n=3)	$81 \pm 4,8$	$63 \pm 5,5$	$18 \pm 1,1$
 Composto No. 110 de EP1809622 (n=4)	$86 \pm 4,6$	$66 \pm 5,2$	$22 \pm 4,6$

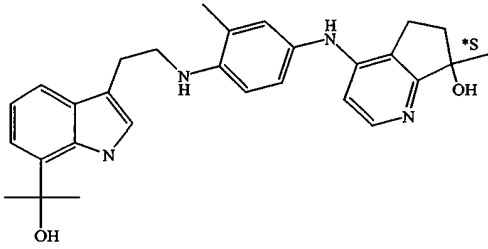
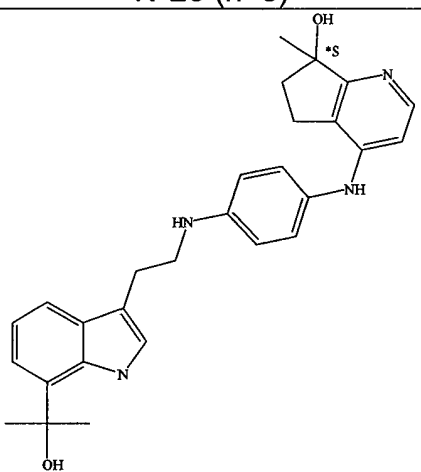
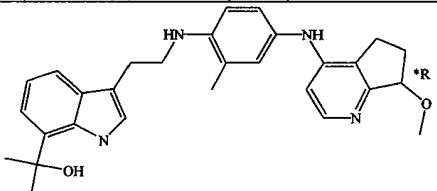
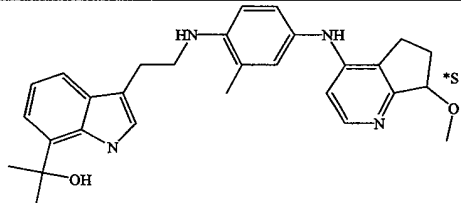
Composto	$1,10^{-7}$ M	$3,10^{-7}$ M	$3,10^{-6}$ M
 Composto No. 21 de EP1809622 (n=3)	$35 \pm 8,6$	$8 \pm 3,6$	0 ± 0
 Composto 112 de EP1809622 (n=3)	$74 \pm 3,2$	$46 \pm 7,3$	$6 \pm 3,1$
 Composto 196 de EP1809622 (n=3)	$87 \pm 0,9$	$76 \pm 1,6$	$38 \pm 3,1$
 Composto N° 2 (n=3)	$89 \pm 3,9$	$75 \pm 0,8$	$18 \pm 4,6$
 Composto N° 20 (n=3)	$88 \pm 5,1$	$76 \pm 1,8$	$26 \pm 7,1$
 Composto N° 18 (n=3)	$90 \pm 1,8$	$82 \pm 3,8$	$41 \pm 4,3$

Composto	$1,10^{-7}$ M	$3,10^{-7}$ M	$3,10^{-6}$ M
 Composto N° 1 (n=4)	$86 \pm 2,5$	$82 \pm 1,1$	$69 \pm 5,1$
 Composto N° 7 (n=3)	$86 \pm 2,9$	$53 \pm 6,8$	$2 \pm 0,3$
 N° 6 (n=4)	$89 \pm 2,9$	$87 \pm 4,8$	$69 \pm 3,4$
 N° 17 (n=3)	$84 \pm 3,9$	$70 \pm 4,7$	$21 \pm 3,3$
 N° 12 (n=6)	$87 \pm 0,9$	$78 \pm 2,8$	$58 \pm 2,9$
 N° 13 (n=3)	$91 \pm 2,8$	$85 \pm 4,2$	$75 \pm 1,8$

Composto	$1,10^{-7}$ M	$3,10^{-7}$ M	$3,10^{-6}$ M
 N°19 (n=3)	$89 \pm 2,4$	$72 \pm 3,2$	$26 \pm 4,7$
 N°5 (n=3)	$88 \pm 1,9$	$74 \pm 6,1$	$33 \pm 10,5$
 N°22 (n=3)	$76 \pm 5,2$	$49 \pm 7,8$	$9 \pm 2,3$
 N°15 (n=3)	$93 \pm 1,2$	$88 \pm 0,8$	$66 \pm 4,4$
 N°21 (n=3)	$91 \pm 0,9$	$86 \pm 1,8$	$65 \pm 1,2$
 N°9 (n=3)	$87 \pm 2,1$	$72 \pm 3,4$	$47 \pm 3,2$

