



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0715066-0 A2



(22) Data de Depósito: 26/07/2007
(43) Data da Publicação: 28/05/2013
(RPI 2212)

(51) Int.Cl.:
C07D 403/12
C07D 207/273
A61K 31/4025
C07D 317/72

(54) Título: MODULADORES DE ATIVIDADES DE RECEPTOR DE QUIMIOCINA, FORMAS CRISTALINAS E PROCESSO

(30) Prioridade Unionista: 25/07/2007 US 11782704, 28/07/2006 US 60834235, 21/03/2007 US 60896026, 21/03/2007 US 60896026, 21/03/2007 US 60896026, 25/07/2007 US 11782704, 28/07/2006 US 60834235

(73) Titular(es): Bristol-Myers Squibb Company

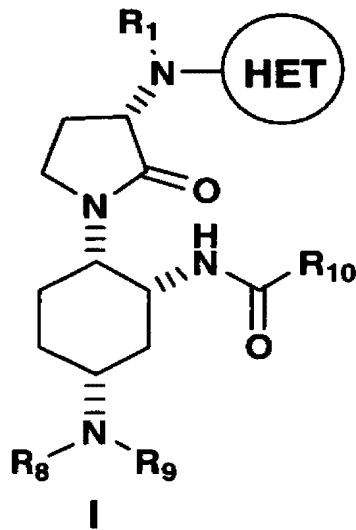
(72) Inventor(es): Jale Muslehiddinoglu, Marting G. Eastgate, Michael G. Yang, Robert J. Cherney, Siva Josyula Prasad, Zili Xiao

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007074438 de 26/07/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/014381de 31/01/2008

(57) Resumo: MODULADORES DE ATIVIDADE DE RECEPTOR DE QUIMIOCINA, FORMAS CRISTALINAS E PROCESSO. A presente invenção fornece um novo antagonista ou agonista/antagonistas parciais de atividade de receptor de MCO-1:N-((1R,2S,5R)-5(isopropil(metil)-2((S)-2-oxo-3(6-(trifluorometil)quizolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, ou um pró-fármaco, solvato ou sal farmacuticamente aceitável, deste tendo uma combinação inesperada de características farmacológicas desejáveis. Formas cristalinas da presente invenção são fornecidas. Composições farmacêuticas contendo as mesmas e métodos de utilização das mesmas como agentes para o tratamento de doenças inflamatórias, alérgicas, autoimunes, metabólicas, câncer e/ou doenças cardiovasculares são também um objetivo desta invenção. A presente descrição também fornece um processo para a preparação e compostos de fórmula (I), incluindo N-((1R,2S,5R)-5(isopropil(metil)amino)-2((S)-2-oxo-3(6-(trifluorometil)quinzolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida; em que R¹, R⁸, R⁹, R¹⁰, e são composto que são também fornecidos aqui.

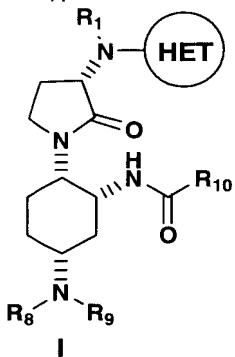


Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MODULADORES DE ATIVIDADE DE RECEPTOR DE QUIMIOCINA, FORMAS CRISTALINAS E PROCESSO**".

Este Pedido reivindica a prioridade de Pedidos Provisórios dos Estados Unidos Nos. 60/834.235, e 60/896.026 depositado em 28 de Julho de 2006 e 21 Março de 2007, respectivamente, as descrições de ambos os quais são incorporadas aqui por referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil (metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, ou um pró-fármaco, solvato ou sal farmaceuticamente aceitável, deste, tendo uma combinação inesperada de características farmacológicas desejáveis. Formas cristalinas da presente invenção são também fornecidas. Composições farmacêuticas contendo as mesmas e métodos de utilização das mesmas como agentes para o tratamento de doenças inflamatórias, alérgicas, autoimunes, metabólicas, câncer e/ou doenças cardiovasculares são também um objetivo desta invenção. A presente descrição também fornece um processo para a preparação e compostos de fórmula (I), incluindo N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida:



em que R^1 , R^8 , R^9 , R^{10} , e HET são como descritos aqui. Compostos que são intermediários úteis dos processos são também fornecidos aqui.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Quimiocinas são citocinas quimiotáticas, de peso molecular 6-15

kDa, que são liberadas por uma ampla variedade de células para atrair e ativar, entre outros tipos de células, macrófagos, linfócitos T e B, eosinófilos, basófilos e neutrófilos (revisto em: Charo e Rasonhoff, *New Eng. J. Med.* 2006, 354, 610-621; Luster, *New Eng. J. Med.* 1998, 338, 436-445; e Rollins, 5 *Blood* 1997, 90, 909-928). Existem duas classes principais de quimiocinas, CXC e CC, dependendo de se as primeiras duas cisteínas na sequência de aminoácido são separadas por um único aminoácido (CXC) ou são adjacentes (CC). As quimiocinas CXC, tais como interleucina-8 (IL-8), proteína 2 ativadora de neutrófilo (NAP-2) e proteína de atidada estimuladora de desenvolvimento de melanoma (MGSA) são quimiotática principalmente para neutrófilos e Linfócitos T, ao passo que as quimiocinas CC, tais como RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , as proteínas quimiotáticas de monócito (MCP-1, 10 MCP-2, MCP-3, MCP-4, e MCP-5) e as eotaxinas (-1 e -2) são quimiotáticas para, entre outros tipos de célula, macrófagos, Linfócitos T, eosinófilos, células dendríticas, e basófilos. Existem também as quimiocinas linfotactin-1, 15 linfotactin-2 (ambas quimiocinas C), e fractalcina (uma quimiocina CX3C) que não se incluem em qualquer das subfamílias de quimiocina.

As quimiocinas ligam-se aos receptores de superfície celular específicos pertencentes à família de Proteínas de domínio de sete membranas acopladas à proteína G (revisto em: Horuk, *Trends Pharm. Sci.* 1994, 20 15, 159-165) que são denominados "receptores de quimiocina." Em ligação de seus ligantes cognatos, os receptores de quimiocina transduzem um sinal intracelular através de proteínas G triméricas associadas, resultando e, entre outras respostas, um rápido aumento na concentração de cálcio intracelular, 25 alterações na forma celular, expressão aumentada de moléculas de adesão celular, desgranulação, e promoção de migração celular. Existem pelo menos dez receptores de quimiocina humana que ligam-se ou respondem à quimiocinas CC com as seguintes características padrão (revisto em Zlotnik e Oshie *Immunity* 2000, 12, 121): CCR-1 (ou "CKR-1" ou "CC-CKR-1") [MIP- 30 1 α , MCP-3, MCP-4, RANTES] (Ben-Barruch, e outro, *Cell* 1993, 72, 415-425, e Luster, *New Eng. J. Med.* 1998, 338, 436-445); CCR-2A e CCR-2B (ou "CKR-2A"/"CKR-2B" ou "CC-CKR-2A"/"CC-CKR-2B") [MCP-1, MCP-2,

MCP-3, MCP-4, MCP-5] (Charo, e outro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 2752-2756, e Luster, *New Eng. J. Med.* **1998**, 338, 436-445); CCR-3 (ou "CKR-3" ou "CC-CKR-3") [eotaxin-1, eotaxin-2, RANTES, MCP-3, MCP-4] (Combadiere, e outro, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 16491-16494, e Luster, *New Eng. J. Med.* **1998**, 338, 436-445); CCR-4 (ou "CKR-4" ou "CC-CKR-4") [TARC, MDC] (Power, e outro, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 19495-19500, e Luster, *New Eng. J. Med.* **1998**, 338, 436-445); CCR-5 (ou "CKR-5" ou "CC-CKR-5") [MIP-1 α , RANTES, MIP-1 β] (Sanson, e outro, *Biochemistry* **1996**, 35, 3362-3367); CCR-6 (ou "CKR-6" ou "CC-CKR-6") [LARC] (Baba, e outro, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 14893-14898); CCR-7 (or "CKR-7" ou "CC-CKR-7") [ELC] (Yoshie e outro, *J. Leukoc. Biol.* **1997**, 62, 634-644); CCR-8 (or "CKR-8" ou "CC-CKR-8") [I-309] (Napolitano e outro, *J. Immunol.*, 1996, 157, 2759-2763); CCR-10 (ou "CKR-10" ou "CC-CKR-10") [MCP-1, MCP-3] (Bonini, e outro, *DNA e Cell Biol.* **1997**, 16, 1249-1256); e CCR-11 [MCP-1, 15 MCP-2, e MCP-4] (Schweickert, e outro, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 90550).

Além dos receptores de quimiocinas mamíferas, citomegalovírus mamíferos, herpesvírus e poxvírus foram mostrados expressarem, em células infectadas, proteínas com as propriedades de ligação de receptores de quimiocinas (revisto em: Cavidades e Schwartz, *Curr. Opin. Biotech.* **1997**, 8, 20 741-748). Quimiocinas CC humanas, tais como RANTES e MCP-3, podem causar rápida mobilização de cálcio por meio destes receptores viralmente codificados. A expressão de receptor pode ser premissa para infecção provendo a subversão de vigilância do sistema imune normal e resposta à infecção. Adicionalmente, receptores quimiocina humana, tais como CXCR4, 25 CCR2, CCR3, CCR5 e CCR8, podem agir como co-receptores para as infecções de células mamíferas por micróbios como com, por exemplo, o vírus de imunodeficiência humana (HIV).

As quimiocinas e seus receptores cognatos têm sido implicados como sendo importantes mediadores de doenças e distúrbios inflamatórios, 30 infecciosos, e imunoreguladores, incluindo asma e doenças alérgicas; bem como patologias autoimunes, tais como artrite reumatóide e esclerose múltipla; e doenças metabólicas, tais como aterosclerose e diabetes (revisto em:

Charo e Rasonhoff, *New Eng. J. Med.* **2006**, *354*, 610-621; Z. Gao e W. A. Metz, *Chem. Rev.* 2003, **103**, 3733; P. H. Carter, *Current Opinion in Chemical Biology* **2002**, *6*, 510; Trivedi, e outro, *Ann. Reports Med. Chem.* **2000**, *35*, 191; Saunders e Tarby, *Drug Disc. Today* **1999**, *4*, 80; Premack e Schall,

5 *Nature Medicine* **1996**, *2*, 1174). Por exemplo, o quimioatraente-1 de monó-
cito de quimiocina (MCP-1) e seu receptor, o Receptor 2 de Quimiocina CC 2
(CCR-2) desempenha um papel principal na atração de leucócitos aos sítios
de inflamação e subsequentemente na ativação destas células. Quando a
10 quimiocina MCP-1 liga-se ao CCR-2, ela induz um rápido aumento na con-
centração de cálcio intracelular, expressão aumentada de moléculas de ade-
são celular, e a promoção de migração de leucócito. A demonstração da im-
portância da interação de MCP-1/CCR-2 foi fornecida por experimentos com
camundongos geneticamente modificados. Os camundongos MCP-1^{-/-} foram
incapazes de recrutar monócitos em sítios de inflamação após diversos dife-
rentes tipos de desafios imunes (Bao Lu, e outro, *J. Exp. Med.* **1998**, *187*,
15 601). Igualmente, os camundongos CCR-2^{-/-} foram incapazes de recrutar
monócitos ou produzir interferon-γ quando desafiados com vários agentes
exógenos; além disso, os leucócitos de camundongos nulos CCR-2 não mi-
graram em resposta à MCP-1 (Landin Boring, e outro, *J. Clin. Invest.* **1997**,
20 *100*, 2552), pelo qual demonstrando a especificidade da interação de MCP-
1/CCR-2. Dois outros grupos têm independentemente reportado resultados
equivalentes com diferentes linhagens de camundongos CCR-2^{-/-} (William
A. Kuziel, e outro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 12053, e Takao Kuri-
hara, e outro, *J. Exp. Med.* **1997**, *186*, 1757). A viabilidade e saúde geral-
25 mente normal dos animais MCP-1^{-/-} e CCR-2^{-/-} são notáveis, em que a
ruptura da interação de MCP-1/CCR-2 não induz à crise fisiológica. Conside-
rados juntos, estes dados levam a uma conclusão que moléculas que blo-
queiam as ações de MCP-1/CCR2 seriam úteis no tratamento de diversos
distúrbios inflamatórios e autoimunes: M. Feria e F. Díaz-González, *Exp. O-*
30 *pin. Ther. Patents* **2006**, *16*, 49; e J. Dawson, W. Miltz, e C. Wiessner, *C.*
Exp. Opin. Ther. Targets **2003**, *7*, 35). Esta hipótese foi atualmente validade
em diversos diferentes modelos de doença de animal, como abaixo descrito.

Sabe-se que MCP-1 é super-regulada em pacientes com artrite reumatóide (Alisa Koch, e outro, *J. Clin. Invest.* **1992**, *90*, 772 – 779). Além disso, diversos estudos pré-clínicos demonstraram o valor terapêutico potencial de antagonismo da interação de MCP-1/CCR2 no tratamento de artrite reumatóide. Uma vacina de DNA codificando MCP-1 foi mostrada recentemente melhorar artrite induzida por poliadjuvante crônico em ratos (Sawsan Youssef, e outro, *J. Clin. Invest.* **2000**, *106*, 361). Igualmente, os sintomas de doença podem ser controlados por meio de administração direta de anticorpos para MCP-1 aos ratos com artrite induzida por colágeno (Hiroomi Ogata, e outro, *J. Pathol.* **1997**, *182*, 106), ou artrite induzida por parede celular estreptocócica (Ralph C. Schimmer, e outro, *J. Immunol.* **1998**, *160*, 1466). Talvez mais显著mente, um antagonista de peptide de sintomas MCP-1, MCP-1(9-76), foi mostrado tanto prevenir o início da doença quanto reduzir os sintomas de doença (dependendo do tempo de administração) no modelo de camundongo MRL-lpr de artrite (Jiang-Hong Gong, e outro, *J. Exp. Med.* **1997**, *186*, 131). Além disso, foi demonstrado que a administração de antagonistas de CCR2 de molécula pequena reduziu escore clínico em modelos de roedores de artrite (C. M. Brodmerkel, e outro, *J. Immunol.* **2005**, *175*, 5370; e M. Xia, e outro, Pedido de Patente dos Estados Unidos 0069123, 2006). A administração de um anticorpo anti-CCR2 tem efeitos variáveis sobre CIA de murino, dependendo do tempo de administração (H. Bruhl, e outro, *J. Immunol.* **2004**, *172*, 890). Estudos recentes com camundongos CCR2-/ sugestionaram que a deleção de CCR2 pode agravar os modelos de artrite de roedor em circunstâncias experimentais específicas (M. P. Quinones, e outro, *J. Clin. Invest.* **2004**, *113*, 856; M. P. Quinones, e outro, *J. Mol. Med.* **2006**, *84*, 503).

Sabe-se que MCP-1 é super-regulada em lesões ateroscleróticas, e foi mostrado que níveis circulantes de MCP-1 são reduzidos através do tratamento com agentes terapêuticos (Abdolreza Rezaie-Majd, e outro, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2002**, *22*, 1194 – 1199). Diversos estudos chaves demonstraram o valor terapêutico potencial de antagonismo da interação de MCP-1/CCR2 no tratamento de aterosclerose. Por exemplo, quan-

do camundongos MCP-1 -/- são cruzados com camundongos deficientes de receptor de LDL, uma redução de 83% em deposição de lipídeo aórtico foi observada (Long Gu, e outro, *Mol. Cell* **1998**, 2, 275). Similarmente, quando MCP-1 foi geneticamente removido dos camundongos que já superexpressaram apolipoproteína B, os camundongos resultantes foram protegidos da formação de lesão aterosclerótica com relação aos camundongos de controle MCP-1 +/- apoB (Jennifa Gosling, e outro, *J. Clin. Invest.* **1999**, 103, 773). Igualmente, quando camundongos CCR-2 -/- são cruzados com camundongos E -/- de apolipoproteína, uma diminuição significante na incidência de lesões ateroscleróticas foi observada (Landin Boring, e outro, *Nature* **1998**, 394, 894; T. C. Dawson, e outro, *Atherosclerosis* **1999**, 143, 205). Finalmente, quando os camundongos E -/- de apolipoproteína são administrados um gene codificando um antagonista de peptídeo de CCR2, em seguida o tamanho da lesão é diminuído e a estabilidade de placa é aumentada (W. Ni, e outro, *Circulation* **2001**, 103, 2096 – 2101). O transplante de medula óssea de camundongos CCR2/- em camundongos ApoE3-Leiden inibiu aterogênese precoce (J. Guo, e outro, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2003**, 23, 447), porém tem um efeito mínimo sobre lesões avançadas (J. Guo, e outro, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2005**, 25, 1014).

Pacientes com diabetes melito tipo 2 tipicamente exibem resistência à insulina como uma das características marcantes da doença. Resistência à insulina é também associada com o agrupamento de anormalidades conhecidas como a "síndrome metabólica" ou "síndrome X," que inclui obesidade, aterosclerose, hipertensão, e dislipidemia (revisto em: Eckel, e outro, *Lancet* **2005**, 365, 1415). É bem reconhecido que inflamação desempenha um papel na exacerbação do processo de doença em diabetes tipo 2 e as patologias de "síndrome X" (revisto em: Chen, *Pharmacological Research* **2006**, 53, 469; Neels e Olefsky, *J. Clin. Invest.* **2006**, 116, 33; Danadona e Aljada, *Am J Cardiol.* **2002** 90, 27G-33G; Pickup e Crook, *Diabetologia* **1998**, 41, 1241). MCP-1 é conhecida desempenhar um papel na resistência à insulina induzida por obesidade. Em cultura, pré-adipócitos constitutivamente expressaram MCP-1 (Gerhardt, *Mol. Cell. Endocrinology* **2001**, 175, 81).

CCR2 é expressa em adipócitos; A adição de MCP-1 em adipócitos diferenciados *in vitro* diminui a captação de glicose estimulada por insulina e a expressão de diversos genes adipogênicos (LpL, adiponectin, GLU-4), aP2, receptor β 3-adrenérgico, e PPAR γ (P. Sartipy e D. Loskutoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 6902). Pacientes com diabetes tipo 2 tiveram níveis maiores de MCP-1 circulante do que controles não diabéticos (S. Nomura, e outro, *Clin. Exp. Immunol.* **2000**, *121*, 437), e a liberação de MCP-1 do tecido adiposo pode ser reduzida por tratamento com terapias anti-diabéticas tais como metformina ou tiazolidinedionas (J. M. Bruun, e outro, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2005**, *90*, 2282). Igualmente, MCP-1 foi também superexpressa em modelos experimentais de murino de obesidade, e foi primeiramente produzida por tecido adiposo (Sartipy e Loskutoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 7265). Em camundongos obesos, a expressão de MCP-1 tanto precedeu quanto ocorreu concorrentemente com o início da resistência à insulina (H. Xu, e outro, *J. Clin. Invest.* **2003**, *112*, 1821). Outro estudo mostrou que a expressão de MCP-1 positivamente correlacionada com a massa corporal no tecido adiposo perigonadal de camundongos (Weisberg, e outro, *J. Clin. Invest.* **2003**, *112*, 1796). Consistente com estes dados, o desenvolvimento de resistência à insulina em camundongos *db/db* foi melhorada ou por meio da deleção genética de MCP-1 ou por expressão induzida por gene de um peptídeo negativo dominante (H. Kanda, e outro, *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 1494). A conversa lógica pode também ser demonstrada: superexpressão de MCP-1 em tecido adiposo promoveu resistência à insulina (N. Kamei, e outro, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 26602). Um resultado conflitante mostrando que a deleção genética de MCP-1 não afeta a resistência à insulina no camundongo *db/db* também apareceu (F. Y. Chow, e outro, *Diabetologia* **2007**, *50*, 471). Consistentes com os dados sobre MCP-1, estudos diretos com CCR2 (o receptor de MCP-1) mostraram que ele desempenha um papel na formação de obesidade e resistência à insulina induzida por obesidade. A manutenção de uma dieta de gordura elevada aumentou o número de monócitos inflamatórios de CCR2 $^+$ circulantes tanto nos camundongos do tipo selvagem (C. L. Tsou, e outro, *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 902) quanto ApoE $^{-/-}$

(F. Tacke, e outro, *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 185). A deleção genética de CCR2 reduziu os números de macrófagos ativados em tecido adiposo de murino (C. N. Lumeng, e outro, *Diabetes* **2007**, *56*, 16), porém não afetaria uma população de macrófagos adiposos de M2 acreditados manterem o estado "magro" (C. N. Lumeng, e outro, *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 175). A deleção genética de CCR2 reduziu a obesidade induzida por dieta e melhorou a sensibilidade à insulina em modelo de obesidade induzida por dieta (S. P. Weisberg, e outro, *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 115; P Cornelius, RP Gladue, RS Sebastian, Patente WO 2006/013427 A2), 2006), dependendo das condições experimentais (A. Chen, e outro, *Obes. Res.* **2005**, *13*, 1311). A administração de um antagonista de CCR2 de molécula pequena também melhorou a sensibilidade à insulina neste mesmo modelo (S. P. Weisberg, e outro, *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 115).

Dois estudos descreveram o papel importante de CCR2 em hipertrofia, remodelagem e inflamação vascular induzida por hipertensão (E Bush e outro *Hypertension* **2000**, *36*, 360; M Ishibashi, e outro, *Circ. Res.* **2004**, *94*, 1203).

Sabe-se que MCP-1 é super-regulada em esclerose múltipla humana, e foi mostrado que terapia eficaz com interferon- β -1b reduz a expressão de MCP-1 em células mononucleares de sangue periférico, sugerindo que MCP-1 desempenha um papel em progresso da doença (Carla Iarlori, e outro, *J. Neuroimmunol.* **2002**, *123*, 170 – 179). Outros estudos demonstraram o valor terapêutico potencial de antagonism da interação de MCP-1/CCR-2 no tratamento de esclerose múltipla; todos estes estudos foram demonstrados em encefalomielite autoimune experimental (EAE), o modelo animal convencional para esclerose múltipla. Administração de anticorpos para MCP-1 aos animais com EAE reduziu显著mente a reincidência de doença (K. J. Kennedy, e outro, *J. Neuroimmunol.* **1998**, *92*, 98). Além disso, dois relatos foram que camundongos CCR-2 -/- são resistentes à EAE (B. T. Fife, e outro, *J. Exp. Med.* **2000**, *192*, 899; L. Izikson, e outro, *J. Exp. Med.* **2000**, *192*, 1075). Um relato subsequente estendeu estas observações iniciais examinando-se os efeitos de deleção de CCR2 em camundongos de

diferentes linhagens (S. Gaupp, e outro, *Am. J. Pathol.* **2003**, *162*, 139). Notavelmente, a administração de um antagonista de CCR2 de molécula pequena também mitigou a progressão da doença em camundongos C57BL/6 (C. M. Brodmerkel, e outro, *J. Immunol.* **2005**, *175*, 5370).

5 Sabe-se que MCP-1 é super-regulada em pacientes que desenvolveram síndrome obliterante de bronquiolite após transplante de pulmão (Martine Reynaud-Gaubert, e outro, *J. of Heart e Lung Transplant.*, **2002**, *21*, 721 – 730; John Belperio, e outro, *J. Clin. Invest.* **2001**, *108*, 547 – 556). Em um modelo de murino de síndrome obliterante de bronquiolite, A administração de um anticorpo à MCP-1 induz à atenuação da obliteração da via aérea; igualmente, os camundongos CCR2 -/- foram resistentes à obliteração neste mesmo modelo (John Belperio, e outro, *J. Clin. Invest.* **2001**, *108*, 547 – 556). Estes dados sugerem que o antagonismo de MCP-1/CCR2 pode ser benéfico no tratamento de rejeição de órgãos seguinte ao transplante.
10 15 Além disso, estudos mostraram que a ruptura de eixo de MCP-1/CCR2 foi capaz de prolongar a sobrevivência de transplante de ilhota (I Lee e outro, *J Immunol* **2003**, *171*, 6929; R Abdi e outro, *J Immunol* **2004**, *172*, 767). Em modelos de enxerto de rato, CCR2 e MCP-1 foram mostradas a serem super-reguladas em enxerto que desenvolve vascolopatia de enxerto (K Horiguchi e outro, *J Heart Lung Transplant.* **2002**, *21*, 1090). Em outro estudo, a terapia de gene anti-MCP-1 atenuou (A Saiura e outro, *Artherioscler Thromb Vasc Biol* **2004**, *24*, 1886). Um estudo descreveu a inibição de formação neointima de enxerto de veia por bloqueio de MCP-1 (H Tatewaki e outro, *J Vasc Surg.* **2007**, *45*, 1236).
20 25

Outros estudos demonstraram o valor terapêutico potencial de antagonismo da interação de MCP-1/CCR2 no tratamento de asma. Sequestro de MCP-1 com um anticorpo neutralizante em camundongos desafiados por ovalbumina resultou em decréscimo acentuado em hipersensibilidade brônquica e inflamação (Jose-Angel Gonzalo, e outro, *J. Exp. Med.* **1998**, *188*, 157). Provou-se ser possível reduzir a inflamação da via aérea alérgica em camundongos desafiados por ovos de *Schistosoma mansoni* por meio da administração de anticorpos para MCP-1 (Nicholas W. Lukacs, e outro, *J.*
30

Immunol. 1997, 158, 4398). Consistentes com isto, Camundongos MCP-1 -/- exibiram uma resposta reduzida ao desafio com ovos de *Schistosoma mansoni* (Bao Lu, e outro, *J. Exp. Med.* 1998, 187, 601).

Outros estudos demonstraram o valor terapêutico potencial de antagonismo da interação de MCP-1/CCR2 no tratamento de doença renal. Administração de anticorpos para MCP-1 em um modelo de murino de glomerulonefrite resultou em um decréscimo acentuado em deposição e formação crescente glomerular de colágeno tipo I (Clare M. Lloyd, e outro, *J. Exp. Med.* 1997, 185, 1371). Além disso, Camundongos MCP-1 -/- com nefrite do soro nefrotóxico induzida mostraram menos danos tubulares do que seus contrapartes MCP-1 +/+ (Gregory H. Tesch, e outro, *J. Clin. Invest.* 1999, 103, 73).

Diversos estudos têm demonstrado o valor terapêutico potencial de antagonismo da interação de MCP-1/CCR2 no tratamento de lúpus eritematoso sistêmico. Camundongos CCR2-/- exibiram sobrevida prolongada e doença renal reduzida com relação a seus contrapartes WT em um modelo de murino de lúpus eritematoso sistêmico (G. Perez de Lema, e outro, *J. Am. Soc. Neph.* 2005, 16, 3592). Estes dados são consistentes com a atividade modificadora da doença encontrada em recentes estudos sobre uma deleção genética de MCP-1 (S. Shimizu, e outro, *Rheumatology (Oxford)* 2004, 43, 1121; Gregory H. Tesch, e outro, *J. Exp. Med.* 1999, 190, 1813) ou a administração de um antagonista de peptídeo de CCR2 (H. Hassegawa, e outro, *Arthritis & Rheumatism* 2003, 48, 2555) em modelos de roedores de lúpus.

Um notável decréscimo de 30 vezes em linfócitos da própria lâmina CCR2⁺ foi observado nos intestinos delgados de pacientes de Crohn com relação ao íleo não doente (S. J. Connor, e outro, *Gut* 2004, 53, 1287). Também de nota, houve uma expansão no subgrupo de monócitos de CCR2⁺/CD14⁺/CD56⁺ circulantes com doença de Crohn ativa com relação aos controles. Diversos estudos de roedor têm demonstrado terapêutico potencial de antagonismo da interação de MCP-1/CCR2 no tratamento de doença de Crohn /colite. Os camundongos CCR2-/- foram protegidos dos efeitos de colite induzida por sulfato de sódio de dextran (Pietro G. Andres, e outro, *J.*

Immunol. **2000**, *164*, 6303). A admininistração de um antagonista de molécula pequena de CCR2, CCR5, e CXCR3 (afinidades de ligação de murino = 24, 236, e 369 nM, respectivamente) também protegeu contra colite induzida por sulfato de sódio de dextran (H. Tokuyama, e outro, *Int. Immunol.* **2005**, *17*, 1023). Finalmente, os camundongos MCP-1/- mostraram dano colônico substancialmente reduzido (tanto macroscópico e histológico) em um modelo induzido por hapteno de colite (W. I. Khan, e outro, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2006**, *291*, G803).

Dois relatos descreveram a superexpressão de MCP-1 nas células epiteliais intestinais e mucosa do intestino de pacientes com doença do intestino inflamatória (H. C. Reinecker, e outro, *Gastroenterology* **1995**, *108*, 40, e Michael C. Grimm, e outro, *J. Leukoc. Biol.* **1996**, *59*, 804).

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

Um estudo demonstrou o valor terapêutico potencial de antagonismo da interação de MCP-1/CCR2 no tratamento de alveolite. Quando ratos com lesão pulmonar complexa imune à IgA foram tratados intravenosamente com anticorpos criados contra MCP-1 de rato (JE), os sintomas de alveolite foram parcialmente aliviados (Michael L. Jones, e outro, *J. Immunol.* **1992**, *149*, 2147).

Diversos estudos mostraram o valor terapêutico potencial de antagonismo da interação de MCP-1/CCR2 no tratamento de câncer (revisto em: M. J. Craig e R. D. Loberg, *cancer Metastasis Rev.* **2006**, *25*, 611; I. Conti e B. Rollins, *Seminars in cancer Biology* **2004**, *14*, 149; R. Giles e R. D.

Loberg, *Curr. cancer Drug Targets* **2006**, *6*, 659). Quando camundongos imunodeficientes transportando células de carcinoma de mama humanas foram tratados com um anticorpo anti-MCP-1, a inibição de micrometastases pulmonares e aumentos na sobrevida foram observados (Rosalba Salcedo, e outro, *Blood* **2000**, *96*, 34 – 40). Utilizando espécimes de tumor clínico humano, a expressão de CCR2 foi associada com progressão de câncer de próstata (Y. Lu, e outro, *J. Cell. Biochem.* **2007**, *101*, 676). A expressão de MCP-1, *in vitro*, foi mostrada mediar a invasão e desenvolvimento células de câncer de próstata (Y. Lu, e outro, *Prostate* **2006**, *66*, 1311); além disso, MCP-1 expressa por células de câncer de próstata induziu progenitores de medula óssea humanos para reabsorção óssea (Y. Lu, e outro, *câncer Res.* **2007**, *67*, 3646).

Múltiplos estudos descreveram o valor terapêutico potencial de antagonismo da interação de MCP-1/CCR2 no tratamento de restenose. Em humanos, os níveis de MCP-1 correlacionam diretamente com o risco para restenose (F. Cipollone, e outro, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2001**, *21*, 327). Os camundongos deficientes em CCR2 ou em MCP-1 mostraram reduções na área íntima e na relação da íntima/média (com relação aos filhos-
tes do tipo selvagem) após a lesão arterial (Merce Roque, e outro, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2002**, *22*, 554; A. Schober, e outro, *Circ. Res.* **2004**, *95*, 1125; W. J. Kim, e outro, *Biochem Biophys Res Commun.* **2003**, *310*, 936). Em camundongos, a transfeção de um inibidor negativo dominante de MCP-1 no músculo esquelético (K. Egashira, e outro, *Circ. Res.* **2002**, *90*, 1167) também reduziu a hiperplasia íntima após a lesão arterial. O bloqueio de CCR2 utilizando um anticorpo neutralizante reduziu a hiperplasia neoíntima após sondagem em primatas (C. Horvath, e outro, *Circ. Res.* **2002**, *90*, 488).

Dois relatos descrevem a superexpressão de MCP-1 de ratos com trauma cerebral induzido (J. S. King, e outro, *J. Neuroimmunol.* **1994**, *56*, 127, e Joan W. Berman, e outro, *J. Immunol.* **1996**, *156*, 3017). Além disso, estudos têm mostrado que tanto os camundongos CCR2^{-/-} (O. B. Dimitrijevic, e outro, *stroke* **2007**, *38*, 1345) quanto MCP-1^{-/-} (P. M. Hughes, e outro, *J.*

Cereb. Blood Flow Metab. **2002**, *22*, 308) são parcialmente protegidos de isquemia/lesão de reperfusão.

Sabe-se que monócitos/macrófagos desempenham um papel importante no desenvolvimento de dor neuropática (Liu T, van Rooijen N, Tracey DJ, *Pain* **2000**, *86*, 25). Consistente com esta noção, um papel potencial para CCR2 no tratamento tanto de dor neuropática quanto inflamatória foi recentemente descrito. Os camundongos CCR2-/ mostraram respostas alteradas à dor inflamatória com relação a seus contrapartes WT, incluindo comportamento de dor reduzida após intraplantar injeção de formalina e alodinia mecânica ligeiramente reduzida após intraplantar a injeção de CFA (C. Abbadie, e outro, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **2003**, *100*, 7947). Além disso, Camundongos CCR2-/ não exibiram alodinia mecânica significante após lesão do nervo ciático. Igualmente, um antagonista de CCR2 de molécula pequena reduziu a alodinia mecânica para ~80% de níveis de pré-lesão a 15 pós administração oral (C. Abbadie, J. A. Lindia, e H. Wang, WO PCT 110376, 2004).

Um estudo descreveu o papel crítico de MCP-1 em cardiomiopatia isquêmica (N. G. Frangogiannis, e outro, *Circulation* **2007**, *115*, 584). Outro estudo descreveu a atenuação de insuficiência cardíaca experimental seguindo a inibição de MCP-1 (S Hayashidani e outro, *Circulation* **2003**, *108*, 2134).

Outros estudos têm fornecido evidência que MCP-1 é superexpressa em vários estados de doença não mencionados acima. Estes relatos fornecem evidência correlativa que antagonistas de MCP-1 poderiam ser terapêuticos úteis para tais doenças. Outro estudo demonstrou a superexpressão de MCP-1 em aloenxertos cardíacos de roedor, sugerindo um papel para MCP-1 na patogênese de arteriosclerose de transplante (Mary E. Russell, e outro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 6086). A superexpressão de MCP-1 foi observada nas células endoteliais de pulmão de pacientes com fibrose pulmonar idiopática (Harry N. Antoniades, e outro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 5371). Similarmente, a superexpressão de MCP-1 foi observada na pele de pacientes com psoríase (M. Deleuran, e outro, *J. Dermatol. Sci.* **1996**, *13*, 228, e R. Gillitzer, e outro, *J. Invest. Dermatol.* **1993**,

101, 127); descobertas correlativas com predominância de células CCR2+ também foram reportadas (C. Vestergaard, e outro, *Acta Derm. Venerol.* 2004, 84, 353). Finalmente, um recente relato mostrou que MCP-1 é super-expressa nos cérebros e fluído cerebroespinhal de pacientes com demência 5 associada com HIV-1 (Alfredo Garzino-Demo, WO 99/46991).

Além disso, o polimorfismo de CCR2 foi mostrado estar associado com sarcoidose em pelo menos um subgrupo de pacientes (P. Spagnolo, e outro, *Am J Respir Crit Care Med.* 2003, 168, 1162).

Deve-se também observar que CCR-2 foi implicada como um co-receptor para algumas linhagens de HIV (B. J. Doranz, e outro, *Cell* 1996, 85, 1149). Foi também determinado que o uso de CCR-2 como um co-receptor de HIV pode ser correlacionado com progressão de doença (Ruth I. Connor, e outro, *J. Exp. Med.* 1997, 185, 621). A descoberta é consistente com a descoberta recente de que a presença de um mutante de CCR-2, 10 CCR2-64I, é positivamente com o início retardado de HIV na população humana (Michael W. Smith, e outro, *Science* 1997, 277, 959). Embora MCP-1 não tenha sido implicada, pode ser que os antagonistas de MCP-1 que agem por meio de ligação à CCR-2 podem ter efeitos terapêuticos benéficos no 15 retardo da progressão da doença para AIDS em pacientes infectados por CCR2-64I. 20 HIV.

Deve-se observar que CCR2 é também o receptor para as quimiocinas humanas MCP-2, MCP-3, e MCP-4 (Luster, *New Eng. J. Med.* 1998, 338, 436-445). observado que os novos compostos de fórmula (I) descritos aqui antagonizam MCP-1 ligando-se ao receptor de CCR-2, pode ser que 25 estes compostos de fórmula (I) sejam também antagonistas eficazes das ações de MCP-2, MCP-3, e MCP-4 que são mediadas por CCR-2. Consequentemente, quando referência é feita aqui ao "antagonismo de MCP-1," deve ser assumido que este é equivalente ao "antagonismo de estimulação de quimiocina de CCR-2."

Consequentemente, os compostos que modulam a atividade de 30 quimiocina podem demonstrar uma ampla faixa de utilidades no tratamento de doenças inflamatórias, alérgicas, autoimunes, metabólicas, câncer e/ou

cardiovasculares. Publicação de Pedido de Patente dos estados Unidos WO2005021500 A1 (incorporada aqui por referência e designada pelo presente Requerente) descreve compostos que modulam a atividade de MCP-1, MCP-2, MCP-3 e MCP-4 por meio de CCR2. A referência também descreve 5 vários processos para preparer estes compostos incluindo sínteses de múltiplas etapas que incluem a introdução e subsequente remoção de grupos de proteção.

É desejável encontrar novos compostos com características farmacológicas melhoradas comparadas com moduladores de quimiocina conhecidos. Por exemplo, é desejável encontrar novos compostos com atividade inibidora melhorada de CCR-2 e seletividade para CCR-2 *versus* outros receptores acoplados à proteína G (isto é, receptor de 5HT2A). É também desejável encontrar compostos com características vantajosas e melhoradas em uma ou mais das seguintes categorias:

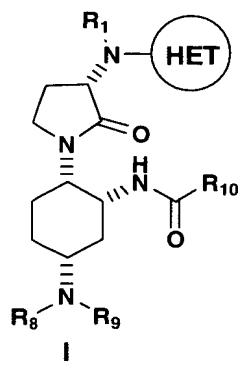
- 15 (a) propriedades farmacêuticas (isto é, solubilidade, permeabilidade, amenabilidade para formulações de liberação prolongada);
- (b) requerimentos de dosagem (por exemplo, dosagens inferiores e/ou dosagem uma vez ao dia);
- (c) fatores que diminuem as carecaterísticas *peak-to-trough* de concentração sanguínea (isto é, liberação e/ou volume de distribuição);
- (d) fatores que aumentam a concentração do fármaco ativo no receptor (isto é, ligação de proteína, volume de distribuição);
- (e) fatores que diminuem a responsabilidade para interações fármaco-fármaco clínicas (indução ou inibição de enzima citocromo P450, tal como 25 inibição de CYP 2D6, veja G.K. Dresser, J.D. Spence, D.G. Bailey, *Clin. Pharmacokinet.* **2000**, 38, 41-57, que é pelo presente incorporado por referência);
- (f) fatores que diminuem o potencial para efeitos colaterias adversos (por exemplo, seletividade farmacológica além de receptores acoplados à 30 proteína G, reatividade química ou metabólica potencial, seletividade de canal de íon, penetração de CNS limitada). É especialmente desejável encontrar compostos tendo uma combinação desejável das características farma-

cológicas anteriormente mencionadas.

É também desejável na técnica fornecer processos novos e/ou melhorados para preparar tais compostos. Estes processos podem ser caracterizados, sem limitação, por a) fácil adaptação à produção de escala maior, tal como usina piloto ou escalas de fabricação; b) etapas de processo e/ou técnicas que possibilitam melhorias na pureza (incluindo pureza quiral), estabilidade e/ou facilidade manipulação de intermediários e/ou compostos finais; e/ou c) menos etapas de processo.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece um novo antagonista ou agonista/antagonista parcial de atividade de receptor de MCP-1: N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, ou um pró-fármaco, solvato ou sal farmaceuticamente aceitável, deste, tendo uma combinação inesperada de características farmacológicas desejáveis. Formas cristalinas da presente invenção são também fornecidas. Composições farmacêuticas contendo as mesmas e métodos de utilização das mesmas como agentes para o tratamento de doenças inflamatórias, alérgicas, autoimunes, metabólicas, câncer e/ou doenças cardiovasculares são também um objetivo desta invenção. A presente descrição também fornece um processo para a preparação e compostos de fórmula (I), incluindo N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil) acetamida:



em que R^1 , R^8 , R^9 , R^{10} , e  são como descritos aqui. Compostos que são intermediários úteis dos processos são também fornecidos aqui.

A presente descrição também fornece o uso de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, um pró-fármaco, solvato ou sal farmaceuticamente aceitável, para afabricação de um medicamento para o tratamento de doenças inflamatórias, alérgicas, autoimunes, metabólicas, câncer e/ou doenças cardiovasculares.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 descreve os padrões de força experimental e estimulada de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, sal de ácido di-benzenossulfônico, Forma N-1.

A Figura 2 descreve os padrões de força experimental e estimulada de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, forma de base livre N-2.

A Figura 3 descreve os padrões de força experimental e estimulada de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, forma de base livre E-1 (mono-etanolato).

A Figura 4 descreve os padrões de força experimental e estimulada de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, Forma de Sal de HCl H4-1 (tetraídrato).

A Figura 5 descreve os padrões de força experimental e estimulada de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, forma de base livre A-1 (solvato de mono-acetona).

A Figura 6 descreve os padrões de força experimental e estimulada de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, forma de base livre DC-1 (solvato de mono-diclorometano).

A Figura 7 descreve os padrões de força experimental e estimulada de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, forma de base livre D-1 (solvato de diclorometano).

lada de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, forma de base livre AN-3 (solvato de mono-acetonitrilo).

A Figura 8 descreve a análise de calorimetria de varredura diferencial da N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, forma de sal de di-besilato N-1.

A Figura 9 descreve a análise termogravimétrica de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, forma de sal de di-besilato N-1.

A Figura 10 descreve a análise de calorimetria de varredura diferencial de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, base livre, Forma N-2.

A Figura 11 descreve a análise termogravimétrica de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, base livre, Forma N-2.

A Figura 12 descreve o Isoterma de Absorção de Umidade de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, base livre, Forma N-2.

A Figura 13 descreve uma Estrutura cristal de raio X de *terc*-butila (1*R*,3*R*,4*S*)-3-acetamido-4-((*S*)-3-(benziloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)cicloexilcarbamato.

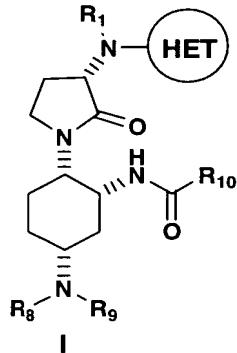
A Figura 14. Modelo de peritonite TG de 48 horas em camundongos hCCR2 KI: Exemplo 1 inibição de monócito/infiltração de macrófago na cavidade peritoneal (contagem celular diferencial).

FIG. 15. modelo de peritonite TG de 48 horas em camundongos hCCR2 KI: Exemplo 1 inibição de monócito/infiltração de macrófago na cavidade peritoneal (Análise de FACS).

FIG. 16. EAE em camundongos hCCR2 KI: escore clínico de tratamento Exemplo 1

DESCRIÇÃO DETALHADA

A presente invenção fornece um novo antagonista ou agonista/antagonista parcial de atividade de receptor de MCP-1: N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, ou um pró-fármaco, solvato ou sal farmaceuticamente aceitável, deste, tendo uma combinação inesperada de características farmacológicas desejáveis. Formas cristalinas da presente invenção são também fornecidas. Composições farmacêuticas contendo as mesmas e métodos de utilização das mesmas como agentes para o tratamento de doenças inflamatórias, alérgicas, autoimunes, metabólicas, câncer e/ou doenças cardiovasculares são também um objetivo desta invenção. A presente descrição também fornece um processo para a preparação e compostos de fórmula (I), incluindo N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida:



em que R¹, R⁸, R⁹, R¹⁰, e HET são como descritos aqui. Compostos que são intermediários úteis dos processos são também fornecidos aqui.

N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, inesperadamente demonstra uma combinação desejável de características farmacológicas incluindo um grau supreendentemente elevado de biodisponibilidade oral em combinação com indicações que é altamente eficaz e tem excelentes critérios de segurança.

Moduladores conhecidos de receptores de CCR2, tais como aqueles descritos na Publicação de Patente WO2005021500 A1 publicada em 10 de março de 2005 (Patente dos Estados Unidos No. 7.163.937, publicada em 16 de Janeiro de 2007, designada pelo presente Requerente) que demonstram um grau adequado de permeabilidade de membrana (um fator crítico de biodisponibilidade oral), não são suficientemente eficazes, como avaliados por sua capacidade de ligação de CCR2- (uma avaliação de eficácia), e/ou eles não têm critérios apropriados para segurança como indicado por seletividade de canal de íon como medido por estudos de hERG e canal de íon de Na+.

Em contraste, como ilustrado pelos dados representados aqui na seção intitulada "Características Farmacológicas Comparativas", *infra*, a molécula relativamente polar, N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida demonstra um grau supreendentemente elevado de permeabilidade de membrana, e ainda mantém potente capacidade de ligação de CCR2 juntamente com excelente seletividade de canal de íon.

Consequentemente, a presente invenção fornece um novo modulador de quimiocina tendo características farmacológicas melhoradas que esperado ser útil no tratamento de doenças inflamatórias, alérgicas, autoimunes, metabólicas, câncer e/ou doenças cardiovasculares.

MODALIDADES

Em uma modalidade, a descrição está direcionada a N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, e sais farmaceuticamente aceitáveis deste.

Outra modalidade é uma forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, base livre.

Outra modalidade é uma forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, a base livre, a forma cristalina

compreendendo a forma N-2.

Outra modalidade é a Forma N-2 caracterizada por (ou tendo) parâmetros de célula unitária substancialmente iguais aos seguintes:

Dimensões celulares:

5 $a = 11,8427(3)$

$b = 18,1503(7)$

$c = 12.7923(4)$

$\alpha = 90$

$\beta = 105,362(2)$

10 $\gamma = 90$

Grupo de espaço $P2_1$

Moléculas/célula unitária 2

em que o referido cristal está em uma temperatura de cerca de +22°C (RT).

Outra modalidade é a Forma N-2 caracterizada por (ou tendo) 15 um padrão de difração de pó de raio X comreendendo três ou mais de valores 2θ ($CuK\alpha \lambda=1.541\text{\AA}$) selecionados de 7.2, 8.7, 9.7, 12.5, 12.8, 13.3, 16.0, 16.6, 18.2, e 18.8, em uma temperatura de cerca de 22°C.

Outra modalidade é a Forma N-2 caracterizada por (ou tendo) 20 um padrão de difração de pó de raio X também comreendendo quatro ou mais de valores 2θ ($CuK\alpha \lambda=1.541\text{\AA}$) selecionados do grupo consistindo em 7.2, 8.7, 9.7, 12.5, 12.8, 13.3, 16.0, 16.6, 18.2, e 18.8, em uma temperatura de cerca de 22°C.

Outra modalidade é a Forma N-2 caracterizada por (ou tendo) a 25 por coordenadas atômicas fracionais substancialmente como listado na Tabela 7.

Outra modalidade é a Forma N-2 caracterizada por (ou tendo) um padrão de difração de pó de raio X substancialmente de acordo com a Figura 2.

Outra modalidade é uma forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5- 30 (isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, sal de ácido di-benzenossulfônico, comreendendo a Forma N-1, caracterizada pelos parâmetros de célula uni-

tária encontrados na Tabela 1; 3 ou 4 ou mais valores de 2θ ($\text{CuK}\alpha \lambda=1.541\text{\AA}$) selecionados de Tabela 10; por coordenadas atômicas fracionais substancialmente como listado na Tabela 2, e/ou um padrão de difração de pó de raio X substancialmente de acordo com a Figura 1.

5 Outra modalidade é uma forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, base livre, compreendendo a Forma E-1 (mono-etanolato), caracterizada pelos parâmetros de célula unitária encontrados na Tabela 1; 3 ou 4 ou more 2θ values ($\text{CuK}\alpha \lambda=1.541\text{\AA}$) selecionados de Tabela 10; por coordenadas atômicas fracionais substancialmente como listado na Tabela 5, e/ou um padrão de difração de pó de raio X substancialmente de acordo com a Figura 3.

10

Outra modalidade é uma forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, sal de HCl, compreendendo a Forma H4-1 (tetraidrato), caracterizada pelos parâmetros de célula unitária encontrados na Tabela 1; 3 ou 4 ou mais valores de 2θ ($\text{CuK}\alpha \lambda=1.541\text{\AA}$) selecionados de Tabela 10; por coordenadas atômicas fracionais substancialmente como listado na Tabela 9, e/ou um padrão de difração de pó de raio X substancialmente de acordo com a Figura 4.

20

Outra modalidade é um padrão de forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, base livre, compreendendo a Forma A-1 (solvato de mono-acetona), caracterizada pelos parâmetros de célula unitária encontrados na Tabela 1; 3 ou 4 ou mais valores de 2θ ($\text{CuK}\alpha \lambda=1.541\text{\AA}$) selecionados de Tabela 10; por coordenadas atômicas fracionais substancialmente como listado na Tabela 6, e/ou um padrão de difração de pó de raio X substancialmente de acordo com a Figura 5.

25

30 Outra modalidade é uma forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, base livre, compreendendo a For-

ma DC-1 (solvato de mono-diclorometano), caracterizada pelos parâmetros de célula unitária encontrados na Tabela 1; 3 ou 4 ou mais valores de 2θ ($\text{CuK}\alpha \lambda=1.541\text{\AA}$) selecionados de Tabela 10; por coordenadas atômicas fracionais substancialmente como listado na Tabela 3, e/ou um padrão de difração de pó de raio X substancialmente de acordo com a Figura 6.

Outra modalidade é uma forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, base livre compreendendo a Forma AN-3 (solvato de mono-acetonitrilo), caracterizada pelos parâmetros de célula unitária encontrados na Tabela 1; 3 ou 4 ou mais valores de 2θ ($\text{CuK}\alpha \lambda=1.541\text{\AA}$) selecionados de Tabela 10; por coordenadas atômicas fracionais substancialmente como listado na Tabela 8, e/ou um padrão de difração de pó de raio X substancialmente de acordo com a Figura 7.

Outra modalidade é uma forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, base livre compreendendo a Forma THOO-1 (solvato de mono-tetraidrofurano), caracterizada pelos parâmetros de célula unitária encontrados na Tabela 1; 3 ou 4 ou mais valores de 2θ ($\text{CuK}\alpha \lambda=1.541\text{\AA}$) selecionados de Tabela 10; e/ou por coordenadas atômicas fracionais substancialmente como listado na Tabela 4..

Outra modalidade é uma composição farmacêutica, compreendendo um veículo farmaceuticamente aceitável e um composto dos Exemplos.

Outra modalidade é método para modulação de quimiocina ou atividade receptora de quimiocina compreendendo administrar a um paciente em necessidade disto uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto dos Exemplos.

Outra modalidade é método para modulação de Atividade de receptor de CCR-2 compreendendo administrar a um paciente em necessidade disto uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto dos Exemplos.

Outra modalidade é método para modulação da atividade de

MCP-1, MCP-2, MCP-3 e MCP-4, e MCP-5 que é mediada pelo receptor de CCR2 compreendendo administrar a um paciente em necessidade disto uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto dos Exemplos.

- Outra modalidade é método para modulação da atividade de
- 5 MCP-1 compreendendo administrar a um paciente em necessidade disto uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto dos Exemplos.

Outra modalidade é um método para tratamento de distúrbios, compreendendo administrar a um paciente em necessidade disto uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto dos Exemplos, os referidos

10 distúrbios sendo selecionados de outra modalidade é um método para tratamento de distúrbios, compreendendo administrar a um paciente em necessidade disto uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto dos Exemplos, os referidos distúrbios sendo selecionados de diabetes, obesidade, síndrome metabólica, acidente vascular cerebral, dor neuropática, cardiomiopatia isquêmica, psoríase, hipertensão, escleroderma, osteoartrite, aneurisma, febre, doença cardiovascular, doença de Crohn, insuficiência cardíaca congestiva, doença autoimune, Infecção por HIV, demência associada com HIV, psoríase, fibrose pulmonar idiopática, arteriosclerose de transplante, trauma cerebral fisicamente ou quimicamente induzido, doença do intestino inflamatória, alveolite, colite, lúpus eritematoso sistêmico, nefrite do soro nefrotóxico, glomerulonefrite, asma, esclerose múltipla, atherosclerose, vasculite, placas vulneráveis, artrite reumatóide, restenose, hiperplasia neoíntima venosa, hiperplasia neoíntima de enxerto de diálise, hiperplasia íntima de desvio arteriovenoso, transplante de órgão, neuropatia de aloenxerto crônica,

20 25 e câncer.

Outra modalidade é um método para tratamento de distúrbios, compreendendo administrar a um paciente em necessidade disto uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto dos Exemplos, em que os referidos distúrbios são selecionados de diabetes, obesidade, doença de

30 Crohn, psoríase, fibrose pulmonar idiopática, arteriosclerose de transplante, trauma cerebral fisicamente ou quimicamente induzido, doença do intestino inflamatória, alveolite, colite, lúpus eritematoso sistêmico, nefrite do soro ne-

frotóxico, glomerulonefrite, asma, esclerose múltipla, aterosclerose, e artrite reumatóide, restenose, transplante de órgão, e câncer.

Outra modalidade é um método para tratamento de distúrbios, compreendendo administrar a um paciente em necessidade disto uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto dos Exemplos, em que os referidos distúrbios são selecionados de diabetes, obesidade, doença de Crohn, lúpus eritematoso sistêmico, glomerulonefrite, esclerose múltipla, aterosclerose, restenose, e transplante de órgão.

Outra modalidade é um método para tratamento de distúrbios, 10 compreendendo administrar a um paciente em necessidade disto uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto dos Exemplos, em que os referidos distúrbios são selecionados de esclerose múltipla, aterosclerose, doença de Crohn, e diabetes.

Outra modalidade é um método para tratamento de distúrbios, 15 compreendendo administrar a um paciente em necessidade disto uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto dos Exemplos, em que os referidos distúrbios são selecionados de restenose, transplante de órgão, e câncer.

Outra modalidade é um método para tratamento de diabetes, 20 compreendendo administrar a um paciente em necessidade disto uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto dos Exemplos.

Outra modalidade é um método para tratamento de Doença de Crohn, compreendendo administrar a um paciente em necessidade disto uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto dos Exemplos.

Outra modalidade é um método para tratamento de esclerose múltipla, compreendendo administrar a um paciente em necessidade disto uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto dos Exemplos.

Outra modalidade é um método para tratamento de aterosclerose, compreendendo administrar a um paciente em necessidade disto uma 30 quantidade terapeuticamente eficaz de um composto dos Exemplos.

Outra modalidade é um método para tratamento de restenose, compreendendo administrar a um paciente em necessidade disto uma quan-

tidade terapeuticamente eficaz de um composto dos Exemplos.

Outra modalidade é um método para tratamento de transplante de órgão, compreendendo administrar a um paciente em necessidade disto uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto de Exemplo 1.

5 Outra modalidade é um método para tratamento de câncer, compreendendo administrar a um paciente em necessidade disto uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto de Exemplo 1.

Outra modalidade é um método para tratamento de câncer, em que o câncer é selecionado de câncer de mama, câncer de fígado, câncer
10 de próstata e melanoma.

Outra modalidade é um método para tratamento de doenças inflamatórias, alérgicas, autoimunes, metabólicas, câncer e/ou doenças cardiovasculares compreendendo administrar a um paciente em necessidade disto uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto de Exemplo 1.

15 Outra modalidade é um método para tratamento de doenças que são pelo menos parcialmente mediadas por CCR-2, compreendendo administrar a um paciente em necessidade disto uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto de Exemplo 1.

Outra modalidade é método para modulação da atividade de
20 CCR2 compreendendo administrar a um paciente em necessidade disto uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto de Exemplo 1.

Outra modalidade é um composto de Exemplo 1 na preparação de um medicamento para o tratamento de diabetes, obesidade, síndrome metabólica, acidente vascular cerebral, dor neuropática, cardiomiopatia is-
25 quêmica, psoríase, hipertensão, escleroderma, osteoartrite, aneurisma, febre, doença cardiovascular, Doença de Crohn, insuficiência cardíaca congestiva, doença autoimune, Infecção por HIV, Demência associada com HIV, psoríase, fibrose pulmonar idiopática, arteriosclerose de transplante, trauma cerebral fisicamente ou quimicamente induzido, doença do intestino inflama-
30 tória, alveolite, colite, lúpus eritematoso sistêmico, nefrite do soro nefrotóxico, glomerulonefrite, asma, esclerose múltipla, atherosclerose, vasculite, placas vulneráveis, artrite reumatóide, restenose, hiperplasia neoíntima venosa,

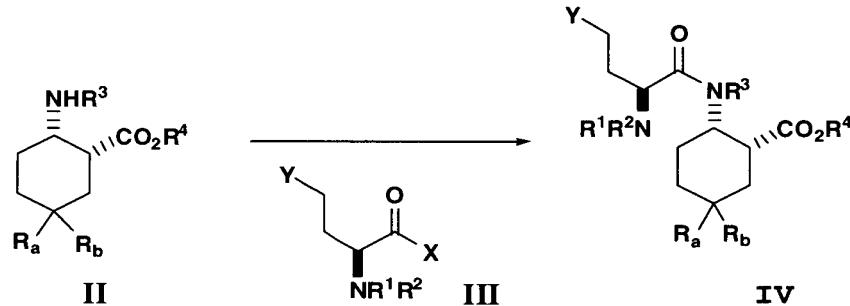
hiperplasia neoíntima de enxerto de diálise, hiperplasia íntima de desvio arteriovenoso, transplante de órgão, neuropatia de aloenxerto crônica, e câncer.

Outra modalidade é um composto dos Exemplos para uso em 5 terapia.

A invenção pode ser representada de outras formas específicas sem afastar-se do espírito ou atributos essenciais desta. Esta invenção também abrange todas as combinações de modalidades e aspectos alternativos da invenção observados aqui. Entende-se que quaisquer e todas as modalidades podem 10 consideradas em conjunção com qualquer outra modalidade para descrever modalidades adicionais da presente invenção. Além disso, quaisquer elementos de uma modalidade destinam-se a serem combinados com quaisquer e todos os outros elementos de qualquer uma das modalidades para descrever modalidades adicionais.