Composto	$1,10^{-7}$ M	$3,10^{-7}$ M	$3,10^{-6}$ M
 N°11 (n=3)	$90 \pm 8,7$	$80 \pm 7,2$	$43 \pm 3,3$
 N°14 (n=4)	$84 \pm 2,1$	$57 \pm 5,4$	$10 \pm 3,8$
 N°4 (n=3)	$89 \pm 4,2$	$85 \pm 1,7$	$66 \pm 3,3$
 N°10 (n=3)	$82 \pm 2,1$	$72 \pm 2,6$	$62 \pm 1,8$
 N°8 (n=3)	$93 \pm 7,3$	$83 \pm 6,4$	$25 \pm 5,4$
 N°16 (n=3)	$89 \pm 6,0$	$74 \pm 7,9$	$34 \pm 4,4$

Composto	$1,10^{-7}$ M	$3,10^{-7}$ M	$3,10^{-6}$ M
 N°23 (n=3)	$92 \pm 1,0$	$87 \pm 2,0$	$72 \pm 0,4$
 N°27 (n=3)	$90 \pm 1,8$	$75 \pm 3,3$	$53 \pm 8,1$
 N°24 (n=3)	$88 \pm 3,2$	$77 \pm 4,2$	$29 \pm 2,9$
 N°25 (n=3)	$82 \pm 1,7$	$65 \pm 2,8$	$27 \pm 2,7$
 N°31 (n=3)	$91 \pm 0,9$	$82 \pm 2,3$	$55 \pm 3,8$

Composto	$1,10^{-7}$ M	$3,10^{-7}$ M	$3,10^{-6}$ M
 N°26 (n=3)	$87 \pm 1,7$	$78 \pm 1,8$	$51 \pm 5,9$
 N°30 (n=3)	$98 \pm 1,6$	$93 \pm 6,3$	$80 \pm 7,2$
 N°29 (n=3)	$89 \pm 2,3$	$82 \pm 3,9$	$39 \pm 0,8$
 N°28 (n=4)	$84 \pm 4,4$	$79 \pm 8,8$	$60 \pm 6,4$

Surpreendentemente, os presentes compostos mostram excelente atividade *in vitro*, que é combinada com baixa afinidade para enzimas P450 e sem efeitos neurológicos induzidos por fármaco *in vivo* e baixos efeitos cardiovasculares.

5 C.6. Efeitos antitumorais *in vivo*

Atividade antitumoral *in vivo* pode ser testada como se segue:

Referência NCI padrão:

Bissery, M-C., e Chabot, G.G. History and new development of screening and evaluation methods of anticancer drugs used in vivo and in vitro. Bull. Cancer. 1991, 78: 587-602.

Modelo animal:

5 Camundongos *Nus (Nu/Nu)* NMRI machos imunodeficientes (atímicos) (20 a 25 g obtidos de Janvier, França) foram usados para estes estudos. O peso inicial era aproximadamente de 23 a 34 g. Todos os animais foram mantidos sob condições SPF "barreira completa" com acesso livre a alimento e água. Os camundongos foram alojados em grupo sob um ciclo de
10 12h luz:escuridão (luzes ligadas às 06:00 h) a uma temperatura de 19 a 22 °C e umidade de 35 a 40% em jaulas tipo 3 IVC Techniplast. Os camundongos foram alimentados uma ração de Laboratório padrão. Todos os experimentos foram realizados conforme as Diretivas de Conselho de Comunidades Europeias (86/609/EEC) e tiveram que ser aprovados pelo comitê ético
15 local. Para um modelo de xenoenxerto tumoral estabelecido (volume tumoral ~200 mm³), os camundongos foram randomizados de acordo com os volumes tumorais, com 5 camundongos por grupo de tratamento.