15 MODALIDADES DE PROCESSO

Em uma 1^a modalidade, a descrição fornece um processo para a preparação de um composto de fórmula IV, ou um sal deste:

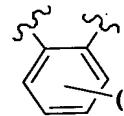


o processo compreende as etapas de:

acoplamento de β -aminoéster de fórmula II, ou um sal deste, com um 20 α -aminoácido quiral adequadamente protegido de fórmula III para fornecer amida IV (veja WO2005021500);
em que:

R_a e R_b são independentemente C₁-alcóxi;

ou R_a e R_b juntamente com o átomo de carbono ao qual eles são ambos ligados combinam-se para formar uma carbonila, uma tiocarbonila, um acetal cíclico ou tioacetal cíclico, em que o acetal cíclico ou tioacetal cíclico é sele-



cionado de $-O-Z-O-$ e $-S-Z-S-$, Z é $-(CT_1T_2)_2^-$, $-(CT_1T_2)_3^-$, ou T_1 , T_2 e T_3 em cada ocorrência são independentemente selecionados de hidrogênio, C_{1-4} alquila, C_{2-4} alquenila, halogênio, hidróxi, ciano, nitro, CF_3 , OC_{1-4} alquila, OCF_3 , $C(=O)C_{1-4}$ alquila, e CO_2C_{1-4} alquila (preferivelmente T_1 , T_2 e T_3 são cada qual hidrogênio);

R_1 , R_2 e R_3 são independentemente hidrogênio ou um grupo de proteção de amina selecionado de um grupo carbobenzilóxi (Cbz), um terc-butiloxicarbonila (BOC), um grupo fluorenilmetyloxicarbonila (FMOC), um grupo benzila (Bn), e um grupo p-metoxibenzila (PMB) (preferivelmente o

- 5 grupo de proteção de amina é Cbz, Bn ou BOC, especialmente Cbz ou Bn); R_4 é C_{1-6} alquila inferior ou uma benzila opcionalmente substituída por C_{1-4} alquila, C_{2-4} alquenila, halogênio, hidróxi, ciano, nitro, CF_3 , OC_{1-4} alquila, OCF_3 , e $C(=O)C_{1-4}$ alquila;

Y é halogênio, SR_{12} ou OSO_2R_{13} ;

- 10 X é OH, halogênio ou $OCOR_{14}$;

R_{12} é C_{1-6} alquila, $-(CH_2)C(O)OR_{13}$, ou $-(CH_2)C(O)R_{13}$;

R_{13} em cada ocorrência é C_{1-6} alquila ou uma benzila opcionalmente substituída por C_{1-4} alquila, C_{2-4} alquenila, halogênio, hidróxi, ciano, nitro, CF_3 , OC_{1-4} alquila, OCF_3 , e $C(=O)C_{1-4}$ alquila; e

- 15 R_{14} em cada ocorrência é hidrogênio, C_{1-6} alquila ou uma benzila opcionalmente substituída por C_{1-4} alquila, C_{2-4} alquenila, halogênio, hidróxi, ciano, nitro, CF_3 , OC_{1-4} alquila, OCF_3 , e $C(=O)C_{1-4}$ alquila.

Uma benzila opcionalmente substituída como utilizado aqui indica um grupo benzila que é conectada através de seu grupo metíleno ($-CH_2-$) e opcional-

- 20 mente substituída no anel fenila ligado ao grupo metíleno.

Em uma 2^a modalidade, a descrição fornece um processo para formação de um produto de fórmula IV, ou um sal deste, em que:

R_a e R_b juntamente com o átomo de carbono ao qual eles são ambos ligados combinam-se para formar um grupo 1,3-dioxolano ou carbonila (preferivelmente R_a e R_b juntamente com os átomos de carbono aos quais eles são ligados combinam-se para formar um grupo 1, 3-dioxolano);

R₁ é hidrogênio;

R₂ é Cbz;

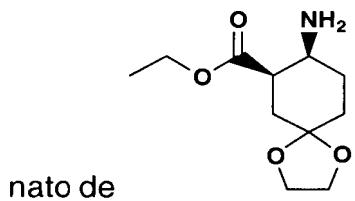
R₃ é hidrogênio;

R₄ é C₁₋₆alcóxi;

5 Y é S(Me); e

X é OH.

Em uma 3^a modalidade, a descrição fornece um processo em que o β-aminoéster de fórmula II é um sal de hidrobrometo ou a toluenossulfonato. Um sal preferível do β-aminoéster de fórmula II é o sal de toluenossulfo-



Em uma 4^a modalidade, a descrição fornece um processo para a formação de um composto de fórmula IV, ou um sal deste, em que o acoplamento é conduzido sob uma atmosfera inerte, tal como nitrogênio ou argônio (preferivelmente nitrogênio) em um solvente aprótico tal como propionitrilo, acetato de isopropila, acetato de n-butila, acetato de terc-butila ou acetonitrilo (especialmente acetonitrilo e/ou acetato de etila).

Em uma 5^a modalidade, a descrição fornece um processo para a formação de um composto de fórmula IV, ou um sal deste, em que o acoplamento é obtido contactando-se o β-aminoéster de fórmula II com um reagente de acoplamento de diimida na presença de um ativador, o β-

15 aminoéster protegido de fórmula II, e uma base de amina terciária. O reagente de acoplamento de diimida inclui, por exemplo, reagentes tais como EDAC. Exemplos de ativadores incluem 1-hidroxibenzotriazol (HOBr; o referido termo inclui hidratos destes) e N,N-dimetilamino-piridina. Uma base de amina terciária inclui, por exemplo, trialquilaminas tais como trietilamina,

20 N-N-diisopropil-N-etyl amina e tri-n-propilamina.

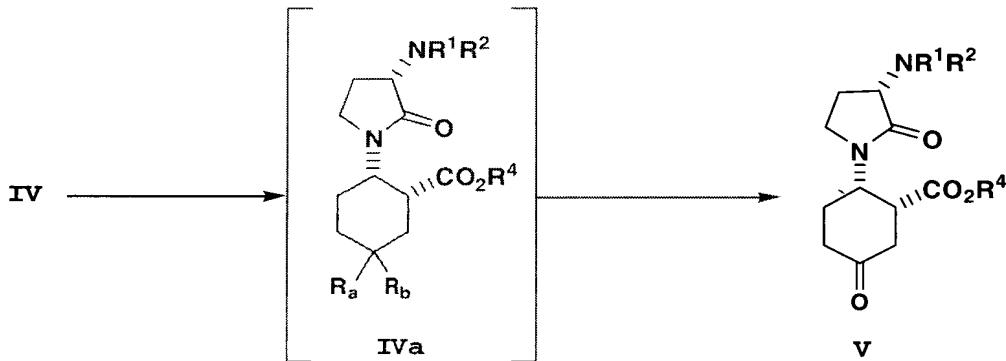
Em uma 6^a modalidade, a descrição fornece um processo para a formação de um composto de fórmula IV, ou um sal deste, em que o reagen-

25 te de acoplamento de diimida é EDAC, o ativador, é HOBr, e a base de ami-

na terciária é trietilamina ou *N,N*-diisopropil-*N*-etyl amina.

Em uma 7^a modalidade, a descrição fornece um processo para Fórmula um composto de fórmula IV, ou um sal deste, onde as relações molares do aminoéster de fórmula II para reagente de acoplamento de diimida 5 para ativador para a amina terciária para é uma em torno de 0,90 – 1,50 a cerca de 0,95-1,50 a cerca de 2,00 a 3,00, respectivamente. As referidas relações molares são preferivelmente uma em torno de 0,95 – 1,05 a cerca de 0,95-1,10 e a cerca de 2.10 a 2.30, respectivamente.

Em uma 8^a modalidade, a descrição fornece um processo para 10 preparação de um composto de fórmula V, ou um sal deste:



o processo, compreendendo as etapas de:

a) alquilação de um composto de fórmula IV com um agente de alquilação para formar um composto ativado; e

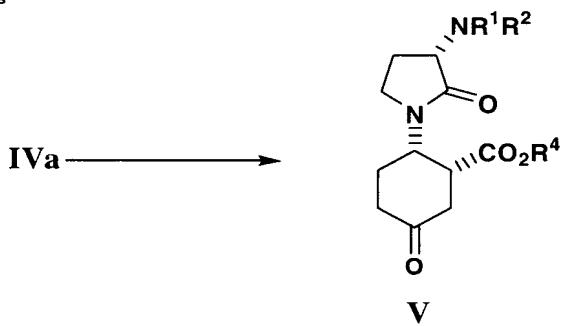
b) ciclização do composto ativado *in situ* para fornecer um composto de fórmula IVa.

Em uma 9^a modalidade, a descrição fornece um processo para a preparação de um composto de fórmula V, ou um sal deste, em que o agente de alquilação de etapa a) é um agente de alquilação de enxofre tal como como um haleto de C₁₋₆alquila e o composto ativado é um sal de sulfônio de 20 composto IV em que Y é S⁻ (C₁₋₆alquil)R₁₂. Preferivelmente, o agente de alquilação é iodeto de metila e Y é S⁻ (CH₃)₂.

Em uma 10^a modalidade, a descrição fornece um processo para a formação de um composto de fórmula V, ou um sal deste, em que a etapa de ciclização compreende a combinação do composto ativado, ou um sal 25 deste, com a base na presença de um solvente. A base é selecionada de

carbonato de césio, bicarbonato de césio, carbonato de potássio, terc-butilato de sódio, ou hexametildisilazida de sódio, (preferivelmente a base é carbonato de césio).

- Em uma 11^a modalidade, a descrição fornece um processo para
- 5 a formação de um composto de fórmula V, ou um sal deste, em que a etapa de ciclização é conduzida sob uma atmosfera inerte, tal como nitrogênio ou argônio, em um solvente selecionado de DMSO, DMF, DMA, N-metilpirrolidona, e sulfolano. Preferivelmente a atmosfera inerte é nitrogênio e o solvente é selecionado de DMSO e/ou DMF.
- 10 Em uma 12^a modalidade, onde o composto de fórmula IVa tem uma porção acetal, isto é, onde R_a e R_b são independentemente C₁-6alcóxi, ou juntamente com o átomo ao qual eles são ligados R_a e R_b combinam-se para formar um acetal cíclico ou tioacetal cíclico, a descrição fornece um processo para a formação de um composto de fórmula V, ou um sal deste,
- 15 também compreendendo a etapa de hidrólise de um composto de fórmula IVa tendo uma porção acetal:



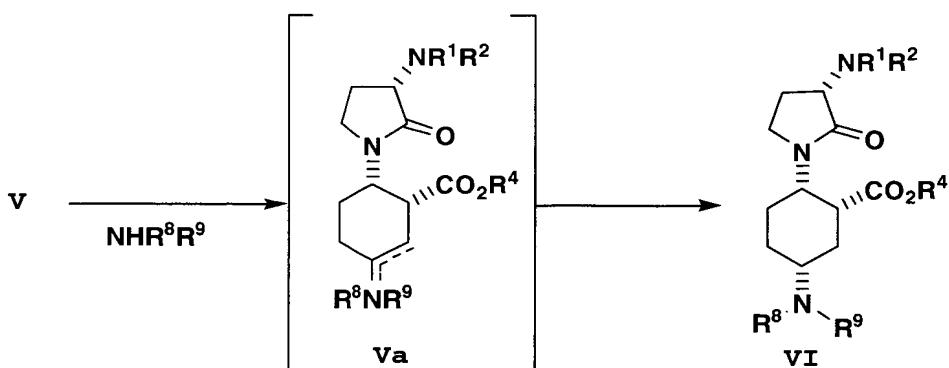
para formar o composto de fórmula V.

a etapa de hidrólise pode ser conduzida de acordo com os procedimentos para hidrólise de grupos acetal conhecidos por aqueles versados na técnica.

- 20 Por exemplo, a etapa de hidrólise pode compreender o tratamento do composto de fórmula IVa em um solvente tal como acetona, butanona, acetonitrilo e isopropanol, ou soluções aquosas destes com um ácido. A etapa de hidrólise preferivelmente compreende o tratamento do composto de fórmula IVa em uma solução de acetona aquosa com ácido hidroclórico.

- 25 Em uma 13^a modalidade, a presente descrição fornece um processo para a preparação de um composto de fórmula VI tendo uma porção

éster, ou um sal deste:



o processo compreende a etapa de:

aminar redutivamente um composto de fórmula V com uma amina tendo a Fórmula, $\text{NH}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$, para fornecer uma imina/enamina de fórmula Va em 5 que R_8 e R_9 são independentemente selecionados de hidrogênio e C_{1-6} -alquila. Preferivelmente, R_8 e R_9 , são independentemente selecionados de C_{1-6} -alquila. Mais preferivelmente, a amina é N-metil-N-isopropilamina.

Em uma 14^a modalidade, a descrição fornece um processo para formação de um produto de fórmula VI compreendendo a etapa de aminar 10 redutivamente de:

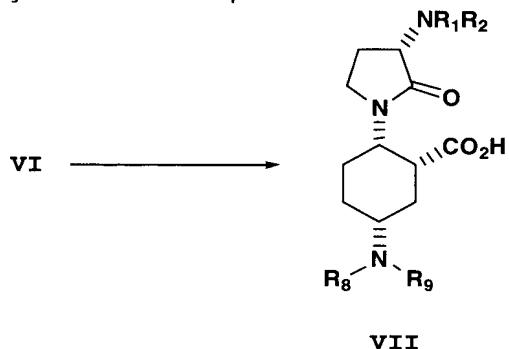
- (a) adicionar a amina de fórmula $\text{NH}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$ e um agente de desidratação a um composto de fórmula V em um solvente aprótico em uma temperatura de cerca de 20° a cerca de $+50^\circ \text{C}$ para formar a imina/enamina de fórmula Va; e
- 15 (b) tratar uma solução da imina /enamina de fórmula Va e um catalisador de paládio, 5% de Pt/S/C, com uma pressão de gás de hidrogênio para fornecer um composto de fórmula VI.

Em uma 15^a modalidade, a descrição fornece um processo para a formação de um composto de fórmula VI, ou um sal deste, em que o agente de desidratação de etapa a) é um ácido de Lewis/ácido Brønsted (preferivelmente tetraisopropóxido de titânio) e o solvente aprótico é selecionado de dicloroetano, diclorometano, acetonitrilo, DMSO, DMF, e N-metilpirrolidinona (preferivelmente diclorometano).

Em uma 16^a modalidade, a descrição fornece um processo para 25 a formação de um composto de fórmula VI, ou um sal deste, em que na eta-

pa b) os 5% de catalisador de Pt/S/C estão presentes em aproximadamente 0,5 a 50% (peso/peso) com relação ao composto Va. Preferivelmente, o gás de hidrogênio é em uma pressão de cerca de 15 a cerca de 2,46 kg/cm².

5 Em uma 17^a modalidade, a presente invenção fornece um processo para a preparação de um composto de fórmula VII, ou um sal deste:

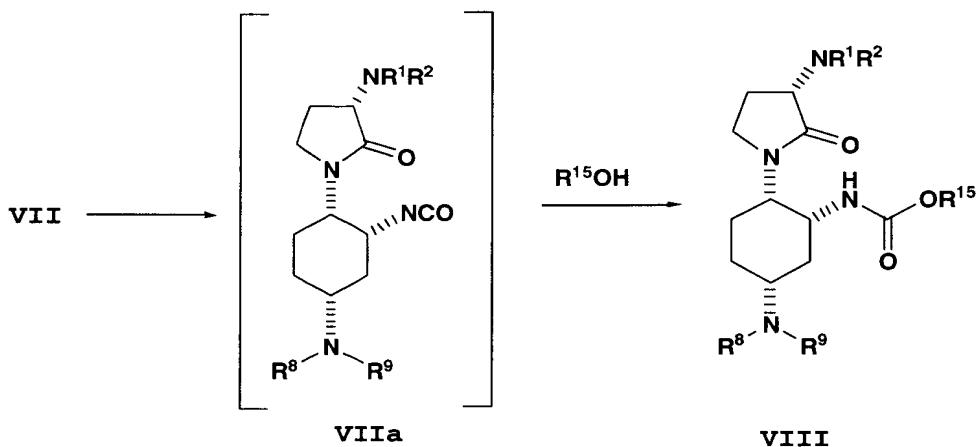


o processo comprehende a etapa de:

hidrolisar o composto de éster de fórmula VI, para fornecer um composto de ácido de fórmula VII. A temperatura varia de cerca de 40°C a cerca de 100 °C (a temperatura varia de cerca de 50° °C a cerca de 70 °C é mais preferida). Os ácidos são selecionados de ácido enxofre, ácido toluenossulfônico, ácido nítrico, ácido metanossulfônico, ácido hidrobrômico e ácido hidroclórico. Ácido hidroclórico é mais preferido. Preferivelmente, a etapa de hidrólise é realizada em uma solução de ácido hidroclórico aquoso para obter o composto de fórmula VII.

15 Em uma 18^a modalidade, a descrição fornece um processo para a preparação de um sal do composto de fórmula VII também comprehendendo a etapa de misturar a base com uma solução do composto de fórmula VII, opcionalmente *in situ*. A base é preferivelmente um hidróxido de alcáli, por exemplo, hidróxido de sódio.

20 Em uma 19^a modalidade, a descrição fornece um processo para a preparação de um composto de carbamato de fórmula VIII, ou um sal deste:



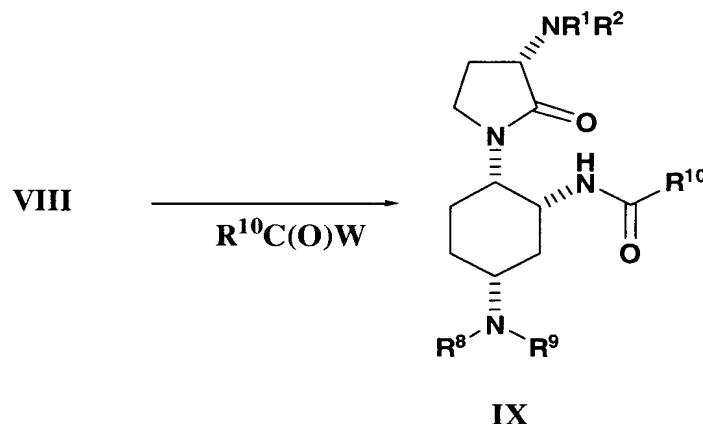
o processo, compreendendo as etapas de:

- a) converter um composto de ácido de fórmula VII em um composto de isocianato de fórmula VIIa; e
 - b) reagir o composto de isocianato de fórmula VIIa com um álcool de fórmula $R^{15}OH$ para fornecer a composta de carbamato de fórmula VIII;
- 5 em que R^{15} é C_{1-6} -alquila ou uma benzila opcionalmente substituída por C_{1-4} -alquila, C_{2-4} -alquenila, halogênio, hidróxi, ciano, nitro, CF_3 , OC_{1-4} -alquila, OCF_3 , e $C(=O)C_{1-4}$ -alquila. R^{15} é preferivelmente *terc*-butila ou benzila não substituída.

10 Em uma 20^a modalidade, a descrição fornece um processo para a preparação de um composto de fórmula VIII, ou um sal deste, por meio de uma redisposição Curtius compreendendo contatar o sal de sódio do composto de fórmula VII com um reagente de azida (preferivelmente azida de difenilfosforila) em um solvente (preferivelmente álcool *terc*-butílico) contendo tolueno em uma temperatura acima do ponto de disparo da(redisposição térmica. A temperatura é preferivelmente uma maior do que 50 °C.

15

Em uma 21^a modalidade, a descrição fornece um processo para a preparação de um composto de fórmula IX, ou um sal deste:



o processo compreende as etapas de:

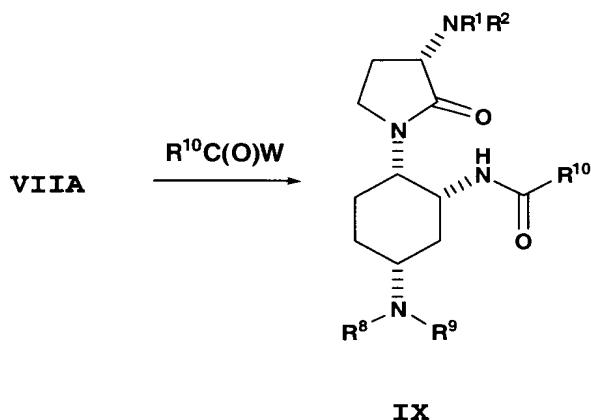
- a) transformar o composto de carbamato de fórmula VIII em um intermediário de amina livre; e
- b) acilar o intermediário de amina livre *in situ* com um reagente, $\mathbf{R}^{10}\mathbf{C}(\mathbf{O})\mathbf{W}$,
- 5 para fornecer um composto de fórmula IX;
- em que:
- \mathbf{R}^{10} é independentemente \mathbf{C}_{1-6} -alquila ou uma benzila opcionalmente substituída por \mathbf{C}_{1-4} -alquila, \mathbf{C}_{2-4} -alquenila, halogênio, hidróxi, ciano, nitro, \mathbf{CF}_3 , \mathbf{OC}_{1-4} -alquila, \mathbf{OCF}_3 , e $\mathbf{C}(=\mathbf{O})\mathbf{C}_{1-4}$ -alquila; e
- 10 W é a halogênio ou $\mathbf{R}^{10}\mathbf{C}(\mathbf{O})-$.

Preferivelmente, $\mathbf{R}^{10}\mathbf{C}(\mathbf{O})\mathbf{W}$ é anidrido acético.

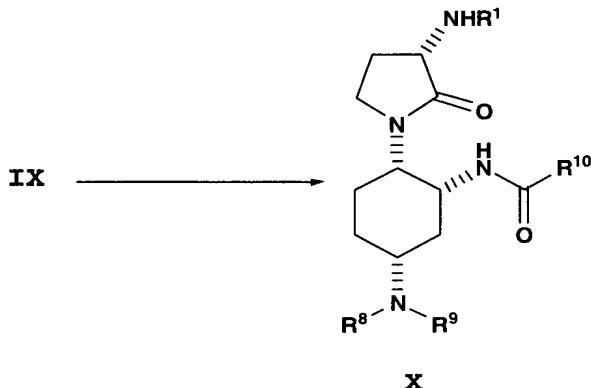
Em uma 22^a modalidade, a descrição fornece um processo para a preparação de um composto de fórmula IX, ou um sal deste, em que a etapa de transformação comprises as etapas de:

- 15 a) tratar uma solução de um composto de fórmula VIII com um ácido; e
 - b) adicionar a base à solução para fornecer um intermediário de amina livre.
- Preferivelmente o ácido é selecionado de ácido enxofre, ácido toluenossulfônico, ácido nítrico, ácido metanossulfônico, ácido hidrobrômico e ácido hidroclórico, mais preferivelmente ácido metanossulfônico. Preferivelmente a
- 20 base é uma trialquilamina, preferivelmente trietilamina.

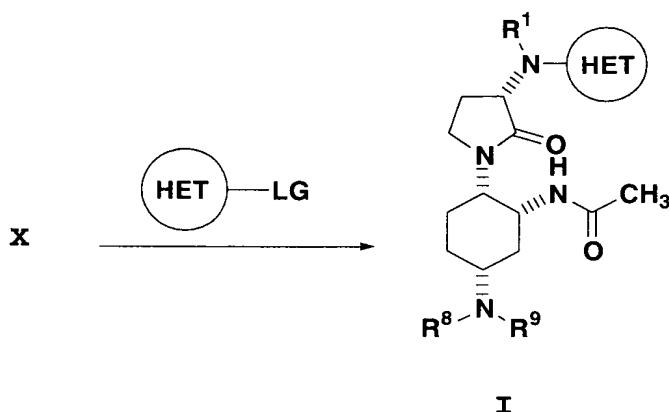
Em uma 23^a modalidade, a descrição fornece um processo alternativo para preparar um composto de fórmula IX, ou um sal deste:



- o processo compreende a etapa de adicionar o composto de isocianato de fórmula VIIa, opcionalmente *in situ*, a um agente de acilação, $(R^{10}C(O))_2O$ na presença de seu ácido correspondente, $R^{10}C(O)OH$, em que R^{10} é independentemente C₁₋₆alquila ou uma benzila opcionalmente substituída por C₁₋₄alquila, C₂₋₄alquenila, halogênio, hidróxi, ciano, nitro, CF₃, OC₁₋₄alquila, OCF₃, e C(=O)C₁₋₄alquila. Preferivelmente, R^{10} é C₁₋₆alquila, especialmente metila.
- 5 Em uma 24^a modalidade, a descrição fornece um processo para a preparação de um composto de fórmula X, ou um sal deste:

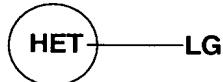


- 10 o processo compreende:
a desproteção do composto de amina protegida de fórmula IX para fornecer um composto de fórmula X. Preferivelmente, em que R² é Cbz, a desproteção é realizada por hidrogenação na presença de um catalisador de paládio. O catalisador de paládio é preferivelmente 10% Pd/C.
- 15 em uma 25^a modalidade, a descrição fornece um processo para a preparação de um composto de fórmula I:



o processo compreende:

acoplar um composto de fórmula X com um composto de formula:

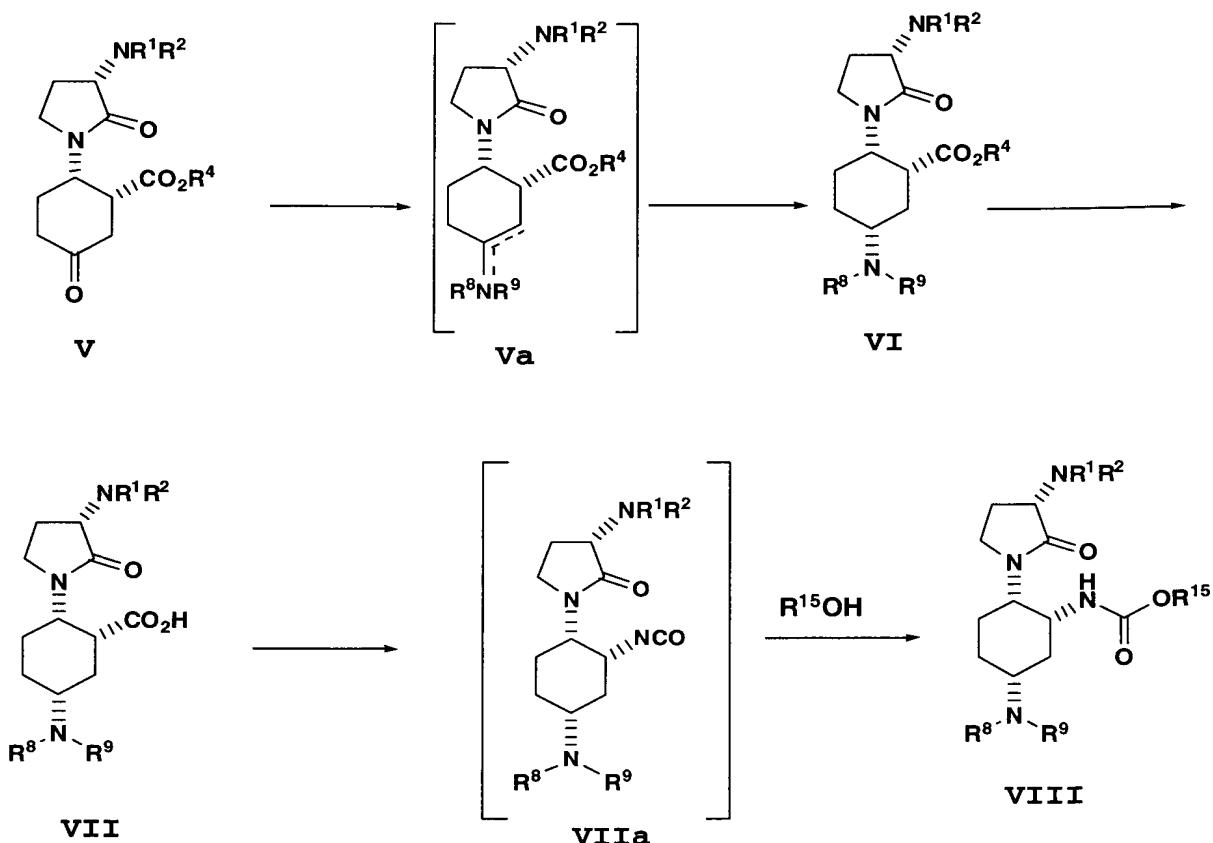


para fornecer um composto de fórmula I;

em que:

- HET é um anel heteroarila ou heterociclo de 3 a 14 membros opcionalmente substituído tendo um a quatro heteroátomos selecionados de N, O ou S (preferivelmente um a três heteroátomos, especialmente um a dois átomos de nitrogênio) em pelo menos um dos anéis (HET é preferivelmente quinazolin-4-il 6-substituída, mais preferivelmente 6-trifluorometil-quinazolin-4-il); e
- 5 LG é um grupo de partida selecionado de halogênio ou $\text{OSO}_2\text{R}_{16}$ (LG é preferivelmente a halogênio, mais preferivelmente cloro), em que R_{16} é C_{1-6} alquila, fenila, uma heteroarila de 5 a 7 membros tendo um ou mais átomos selecionados de N, S, ou O, ou uma cicloalquila de 3 a 7 membros, todos os quais são opcionalmente substituídos (preferivelmente, substituintes opcionais para R_{16} são um a três grupos selecionados de halogênio, CF_3 e C_{1-6} alquil).
- 10
- 15

Em uma 26^a modalidade, a presente invenção fornece um novo processo para preparar um composto de fórmula VIII, ou um sal deste:



o processo compreende as etapas de:

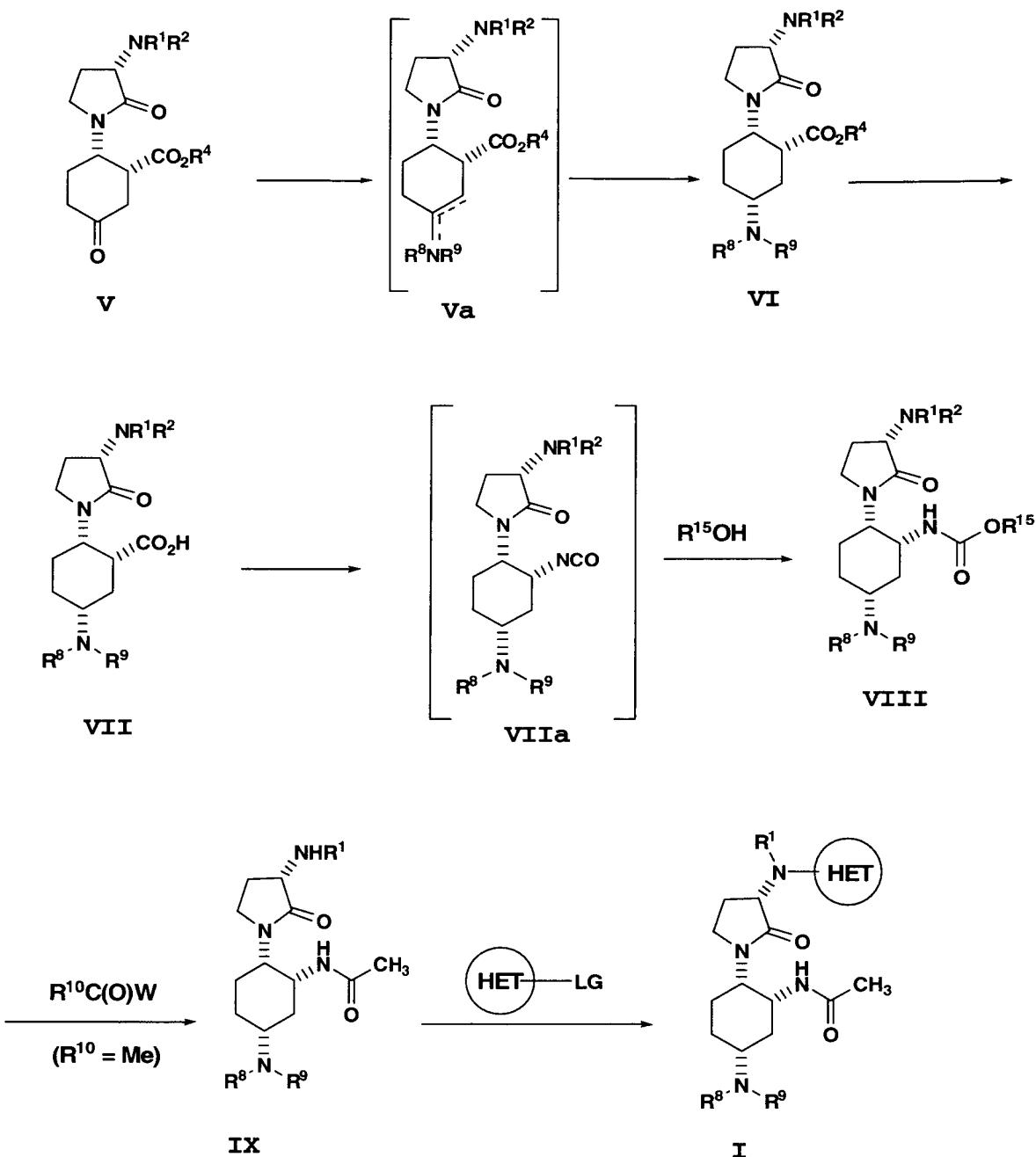
aminar redutivamente um composto de fórmula V com uma amina de Fórmula, $NH(R^8)(R^9)$, para fornecer um composto de fórmula VI compreendendo as etapas de:

- 5 (a) adicionar a amina e um agente de desidratação a um composto de fórmula V em um solvente aprótico em uma temperatura de cerca de $\sim 20^\circ$ a cerca de $+50^\circ C$ para formar o composto de imina/enamina de fórmula **Va**; e
 (b) tratar uma solução do composto de imina/enamina de fórmula **Va** e um catalisador de paládio, 5% de Pt/S/C, com uma pressão de gás de hidrogênio para fornecer um composto de éster de fórmula **VI**;
- 10 hidrolisar o composto de éster de fórmula **VI** para fornecer um composto de ácido de fórmula **VII**;
- 15 converter um composto de ácido de fórmula **VII** em um composto de isocianato de fórmula **VIIa**; e
 reagir o composto de isocianato de fórmula **VIIa** com um álcool de fórmula $R^{15}OH$ para fornecer a composta de carbamato de fórmula **VIII**;

em que:

- R₁ e R₂ são independentemente hidrogênio ou um grupo de proteção de amina selecionado de um grupo carbobenzilóxi (Cbz), uma terc-butiloxicarbonila (BOC), um grupo fluorenilmethoxycarbonila (FMCOC), um grupo benzila (Bn), e um grupo p-metoxibenzil (PMB) (preferivelmente o grupo de proteção de amina é Cbz, Bn ou BOC, especialmente Cbz ou Bn);
- 5 R₄ é C₁₋₆alquila inferior ou uma benzila opcionalmente substituída por C₁₋₄alquila, C₂₋₄alquenila, halogênio, hidróxi, ciano, nitro, CF₃, OC₁₋₄alquila, OCF₃, e C(=O)C₁₋₄alquila;
- 10 R₈ e R₉ são independentemente hidrogênio ou C₁₋₆alquila;
- R¹⁵ é C₁₋₆alquila ou uma benzila opcionalmente substituída por C₁₋₄alquila, C₂₋₄alquenila, halogênio, hidróxi, ciano, nitro, CF₃, OC₁₋₄alquila, OCF₃, e C(=O)C₁₋₄alquila (R¹⁵ é preferivelmente *terc*-butil ou benzila não substituída, mais preferivelmente *terc*-butila);
- 15 HET é um anel heterociclo ou heteroarila de 3 a 14 membros opcionalmente substituído tendo um a quatro heteroátomos selecionados de N, O ou S (preferivelmente um a três heteroátomos, especialmente um a dois átomos de nitrogênio) em pelo menos um dos anéis (HET é preferivelmente quinazolin-4-il 6-substituída , mais preferivelmente 6-trifluorometil-quinazolin-4-il); e
- 20 LG é um grupo de partida selecionados de halogênio ou OSO₂R₁₆ (LG é preferivelmente a halogênio, mais preferivelmente cloro), em que R₁₆ é C₁₋₆alquila, fenila, uma heteroarila de 5 a 7 membros tendo um ou mais átomos selecionados de N, S, ou O, ou uma cicloalquila de 3 a 7 membros, todos os quais são opcionalmente substituídos (preferivelmente, substituintes opcionais para R₁₆ são um a três grupos selecionados de halogênio, CF₃ e C₁₋₆alquil).

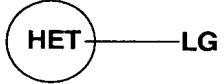
Em uma 27^a modalidade, a presente invenção fornece um novo processo para preparar um composto de fórmula I, ou um sal deste:



o processo compreende as etapas de:

aminar redutivamente um composto de fórmula **V** com uma amina de Fórmula, $\text{NH}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$, para fornecer um composto de fórmula **VI**, redutivamente aminar compreendendo as etapas de:

- 5 (a) adicionar a amina e um agente de desidratação a um composto de fórmula **V** em um solvente aprótico em uma temperatura de cerca de 20° a cerca de $+50^\circ\text{C}$ para formar o composto de imina/enamina de fórmula **Va**; e

- (b) tratar uma solução do composto de imina/enamina de fórmula Va e um catalisador de paládio, 5% de Pt/S/C, com uma pressão de gás de hidrogênio para fornecer um composto de éster de fórmula VI;
- hidrolisar o composto de éster de fórmula VI para fornecer um composto de ácido de fórmula VII;
- 5 converter um composto de ácido de fórmula VII em um composto de isocianato de fórmula VIIa;
- reagir o composto de isocianato de fórmula VIIa com um álcool de fórmula R¹⁵OH para fornecer a composta de carbamato de fórmula VIII;
- 10 transformar o composta de carbamato de fórmula VIII em um intermediário de amina livre; e
- acilar o intermediário de amina livre *in situ* com um reagente, R¹⁰C(O)W, para fornecer um composta de amina protegida de fórmula IX.;
- desproteger o composta de amina protegida de fórmula IX para fornecer um
- 15 composta de fórmula X; e
- acoplar um composta de fórmula X com um composta de fórmula
- 
- para fornecer um composta de fórmula I;
- em que:
- R₁ e R₂ são independentemente hidrogênio ou um grupo de proteção de amina selecionado de um grupo carbobenzilóxi (Cbz), um terc-butiloxicarbonil (BOC), um grupo fluorenilmeloxicarbonila (FMOC), um grupo benzila (Bn), e
- 20 um grupo p-metoxibenzila (PMB) (preferivelmente o grupo de proteção de amina é Cbz, Bn ou BOC, especialmente Cbz ou Bn);
- R₄ é C₁₋₆alquila inferior ou uma benzila opcionalmente substituída por C₁₋₄alquila, C₂₋₄alquenila, halogênio, hidróxi, ciano, nitro, CF₃, OC₁₋₄alquila, OCF₃, e C(=O)C₁₋₄alquila;
- 25 R₈ e R₉ são independentemente hidrogênio ou C₁₋₆alquila;
- R¹⁰ é independentemente C₁₋₆alquila ou uma benzila opcionalmente substituída por C₁₋₄alquila, C₂₋₄alquenila, halogênio, hidróxi, ciano, nitro, CF₃, OC₁₋₄alquila, OCF₃, e C(=O)C₁₋₄alquila (preferivelmente C₁₋₆alquila, mais preferivelmente metil);

W é halogênio ou $R^{10}C(O)-$;

R^{15} é C_{1-6} alquila ou uma benzila opcionalmente substituída por C_{1-4} alquila, C_{2-4} alquenila, halogênio, hidróxi, ciano, nitro, CF_3 , OC_{1-4} alquila, OCF_3 , e $C(=O)C_{1-4}$ alquila (R^{15} é preferivelmente *terc*-butila ou benzila não substituída,

5 mais preferivelmente *terc*-butil);

HET é um anel heterociclo ou heteroarila de 3 a 14 membros opcionalmente substituído tendo um a quatro heteroátomos selecionados de N, O ou S (preferivelmente um a três heteroátomos, especialmente um a dois átomos de nitrogênio) em pelo menos um dos anéis (HET é preferivelmente quinazolin-

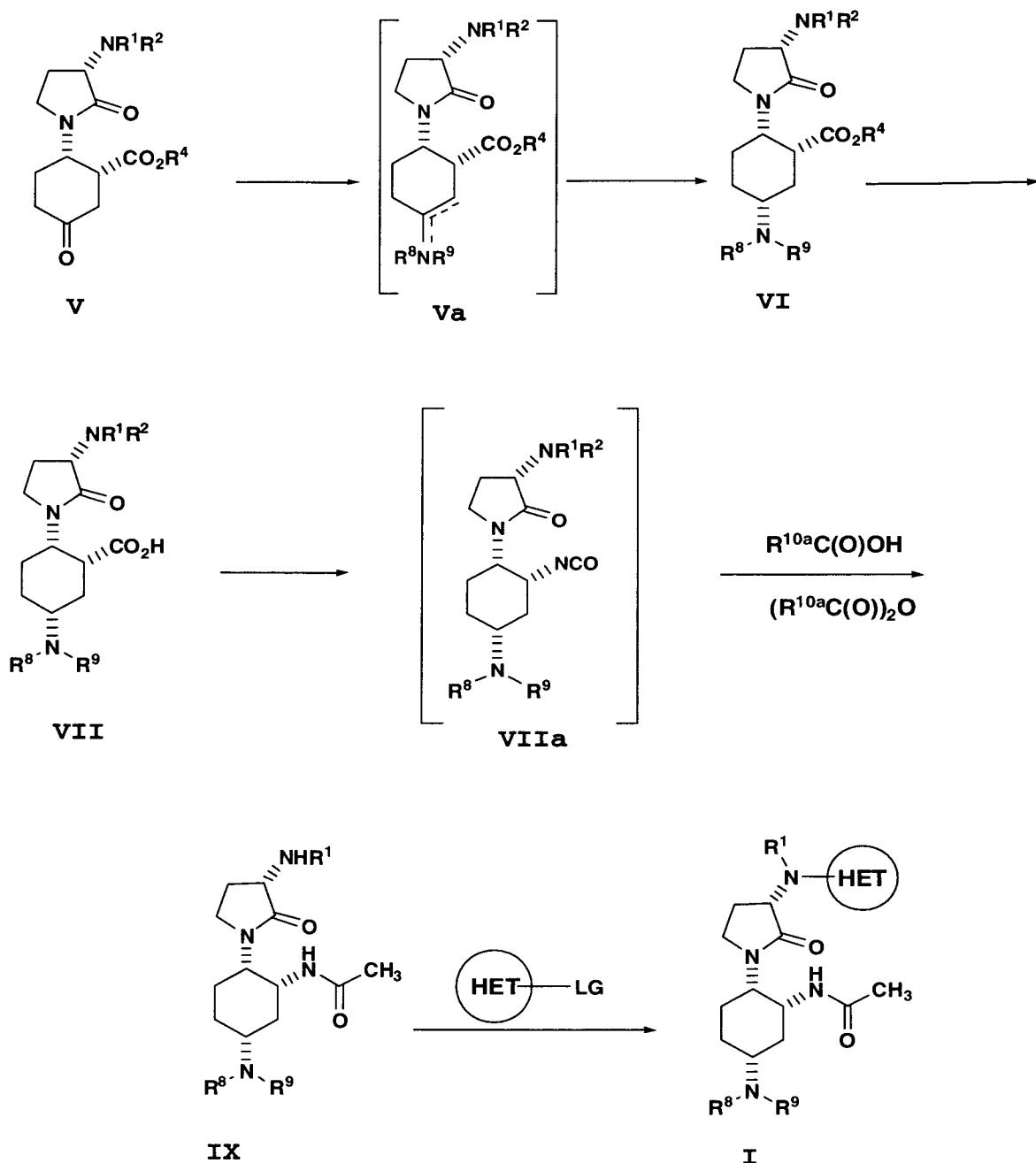
10 4-il 6-substituída , mais preferivelmente 6-trifluorometil-quinazolin-4-il); e

LG é um grupo de partida selecionado de halogênio ou OSO_2R_{16} (LG é preferivelmente a halogênio, mais preferivelmente cloro), em que R_{16} é C_{1-6} alquila, fenila, uma heteroarila de 5 a 7 membros tendo um ou mais átomos selecionados de N, S, ou O, ou uma cicloalquila de 3 a 7 membros, todos os

15 quais são opcionalmente substituídos (preferivelmente, substituintes opcionais para R_{16} são um a três grupos selecionados de halogênio, CF_3 e C_{1-6} alquil).

Em uma 28^a modalidade, a presente invenção fornece um novo processo alternativo para preparar um composto de fórmula I, ou um sal des-

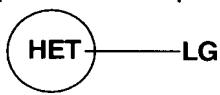
20 te:



o processo compreende as etapas de:

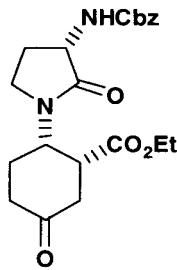
aminar redutivamente um composto de fórmula V com uma amina de Fórmula, NH(R⁸)(R⁹), para fornecer um composto de fórmula VI, redutivamente aminar compreendendo as etapas de:

- 5 (a) adicionar a amina e um agente de desidratação a um composto de fórmula V em um solvente aprótico em uma temperatura de cerca de 20° a cerca de +50 °C para formar o composto de imina/enamina de fórmula Va; e

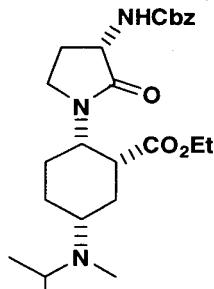
- (b) tratar uma solução do composto de imina/enamina de fórmula Va e um catalisador de paládio, 5% de Pt/S/C, com uma pressão de gás de hidrogênio para fornecer um composto de éster de fórmula VI;
- hidrolisar o composto de éster de fórmula VI para fornecer um composto de ácido de fórmula VII;
- 5 converter um composto de ácido de fórmula VII em um composto de isocianato de fórmula VIIa;
- adicionalmente fornecer um composto de isocianato de fórmula VIIa, opcionalmente *in situ*, a um agente de acilação, $(R^{10a}C(O))_2O$ na presença de seu ácido correspondente, $R^{10a}C(O)OH$ para fornecer o composto de amina protegida de fórmula IX;
- 10 desproteger o composto de amina protegida de fórmula IX para fornecer um composto de fórmula X; e
- desproteger o composto de amina protegida de fórmula IX para fornecer um composto de fórmula X; e
- acoplar um composto de fórmula X com um composto de fórmula
- 
- para fornecer um composto de fórmula I;
- em que:
- 15 R_1 e R_2 são independentemente hidrogênio ou um grupo de proteção de amina selecionado de um grupo carbobenzilóxi (Cbz), um terc-butiloxicarbonil (BOC), um grupo fluorenilmeloxicarbonila (FMOC), um grupo benzila (Bn), e um grupo p-metoxibenzila (PMB) (preferivelmente o grupo de proteção de amina é Cbz, Bn ou BOC, especialmente Cbz ou Bn);
- 20 R_4 é C_{1-6} alquila inferior ou uma benzila opcionalmente substituída por C_{1-4} alquila, C_{2-4} alquenila, halogênio, hidróxi, ciano, nitro, CF_3 , OC_{1-4} alquila, OCF_3 , e $C(=O)C_{1-4}$ alquila;
- R_8 e R_9 são independentemente hidrogênio ou C_{1-6} alquila;
- em que R^{10a} é independentemente C_{1-6} alquila ou benzila opcionalmente substituída (preferivelmente R^{10a} é metil);
- 25 HET é um anel heterociclo ou heteroarila de 3 a 14 membros opcionalmente substituído tendo um a quatro heteroátomos selecionados de N, O ou S (preferivelmente um a três heteroátomos, especialmente um a dois átomos de nitrogênio) em pelo menos um dos anéis (HET é preferivelmente quinazolin-

- 4-il 6-substituída , mais preferivelmente 6-trifluorometil-quinazolin-4-il); e
 LG é um grupo de partida selecionados de halogênio ou $\text{OSO}_2\text{R}_{16}$ (LG é preferivelmente a halogênio, mais preferivelmente cloro), em que R_{16} é C_{1-6} alquila, fenila, uma heteroarila de 5 a 7 membros tendo um ou mais átomos
 5 selecionados de N, S, ou O, ou uma cicloalquila de 3 a 7 membros, todos os quais são opcionalmente substituídos (preferivelmente, substituintes opcionais para R_{16} são um a três grupos selecionados de halogênio, CF_3 e C_{1-6} alquil).

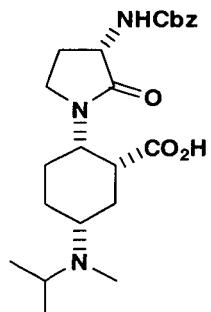
Em uma 29^a modalidade, a descrição fornece um processo de
 10 acordo com qualquer uma das seguintes modalidades em que:



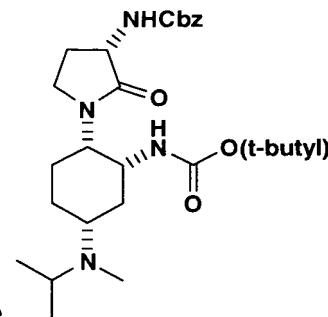
o composto de fórmula V é , ou um sal deste;



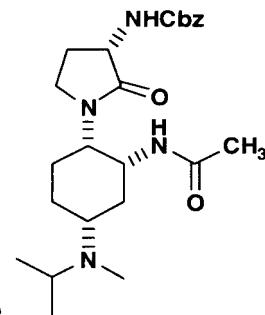
o composto de fórmula VI é , ou um sal deste;



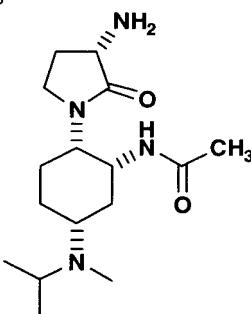
o composto de fórmula VII é , ou um sal deste (preferivelmente o sal de sódio);



o composto de carbamato de fórmula VIII é , ou um sal deste;



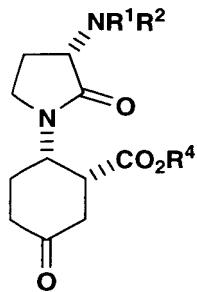
o composto de amina protegida de fórmula IX é , ou um sal deste;



o composto desprotegido de fórmula X é , ou um sal deste; e o composto de fórmula I é N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-

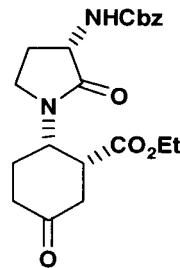
2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-
il)cicloexil)acetamida, ou um sal deste.

Em uma 30ª modalidade, a descrição fornece um composto de fórmula V, ou um sal deste:



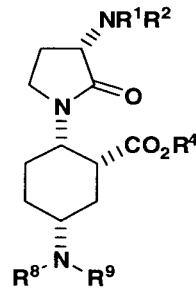
em que:

R^1 e R^2 são hidrogênio ou um grupo de proteção de amina selecionado de BOC, Cbz, ou benzila; e
 R^4 é C₁₋₆ alquila inferior.



Um composto preferido de fórmula V é , ou um sal deste.

5 Em uma 31^a modalidade, a descrição fornece um composto de fórmula VI, ou um sal deste:



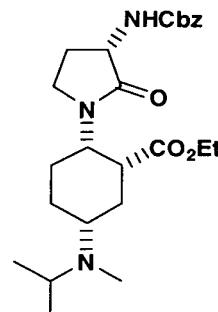
VI

em que:

R^1 e R^2 são independentemente hidrogênio ou um grupo de proteção de amina selecionado de BOC, Cbz, ou benzila; e

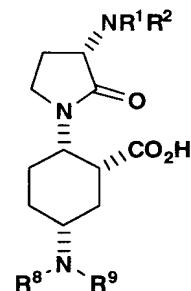
10 R^4 é C₁₋₆alquila; e

R^8 e R^9 são independentemente selecionados de hidrogênio ou C₁₋₆alquila.



Um composto preferido de fórmula VI é , ou um sal deste

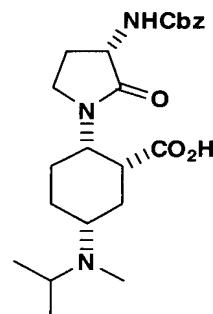
Em uma 32^a modalidade, a descrição fornece um composto de fórmula VII, ou um sal deste:



em que:

R¹ e R² são independentemente hidrogênio ou um grupo de proteção de amina selecionado de BOC, Cbz, ou benzila; e

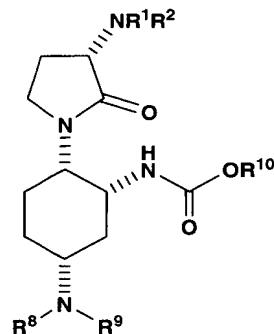
R⁸ e R⁹ são independentemente selecionados de hidrogênio ou C₁-6alquila.



Um composto preferido de fórmula VII é , ou um sal deste.

Sais preferíveis deste incluem os sais de álcali tais como o sal de sódio do composto de fórmula VII.

- 5 Em uma 33^a modalidade, a descrição fornece um composto de fórmula VII, ou um sal deste:



VIII

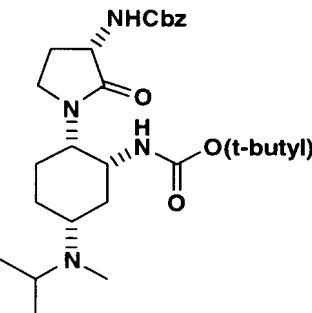
em que:

R¹ e R² são independentemente hidrogênio ou um grupo de proteção de amina selecionado de BOC, Cbz, ou benzila;

- 10 R⁸ e R⁹ são independentemente selecionados de hidrogênio ou C₁-6alquila;

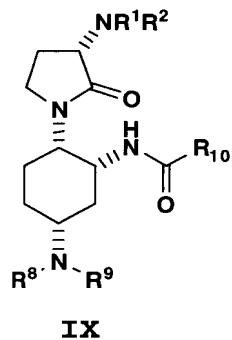
e

R_{10} é C₁-6alquila ou benzila.



Um composto preferido de fórmula VIII é , ou um sal deste.

Em uma 34^a modalidade, a descrição fornece um composto de fórmula IX, ou um sal deste:



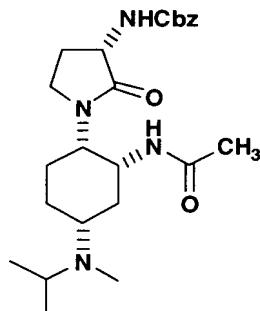
5 em que:

R^1 e R^2 são independentemente hidrogênio ou um grupo de proteção de amina selecionado de BOC, Cbz, ou benzila;

R^8 e R^9 são independentemente selecionados de hidrogênio ou C₁-6alquila;

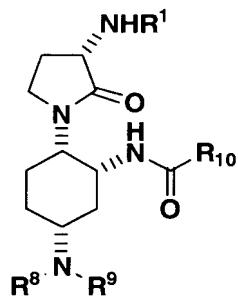
e

10 R_{10} é C₁-6alquila ou benzila opcionalmente substituído benzila.



Um composto preferido de fórmula IX é , ou um sal deste.

Em uma 35^a modalidade, a descrição fornece um composto de fórmula X, ou um sal deste:

**X**

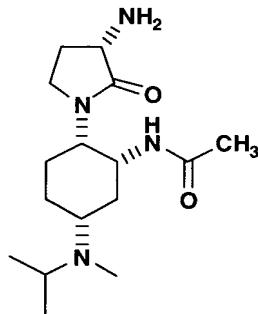
em que:

R¹ é independentemente hidrogênio ou um grupo de proteção de amina selecionado de BOC, Cbz, ou benzila;

R⁸ e R⁹ são independentemente selecionados de hidrogênio ou C₁-6alquila;

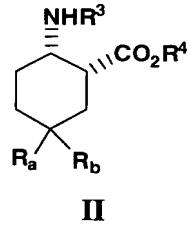
5 e

R₁₀ é C₁-6alquila ou benzila opcionalmente substituída.



Um composto preferido de fórmula X é , ou um sal deste.

Em uma 36^a modalidade, a descrição fornece um composto de fórmula II, ou um sal deste:

**II**

em que:

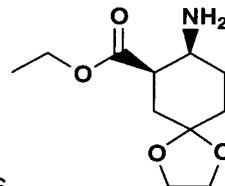
10 R_a e R_b juntamente com o átomo de carbono ao qual eles são ambos ligados combinam-se para formar um grupo 1,3-dioxolano ou carbonila (preferivelmente R_a e R_b juntamente com os átomos de carbono aos quais eles são ligados combinam-se para formar um grupo 1, 3-dioxolano);

R₁ é hidrogênio;

R₂ é Cbz;

R₃ é hidrogênio; e

R₄ é C₁₋₆alcóxi.



Um composto preferido de fórmula II is , ou um sal deste.

Sais preferíveis são os sais de toluenossulfonato ou hidrobrometo, especialmente o sal de toluenossulfonato.

Em uma 46^a modalidade, a descrição fornece um processo em

- 5 que um composto de fórmula I é N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida ou um sal deste.

A presente invenção pode ser apresentada de outras formas específicas sem afastar-se do espírito ou atributos essenciais desta. Desse modo, as modalidades acima não devem ser consideradas limitantes. Quaisquer e todas as modalidades da presente invenção podem ser consideradas em conjunção com qualquer outra modalidade ou modalidades para descrever modalidades adicionais. Cada elemento individual (por exemplo, aspectos preferidos ou especiais) das modalidades é sua própria modalidade independente. Além disso, qualquer elemento de uma modalidade destina-se a ser combinado com qualquer e todos os outros elementos de qualquer modalidade para descrever uma modalidade adicional. Além disso, a presente invenção abrange combinações de diferentes modalidades, partes de modalidades, definições, descrições, e exemplos da invenção observados aqui.

20 DEFINIÇÕES

Os seguintes são definições de termos utilizados nesta especificação e reivindicações anexas. A definição inicial fornecida para um grupo ou termo aqui se aplica àquele grupo ou termo por toda a especificação e reivindicações, individualmente, ou como parte de outro grupo, a menos que 25 de outro modo indicado.