Sistema de teste:

20 A linhagem celular tumoral de glioma humano U87 foi derivada de um paciente feminino caucasiano de 44 anos. As células foram cultivadas a 37 °C em uma atmosfera umidificada (CO₂ 5%, ar 95%), em meio DMEM suplementado com L-glutamina 2 mM, piruvato de sódio 2,0 mM, 25 unidades /ml de penicilina / 25 µg /ml de estreptomicina e soro fetal bovino 10%. As células foram mantidas como culturas de monocamada celular, sendo
25 passadas duas vezes semanalmente em 3 x 10⁶ células por frasco T175 usando o seguinte procedimento. Resumidamente, as células foram lavadas com PBS (sem Mg²⁺, Ca²⁺), antes da adição de tripsina-EDTA aos frascos de cultura. Após remoção de células, a tripsina-EDTA foi inativada pela adição de meio completo. A suspensão celular em seguida foi transferida para
30 tubo Falcon de 50 ml e centrifugada por 3 min em 1200 rpm. O meio foi aspirado, com células que são ressuspensas em um volume apropriado do meio completo. As células foram contadas em um hemocítômetro e sua viabilidade

de foi avaliada em exclusão de azul de trypan 0,25%. Um volume apropriado da suspensão celular em seguida foi adicionado a um novo(s) frasco(s) de cultura T175 ou garrafa de rosca contendo meio fresco. Para crescimento em grande escala de células tumorais U87, uma quantidade apropriada de garrafas de rosca foi semeada com 0,5 a 1×10^7 células 1 semana antes da inoculação de camundongos. O meio foi modificado duas vezes durante este período, com a última modificação sendo no dia antes da injeção celular. As células foram coletadas como descrito acima, à exceção de que após centrifugação, as células foram ressuspensas em meio sem soro frio (4°C). Os camundongos foram injetados na região inguinal com 1×10^7 total de células em um volume de 200 µl.

Desenho de estudo:

Células de glioma U87 humano foram injetadas diretamente na região inguinal dos camundongos *Nus* NMRI machos (1×10^7 células/200 µl/animal) no dia 0 (D0). No dia 7 a 10 (pode variar devido a ocupação/crescimento tumoral entre lotes celulares) quando o volume tumoral tinha alcançado uma média aproximada de 200 mm³, os camundongos foram randomizados de acordo com o volume tumoral, com 5 camundongos por grupo de tratamento. Os camundongos em seguida foram tratados uma vez diariamente (QD) com veículo (HP-β-CD 10%) ou veículo contendo composto teste (20 mg/kg) por alimentação forçada (p.o). administrada em um volume de 10 ml/kg de peso corporal por 5 dias. Medidas tumorais específicas foram tomadas no dia 6 (24 horas pós 5ª dose) e em seguida novamente no dia 10. O recrescimento tumoral (após a dosagem parar) foi monitorado de forma que o tempo para alcançar um volume de 2000 mm³ (TTR2000) possa ser registrado. Isto fornece informação extra sobre a duração da ação de fármaco no crescimento tumoral. Em geral, tamanho tumoral e pesos corporais foram medidos duas vezes semanalmente, com camundongos monitorados diariamente para sinais clínicos da toxicidade para a duração do tratamento. Sinais clínicos da toxicidade incluem (mas não limitados a), anorexia persistente ou desidratação, postura, moribundo, letargia, hipotermia e/ou respiração forçada (de acordo com referências UKCCCR para o bem-

estar de animais em referências de neoplasia experimental (UKCCCR (The UK Coordinating Committee on Cancer Research) para o bem-estar de animais em neoplasia experimental (July 1997); e Workman, P. *et al.* UKCCCR guideline. *Br. J. Cancer.* 1998, **77**: 1-10).

5 Análise de Dados:

Para cada animal individual, peso corporal e tamanho tumoral [usando a fórmula comumente aceita: $\text{Volume Tumoral (mm}^3\text{)} = (a \times b^2/2)$; onde 'a' representa o comprimento, e 'b' a largura do tumor como determinado por medidas de compasso de calibre], foram monitorados duas vezes
10 semanalmente em todas as partes do estudo. Uma perda de peso corporal sustentada maior do que 15% do peso corporal inicial foi considerada como toxicidade clínica, com o animal removido do estudo e sacrificado. O curso do tempo de crescimento tumoral é expresso como valores medianos, ou pode ser normalizado para volume tumoral inicial no dia de início do trata-
15 mento e expresso como média $\pm$ erro padrão da média (SEM) (5 animais por grupo). Para tumores preestabelecidos, os volumes tumorais relativos podem ser calculados para cada camundongo (volume de tumor tratado/volume tumoral no dia 0) e expresso como média $\pm$ SEM para cada grupo de tratamento. Significância estatística é indicada por valores p unilaterais da
20 análise Wilcoxon-Mann-Whitney (teste de soma de fila de Wilcoxon) e $p < 0,05$ é considerado como estatisticamente significativo. Razões tratamento/controle (T/C) são calculadas com base em volumes tumorais relativos finais, usando os critérios NCI no dia 6 e 10 (dia 1 = início do tratamento, uma vez que os camundongos foram randomizados e destinados a grupos
25 de tratamento apropriados). Os critérios eficazes para proporções T/C é 42%.