O termo "alquila" refere-se a grupos hidrocarboneto de cadeia

linear ou ramificada tendo 1 a 12 átomos de carbono, preferivelmente 1 a 6 átomos de carbono. Quando os númeross aparecerem em um subscrito a-pós o símbolo "C", o subscrito define com maior especificidade o número de átomos de carbono que um particular grupo pode conter. Por exemplo, "C₁₋₆alquil" refere-se grupos alquila de cadeia linear ou ramificada com um a seis átomos de carbono, tais como metila, etila, n-propila, isopropila, n-butila, t-butila, n-pentila, e assim por diante. O subscrito "0" refere-se a uma ligação. Desse modo, o termo hidróxi(C₀₋₂)alquila ou (C₀₋₂)hidroxialquila inclui hidróxi, hidroximetila e hidroxietila. Grupos alquila podem ser substituídos com um a três grupos selecionados de (C₁₋₆)alquila, (C₂₋₆)alquenila, hidróxi, halogênio, ciano, nitro, CF₃, O(C₁₋₆alquil), OCF₃, C(=O)H, C(=O)(C₁₋₆alquil), CO₂H, CO₂(C₁₋₆alquil), NHCO₂(C₁₋₆alquil), -S(C₁₋₆alquil), NH₂, NH(C₁₋₆alquil), N(C₁₋₆alquil)₂, N(CH₃)₃⁺, SO₂(C₁₋₆alquil), C(=O)(C₁₋₄alquíleno)NH₂, C(=O)(C₁₋₄alquíleno)NH(alquil), C(=O)(C₁₋₄alquíleno)N(C₁₋₄alquil)₂, C₃₋₇cicloalquila, feni-15 la, benzila, feniletila, fenilóxi, benzilóxi, naftila, um heterociclo de quatro a sete membros, e/ou uma heteroarila de cinco a seis membros. Quando uma alquila substituída for substituída com um grupo arila, heterociclo, cicloalquila, ou heteroarila, os referidos sistemas anelados são como definidos abaixo e desse modo têm zero, um, dois, ou três substituintes, também como definido abaixo.

Quando o termo "alquila" é utilizado juntamente com outro grupo, tal como em "arilalquila", esta conjução define com maior especificidade pelo menos um dos substituintes que a alquila substituída conterá. Por exemplo, "arilalquil" refere-se a um grupo alquila substituída como acima definido em que pelo menos um dos substituintes é uma arila, tal como benzila. Desse modo, o termo aril(C₀₋₄)alquila inclui uma alquila inferior substituída tendo pelo menos um substituinte de arila e também inclui uma arila diretamente ligada a outro grupo, *isto é*, aril(C₀)alquila.

O termo "alquenila" refere-se a grupos hidrocarboneto de cadeia linear ou ramificada tendo 2 a 12 átomos de carbono e pelo menos uma ligação dupla. Grupos alquenila de 2 a 6 átomos de carbono e tendo uma ligação dupla são mais preferidos. Grupos alquenila podem ser substituídos co-

mo acima descrito para grupos alquila.

O termo "alquinil" refere-se a grupos hidrocarboneto de cadeia linear ou ramificada tendo 2 a 12 átomos de carbono e pelo menos uma ligação tripla. Grupos alquinila de 2 a 6 átomos de carbono e tendo uma ligação tripla são mais preferidos. Grupos alquinila podem ser substituídos como acima descrito para grupos alquila.

O termo "alquíleno" refere-se a grupos hidrocarboneto de cadeia linear ou ramificada bivalentes tendo 1 a 12 átomos de carbono, preferivelmente 1 a 8 átomos de carbono, por exemplo, $\{-\text{CH}_2-\}_n$, em que n é 1 a 12, preferivelmente 1-8. Grupos alquíleno inferior, isto é, grupos alquíleno de 1 a 2 átomos de carbono, são mais preferidos. Os termos "alqueníleno" e "alquiníleno" referem-se a radicais bivalentes de grupos alquenila e alquinila, respectivamente, como acima definido. Grupos alqueníleno podem ser substituídos como acima descrito para grupos alquila.

O termo "alcóxi" refere-se a um átomo de oxigênio substituído por alquila, como definido aqui. Por exemplo, o termo "alcóxi" ou inclui o grupo $-\text{O}-\text{C}_{1-6}\text{-alquila}$.

Quando o subscrito for utilizado com referência a um alcóxi, tioalquila ou aminoalquila, o subscrito refere-se ao número de átomos de carbono que o grupo pode conter além dos heteroátomos.

Deve-se entender que as seleções para todos os grupos, incluindo por exemplos, alcóxi, tioalquila, e aminoalquila, serão feitas por alguém versado no campo para fornecer compostos estáveis.

O termo "carbonila" refere-se a um grupo carbonila bivalente $\tilde{\text{C}}(\text{=O})$.

O termo "acila" refere-se a um grupo carbonila ligado a um radical orgânico, mais particularmente, o grupo $\text{C}(\text{=O})\text{R}_e$, bem como o grupo bivalente $\tilde{\text{C}}(\text{=O})\tilde{\text{R}}_e$, que são ligados aos radicais orgânicos. O grupo R_e pode ser selecionado de alquila, alquenila, alquinila, cicloalquila, heterociclo, arila, ou heteroarila como definido aqui, ou quando apropriado, o grupo bivalente correspondente, por exemplo, alquíleno.

O termo "cicloalquila" refere-se a anéis hidrocarboneto totalmen-

te saturado ou parcialmente insaturado (e, portanto, inclui "anéis cicloalquenila") de 3 a 9, preferivelmente 3 a 7 átomos de carbono. O termo "cicloalquil" inclui tais anéis tendo zero, um, dois, ou três substituintes selecionados de (C₁₋₄)alquila, (C₂₋₄)alquenila, halogênio, hidróxi, ciano, nitro, CF₃, O(C₁₋₄alquil), OCF₃, C(=O)H, C(=O)(C₁₋₄alquil), CO₂H, CO₂(C₁₋₄alquil), NHCO₂(C₁₋₄alquil), S(C₁₋₄alquil), NH₂, NH(C₁₋₄alquil), N(C₁₋₄alquil)₂, N(C₁₋₄alquil)₃⁺, SO₂(C₁₋₄alquil), C(=O)(C₁₋₄alquíleno)NH₂, C(=O)(C₁₋₄alquíleno)NH(alquil), e/ou C(=O)(C₁₋₄alquíleno)N(C₁₋₄alquil)₂. O termo "cicloalquil" também inclui tais anéis tendo um segundo anel fundido a estes (por exemplo, incluindo anéis benzo, heterociclo, ou heteroarila) ou tendo uma ligação em ponte de carbono-carbono de 3 a 4 átomos de carbono.

O termo "halo" ou "halogênio" refere-se a cloro, bromo, fluoro e iodo.

O termo "haloalquila" significa uma alquila substituída tendo um ou mais substituintes de halo. Por exemplo, "haloalquila" inclui mono, bi, e trifluorometila.

O termo "haloalcóxi" significa um grupo alcóxi tendo um ou mais substituintes de halo. Por exemplo, "haloalcóxi" inclui OCF₃.

O termo "heteroátomos" deve incluir oxigênio, enxofre e nitrogênio.

O termo "arila" refere-se a fenila, bifenila, fluorenila, 1-naftila e 2-naftila. O termo "aril" inclui tais anéis tendo zero, um, dois ou três substituintes selecionados de (C₁₋₄)alquila, (C₂₋₄)alquenila, halogênio, hidróxi, ciano, nitro, CF₃, O(C₁₋₄alquil), OCF₃, C(=O)H, C(=O)(C₁₋₄alquil), CO₂H, CO₂(C₁₋₄alquil), NHCO₂(C₁₋₄alquil), S(C₁₋₄alquil), NH₂, NH(C₁₋₄alquil), N(C₁₋₄alquil)₂, N(C₁₋₄alquil)₃⁺, SO₂(C₁₋₄alquil), C(=O)(C₁₋₄alquíleno)NH₂, C(=O)(C₁₋₄alquíleno)NH(alquil), e/ou C(=O)(C₁₋₄alquíleno)N(C₁₋₄alquil)₂.

Os termos "heterociclo" ou "heterocíclico" referem-se a anéis substituídos e não substituídos não aromáticos (que podem ser parcialmente ou totalmente saturados) de 3 a 15 membros tendo um a quatro heteroátomos. Tais anéis podem ser grupos monocíclicos de 3 a 7 membros, grupos bicíclicos de 7 a 11 membros, e grupos tricíclicos de 10 a 15 membros. Cada

anel do grupo heterociclo contendo um heteroátomo pode conter um ou dois átomos de oxigênio ou enxofre e/ou de um a quatro átomos de nitrogênio contanto que o número total de heteroátomos em cada anel seja quatro ou menos, e também contanto que o anel contenha pelo menos um átomo de carbono. Os anéis fundidos completando grupos bicíclicos ou tricíclicos podem conter apenas átomos de carbono e podem ser saturados, parcialmente saturados, ou insaturados. Os átomos de nitrogênio e enxofre podem opcionalmente ser oxidados e os átomos de nitrogênio podem opcionalmente ser quaternizados. O grupo heterociclo pode ser ligado por meio de qualquer átomo de nitrogênio ou carbono disponível. O anel heterociclo pode conter zero, um, dois ou três substituintes selecionados de (C₁₋₄)alquila, (C₂₋₄)alquenila, halogênio, hidróxi, ciano, nitro, CF₃, O(C₁₋₄alquil), OCF₃, C(=O)H, C(=O)(C₁₋₄alquil), CO₂H, CO₂(C₁₋₄alquil), NHCO₂(C₁₋₄alquil), S(C₁₋₄alquil), NH₂, NH(C₁₋₄alquil), N(C₁₋₄alquil)₂, N(C₁₋₄alquil)₃⁺, SO₂(C₁₋₄alquil), C(=O)(C₁₋₄alquíleno)NH₂, C(=O)(C₁₋₄alquíleno)NH(alquil), e/ou C(=O)(C₁₋₄alquíleno)N(C₁₋₄alquil)₂. Grupos heterocíclicos exemplares incluem azetidinila, pirrolidinila, oxetanila, imidazolinila, oxazolidinila, isoxazolinila, tiazolidinila, isotiazolidinila, tetraidrofuranila, piperidila, piperazinila, 2-oxopiperazinila, 2-oxopiperidila, 2-oxopirrolodinila, 2-oxoazepinila, azepinila, 4-piperidonila, 20 tetraidropiranila, morfolinila, tiamorfolinila, sulfóxido de tiamorfolinila, sulfona tiamorfolinila, 1,3-dioxolano, quinuclidinila, tetraidro-1,1-dioxotienila e similares.

O termo "heteroaril" refere-se a anéis de 3 a 14 membros substituídos e não substituídos aromáticos tendo um a quatro heteroátomos selecionados de O, S, ou N em pelo menos um dos anéis. Os referidos anéis podem ser grupos monocíclicos de 5 ou 6 membros, grupos bicíclicos de 9 ou 10 membros, e grupos tricíclicos de 11 a 14 membros. Cada anel do grupo heteroarila contendo um heteroátomo pode conter um ou dois átomos de oxigênio ou enxofre e/ou de um a quatro átomos de nitrogênio contanto que o número total de heteroátomos em cada anel seja quatro ou menos e cada anel tenha pelo menos um átomo de carbono. Os anéis fundidos completando os grupos bicíclicos ou tricíclicos podem conter apenas átomos de carbo-

no e podem ser saturados, parcialmente saturados, ou insaturados. Os átomos de nitrogênio e enxofre podem opcionalmente ser oxidados e os átomos de nitrogênio podem opcionalmente ser quaternizados. Grupos hteroorila que são bicíclicos ou tricíclicos devem incluir pelo menos um anel totalmente aromático, porém o outro anel ou anéis fundidos podem ser aromáticos ou não aromáticos. O grupo heteroarila pode ser ligado em qualquer átomo de nitrogênio ou carbono disponível de qualquer anel. O sistema de anel heteroarila pode conter zero, um, dois ou três substituintes selecionados de (C_{1-4})alquila, (C_{2-4})alquenila, halogênio, hidróxi, ciano, nitro, CF_3 , $O(C_{1-4}alquil)$, OCF_3 , $C(=O)H$, $C(=O)(C_{1-4}alquil)$, CO_2H , $CO_2(C_{1-4}alquil)$, $NHCO_2(C_{1-4}alquil)$, $S(C_{1-4}alquil)$, NH_2 , $NH(C_{1-4}alquil)$, $N(C_{1-4}alquil)_2$, $N(C_{1-4}alquil)_3^+$, $SO_2(C_{1-4}alquil)$, $C(=O)(C_{1-4}alquíleno)NH_2$, $C(=O)(C_{1-4}alquíleno)NH(alquil)$, e/ou $C(=O)(C_{1-4}alquíleno)N(C_{1-4}alquil)_2$.

Grupos heteroarila exemplares incluem pirrolila, pirazolila, pirazolinila, imidazolila, oxazolila, isoxazolila, tiazolila, tiadiazolila, isotiazolila, furanila, tienila, oxadiazolila, piridila, pirazinila, pirimidinila, piridazinila, triazinila, indolila, benzotiazolila, benzodioxolila, benzoxazolila, benzotienila, quinolinila, tetraidroisoquinolinila, isoquinolinila, benzimidazolila, benzopiranila, indolizinila, benzofuranila, chromonila, cumarinila, benzopiranila, cinnolinila, quinoxalinila, indazolila, pirrolopiridila, furopiridila, diidroisoindolila, tetraidroquinolinila e similares. Grupos particulares heteroarila incluem, por exemplo, quinazolin-4-il e 6-trifluorometil-quinazolin-4-ila 6-substituída.

Onde um é opcionalmente substituído, deve-se incluir grupos substituídos e não substituídos.

Os compostos aqui descritos podem ter centros assimétricos. Os compostos da presente invenção contendo um átomo assimetricamente pode ser isolado em formas oticamente ativas ou racêmicas. É bem conhecido na técnica que para preparar formas oticamente ativas, tais como por resolução de formas racêmicas ou por síntese de materiais de partida. Muitos isômeros geométricos de oleofinas, ligações duplas de $C=N$, e similares podem também estar presentes nos compostos descritos aqui, e todos os tais isômeros estáveis são contemplados na presente invenção. Isômeros geo-

métricos cis e trans dos compostos da presente invenção são descritos e podem ser isolados como uma mistura de isômeros ou como formas isoméricas separadas. Todas as formas racêmicas, diastereoméricas, quirais e todas as formas isoméricas geométricas de uma estrutura são pretendidas, a 5 menos que a estereoquímica específica ou forma isomérica seja especificamente indicada.

Um enantiômero de compostos descritos aqui pode exibir uma atividade superior comparada com o outro. Desse modo, todas as estereoquímicas são consideradas serem uma parte da presente invenção. Quando 10 requirida, a separação do material racêmico pode ser obtida por HPLC utilizando uma coluna quiral ou por uma resolução utilizando um agente de resolução tal como sal de cloreto canfônico como em Steven D. Young e outro, *Antimicrobial Agents e Chemotherapy*, 1995, 2602-2605.

A frase "farmaceuticamente aceitável" é empregada aqui para 15 referir-se àqueles compostos, materiais, composições, e/ou formas de dosagem que estão, no escopo de diagnóstico médico seguro, adequadas para uso em contato com tecidos de seres humanos e animais sem toxicidade excessiva, irritação, resposta alérgica, ou outro problema ou complicações, comensurado com uma relação benefício/risco razoável.

Como utilizado aqui, "sais farmaceuticamente aceitáveis" refere-se a derivados dos compostos descritos em que o composto origem é modificado por preparação de sais de ácido ou base destes. Exemplos de sais farmaceuticamente aceitáveis incluem, porém não estão limitados a, sais minerais ou orgânicos de resíduos básicos tais como aminas; sais de álcali 20 ou orgânicos de resíduos acídicos tais como ácidos carboxílicos; e similares. Os sais farmaceuticamente aceitáveis incluem os sais não tóxicos convencionais ou os sais de amônio quartenário do composto origem formado, por exemplo, de ácidos inorgânicos ou orgânicos não tóxicos. Por exemplo, tais sais não tóxicos convencionais incluem aqueles derivados de ácidos inorgânicos tais como hidroclóricos, benzenossulfônicos, hidrobrônicos, sulfúricos, sulfâmicos, fosfóricos, nítricos e similares; e os sais preparados de ácidos 25 orgânicos tais como acéticos, propiônicos, sucínico, glicólicos, esteáricos,

lácticos, málicos, tartáricos, cítricos, ascórbicos, pamóicos, maléicos, hidroximaléicos, fenilacéticos, glutâmicos, benzóicos, salicílicos, sulfanílicos, 2-acetoxibenzóicos, fumáricos, toluenossulfônicos, metanossulfônicos, etano-dissulfônicos, oxálicos, isetiônicos, e similares.

5 Os sais farmaceuticamente aceitáveis da presente invenção podem ser sintetizados do composto origem que contém uma porção básica ou ácida por métodos químicos convencionais. Geralmente, tais sais podem ser preparados reagindo o ácido livre ou formas de base destes compostos com uma quantidade estequiométrica da base apropriada ou ácido em água ou
10 em um solvente orgânico, ou em uma mistura dos dois; geralmente, meios não aquosos tipo éter, acetato de etila, etanol, isopropanol, ou acetonitrilo são preferidos. As listas dos sais adequados são encontradas na *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17^a edição, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, p. 1418, a descrição das quais é pelo presente incorporado
15 aqui por referência.

Visto que os fármacos são conhecidos para alcançar qualidades desejáveis numerosas de farmacêuticos (por exemplo, solubilidade, disponibilidade, fabricação, etc...) os compostos da presente invenção podem ser liberados em forma de fármaco. Desse modo, a presente invenção destina-
20-se a abranger fármacos dos compostos atualmente reivindicados, métodos de liberação dos mesmos e composições contendo os mesmos. Os "fármacos" destinam-se a incluir qualquer portador covalentemente ligado que libera um fármaco origem ativo da presente invenção *in vivo* quando tal fármaco é administrado a um paciente mamífero. Os fármacos na presente invenção
25 são preparados modificando grupos funcionais presentes no composto de tal maneira que as modificações sejam clivadas, em manipulação de rotina ou *in vivo*, para o composto origem. Os fármacos incluem compostos da presente invenção em que um grupo hidróxi, amino, ou sulfonila é ligado a qualquer grupo que, quando o fármaco da presente invenção é administrado
30 a um paciente mamífero, cliva para formar uma hidroxila livre, amino livre, ou grupo sulfidrina livre, respectivamente. Exemplos de fármaco incluem, porém não são limitados a, derivados de acetato, formato e benzoato de álcool e

grupos funcionais de amina nos compostos da presente invenção.

"Composto estável" e "estrutura estável" destinam-se indicar um composto que é suficientemente forte para sobreviver ao isolamento a um grau útil de pureza de uma mistura reacional, e formulação em um agente terapêutico eficaz. A presente invenção destina-se representar compostos estáveis.

"Quantidade terapeuticamente eficaz" destina-se incluir uma quantidade de um composto da presente invenção apenas ou uma quantidade da combinação dos compostos reivindicados ou uma quantidade de um composto da presente invenção em combinação com outros ingredientes ativos eficazes para inibir MCP-1 ou eficazes para tratar ou prevenir distúrbios como descrito aqui.

Como utilizado aqui, "tratar" ou "tratamento" abrange o tratamento de um estado da doença em um mamífero, particularmente em um humano, e inclui: (a) prevenir o estado da doença de ocorrência em um mamífero, em particular, quando tal mamífero é pré-disposto ao estado da doença, porém não sendo ainda diagnosticado como tendo ela; (b) inibir o estado da doença, isto é, interrompendo seu desenvolvimento; e/ou (c) aliviar o estado da doença, isto é, causando regressão do estado da doença.

Os nomes utilizados aqui para designar uma forma específica, por exemplo, "N-2", não devem ser considerados limitantes com relação a qualquer outra possuindo características químicas e físicas idênticas ou similares, exceto de preferência deve-se entender que estas designações são identificadores que devem ser interpretados de acordo a informação de caracterização também presente aqui.

A presente invenção fornece formas cristalinas de uma base livre de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida como um material novo, em particular, em uma forma farmaceuticamente aceitável. Em certas modalidades preferidas, formas cristalinas de uma base livre são em forma substancialmente pura. Modalidades preferidas de uma base livre são descritas nos exemplos como o N-2, DC-1, THOO-1, E-1, A-1, e AN-3.

A presente invenção também fornece formas cristalinas e sais de

N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida como um material novo, em particular, em uma forma farmaceuticamente aceitável. Em certas modalidades preferidas, formas cristalinas dos sais são em forma substancialmente pura. Modalidades preferidas dos sais são descritas nos exemplos como a forma N-1 do sal de ácido di-benzenosulfônico e a forma H4-1 do sal de HCl.

Como utilizado aqui "polimorfo" refere-se a formas cristalinas tendo a mesma composição química, porém disposições espaciais diferentes das moléculas, átomos, e/ou íons formando cristal.

Como utilizado aqui "solvato" refere-se a uma forma cristalina de uma molécula, átomo, e/ou íons que também contém moléculas de um solvente ou solventes incorporados na estrutura cristalina. As moléculas de solvente no solvato podem estar presentes em uma disposição regular e/ou uma disposição não ordenada. O solvato pode compreender uma quantidade estequiométrica ou não estequiométrica das moléculas de solvente. Por exemplo, um solvato com uma quantidade não estequiométrica das moléculas de solvente pode resultar da perda parcial de solvente do sulfato.

Como utilizado aqui "amorfo" refere-se a uma forma sólida de uma molécula molécula, átomo, e/ou íons que não é cristalina. Um amorfó sólido não exibe um modelo de difração de raio X definitivo.

Como utilizado aqui, "substancialmente puro", quando utilizado na referência a uma forma cristalina, significa um composto tendo uma pureza maior do que 90% em peso, incluindo maior do que 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 e 99 % em peso, e também incluindo igual a cerca de 100% em peso de composto I, com base no peso do composto. O material restante compreende outras forma(s) do composto, e/ou impurezas de reação e/ou processar impurezas originando sua preparação. Por exemplo, uma forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, base livre ou sal, pode ser julgada substancialmente pura em que ela tenha uma pureza maior do que 90% em peso, como medido por meios que são neste

tempo conhecido e geralmente aceitos na técnica, em que o restante menor do que 10% em peso de material compreende outra forma(s) de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, base livre ou sal, e/ou impurezas de reação e/ou processando impurezas.

As amostras das formas cristalinas podem ser fornecidas com homogeneidade de fase substancialmente pura, indicando a presença de uma quantidade dominante de uma forma cristalina pura e opcionalmente quantidades menores de uma ou mais outras formas cristalinas. A presença de mais do que uma forma cristalina em uma amostra pode ser determinada por técnicas tais como difração de pó de raio X (PXRD) ou espectroscopia de ressonância magnética nuclear de estado sólido (SSNMR). Por exemplo, a presença de picos extras na comparação de um modelo PXRD experimentalmente medido com um modelo PXRD simulado podem indicar mais do que uma forma cristalina na amostra. O PXRD simulado pode ser calculado de dados de raio X de crystal simples. Veja Smith, D.K., "A FORTRAN Program for Calculating X-Ray Powder Diffraction Patterns," Lawrence Radiation Laboratory, Livermore, California, UCRL-7196 (April 1963).

Preferivelmente, a forma cristalina tem homogeneidade de fase substancialmente pura como indicado por menos do que 10%, preferivelmente menos do que 5%, e mais preferivelmente menos do que 2% da área de pico total no modelo PXRD experimentalmente medido originando os picos extras que estão ausentes do modelo PXRD simulado. Mais preferido é uma forma cristalina tendo homogeneidade de fase substancialmente pura com menos do que 1% da área de pico total no modelo PXRD experimentalmente medido originando os picos extras que estão ausentes do modelo PXRD simulado.

Procedimentos para a preparação de formas cristalinas são conhecidos na técnica. As formas cristalinas podem ser preparadas por uma variedade de métodos, incluindo, por exemplo, cristalização ou recristalização de um solvente adequado, sublimação, desenvolvimento de uma fusão, transformação do estado sólido de outra fase, cristalização de um fluído super-crítico, e va-

porização a jato. As técnicas para cristalização ou recristalização de formas cristalinas de uma mistura de solvente incluem, por exemplo, evaporação do solvente, diminuição da temperatura da mistura de solvente, cristal semeando uma mistura super-saturada de solvente da molécula e/ou sal, dessecamento a frio da mistura de solvente, e adição de anti-solventes (contra solventes) à mistura de solvente.

As formas podem ser caracterizadas e distinguidas utilizando difração de raio X de cristal simples, que é com base em medições de célula unitária de um cristal simples de uma forma em uma temperatura analítica fixada. Uma descrição detalhada de células unitárias é fornecida em Stout & Jensen, *X-Ray Structure Determination: A Practical Guide*, Macmillan Co., Nova Iorque (1968), Capítulo 3, que é incorporado aqui por referência. Alternativamente, a disposição única de átomos em relação parcial dentro da estrutura cristalina pode ser caracterizada de acordo com as coordenadas atômicas fracionais observadas. Outros meios de caracterização da estrutura cristalina é por análise de difração de pó de raio X em que o perfil de difração experimental ou observado é comparado a um perfil simulado representando material em pó puro, ambos conduzidos na mesma temperatura analítica, e medições para a forma de paciente caracterizada como uma série de valores 20 21.

Outros meios de caracterização da forma podem ser utilizados, tais como ressonância magnética nuclear de estado sólido (SSNMR), calorimetria de varredura diferencial e análise termogravimétrica. Estes parâmetros podem também ser utilizados em combinação para caracterizar a forma 25 de paciente.

O termo "perda de peso insignificante," como empregado aqui, como caracterizado por TGA indica a presença de uma forma de cristal de gado vacum (não solvatada).

O termo "% de captação de água insignificante," como empregado aqui, como caracterizado por isotermia de sorção de umidade indica que a forma testada não é hidroscópica.

Em uma modalidade da invenção, uma forma cristalina de N-

((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, base livre ou sal, é fornecida em forma substancialmente pura. Esta forma cristalina pode ser empregada em composições farmacêuticas que podem opcionalmente incluir um ou mais outros componentes selecionados, por exemplo, do grupo consistindo de excipientes, portadores, e um dos outros ingredientes farmacêuticos ativos ou entidades químicas ativas de estruturas moleculares diferentes.

Preferivelmente, a forma cristalina tem homogeneidade de fase substancialmente pura como indicado por menos do que 10%, preferivelmente menos do que 5%, e mais preferivelmente menos do que 2% da área de pico total no modelo PXRD experimentalmente medido originando os picos extras que estão ausentes do modelo PXRD simulado. A forma mais preferida é a cristalina tendo homogeneidade de fase substancialmente pura com menos do que 1% da área de pico total no modelo PXRD experimentalmente medido originando os picos extras que estão ausentes do modelo PXRD simulado.

Em outra modalidade, uma composição é fornecida consistindo essencialmente das formas cristalinas de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, base livre ou sal. A composição desta modalidade pode compreender pelo menos 90% em peso da forma, com base no seu peso na composição.

A presença de impurezas de reação e/ou processamento de impurezas pode ser determinada por técnicas analíticas conhecidas na técnica, tal como, por exemplo, cromatografia, espectroscopia de ressonância magnética nuclear, espectrometria de massa ou espectroscopia de infravermelho.

Formas cristalinas podem ser preparadas por uma variedade de métodos, incluindo por exemplo, cristalização ou recristalização de um solvente adequado, sublimação, desenvolvimento de uma fusão, transformação do estado sólido de outra fase, cristalização de um fluído super-crítico, e va-

porização a jato. Técnicas para cristalização ou recristalização de formas cristalinas de uma mistura de solvente incluem, por exemplo, evaporação do solvente, diminuição da temperatura da mistura de solvente, cristal semeando uma mistura de solvente supersaturada da molécula e/ou sal, dessecamento a frio da mistura de solvente, e adição dos anti-solventes (contrasolventes) à mistura de solvente. Técnicas de cristalização de alta produção podem ser empregadas para preparar formas cristalinas incluindo poliformos.

Os cristais de fármacos, incluindo poliformos, métodos de preparação, e caracterização de cristais de fármaco são descritos no Solid-State Chemistry of Drugs, S.R. Byrn, R.R. Pfeiffer, e J.G. Stowell, 2nd Edition, SSCI, West Lafayette, Indiana (1999).

Para técnicas de cristalização que empregam solvente, a escolha de solvente ou solventes é tipicamente dependente de um ou mais fatores, tais como solubilidade do composto, técnica de cristalização, e pressão a vapor do solvente. As combinações de solventes podem ser empregadas; por exemplo, o composto pode ser solubilizado em um solvente primário para fornecer uma solução, seguido pela adição de um anti-solvente para diminuir a solubilidade do composto na solução e para fornecer a formação de cristais. Um "anti-solvente" é um solvente em que o composto tem baixa solubilidade. Os solventes adequados para preparar cristais incluem solventes polares e não polares.

Em um método para preparar cristais, N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, base livre ou sal, é suspenso e/ou agitado em um solvente adequado para fornecer uma suspensão, que pode ser aquecida para promover dissolução. O termo "suspenso," como utilizado aqui, significa uma solução saturada, que pode também conter uma quantidade adicional do sólido para fornecer a mistura heterogênea em uma determinada temperatura. Os solventes adequados a este respeito incluem, por exemplo, solventes apróticos polares e solventes próticos polares, e misturas de duas ou mais destes, como descrito aqui.

Os cristais semeados podem ser adicionados a qualquer mistura de cristalização para promover cristalização. Como será claro para o técnico versado, a semeação é utilizada como um meio de controle do desenvolvimento de uma forma cristalina particular ou como um meio de controle da distribuição de tamanho de partícula do produto cristalino. Consequentemente, o cálculo da quantidade de sementes necessárias dependem do tamanho da semente disponível e o tamanho desejado de uma partícula de produto média como descrito, por exemplo, no "Programmed cooling of batch crystallizers," J.W. Mullin e J. Nyvlt, Chemical Engineering Science (1971) 26:369-377. Em geral, sementes de tamanho pequeno são necessárias para eficazmente controlar o desenvolvimento de cristais na batelada. As sementes de tamanho pequeno podem ser geradas por peneiração, moagem, ou micronização de cristais grandes, ou por micro-cristalização de soluções. Cuidado deve ser tomado para que a moagem ou micronização de cristais não resulte em qualquer mudança na cristalinidade da forma de cristal desejado (isto é, mudança para amorfos ou para outro polímero).

Uma mistura resfriada pode ser filtrada sob vácuo, e os sólidos isolados podem ser lavados com um solvente adequado, tais como solvente de recristalização frio, e secada sob purga de nitrogênio para fornecer a forma cristalina desejada. Os sólidos isolados podem ser analisados por uma técnica analítica ou espectroscópica adequada, tais como SSNMR, DSC, PXRD, ou similares, para assegurar formulação da forma cristalina preferida forma do produto. A forma cristalina resultante é tipicamente produzida em uma quantidade maior do que cerca de 70% em peso de produção isolada, porém preferivelmente maior do que 90% em peso com base no peso de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, base livre ou sal, originalmente empregada no procedimento de cristalização. O produto pode ser co-moído ou passado através de uma tela de malha para desagregar o produto, se necessário.

Formas cristalinas podem ser preparadas diretamente do meio de reação da etapa de processo final para preparar N-((1R,2S,5R)-5-

(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, base livre ou sal. Isto pode ser obtido, por exemplo, empregando na etapa de processo final um solvente ou mistura de solventes das quais o composto pode ser cristalizado. Alternativamente, formas cristalinas podem ser obtidas por destilação ou técnicas de adição de solvente. Solventes adequados para este propósito incluem qualquer daqueles solventes descritos aqui, incluindo solventes polares próticos, tais como álcoois, e solventes polares apróticos, tais como cetonas.

Por meio de orientação geral, a mistura de reação pode ser filtrada para remover qualquer impureza não desejada, sais inorgânicos, e similares, seguido por lavagem com solvente de reação ou cristalização. A solução resultante pode ser concentrada para remover excesso de solvente ou constituintes. Se destilação é empregada, a quantidade final de destilado coletada pode variar, dependendo dos fatores de processo incluindo, por exemplo, tamanho de vaso, capacidade de agitação, e similares. Por meio de orientação geral, o solução de reação pode ser destilada a cerca de 1/10 do volume original antes da substituição de solvente ser realizada. A reação pode ser amostrada e ensaiada para determinar a extensão da reação e o produto % em peso de acordo com técnicas de processo padrão. Se desejado, solvente de reação adicional pode ser adicionado ou removido para otimizar concentração de reação. Preferivelmente, a concentração final é ajustada a cerca de 50 % em peso em cujo ponto uma suspensão tipicamente resulta.

Pode ser preferível adicionar solventes diretamente ao vaso de reação sem destilar a mistura de reação. Solventes preferidos para este propósito são aqueles que podem ultimamente participar na treliça cristalina, como descritos acima na coneção com permuta de solvente. Ainda que a concentração final possa variar dependendo da pureza desejada, recuperação e similares, a concentração final de a base livre na solução é preferivelmente abaixo de 4% a cerca de 7%. A mistura de reação pode ser agitada seguindo adição de solvente e simultaneamente aquecida. Por meio de ilustração, a mistura de reação pode ser agitada durante cerca de 1 hora enquanto aquecendo a cerca de 70°C. A reação é preferivelmente filtrada

quente e lavada com o solvente de reação, o solvente adicionado ou uma combinação destes. Cristais de semente podem ser adicionados a qualquer solução de cristalização para iniciar cristalização.

As várias formas descritas aqui podem ser distinguíveis de uma outra através do uso de várias técnicas analíticas conhecidas por alguém versado na técnica. Tais técnicas incluem, porém não são limitadas a, difração de pó de raio X (PXRD), calorimetria de varredura diferencial (DSC) e/ou análise termogravimétrica (TGA). Alternativamente, as formas podem ser caracterizadas e distinguidas utilizando difração de raio X de cristal simples, que é com base em medições de célula unitária de um cristal simples de uma determinada forma em uma temperatura analítica fixada. Uma descrição detalhada de células unitárias é fornecida em Stout & Jensen, *X-Ray Structure Determination: A Practical Guide*, Macmillan Co., Nova Iorque (1968), Capítulo 3, que é incorporado aqui por referência. Especificamente, a disposição única de átomos em relação parcial dentro da treliça cristalina pode ser caracterizada de acordo com as coordenadas atômicas fracionais observadas. Outros meios de caracterização da estrutura cristalina é por análise de difração de pó de raio X em que o perfil de difração observado é comparado a um perfil simulado gerado de dados de estrutura de cristal simples. Medições de difração de pó de raio X para a forma de paciente são caracterizadas como uma série de valores de 2θ (geralmente quatro ou mais).

Outros meios de caracterização da forma podem ser utilizados, tais como ressonância magnética nuclear de estado sólido (SSNMR) espectroscopia, calorimetria de varredura diferencial (DSC), termografia e exame geral da morfologia amorfa ou cristalina. Estes parâmetros podem também ser utilizados em combinação para caracterização da forma de paciente.

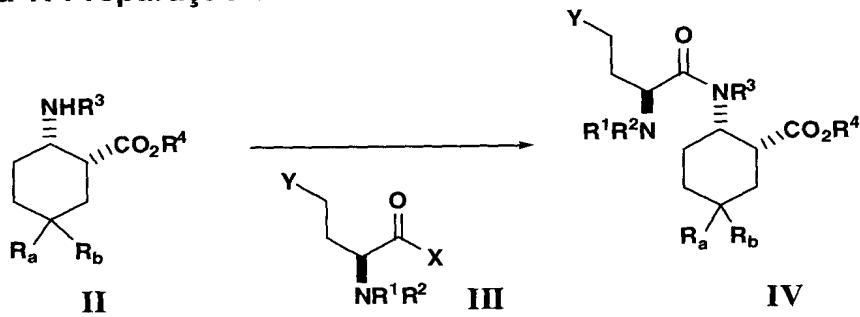
Alguém versado na técnica apreciará que um modelo de difração de raio X podem ser obtido com um erro de medida que é dependente das condições de medição empregadas. Em particular, é geralmente conhecido que intensidades em um modelo de difração de raio X podem inteiramente depender das condições de medição empregadas e a forma ou morfologia do cristal. Deve-se também entender que intensidades relativas podem tam-

bém variar dependendo das condições experimentais e, consequentemente, a exata ordem de intensidade mostrou não ser levada em conta. Adicionalmente, um erro de medida de ângulo de difração para um modelo de difração de raio X convencional é tipicamente cerca de $0,2^\circ$ de valores 2θ ou 5 menos, preferivelmente cerca de $0,1^\circ$ de valores 2θ (como descrito a seguir), e tal grau de erro de medida mostrou ser levado em conta como pertencente aos ângulos de difração acima mencionados. Consequentemente, é entendido que as formas de cristal da invenção instantânea não são limitadas às formas de cristal que fornecem modelos de difração de raio X completamente idênticos aos modelos de difração de raio X representado na Figuras acompanhantes descritas aqui. Qualquer forma de cristal que fornece padrões de difração de raio X substancialmente idênticos aqueles descritos nas Figuras acompanhantes caem no escopo da presente invenção. A capacidade verificar identidades substanciais de modelos de difração de raio X é 10 dentro do alcance de alguém versado na técnica.

15

SÍNTSE

Esquema 1: Preparação de amida IV.



O β -aminoéster de fórmula II, ou um sal deste, incluindo um toluenossulfonato ou um sal de hidrobrometo, é acoplado com um α -aminoácido quiral protegido adequadamente de fórmula III, para fornecer amida IV utilizando métodos conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, a preparação no WO2005021500. A reação de acoplamento pode ser realizada com um reagente de diimida na presença de um ativador, e uma base de amina terciária sob uma atmosfera inerte, tal como nitrogênio ou argônio (preferivelmente nitrogênio) em um solvente aprótico tais como propionitrilo, acetato de isopropila, acetato de n-butila, acetato de terc-butila ou acetonitri-

20

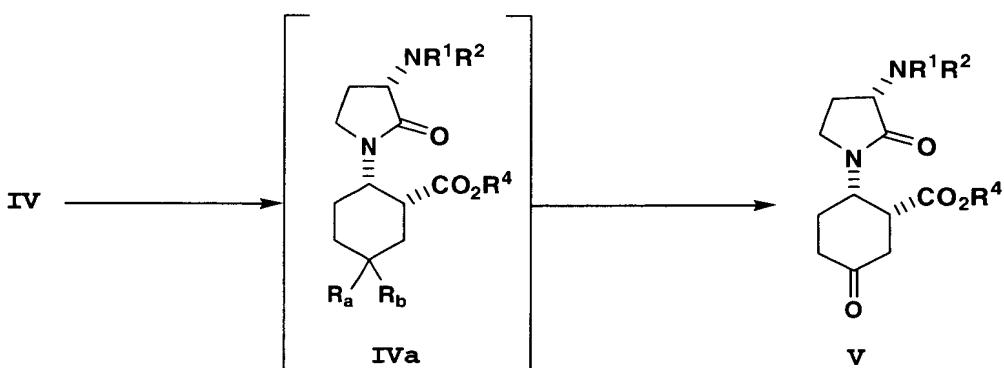
25

lo (especialmente acetonitrilo e/ou acetato de etila). O reagente de acoplamento de diimida inclui, por exemplo, reagentes tais como EDAC. Exemplos de ativadores incluem 1-hidroxibenzotriazol (HOBT; o referido termo inclui hidratos destes) e *N,N*-4-dimetilamino-piridina. Uma base de amina terciária, inclui por exemplo, trietilamina, *N,N*-diisopropil-*N*-etilamina e tri-n-propilamina. As relações molares do aminoéster de fórmula II para o reagente de acoplamento de diimida para o ativador para a amina terciária é um a cerca de 0,90 – 1,50 a cerca de 0,95-1,50 a cerca de 2,00 a 3,00, respectivamente. Referidas taxas de mol são preferivelmente um a cerca de 0,95 – 10 1,05 a cerca de 0,95-1,10 e a cerca de 2,10 a 2,30, respectivamente.

O β -aminoéster é selecionado de modo que R_a e R_b são grupos alcóxi ou alquiliolato, ou juntamente com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma carbonila, ou formam um acetal cíclico ou acílico ou tioacetal, preferivelmente um grupo 1,3-dioxolano. R_4 é C₁₋₆alquila, preferivelmente um grupo etila.

O α -aminoácido quiral de fórmula III incorpora um resíduo terminal funcionalizável Y que apresenta ou pode ser elaborado em um grupo de alquilação adequado para cristalização posterior do carbono distal de cadeia lateral, ao qual Y é ligado, sobre o nitrogênio de amida. Consequentemente, 20 Y pode ser selecionado de grupos tais como halogênio, SMe, ou OSO₂R₁₂, em que R₁₂ é C₁₋₆alquila, -(CH₂)C(O)OR₁₃, ou -(CH₂)C(O)R₁₃; e R₁₃ em cada ocorrência é C₁₋₆alquila. X é OH, halogênio ou OCOR₁₄, em que R₁₄ é C₁₋₆alquila. Grupos de proteção apropriados R₁ e R₂ para o α -aminoácido quiral, de fórmula III são independentemente selecionados de hidrogênio ou grupos 25 proteção de amina que podem ser removidos por hidrólise ou hidrogenólise sob condições padrão. Tais grupos incluem sem limitação, um grupo carbobenzíloxi (Cbz), um terc-butiloxicarbonila (BOC), um grupo fluorenilmetiloxi-carbonila (FMOC), um grupo benzila (Bn) ou um grupo p-metoxibenzila (PMB). Grupos preferidos são Cbz, BOC, ou grupos Bn. Cbz é mais preferido.

Esquema 2: Preparação de uma amida de fórmula IV



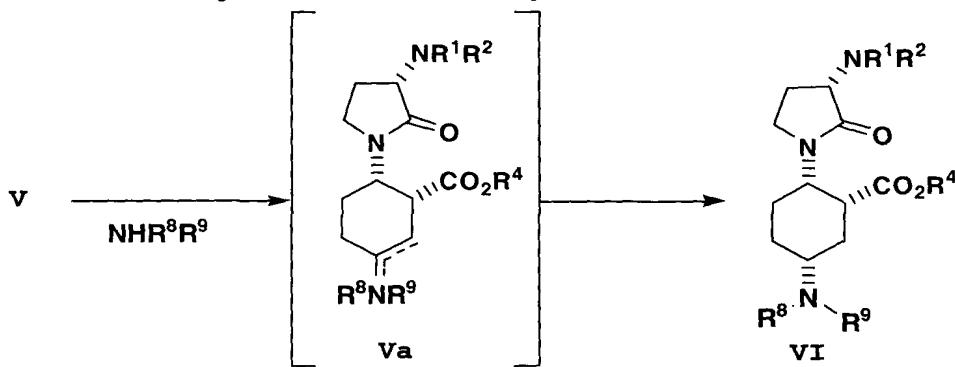
Um composto de fórmula V é preparado por ciclização de porção de alquilação Y sobre o nitrogênio de amida para formar um anel de pirrolidinona, durante cuja transformação Y age como um grupo de partida. Em uma modalidade preferida, a porção de alquilação representa um sal de sulfônio 5 (Y= S⁻(Me)R₁₃, em que R₁₃ é C₁₋₆alquila, benzila ou benzila substituída, metila é mais preferida) gerado por ativação de uma amina derivada de metionina IV (Y= SME) utilizando agentes de alquilação de sílfur bem conhecido na técnica, por exemplo um haleto de C₁₋₆alquila ou benzila, preferivelmente iodeto de metila. Veja, por exemplo, Freidinger e outro, J. Org. Chem. 1982, 10 47, 10.

Cyclização é conduzida sob uma atmosfera inerte, tal como nitrogênio ou argônio (preferivelmente nitrogênio) em um solvente contactando composto IV, ou um sal deste, com a base na presença de um solvente aprótico. Tais bases podem ser, por exemplo sem limitação, carbonato de 15 césio, bicarbonato de césio, carbonato de potássio, terc-butilato de sódio, ou hexametildisilazida de sódio, especialmente carbonato de césio. Solventes apróticos incluem, por exemplo, sem limitação, DMSO, DMF, DMA, N-metilpirrolidinona (NMP), e sulfolano, preferivelmente DMSO e/ou DMF.

Em que R_a e R_b são independentemente C₁₋₆alkóxi, ou juntamente com o átomo ao qual eles são ligados R_a e R_b combinam-se para formar um acetal cíclico ou acíclico ou tioacetal, os grupos de acetal são removidos por desproteção de acordo com os métodos bem conhecidos na técnica para formar a carbonila. Para acetais, a desproteção pode ser realizada por hidrólise, preferivelmente conduzida em um solvente tais como 20 acetona, butanona, acetonitrilo e isopropanol, ou soluções aquosas destes, e

é preferivelmente conduzida em acetona aquosa. Em que referida desproteção de acetal requer ácidos de próton, por exemplo ácido enxofre, ácido toluenossulfônico, ácido nítrico, ácido metanossulfônico, ácido hidrobrômico ou ácido hidroclórico, ácido hidroclórico é mais preferido.

5 Esquema 3: Aminação redutiva de composto V

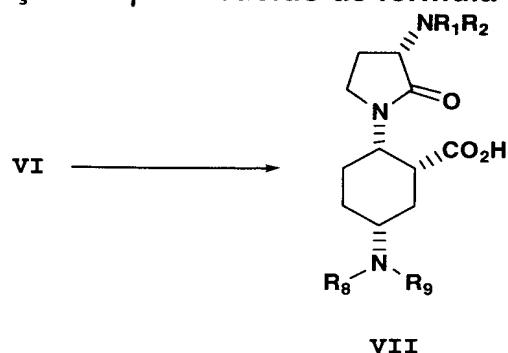


O composto VI é preparado por aminação redutiva de um composto de fórmula V em duas etapas por (a) adicionando uma amina, $\text{NH}(\text{R}_8)(\text{R}_9)$, e um agente de desidratação, a uma solução de fórmula V em um solvente aprótico, e misturando em uma temperatura de 20° a $+50^\circ \text{C}$

- 10 para formar a imina/enamina de fórmula Va; e (b) tratar uma solução de uma imina/enamina de fórmula Va com um catalisador de paládio, preferivelmente contendo um desativador tais como sulfure, preferivelmente 5% de Pt/C/S, sob uma pressão de gás de hidrogênio. Substituintes de amina, R_8 e R_9 , são independentemente selecionados de hidrogênio e C_{1-6} -alquila. A amina de
- 15 fórmula $\text{NH}(\text{R}_8)(\text{R}_9)$ é preferivelmente N-metil-N-isopropilamina. O agente de desidratação é um promotor de desidratação de ácido Lewis /ácido Brønsted que inclui, sem limitação, reagentes de titânio, preferivelmente tetracloreto de titânio ou tetraisopropóxido de titânio ou uma mistura destes (especialmente tetraisopropóxido de titânio). Veja, por exemplo, R. Mattson e outro, J.
- 20 Org. Chem. 1990, 55, 2552-2554. O solvente aprótico pode ser selecionado, sem limitação, de solventes tais como dicloroetano, diclorometano, acetoni-trilo, DMSO, DMF, e N-metil-pirrolidinona (preferivelmente diclorometano). Preferivelmente a solução da imina/enamina de intermediário Va em diclorometano é tratada com gás de hidrogênio em uma temperatura de 1,05-
- 25 2,10 kg/cm² e 5% de Pt/S/C em aproximadamente 0,5 a 50% (peso/peso)

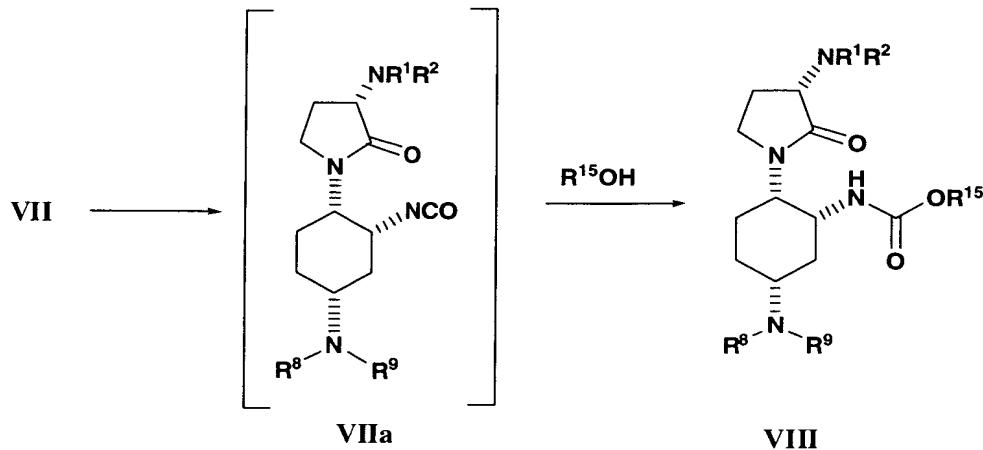
com relação ao composto V. A mais preferida taxa é 5-10% (peso/peso).

Esquema 4: Preparação de γ -aminoácido de fórmula VII, ou um sal deste



O éster de um composto de fórmula VI é hidrolizado para fornecer o ácido correspondente de fórmula VII, ou um sal deste. A hidrólise pode ser realizada por hidrólise de base utilizando métodos comumente conhecidos na técnica, ou, alternativamente, com ácidos aquosos em temperaturas elevadas, para obter o γ -aminoácido correspondente de fórmula VII. A hidrólise de ácido é mais preferida. A temperatura varia de cerca de 40°C a cerca de 100 °C (a temperatura varia de cerca de 50 °C a cerca de 70 °C é mais preferida). Os ácidos são selecionados, sem limitação, de ácido enxofre, ácido toluenossulfônico, ácido nítrico, ácido metanossulfônico, ácido hidrobrômico ou ácido hidroclórico. Ácido hidroclórico é mais preferido. Opcionalmente, compostos de fórmula VII podem ser convertidos para seus sais de carboxilato. Preferivelmente, VII é convertido para seu sal de sódio.

15 Esquema 5: Preparação de carbamato VIII

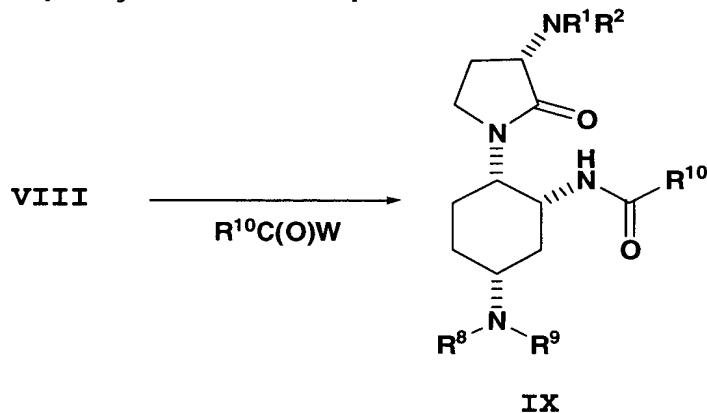


Carbamatos de fórmula VIII são preparados convertendo a γ -aminoácido de fórmula VII para um isocianato tendo fórmula VIIa; e reagindo

do o isocianato com um álcool de fórmula $R^{15}OH$ para fornecer um carbamato de fórmula VIII. A variável R^{15} é de modo que o carbamato forma um grupo de proteção de amina que é removível sob hidrólise padrão ou condições de hidrogenólise. Tais grupos de proteção de amina são preferivelmente N -
 5 CO_2 -terc-butila (de R^{15} = *terc*-butila), ou $N-CO_2$ - benzila (de R^{15} = benzila), ou benzila substituída por $N-CO_2$ (de R^{15} = benzila substituída). Um álcool preferido é *álcool de terc-butila*.

A conversão de VII para o isocianato VIIa pode ser conduzida por meio de diversos métodos, isto é, redisposição *Curtius*-, *Hofmann*-, ou
 10 *Schmidt-Lossen*. Preferivelmente, uma(redisposição *Curtius* é realizada contactando γ aminoácido VII (ou um sal deste) com azida de difenilfosforila em um solvente de álcool (preferivelmente álcool de *terc*-butila), preferivelmente, porém não limitada a, contendo tolueno ou outros co-solventes não-próticos adequados, em uma temperatura do ponto de partida da redisposição térmica para o isocianato (preferivelmente at ou above 50 °C).

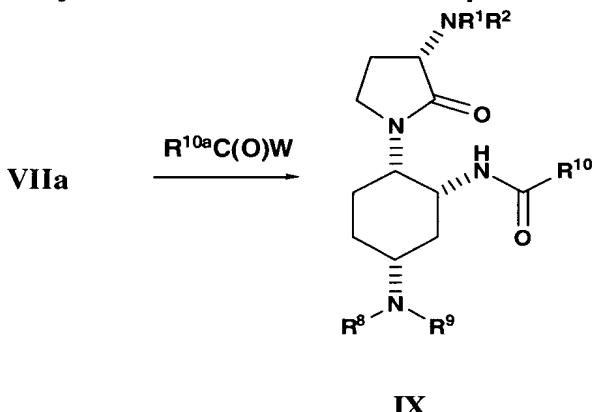
Esquema 6: Preparação de um composto de fórmula IX



Os compostos de fórmula IX são preparados por desproteção da porção de carbamato no composto de fórmula VIII, seguido por acilação da amina livre com um reagente de fórmula $R^{10}C(O)W$, em que W é halogênio
 20 ou $R^{10}C(O)$ para fornecer um composto de fórmula IX. A desproteção de carbamato é realizada por métodos comumente conhecidos na técnica (por exemplo, para R^{10} = *terc*-butila, a desproteção de ácido pode ser realizada com ácido enxofre, ácido toluenossulfônico, ácido nítrico, ácido metanossulfônico, ácido hidrobrômico ou ácido hidroclórico - ácido metanossulfônico é

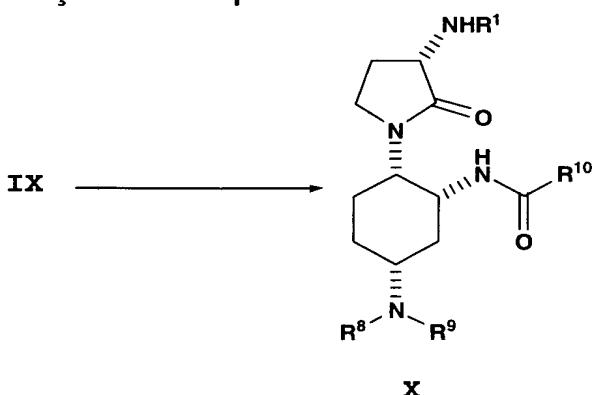
mais preferido). A base (preferivelmente trietilamina) é em seguida adicionada e a amina livre é contactada com um composto de fórmula $R_{10}C(O)W$, em que W é halogênio ou $R^{10}C(O)$, para fornecer um composto de estrutura IX.

Esquema 7: Preparação alternativa de um composto de fórmula IX



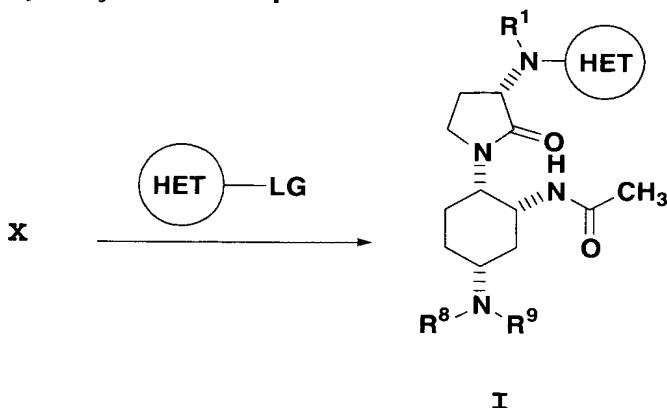
Uma preparação alternativa de compostos de fórmula IX consiste em diretamente acilação do isocianato de intermediário VIIa (veja acima Esquema 5) por adição *in situ* opcional a um agente de alquilação $R^{10a}C(O)W$, em que W é $R^{10a}C(O)$, na presença de seu ácido correspondente (W = hidrogênio). Preferivelmente, a acilação é conduzida introduzindo o isocianato na mistura de ácido acético e anidrido acético (em que R^{10a} é metila e W é hidrogênio) ao isocianato de fórmula VIIa para fornecer um composto de fórmula IX.

Esquema 7: Preparação de compostos de fórmula X



O grupo R^2 no composto de fórmula IX é removido por desproteção para fornecer um composto de fórmula X. Preferivelmente, se R^2 for Cbz, a desproteção é realizada por hidrogenação na presença de um catalisador de paládio, preferivelmente 10% de Pd/C.

Esquema 8: Preparação de compostos de fórmula I



Compostos de fórmula I são preparados acoplando a amina desprotegida de

fórmula X com um composto de fórmula: para fornecer um composto de fórmula I. Tais reações de acoplamento e condições sob as quais elas são conduzidas são conhecidas por alguém versado na técnica. HET é um anel heterociclo ou heteroarila de 3 a 14 membros opcionalmente substituídos tendo um ou mais heteroátomos selecionados de N, O ou S (preferivelmente um a três heteroátomos, especialmente um a dois átomos de nitrogênio). Os grupos heteroarila preferidos incluem, sem limitação, quinazolin-4-ila 6-substituída , mais preferivelmente 6-trifluorometil-quinazolin-4-ila. Um grupo de partida (LG) como utilizado aqui inclui, sem limitação, grupos tais como halogênio, C₁₋₆alkóxi, mesilato, nonaflatos, sulfonatos, tosila-
tos e triflatos. Preferivelmente LG é um grupo de partida selecionados de halogênio ou OSO₂R₁₆, em que R₁₆ é fenila, uma heteroarila de 5 a 7 membros tendo um ou mais átomos selecionados de N, S, ou O, C₁₋₆alquila, ou uma cicloalquila de 3 a 7 membros, todos os quais são opcionalmente subs-
tituídos por um a três grupos selecionados de halogênio, CF₃ e C₁₋₆alquila.

Um grupo de partida preferido é um halogênio, especialmente cloreto.

Para o processo desta invenção, os materiais de partida são comercialmente disponíveis ou podem ser facilmente preparados por alguém versado na técnica. Solventes, temperaturas, pressões, materiais de partida tendo o grupo desejado, e outras condições de reação, podem ser facilmen-

te selecionadas como apropriados por alguém versado na técnica. O processo pode ser escalonado a fim de preparar maiores quantidades do composto de fórmula I, tais como em uma facilidade de produção comercial.

EXEMPLOS

5 Os seguintes exemplos ilustram as modalidades dos compotes e materiais de partida inventivos, e não se destinam a limitar o escopo das reivindicações.