Tabela 10: % T/C no dia 6 e dia 10 após dosagem inicial

Comp. N°	% T/C dia 6	% T/C dia 10
6	105	99
12	64	71
19	57	40
2	14	-0.23

Comp. N°	% T/C dia 6	% T/C dia 10
5	103	67
22	40	55
15	53	88
18	9	-3
21	102	95
9	145	113
11	72	79
4	77	129
10	96	71
16	63	64
23	72	95
1	17	8
27	193	22
24	60	1
31	179	1
26	354	-11
30	-61	-10
29	-196	-13
28	-280	-10
25	330	-3

D. Exemplo de composição: comprimidos recobertos com Filme

Preparação de núcleo de comprimido

Uma mistura de 100 g de um composto de fórmula (I), 570 g de lactose e 200 g de amido é bem misturada e após isso umidificada com uma solução de 5 g de dodecil sulfato de sódio e 10 g de polivinilpirrolidona em aproximadamente 200 ml de água. A mistura de pó úmido é peneirada, seca e peneirada novamente. Em seguida são adicionados 100 g de celulose microcristalina e 15 g de óleo vegetal hidrogenado. O total é bem misturado e comprimido em comprimidos, fornecendo 10,000 comprimidos, cada um compreendendo 10 mg de um composto de fórmula (I).

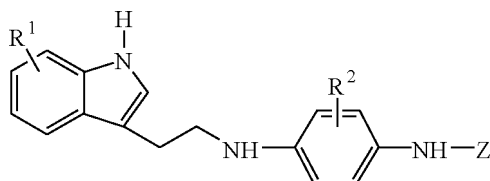
Revestimento

A uma solução de 10 g de metilcelulose em 75 ml de etanol desnaturado é adicionada uma solução de 5 g de etilcelulose em 150 ml de diclorometano. Em seguida são adicionados 75 ml de diclorometano e 2,5 ml de 1,2,3-propanotriol, 10 g de polietilenoglicol são fundidos e dissolvidos em 5 75 ml de diclorometano. A última solução é adicionada à primeira e em seguida são adicionados 2,5 g de octadecanoato de magnésio, 5 g de polivinilpirrolidona e 30 ml da suspensão colorida concentrada e o total é homogeneizado. Os núcleos de comprimido são recobertos com mistura dessa forma obtida em um aparelho de revestimento.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto, caracterizado pelo fato de que apresenta a fórmula

(I)



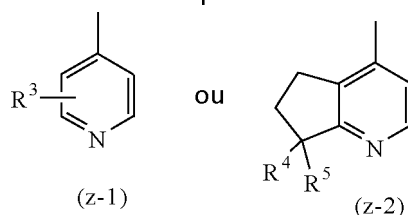
(I)

incluindo qualquer forma isomérica estereoquimicamente do
5 mesmo, em que

R^1 é hidroxiálquila C_{1-6} ou alquênica C_{2-6} ; contanto que o substituinte R^1 seja colocado na posição 6 ou 7 da porção indol;

R^2 é hidrogênio ou álquila C_{1-4} ;

Z é radical selecionado a partir de



10 R^3 é hidrogênio ou hidroxiálquila C_{1-4} ;

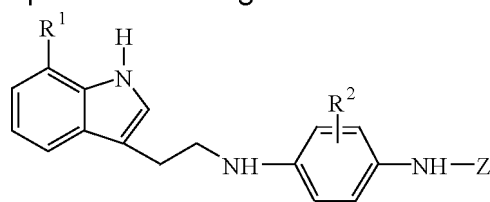
R^4 é hidróxi ou alquilóxi C_{1-4} ;

R^5 é hidrogênio ou álquila C_{1-4} ; ou

R^4 e R^5 são tomados em conjunto para formar oxo;

um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo ou um solvato do
15 mesmo.