Como apropriado, as reações foram conduzidas sob uma atmosfera de nitrogênio seco (ou argônio). Para reações anidrosas, solventes Dri-

10 Solv de EM foram empregados. Para outras reações, solventes de grau de reagente ou grau HPLC foram utilizados. A menos que de outro modo estabelecido, todos os reagentes comercialmente obtidos foram utilizados como receptores.

As avaliações de LC/MS foram obtidas utilizando um sistema
15 híbrido de espectrômetro de massa quádrupla simples Shimadzu H-
PLC/Waters ZQ. Dados para o pico de interesse são reportados de ioniza-
ção de eletrospray de modo positivo. Espectros de NMR (ressonância mag-
nética nuclear) foram tipicamente obtidos em instrumentos Bruker ou JEOL
20 400 MHz e 500 MHz nos solventes indicados. Todas as modificações quími-
cas são reportadas em ppm de tetrametilsilano com a ressonância solvente
como o padrão interno. Dados de espectros de $^1\text{H-NMR}$ são tipicamente re-
portados como segue: mudança química, multiplicidade (s = singuleto, br s =
singleto amplo, d = dupleto, dd = dupla de dupletos, t = tripleto, q = quarteto,
sep = septeto, m = multipleto, app = aparent), constantes de acoplamento
25 (Hz), e integração.

Alguém versado na técnica reconhecerá as abreviações padrão utilizadas aqui. Para facilidade de referência, as abreviações incluem, porém, não necessariamente limitadas a: sat. = saturado, HPLC = cromatografia líquida de alto desempenho, AP = por cento de área, KF = Karl-Fischer,
30 RT = temperatura ambiente (a menos que de outro modo especificado RT é uma temperatura de cerca de 22 °C), mmol = milimoles, HRMS = espectros-
copia de massa de alta resolução, TBTU = tetrafluoroborato de O-

benzotriazol-2-il-N,N,N',N'-tetrametilurônio, MTBE = TBME = éter metílico de

terc-butila, EDAC = cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida,

EDC = N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida, TEA = trietilamina, DPPA

= difenil fosforil azida, IPA = álcool isopropílico, TFA = ácido trifluoroacético,

5 DCM = diclorometano, THF = tetraidrofurano, DMF = N,N-dimetilformamida,

BOP = hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-ilóxi)tris(dimetilamino)fosfônio,

EtOAc = acetato de etila, DMSO = dimetilsulfóxido, °C = graus Celsius, eq =

equivalente ou equivalentes, g = grama ou gramas, mg = miligrama ou mili-

gramas, mL (ou ml) = mililitro ou mililitros, h = hora ou horas, M = molar, N =

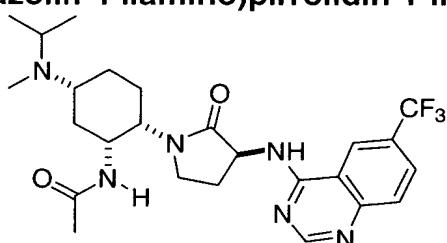
10 normal, min = minuto ou minutos, MHz = megahertz, tlc = cromatografia de

camada fina, v/v = relação volume para volume.

" α ", " β ", "R" e "S" são designações estereoquímicas são familiares para aqueles versados na técnica.

EXEMPLO 1

N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida



Exemplo 1, Etapa 1: 2-benziloxicarbonilamino-7-oxo-6-aza-

15 biciclo[3,2,1]octano-6-carboxilato de (1R, 2S, 5R)-terc-butila (89.6 g, 0,24 mol, veja: P. H. Carter, e outro, Pedido PCT WO 2005/021500) foi dissolvido em acetato de etila (1,5 L) e a solução resultante foi lavada com NaHCO₃ saturado (2 x 0,45 L) e NaCl saturado (1 x 0,45 L). A solução foi secada (Na₂SO₄) e em seguida filtrada diretamente em um frasco de fundo redondo

20 de 3 L de 3 gargalos. A solução foi purgada com injeção de nitrogênio direta antes de ser carregada com 10% de Pd/C (13,65 g) sob atmosfera de nitrogênio. O frasco foi evacuado e carregado novamente com hidrogênio; isto foi repetido mais duas vezes. Hidrogênio foi borbulhado através da solução durante 30 minutos e em seguida a reação foi agitada sob 1 atmosfera de H₂

25 durante 18 horas. O frasco foi evacuado, carregado novamente com nitrogê-

nio, e carregado com catalisador recente (6 g de 10% Pd/C). Hidrogênio foi borbulhado através da solução durante 30 minutos e em seguida a reação foi agitada sob 1 atmosfera de H₂ durante 18 horas. O frasco foi evacuado e carregado novamente com nitrogênio. A mistura foi filtrada através de Celite;

5 a almofada de filtro foi em seguida lavada com acetato de etila. O filtrado (~1,6 L de volume de EtOAc) foi diluído com acetonitrilo (0,3 L) e carregado sequencialmente com *L*-*N*-Cbz-metionina (68 g, 0,24 mol), TBTU (77 g, 0,24 mol), e N,N-diisopropiletilamina (42 mL, 0,24 mol). A reação foi agitada em temperatura ambiente durante 4 horas, tempo durante o qual foi carregada

10 de uma suspensão a uma solução clara. A reação foi saciada com a adição de NH₄Cl saturado (0,75 L) e água (0,15 L); a mistura foi diluída também com EtOAc (0,75 L). As fases foram misturadas e separadas e a fase orgânica foi lavada com Na₂CO₃ saturado (2 x 0,9 L) e NaCl saturado (1 x 0,75 L). A solução foi secada (Na₂SO₄), filtrada, e concentrada em vácuo para

15 fornecer 2-((S)-2-(benziloxicarbonilamino)-4-(metilthio)butanamido)-7-oxo-6-aza-biciclo[3,2,1]octano-6-carboxilato de (1*R*,2*S*,5*R*)-terc-butila como um óleo, que foi tomado na etapa seguinte sem outra purificação. LC/MS para pico primário: [M-Boc+H]⁺ = 406,3; [M+Na]⁺ = 528,3. ¹H-NMR (400 MHz, d₄-MeOH): δ 7,36 (m, 5H), 5,11 (s, 2H), 4,32 (m, 1H), 4,2 (m, 1H), 4,0 (m, 1H),

20 2,5 – 2,7 (m, 3H), 2,25 (m, 1H), 2,11 (s, 3H), 2,05 (m, 4H), 1,9 (m, 1H), 1,7 (m, 2H), 1,54 (s, 9H). Também estão presentes EtOAc [1,26 (t), 2,03 (s), 4,12 (q)] e *N,N,N,N*-tetrametiluréia [2,83 (s)].

Exemplo 1, Etapa 2: Uma amostra de 2-((S)-2-(benziloxicarbonilamino)-4-(metilthio)butanamido)-7-oxo-6-aza-biciclo[3,2,1]octano-6-carboxilato de (1*R*,2*S*,5*R*)-terc-butila (0,24 mol assumido; veja procedimentos anteriores) foi dissolvida em iodometano (1,250 g) e agitada durante 48 horas em temperatura ambiente. A reação foi concentrada em vácuo. O resíduo foi dissolvido em diclorometano e concentrado em vácuo. Isto foi repetido mais duas vezes. O iodo resultante foi dissolvido em diclorometano (0,4 L) e vertido em

25 uma solução rapidamente agitada de MTBE (4.0 L). Os sólidos amarelos resultantes foram coletados por meio de filtração de sucção e secados sob vácuo elevado para fornecer o sal de sulfônio (179 g). Este material foi to-

mado na etapa seguinte sem outra purificação. LC/MS para pico primário: $[M-Me_2S+H]^+$ = 458,4; $[M]^+$ = 520,4. 1H -NMR (400 MHz, d_4 -MeOH): □ 7,35 (m, 5H), 5,09 (s, 2H), 4,33 (m, 1H), 4,28 (m, 1H), 3,98 (m, 1H), 3,3 – 3,45 (m, 2H), 2,97 (s, 3H), 2,94 (s, 3H), 2,78 (m, 1H), 2,0 – 2,3 (m, 4H), 1,7 (m, 2H),

- 5 1,52 (s, 9H). Também estão presentes MTBE [1,18 (s), 3,2 (s)] e traços de *N,N,N,N-tetrametiluréia* [2,81 (s)].

Exemplo 1, Etapa 3: Todo o sal de sulfônio da etapa anterior (0,24 mol assumido) foi dissolvido em DMSO (2,0 L). A solução resultante foi agitada sob nitrogênio em temperatura ambiente e carregada com carbonato de césio

- 10 (216 g) em porções. A suspensão foi agitada em temperatura ambiente durante 3 horas e em seguida filtrada para remover os sólidos. A solução foi dividida em porções de ~0,22 L e preparada como segue: a mistura reacional (~0,22 L) foi diluída com acetato de etila (1,5 L) e lavada sucessivamente com água ($3 \times 0,5$ L) e salmoura ($1 \times 0,3$ L). A fase orgânica foi secada (Na₂SO₄), filtrada, e concentrada em vácuo. O 2-((S)-3-(benziloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-7-oxo-6-azabiciclo[3,2,1]octano-6-carboxilato de (1*R*,2*S*,5*R*)-terc-butila desejado (90,8 g, 83%) foi obtido como uma espuma microcristalina, livre de impureza de tetrametiluréia. LC/MS para pico primário: $[M-Boc+H]^+$ = 358,4; $[M+Na]^+$ = 480,4. 1H -NMR (400
- 15 MHz, d_4 -MeOH): □ 7,35 (m, 5H), 5,12 (s, 2H), 4,35 (m, 2H), 4,2 (m, 1H), 3,6 (m, 1H), 3,3 (m, 1H), 2,64 (m, 1H), 2,28 – 2,42 (m, 2H), 2,15 (m, 1H), 1,7 – 2,0 (m, 5H), 1,55 (s, 9H). Se desejado, este material pode ser isolado como um sólido dissolvendo em MTBE (1 volume), adicionando ao heptano (3,3 volumes), e coletando o precipitado resultante.

- 20 25 **Exemplo 1, Etapa 4:** Uma solução resultante de 2-((S)-3-(benziloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-7-oxo-6-azabiciclo[3,2,1]octano-6-carboxilato de (1*R*,2*S*,5*R*)-terc-butila (108 g, 0,236 mol) em THF (1 L) foi carregada com monoidrato de hidróxido de lítio (21,74 g, 0,519 mol). Água (0,3 L) foi adicionada lentamente, tal que a temperatura não excedeu 20 °C. A reação foi agitada em temperatura ambiente durante a noite e os voláteis foram removidos em vácuo. O pH foi ajustado para ~4 através de uma adição de 1N de HCl (450 mL) e NaH₂PO₄. Os precipitados brancos resultantes

foram coletados por filtração e lavados com água (2×1 L). O sólido foi dissolvido em diclorometano (1,5 L) e água (~ 1 L). A camada orgânica foi seca (Na₂SO₄), filtrada, e concentrada em vácuo. O resíduo foi dissolvido em EtOAc (0,7 L) e a solução resultante foi aquecida em refluxo durante 1 hora. Os sólidos foram separados após resfriarem para temperatura ambiente, e foram coletados por meo de filtração. Estes sólidos foram purificados por recristalização em isopropanol para fornecer o ácido (1*R*,2*S*,5*R*)-2-((*S*)-3-(benziloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(*terc*-butoxicarbonilamino)cicloexanocarboxílico desejado como um sólido branco (104,5 g, 935 de produção). LC/MS para pico primário: [M-tBu+H]⁺ = 420,2; [M-Boc+H]⁺ = 376,2; [M+H]⁺ = 476,2, ¹H-NMR (400 MHz, d₄-MeOH): δ 7,35 (m, 5H), 5,11 (s, 2H), 4,35 (m, 2H), 3,71 (m, 1H), 3,45 – 3,6 (m, 2H), 2,99 (m, 1H), 2,41 (m, 1H), 2,15 (m, 1H), 2,0 (m, 2H), 1,6 – 1,9 (m, 4H), 1,46 (s, 9H).

Exemplo 1, Etapa 5: um frasco de fundo redondo de 3 L foi carregado com ácido (1*R*,2*S*,5*R*)-2-((*S*)-3-(benziloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(*terc*-butoxicarbonilamino)cicloexanocarboxílico (75,5 g, 0,158 mol), EDC•HCl (33,5 g, 0,175 mol), 1-hidroxibenzotriazol (23,6g, 0,175 mol), e diclorometano (1 L). A reação foi agitada em temperatura ambiente durante 2 horas, tempo durante o qual foi carregada de uma suspensão branca a uma solução clara. Amônia (gas) foi borbulhada na solução até o pH ser fortemente básico (papel) e a reação foi agitada durante 10 minutos; esta adição de amônia foi repetida e a reação foi agitada durante mais 10 minutos. Água foi adicionada. A fase orgânica foi lavada com NaHCO₃ saturado, NaH₂PO₄, e salmoura antes de ser concentrada em vácuo. O resíduo foi suspenso com acetonitrilo (0,5 L) e em seguida concentrado para fornecer (1*R*,2*S*,5*R*)-2-((*S*)-3-(benziloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(*terc*-butoxicarbonilamino)cicloexanocarboxamida como um sólido branco (75,9 g, ~100%), que foi utilizado na etapa seguinte sem outra purificação. LC/MS para pico primário: [M-Boc+H]⁺ = 375,3; [M+H]⁺ = 475,4; [M-tBu+H]⁺ = 419,3. ¹H-NMR (400 MHz, d₄-MeOH): δ 7,35 (m, 5H), 5,11 (s, 2H), 4,25 (m, 2H), 3,70 (m, 1H), 3,6(m, 1H), 3,45 (m, 1H), 2,91 (m, 1H), 2,38 (m, 1H), 2,12 (m, 1H), 1,9 – 2,05 (m, 2H), 1,65 – 1,9 (m, 4H), 1,46 (s, 9H).

Exemplo 1, Etapa 6: a reação foi conduzida em três porções iguais e combinada para preparação aquosa. Um frasco de fundo redondo de 3 gargalos, de 5 L foi carregado com (*1R,2S,5R*)-2-((*S*)-3-(benziloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(*terc*-butoxicarbonilamino)cicloexanocarboxamida (25,3 g, 53 mmol), acetonitrilo (1,9 L), e 2,6 L de água/gelo. A mistura foi agitada e resfriada para 0 °C. Diacetato de iodobenzeno (25,77 g, 80 mmol) foi adicionado e a reação foi agitada durante 2 horas; outros 0,5 eq. de diacetato de iodobenzeno foram adicionados. A reação foi agitada durante 9 horas (temperatura de reação < 10 °C). A mistura foi carregada com 8 eq de N,N-diisopropiletilamina e anidrido acético eq.. Durante os trinta minutos seguintes, 4 eq. de N,N-diisopropiletilamina e 2 eq. de anidrido acético foram adicionados cada dez minutos, até a reação ter prosseguido para conclusão (HPLC). O acetonitrilo foi removido em vácuo; um sólido separou-se do resíduo, e este foi coletado por filtração. O resíduo restante foi extraído com clorometano (3 L, em seguida 1 L). A fase orgânica foi lavada sequencialmente com água, NaHCO₃ saturado, e salmoura. Os sólidos coletados foram adicionados à fase orgânica, junto com carbono ativado (15 g). A mistura foi agitada durante 30 minutos a 40 °C antes de ser filtrada e concentrada em vácuo. O resíduo foi dissolvido em EtOAc (1 L), e a solução resultante foi agitada a 75 °C durante 1 hora antes de ser deixada resfriar para temperatura ambiente. Um sólido separou-se e foi coletado por filtração. O sólido foi purificado também por recristalização: foi primeiro dissolvido em 0,5 L de CH₂Cl₂, em seguida concentrado em vácuo, em seguida re-cristalizado de EtOAc a um 1 L; isto foi repetido três vezes. Os sólidos obtidos dos líquidos mãe acima foram recristalizados três vezes utilizando o mesmo método. Os sólidos combinados foram recristalizados duas vezes mais de acetonitrilo (0,7 L) para fornecer 66 g (84%) de (*1R,3R,4S*)-3-acetamido-4-((*S*)-3-(benziloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)cicloexilcarbamato de *terc*-butila (pureza >99,5% por HPLC). LC/MS para pico primário: [M+H]⁺ = 489,4; [M-tBu+H]⁺ = 433,3. ¹H-NMR (400 MHz, d₄-MeOH): δ 7,3 – 7,4 (m, 5H), 5,11 (s, 2H), 4,35 (m, 1H), 4,15 (m, 1H), 4,04 (m, 1H), 3,8 (m, 1H), 3,6(m, 2H), 2,44 (m, 1H), 2,12 (m, 1H), 1,87 – 2,05 (m, 4H), 1,87 (s, 3H), 1,55 – 1,7 (m,

2H), 1,46 (s, 9H). A fidelidade estereoquímica da recombinação Hofmann foi confirmada através de análise de estrutura de cristal de raio X deste composto, como mostra na Figura 1.

Exemplo 1, Etapa 7: Uma solução resultante de (*1R,3R,4S*)-3-acetamido-4-((*S*)-3-(benziloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)cicloexilcarbamato de *terc*-butila (66 g, 0,135 mol) em diclorometano (216 mL) foi carregada com ácido trifluoroacético (216 mL). A reação foi agitada durante 2 horas em temperatura ambiente e concentrada em vácuo. O resíduo foi dissolvido em metanol e a solução resultante foi concentrada em vácuo; isto foi repetido uma vez. (S)-1-((*1S,2R,4R*)-2-acetamido-4-aminocicloexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de benzila foi obtido como um óleo e utilizado diretamente na Etapa 8 abaixo. LC/MS encontrado $[M + H]^+ = 389,4$. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, d_4 -MeOH): δ 7,3 – 7,4 (m, 5H), 5,12 (s, 2H), 4,41 (br, s, 1H), 4,15 (m, 1H), 4,00 (t, $J = 9,3$ Hz, 1H), 3,81 (t, $J = 9,1$ Hz, 1H), 3,65 (q, $J = 8,4$ Hz, 1H), 3,3 – 3,4 (m, 1H), 2,45 (m, 1H), 1,95 – 2,24 (m, 5H), 2,00 (s, 3H), 1,6 – 1,8 (m, 2H).

Exemplo 1, Etapa 8: Uma solução resultante de (S)-1-((*1S,2R,4R*)-2-acetamido-4-aminocicloexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de benzila (~0,135 mol) em metanol (675 mL) foi carregada sequencialmente com acetona (37,8 g, 4 eq), acetato de sódio (33,2 g, 3 eq), e cianoborohidreto de sódio (16,9 g, 2 eq). A mistura foi agitada em temperatura ambiente durante 6 horas e filtrada. O filtrado foi dissolvido em diclorometano (1 L); esta solução foi lavada com 1N de NaOH (1 L). Os sólidos coletados na filtração foram dissolvidos em 1N de NaOH (1L) a 0 °C e em seguida extraídos com diclorometano (1 L). Os extratos orgânicos foram combinados e extraídos com HCl aquoso (200 mL de 1N de HCl + 800 mL de água). A fase aquosa foi basificada com NaHCO₃ saturado (500 mL) e em seguida 1N de NaOH (100 mL) até pH 11. A fase aquosa foi extraída com diclorometano (2 L). Os extratos orgânicos foram combinados, secados (Na₂SO₄), filtrados, e concentrados em vácuo para fornecer (S)-1-((*1S,2R,4R*)-2-acetamido-4-(isopropilamino)cicloexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de benzila como um óleo. LC/MS encontrado $[M + H]^+ = 431,45$. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, d_4 -MeOH): δ 7,3 – 7,4 (m, 5H), 5,12 (s, 2H), 4,31 (m, 1H), 4,24 (t, $J = 9,4$ Hz, 1H), 4,11 (m, 1H), 3,61 (t, $J = 9,1$ Hz,

1H), 3,52 (q, $J = 8,6$ Hz, 1H), 3,04 (br, s, 1H), 2,96 (sep, $J = 6,3$ Hz, 1H), 2,40 (m, 1H), 2,15 (m, 1H), 1,92 (s, 3H), 1,7 – 1,9 (m, 5H), 1,65 (m, 1H), 1,12 (app, dd, $J = 6,3, 1,1$ Hz, 6H).

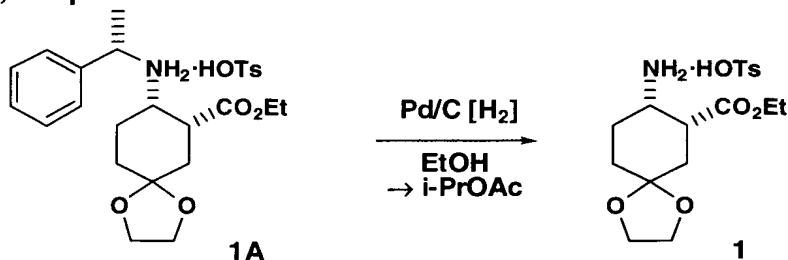
Exemplo 1, Etapa 9 (Veja Etapa Alternativa 9, abaixo): Uma solução resultante de (*S*)-1-((1*S,2R,4R*)-2-acetamido-4-(isopropilamino)cicloexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de benzila (~115 mmol) em diclorometano (600 mL) foi resfriada para 0 °C e carregada sequencialmente com formaldeído (18,6 g, 37 wt% de solução), trietilamina (23 mL), e triacetoxiborohydreto de sódio (28,7 g). A mistura foi agitada em temperatura ambiente durante 30 minutos e diluída com diclorometano (até 1,2 L). Esta solução foi lavada três vezes com 500 mL de NaHCO₃ saturado + NaOH (NaHCO₃ saturado, pH a 11 w/ 1N de NaOH). A camada orgânica foi extraída com HCl aquoso (200 mL de 1N de HCl + 600 mL de água). A fase aquosa foi basificada com NaHCO₃ saturado (500 mL) e em seguida 1N de NaOH (100 mL) até pH 11. A fase aquosa foi extraída com diclorometano (1,2 L). Os extratos orgânicos foram combinados, secados (Na₂SO₄), filtrados, e concentrados em vácuo para fornecer (*S*)-1-((1*S,2R,4R*)-2-acetamido-4-(isopropil(metil)amino)cicloexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de benzila como um óleo, que foi utilizado diretamente na Etapa 10 abaixo. LC/MS encontrado [M + H]⁺ = 445,4. ¹H-NMR (400 MHz, d₄-MeOH): δ 7,3 – 7,4 (m, 5H), 5,12 (s, 2H), 4,33 (br s, 1H), 4,25 (t, $J = 9,2$ Hz, 1H), 4,11 (br s, 1H), 3,5 – 3,6(m, 2H), 2,77 (v br s, 2 H), 2,41 (m, 1H), 2,26 (s, 3H), 2,0 – 2,1 (m, 2H), 1,92 (s, 3H), 1,7 – 1,9 (m, 5H), 1,10 (app, dd, $J = 17, 6,4$ Hz, 6H).

Exemplo 1, Etapa 10: A uma solução de (*S*)-1-((1*S,2R,4R*)-2-acetamido-4-(isopropil(metil)amino)-cicloexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de benzila (~0,115 mol) em metanol (600 mL) foram adicionados 10% de Pd/C (6 g de 50% de catalisador úmido). O frasco foi evacuado e carregado novamente com hidrogênio. A mistura foi agitada sob 1 atmosfera de H₂ durante 2 horas e o catalisador foi removido por filtração através de Celite. O filtrado foi concentrado em vácuo para fornecer *N*-(1*R,2S,5R*)-2-((*S*)-3-amino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(isopropil(metil)amino)cicloexil)acetamida como um óleo, que foi tomado na etapa seguinte sem outra purificação. LC/MS encontrado

$[M + H]^+ = 311,47$. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $d_4\text{-MeOH}$): □ 4,39 (br s, 1H), 4,00 (m, 1H), 3,3 – 3,5 (m, 4H), 2,73 (m, 1H), 2,38 (m, 1H), 2,25 (s, 3H), 2,0 – 2,2 (m, 3H), 1,94 (s, 3H), 1,6 – 1,75 (m, 4H), 1,07 (app, dd, $J = 21, 6,4$ Hz, 6H).

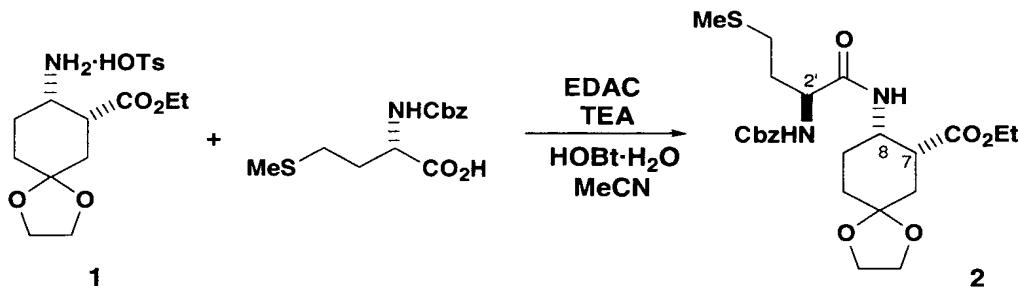
Exemplo 1, Etapa 11: A uma solução de *N*-(*1R,2S,5R*)-2-((*S*)-3-amino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(isopropil(metil)amino)cicloexilacetamida (~35 g, 0,115 mol) em isopropanol (600 mL) foi adicionado 4-cloro-6-(trifluorometil)quinazolina (32 g, 0,138 mol, 1,2 eq, veja: P.H. Carter e outro, Pedido PCT WO 2005/021500). A mistura foi agitada em temperatura ambiente durante a noite antes de ser carregada com trietilamina (46 g, 0,46 mol, 4 eq). A mistura foi agitada a 60 °C durante 10 horas. O solvente foi removido sob pressão reduzida para fornecer um óleo. Destilação azeotrópica com isopropanol foi realizada duas vezes. O resíduo foi dissolvido em diclorometano (600 mL) e extraído com água (250 mL, contendo 4 eq. de ácido acético). Diclorometano (600 mL) foi adicionado às lavagens aquosas combinadas, e a mistura foi resfriada para 0 °C. NaOH aquoso (50% por peso) foi adicionado com agitação até o pH alcançar 11. A camada de água foi extraída com diclorometano duas vezes (2 x 600 mL). Os extratos orgânicos combinados foram secados (Na_2SO_4), filtrados, e concentrados em vácuo para fornecer a base livre de amorfos do composto título (99% de pureza por H-PLC). LC/MS encontrado $[M+H]^+ = 507,3$. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $d_4\text{-MeOH}$): □ 8,82 (s, 1H), 8,59 (s, 1H), 8,05 (dd, $J = 8,8, 1,8$ Hz, 1H), 7,9 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 5,28 (t, $J = 8,6$ Hz, 1H), 4,58 (br s, 1H), 4,06 (m, 1H), 3,52 – 3,68 (m, 2H), 3,43 (m, 1H), 2,76 (br s, 1H), 2,55 (m, 1H), 2,28 (s, 3H), 2,1 – 2,3 (m, 3H), 2,0 (s, 3H), 2,0 (m, 1H), 1,65 – 1,8 (m, 3H), 1,09 (app, dd, $J = 24, 6,4$ Hz, 6 H).