2. Composto como reivindicado na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o composto tem a seguinte fórmula



(I-a)

3. Composto como reivindicado na reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que R^1 é hidroxiálquila C_{1-6} .

4. Composto como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que R^2 é alquila C_{1-4} .

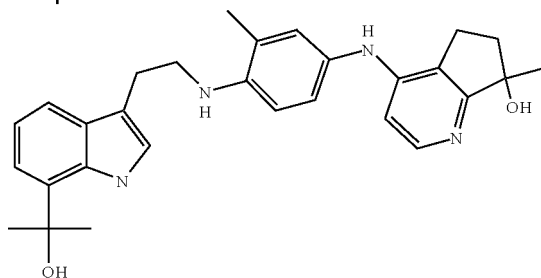
5. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que Z é radical de fórmula (z-1).

6. Composto como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que Z é radical de fórmula (z-2).

7. Composto como reivindicado na reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que R^4 é hidroxila e R^5 é hidrogênio.

8. Composto como reivindicado na reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que R^4 é hidroxila e R^5 é alquila C_{1-4} .

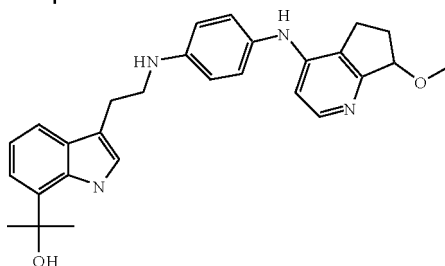
9. Composto como reivindicado na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o composto é um enantiômetro tendo a fórmula



e tendo uma rotação levorrotatória medida com luz no comprimento de onda da linha D do sódio (589 nm) a uma temperatura de 20 °C e um caminho ótico de célula de 1 dm em clorofórmio em uma concentração de 8,59 mg/ml; ou

um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo ou um solvato do mesmo.

10. Composto como reivindicado na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o composto é um enantiômetro tendo a fórmula



e uma rotação dextrorrotatória medida com luz no comprimento de onda da linha D do sódio (589 nm) a uma temperatura de 20 °C e um

caminho ótico de célula de 1 dm em metanol em uma concentração de 10,33 mg/ml; ou

um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo ou um solvato do mesmo.

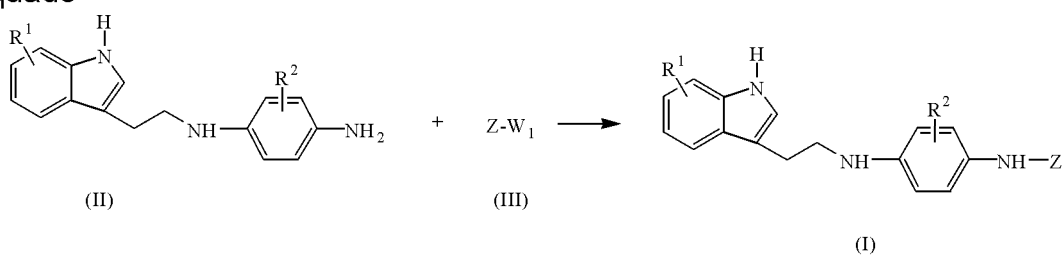
5 11. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um veículo farmaceuticamente aceitável e como um ingrediente ativo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10.

10 12. Uso de um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de ser para a produção de um medicamento para o tratamento de câncer.

13. Processo para preparação de um composto como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de

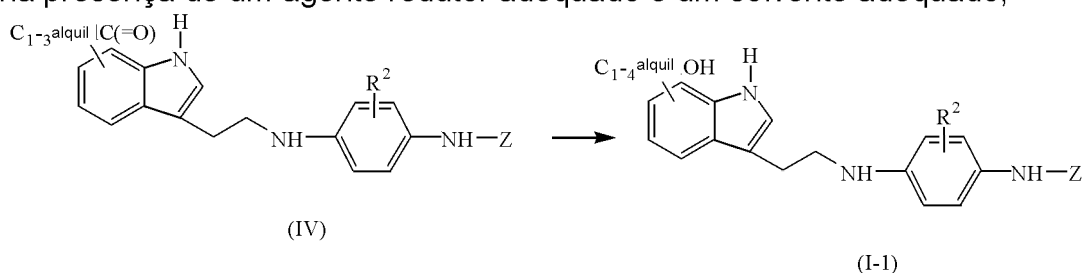
15 a) reagir um intermediário de fórmula (II) com um intermediário de fórmula (III) em que W_1 é um grupo de saída adequado, em um solvente inerte à reação opcionalmente na presença de uma base apropriada ou reação de um intermediário de fórmula (II) com um intermediário de fórmula (III) em que W_1 é um grupo de saída adequado na presença de um catalisador adequado, um ligante adequado, uma base adequada e um solvente adequado

20 quado



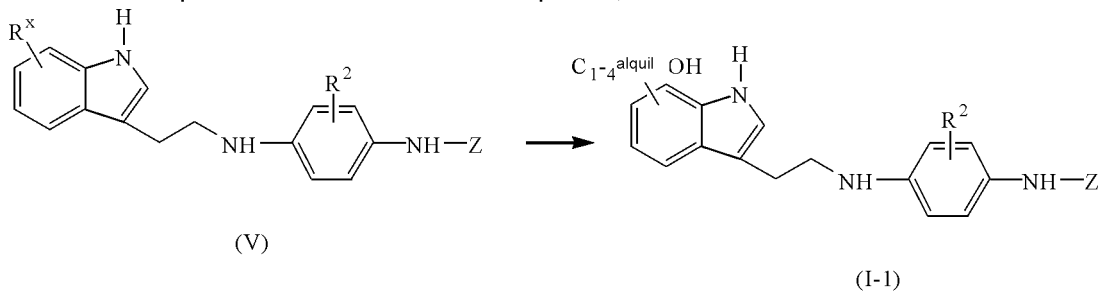
com R^1 , R^2 e Z como definido na reivindicação 1;

b) reduzir o derivado carbonila correspondente da fórmula (IV) na presença de um agente redutor adequado e um solvente adequado,



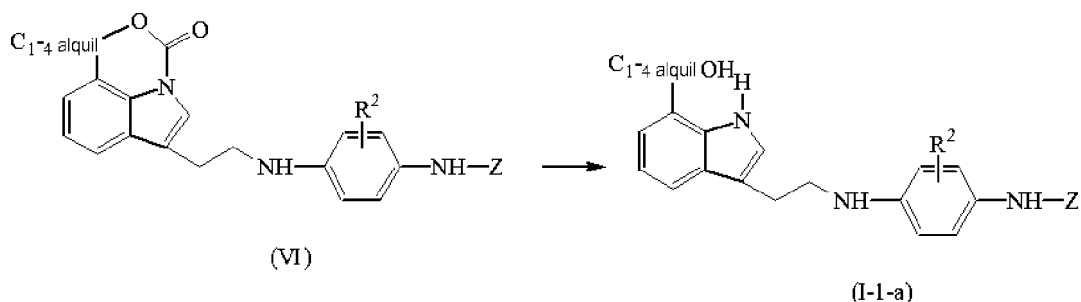
com R^2 e Z como definido na reivindicação 1;

c) redução do derivado éster correspondente da fórmula (V) em que R^x representa- alquil $C_{1-3}C(=O)$ alquil OC_{1-4} , na presença de um agente redutor adequado e um solvente adequado,



5 com R^2 e Z como definido na reivindicação 1;

d) hidrólise de um intermediário de fórmula (VI) com uma base adequada na presença de um solvente adequado,



com R^2 e Z como definido na reivindicação 1;

ou, se desejado, conversão dos compostos de fórmula (I) entre si após transformações conhecidas da técnica, e além disso, se desejado, conversão dos compostos de fórmula (I), em um sal de adição ácida não tóxico terapeuticamente ativo por tratamento com um ácido, ou em um sal de adição básica não tóxico terapeuticamente ativo por tratamento com uma base, ou de modo inverso, conversão da forma de sal de adição ácida em base livre por tratamento com álcali, ou conversão do sal de adição básica em ácido livre por tratamento com ácido; ou, se desejado, preparação de formas isoméricas estereoquimicamente ou solvatos das mesmas.