Exemplo 1, Etapa Alternativa 9

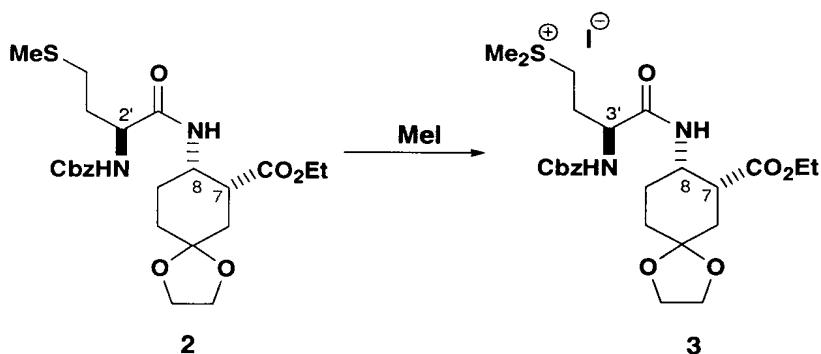


Exemplo 1, Etapa Alternativa 9aⁱ: A um hidrogenador foram carregados sal

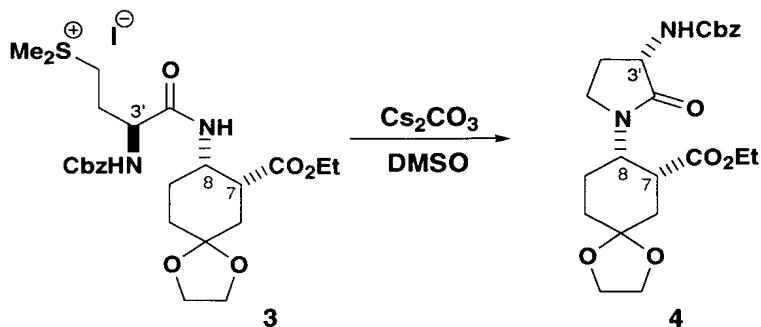
de 4-toluenossulfonato (7*R*,8*S*)-8-((*S*)-1-fenil-etilamino)-1,4-dioxa-espiro[4,5]decano-7-carboxilato de etila **1A** (1417 g, 2,8 moles, c.f.: WO2004098516, preparado análogo a Patente dos estados Unidos 6,835,841), etanol (200 proof, 11,4 L), e 10% de catalisador de Pd/C (50% de umidade, 284 g). A mistura foi neutralizada com nitrogênio, em seguida pressurizada com gás de hidrogênio (45 psig) e agitada vigorosamente a aproximadamente 40 °C até o material agitante ser consumido (HPLC). A suspensão foi resfriada, purgada com gás de nitrogênio e o catalisador foi removido por filtração enquanto neutralizado. O catalisador gasto foi lavado com etanol (4,3 L). O filtrado e as lavagens foram combinados e concentrados sob vácuo a um volume de 2 a 3 L ao mesmo tempo que mantendo a batelada entre 40°60 °C. Acetato de Isopropila (5 L) foi carregado e a mistura foi concentrada a um volume de ~2 L até mais etanol ser removido (<0,5%) e o conteúdo de umidade residual ser <1,000 ppm. O volume de batelada foi ajustado para ~7,5 L pela adição de acetato de isopropila. A mistura foi aquecida para 80 °C até clarear, em seguida resfriada para 65°70 °C. Cristais de semente de **1** (5 g) foram adicionados e a batelada foi resfriada para 50 °C durante 2 horas, em seguida também resfriada para 20 °C durante 4 horas e mantida durante ~10 horas. A suspensão resultante foi filtrada e a massa foi lavada com acetato de isopropila (2 L). O produto foi seco sob vácuo a ~35 °C até os voláteis serem reduzidos abaixo de ~1% (LOD). sal de 4-toluenossulfonato de (7*R*,8*S*)-8-amino-1,4-dioxa-espiro[4,5]decano-7-carboxilato de etila **1** foi obtido como um sólido cristalino, branco (936 g, 835 de produção; pureza de HPLC: 99,8%). ¹H-NMR: (300MHz, CDCl₃) 8,14-7,89 (brs, 3H), 7,75 (d, J 9,0Hz, 2H), 7,15 (d, J 8,0Hz, 2H), 4,22-4,04 (m, 2H), 4,01-3,77 (m, 4H), 3,55-3,43 (m, 1 hora,), 3,20-3,13 (m, 1H), 2,40-2,27 (m, 4H), 2,21-1,94 (m, 2H), 1,81-1,51 (m, 3H), 1,23 (t, J 7,0Hz, 3H); HPLC: Waters Xterra MS C18 4,6 mm x 150 mm i.d., 3,5µm de tamanho de partícula, 0,05% de NH₄OH (5% de ACN, 95% de H₂O, solvente A), a 0,05% de NH₄OH (95% ACN, 5% de H₂O, solvente B), 55 de B a 205 de B em 10 minutos, mudado para 955 de B em 25 minutos, e em seguida mudado para 55 de B em 1 minuto; 11,1 minutos (aminoéster **1**).



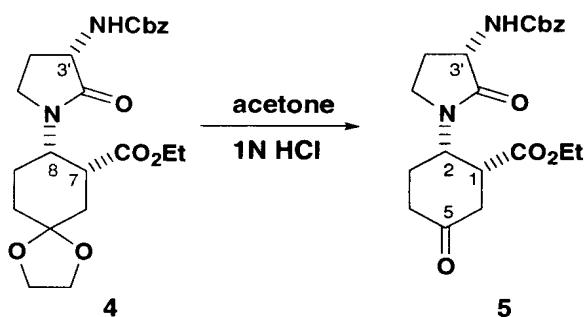
Exemplo 1, Etapa Alternativa 9aⁱⁱ: Aminoéster 1 (63g, 0,16M, 1eq.; o produto de desproteção redutora de um composto conhecido – (Veja por exemplo R. J. Cherney, WO 2004/098516 e G. V. Delucca & S. S. Ko, WO 2004/110993) foi colocado em um frasco de fundo redondo e MeCN (500 mL) foi adicionada. EDAC (33,1g, 0,17M, 1,1eq), HOBT·H₂O (21,2g, 0,16M, 1,0eq) e N-Cbz-L-metionina (46,7g, 0,17M, 1,05eq) foram em seguida adicionados seguido por TEA (48,0 mL, 0,35M, 2,2eq). Uma exotermia exoterma para 38 °C foi observada. A massa de reação foi deixada agitar em temperatura ambiente. Após 30 minutos, HPLC indicou conversão completa. A massa de reação foi diluída com EtOAc (2,5L) e lavada com KHCO₃ (4×500 mL, 20wt % de solução aquosa) e salmoura (500 mL). A fase orgânica foi separada, secada sobre MgSO₄ e concentrada. O resíduo foi dissolvido em TBME e reconcentrado para fornecer (7*R*,8*S*)-8-((2*S*)-2-benziloxicarbonilamino-4-metilsulfanylbutyryl-amino)-1,4-dioxa-15 espiro[4,5]decano-7-carboxilato de etila 2 como um sólido pegajoso (76,2g, 98,5% de produção, 93AP de pureza). ¹H-NMR: (300MHz, CDCl₃) δ 7,36-7,30 (m, 5H), 7,03 (d, *J* 9,0Hz, 1H), 5,66 (d, *J* 8,0Hz, 1H), 5,10 (s, 2H), 4,35-4,25 (m, 2H), 4,19-4,04 (m, 2H), 3,98-3,86 (m, 4H), 2,87-2,80 (m, 1H), 2,55-2,45 (m, 2H), 2,18 (dd, *J* 14,0Hz, 7,0Hz, 1H), 2,08 (s, 3H), 2,05-1,67 (m, 6H), 1,26 (t, *J* 7,0Hz, 3H). HPLC: YMC-Pack Pro C185μm 4,6 × 150 mm, 0,05% de TFA (20% de MeOH, 80% de H₂O), a 0,05% de TFA (20% de MeOH, 80% de MeCN), 0-100% de gradiente de 10 minutos. 10,01 minutos (Composto 2, 93,1 AP). HRMS: *m/z* 495,2166 [Calc: C₂₄H₃₅N₂O₇S 495,2165].



Exemplo 1, Etapa Alternativa 9b: Amida de metionina **2** (75,0 g, 0,15M) foi dissolvido em Mel (225mL, 3mL/g) – um pouco da gaseificação foi observada, porém nenhum exoterma. A massa de reação foi deixada agitar no escuro durante 16,5 horas. Após este tempo um precipitado amarelo claro grosso se formou. O frasco foi em seguida evacuado para 200 mmHg e um pouco de Mel removido. O material restante foi suspenso em TBME (500 mL), após uns 30 minutos de agitação a suspensão foi filtrada, a massa lavada com TBME (500 mL). Análise de NMR deste material indicou uma pequena quantidade de resíduo de Mel. A massa foi re-suspensa em TBME (500 mL), filtrada, lavada com TBME (500 mL) e secada sob vácuo para fornecer iodeto de [(3S)-3-benziloxicarbonilamino-3-[(7R,8S)-7-ethoxicarbonil-1,4-di-oxa-espíro[4,5]dec-8-ilcarbamoil]-propil]-dimetilsulfônio **3** como um sólido não totalmente branco de livre escoamento (93,5g, 97%, 99 % de área de pureza). $^1\text{H-NMR}$: (300MHz, CDCl_3) δ 7,75 (d, J 9,0Hz, 1H), 7,38-7,27 (m, 5H), 6,40 (d, J 7,0Hz, 1H), 5,10 (s, 2H), 4,76-4,65 (m, 1H), 4,48-4,39 (m, 1H), 4,14-3,85 (m, 6H), 3,84-7,73 (m, 1H), 3,68-3,55 (m, 1H), 3,21 (s, 3H), 3,12 (s, 3H), 2,90-2,83 (s, 1H), 2,52-1,55 (m, 8H), 1,24 (t, J 7,0Hz, 3H). HPLC: YMC-Pack Pro C18 5 μm 4,6 x 150 mm, 0,05% de TFA (20% de MeOH, 80% de H_2O), a 0,05% de TFA (20% de MeOH, 80% de MeCN), 0-100% de gradiente de 10 minutos. 2,45 minutos (I-), 8,14 minutos (Composto **3**, 43,6AP, I $^\circ$ 54,6AP). HRMS: m/z 509,2341 [Calc: $\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$ 509,2321].



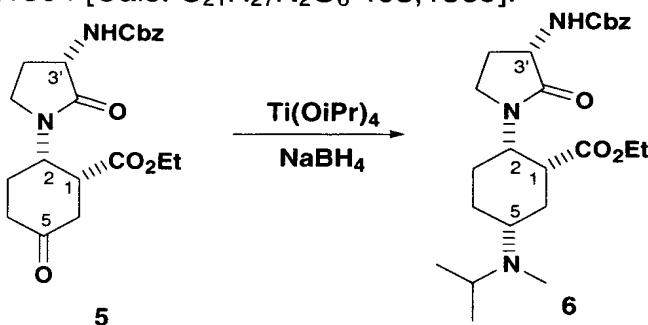
Exemplo 1, Etapa Alternativa 9c: Cs_2CO_3 (61,5g, 0,19M, 1,5eq) foi colocado em um frasco de fundo redondo e DMSO anidroso (2,4L) foi adicionado. Sal de sulfônio **3** (80,0g, 0,13M, 1,0eq) foi em seguida adicionado em porções. Uma vez a adição ser completa a massa de reação foi deixada agitar no escuro durante 20 horas. A massa de reação foi em seguida dividida na metade e cada metade preparada separadamente: a massa de reação foi diluída com EtOAc (2,0L) e lavada com salmoura (2L), a fase orgânica foi lavada com salmoura (500 mL). As camadas aquosas combinadas foram em seguida lavadas EtOAc (500 mL). As fases orgânicas combinadas foram em seguida lavadas com salmoura (3 x 750 mL). A segunda metade da massa de reação foi tratada de uma maneira idêntica e os orgânicos combinados secados sobre MgSO_4 e concentrados para fornecer (*7R,8S*)-8-((*3S*)-3-benziloxicarbonilamino-2-oxo-pirrolidin-1-il)-1,4-dioxa-espiro[4,5]decano-7-carboxilato de etila **4** como um óleo de cor clara (56,5g, 0,13M, ~100 área-% de pureza) puro por análise de NMR. $^1\text{H-NMR}$: (300MHz, CDCl_3) δ 7,38-7,30 (m, 5H), 5,37 (br d, J 4,0Hz, 1H), 5,11 (s, 2H), 4,27-4,18 (m, 1H), 4,17-3,82 (m, 8H), 3,32 (td, J 10,0Hz, 60,0Hz, 1H), 3,23 (q, J 5,0Hz, 1H), 2,63-2,57 (m, 1H), 2,42-2,25 (m, 2H), 1,94-1,68 (m, 5H), 1,25 (t, J 7,0Hz, 3H), HPLC: YMC-Pack Pro C18 5 μm 4,6 x 150 mm, 0,05% de TFA (20% de MeOH, 80% de H_2O), a 0,05% de TFA (20% de MeOH, 80% de MeCN), 0-100% de gradiente de 10 minutos. 8,99 minutos (Composto **5**, produzido em coluna, 4,2AP), 9,48 (Composto **4**, 74,3AP). HRMS: m/z 447,2127 [Calc: $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_7$ 447,2131].



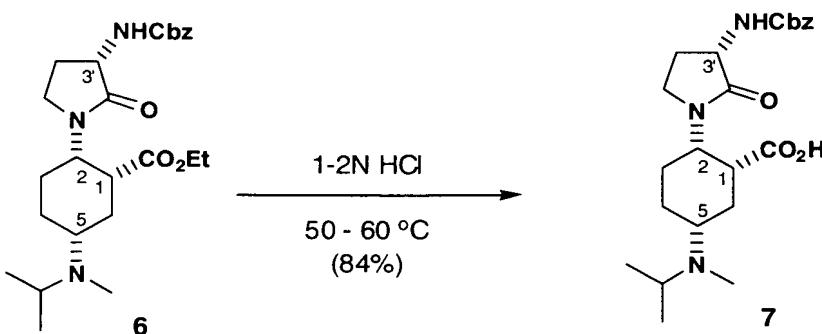
LEGENDA DA FIGURA

acetona

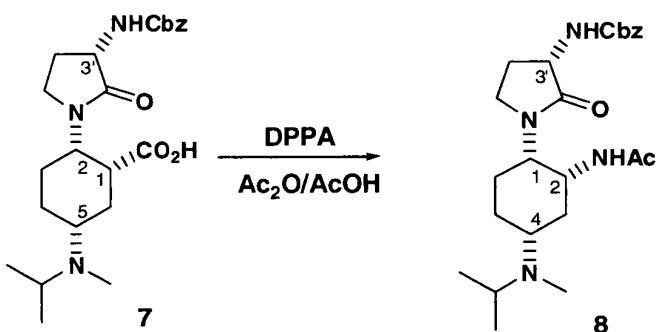
Exemplo 1, Etapa Alternativa 9d: Pirrolidinona 4 (50,0g, 0,11M) foi dissolvido em acetona (500 mL) e 1N de HCl (500 mL) foi adicionado. A massa de reação foi em seguida aquecida para 65°C. Após 20 minutos HPLC indicou reação completa. A massa de reação foi deixada resfriar para temperatura ambiente e a acetona foi removida em um evaporador giratório. Durante esta destilação o produto precipitou-se da solução como um sólido branco. Este foi isolado por filtração e a massa lavada com água. A massa foi em seguida secada azeotropicamente com tolueno (3×300 mL) para fornecer (1*R*,2*S*)-2-((3*S*)-3-benziloxicarbonilamino-2-oxo-pirrolidin-1-il)-5-oxo-cicloexanocarboxilato de etila 5 como um sólido branco (39,8g, 88%, 97 area-% purity). $^1\text{H-NMR}$: (300MHz, CDCl_3) δ 7,37-7,32 (m, 5H), 6,65 (br d, J 4,0Hz, 1H), 5,12 (s, 2H), 4,54-4,47 (m, 1H), 4,34-4,26 (m, 1H), 4,18 (dq, J 11,0Hz, 7,0Hz, 1H), 4,09 (dq, J 11,0Hz, , 7,0Hz, 1H), 3,36-3,20 (m, 3H), 2,70-2,35 (m, 6H), 2,05-1,96 (m, 1H), 1,81 (quin,, J 11,0Hz, 1H), 1,24 (t, J 7,0Hz, 3H). HPLC: YMC-Pack Pro C18 $5\mu\text{m}$ 4,6 × 150 mm, 0,05% de TFA (20% de MeOH, 80% de H₂O), a 0,05% de TFA (20% de MeOH, 80% de MeCN), 0-100% de gradiente de 10 minutos. 8,95 minutos (Composto 5). HRMS: *m/z* 403,1864 [Calc: $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_6$ 403,1869].



Exemplo 1, Etapa Alternativa 9e: Cicloexanona **5** (22,5g, 0,06M, 1eq), DMSO (30 mL) e Ti(O-iPr)₄ (33,7mL, 0,11M, 2,04eq) foram colocados em um frasco de fundo redondo. *N*-isopropil-*N*-metilamina (11,6mL, 0,11M, 2,0eq) foi em seguida adicionado em uma porção. A mistura foi deixada agitar durante 30 minutos em temperatura ambiente antes de ser resfriada para <3°C em gelo/água. MeOH (30 mL) foi em seguida adicionado seguido pela adição em porções de NaBH₄ (4,33g, 0,11M, 2,04eq) – temperatura mantida <8°C. 30 minutos após a adição ser completada a massa de reação foi diluída com cloreto de metileno (300 mL) e em seguida NaOH (1N, 40 mL). A suspensão resultante foi filtrada através de Celite, e a massa lavada com cloreto de metileno (100 mL). O líquido resultante foi concentrada sob pressão reduzida e o resíduo dissolvido em EtOAc (500 mL). Esta solução foi extraída com 1N de HCl (2 – 400 mL), as camadas aquosas combinadas foram em seguida basificadas com Na₂CO₃. Extração com EtOAc (4 – 250 mL) forneceu uma fase orgânica incolor e clara que foi secada sobre Na₂SO₄ e concentrada para fornecer um pó branco (24,6g, 96%, 7:1 d.r.). Este material foi em seguida suspenso durante a noite em hexano (670 mL). O sólido foi isolado por filtração e secado sob pressão reduzida para fornecer (1*R*,2*S*,5*R*)-2-((3*S*)-3-benziloxicarbonilamino-2-oxo-pirrolidin-1-il)-5-(isopropil-metil-amino)-cicloexanocarboxilato de etila **6** como um sólido branco (20,9g, 81%, 24:1 d.r.). ¹H-NMR: (300MHz, CDCl₃) δ 7,37-7,28 (m, 5H), 5,55 (d, *J* 4,5, 1H), 5,10 (s, 2H), 4,42 (q, *J* 4,5, 1H), 4,23-4,12 (m, 1H), 4,08 (dq, *J* 10,5, 7,0, 1H), 4,02 (dq, *J* 10,5, 7,0, 1H), 3,84 (t, *J* 9,0, 1H), 3,46-3,36 (m, 1H), 3,04 (septet, *J* 6,5, 1H), 2,86-2,80 (m, 1H), 2,63-2,48 (m, 2H), 2,17 (s, 3H, Me), 2,10-1,63 (m, 7H), 1,22 (t, *J* 7,0, 3H), 1,00 (d, *J* 6,5, 3H), 0,97 (d, *J* 6,5, 3H). HPLC: YMC-Pack Pro C185μm 4,6 – 150 mm, 0,01M NH₄OAc (MeOH:água 20:80) a 0,01M de NH₄OAc (MeOH:água:MeCN 20:5:75) 10 a 100% de gradiente de 15 minutos. 8,23 (Composto **6**), 8,88 (**5-epi-Composto 6**). HRMS: 460,2798 [Calc: C₂₅H₃₈N₃O₅ 460,2811].



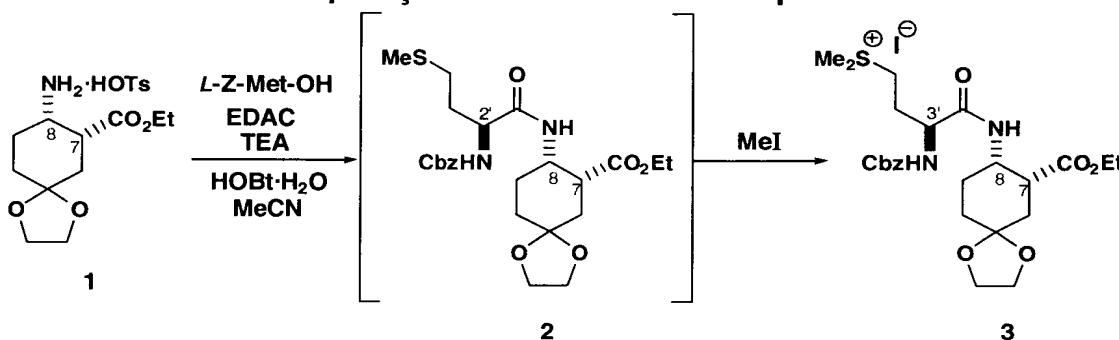
Exemplo 1, Etapa Alternativa 9f: O aminoéster **6** (9,76 g, 2,12 mmol) foi dissolvido em 2N de HCl (80 mL), em seguida aquecida para ~55 °C sob uma atmosfera inerte. A reação foi agitada durante 20 horas, em seguida resfriada para temperatura ambiente. A solução de reação foi lavada duas vezes com tolueno (25 mL de porções), neutralizada para pH 6 – 7 pela adição de péletes de KOH, em seguida extraída oito vezes com cloreto de metíleno (porções de 100 mL). Os extratos combinados foram secados (Na_2SO_4), filtrados, e concentrados sob pressão reduzida ao volume total de 50 mL. A solução concentrada foi em seguida lentamente adicionada ao éter terc-butílico de metila (300 mL) durante 15 minutos em um funil de adição com agitação vigorosa. A suspensão branca resultante foi agitada em temperatura ambiente durante 1 hora, em seguida resfriada para 0 °C e agitada durante 1 hora. O produto foi filtrado, e lavado duas vezes com éter terc-butílico de metila (25 mL porções). A água da massa úmida foi removida por destilação azeotrópica com acetonitrilo (300 mL). O produto foi seco sob pressão reduzida para fornecer ácido $(1R,2S,5R)$ -2-((3*S*)-3-benziloxicarbonilamino-2-oxo-pirrolidin-1-il)-5-(isopropil-metil-amino)-cicloexanocarboxílico **7**, (7.69 g, 845 de produção) como uma espuma branca. $^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, 50°C, CDCl_3) δ 7,44-7,32 (m, 5H), 6,10 (amplo s, 1H), 5,19 (app s, 2H), 4,42 (dd, $J = 15,6, 7,8$ Hz, 1H), 4,29-4,23 (m, 1H), 3,68-3,60 (m, 2H), 3,33-3,27 (m, 2H), 3,20 (amplo s, 1H), 2,99 (amplo s, 1H), 2,51 (s, 3H), 2,49-2,45 (m, 3H), 2,33-2,31 (m, 1H), 2,00 (ddd, $J = 9,0, 8,6, 3,9$ 1H), 1,95-1,78 (m, 2H), 1,36-1,21 (m, 6H), LCMS: m/z 432,20 [Calc: $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_5$ 432,25].



Exemplo 1, Etapa Alternativa 9g: Aminoácido 7 (6,3g, 14,7 mmol, 1,0 eq) foi dissolvido em THF (80 mL) sob N₂ e NaH (584mg, 14,7 mmol, 1,0 eq, 60 wt% de dispersão em óleo mineral) foi adicionado em porções. Quando a adição foi completa, e a evolução de gás parou, a massa de reação foi concentrada sob pressão reduzida e o sólido resultante azeotropado com tolueno (50 mL) para fornecer um sólido branco (KF 0,59 wt%). O sólido foi suspenso em tolueno (100 mL) sob N₂ e aquecido para 90°C. DPPA (3,32 mL, 15,3 mmol, 1,05 eq) foi adicionado gota a gota durante ~2 minutos. Após ~5 minutos todos os sólidos dissolveram, após 10 minutos a precipitação de um sólido branco foi observada. Após 30 minutos análise de HPLC indicou reação completa. A massa de reação foi deixada resfriar para temperatura ambiente antes de ser filtrada, a massa foi lavada com tolueno. Os líquidos foram em seguida lentamente adicionados em solução de AcOH/Ac₂O (80/20, 168mL) a 90°C. Após 45 minutos HPLC ainda indicou um isocianato. Em 1,15 horas, a massa de reação foi resfriada para temperatura ambiente e diluída com tolueno (100 mL) e água (100 mL). A camada orgânica foi removida e o tolueno lavado com 1N de HCl (100 mL). As fases aquosas combinadas foram em seguida basificadas com K₂CO₃(s) e conduzidas para pH 12 com NaOH (10N), mantendo a temperatura abaixo de 20°C. A camada aquosa foi em seguida extraída com cloreto de metíleno (4×150 mL), as camadas orgânicas combinadas secadas sobre K₂CO₃ e concentradas para fornecer (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(isopropil(metil)amino)cicloexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de benzila 8 como uma espuma branca (4,5g, 70%, 94AP de pureza). O ¹H-NMR foi idêntico ao material obtido da rotina descrita acima (Exemplo 1, Etapa 9). HPLC:YMC-Pack Pro C185μm 4,6 × 150 mm, 0,05% de TFA (20% de MeOH, 80% de H₂O), a 0,05% de TFA

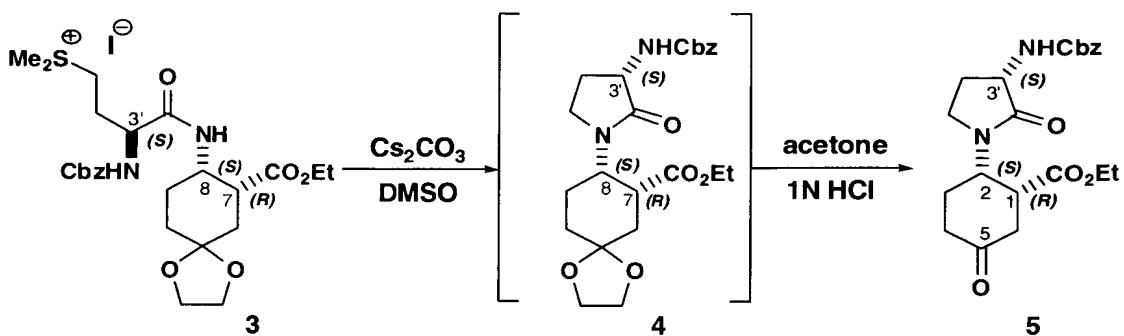
(20% de MeOH, 80% de MeCN), 0-100% de gradiente de 10 minutos. 7,20 minutos (Composto **8**), 7,85 minutos (dímero de uréia). HRMS: 445,2809 [Calc: C₂₄H₃₇N₄O₄ 445,2815].

Preparação Alternativa de Exemplo 1

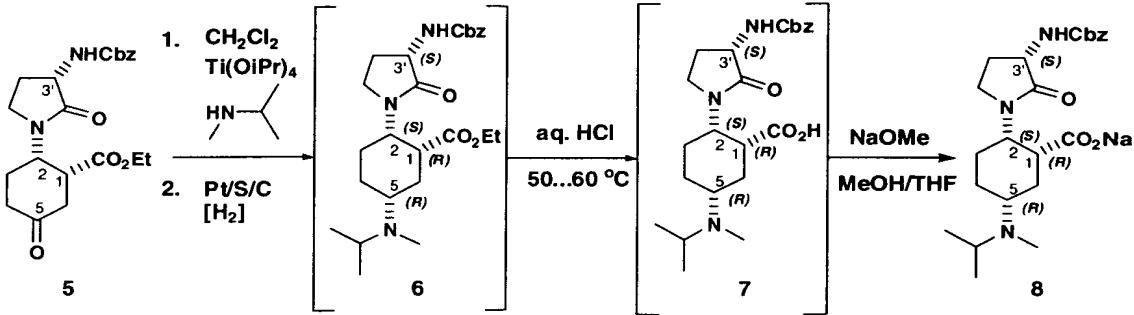


Exemplo 1, Preparação Alternativa, Etapa 1: (7*R*,8*S*)-8-amino-1,4-dioxa-

5 espiro[4,5]decano-7-carboxilato sal de 4-toluenossulfonato de etila **1** (450,1g), foi combinado com hidrocloreto de 1-etyl-3-(3-dimetil-amino-propil)carbo-diimida (236,3g), hidreto de benzotriazol de 1-hidróxi (171,9g), *N*-carbobenziloxi-*L*-metionina (333,4g) e acetonitrilo (3,1 L). À mistura agitada foi adicionado trietilamina (249,5g) abaixo de 30 °C. Na conclusão da
10 reação (HPLC), a mistura foi diluída com acetato de etila (8,2 L) e lavada com 25% de solução de bicarbonato de potássio aquosa (2-4,5 L) seguido por água (4,5 L). A fase orgânica foi separada e concentrada sob pressão reduzida para obter uma solução de (7*R*,8*S*)-8-((*S*)-2-benziloxicarbonilamino-4-metilsulfanyl-butyrylamino)-1,4-dioxa-
15 espiro[4,5]decano-7-carboxilato de etila **2** (1,4 L). Iodeto de metila (2,39 kg) foi adicionado, o vaso foi protegido da luz e a mistura foi mantida sob baixa agitação durante aproximadamente 24 horas. Ao precipitado amarelo grosso foi adicionado éter terc-butílico de metila (2,7 L) e a mistura foi mantida durante aproximadamente 1 hora. O produto foi isolado por filtração e a massa
20 foi lavada com éter terc-butílico de metila (2x1,4 L), em seguida secado sob vácuo, produzindo iodeto de [(*S*)-3-benziloxi-carbonilamino-3-((7*R*,8*S*)-7-ethoxicarbonil-1,4-dioxa-espiro[4,5]dec-8-ilcarbamoyl)-propil]-dimetilsulfônio **3** (671,4 g, ~945 de produção) como um sólido não totalmente branco (99,9% de pureza de HPLC).



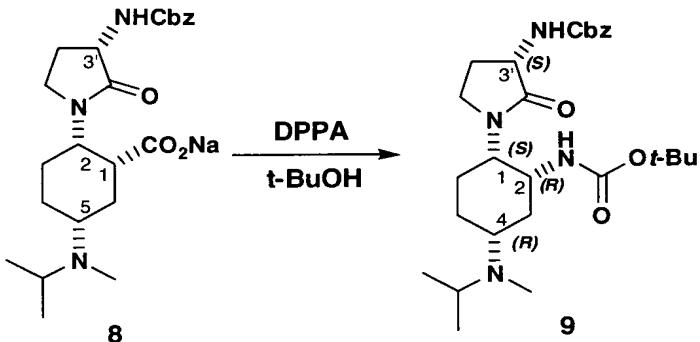
Exemplo 1, Preparação Alternativa, Etapa 2: Sal de sulfônio **3** (619,4 g), e carbonato de céssio (416,8 g) e sulfóxido de dimetila anidroso (6,2 L) foram combinados em um reator equipado com um purificador para neutralizar sulfetos voláteis. A agitação vigorosa foi mantida até a conversão completa ser obtida (HPLC). Acetato de etila (12,4 L) foi adicionado, seguido por 20 % de salmoura (3 L). A fase orgânica foi separada, lavada duas vezes com salmoura (2x3 L) e evaporada para obter uma solução de etila (7*R*,8*S*)-8-((*S*)-3-benziloxicarbonilamino-2-oxo-pirrolidin-1-il)-1,4-dioxa-espiro[4,5]decano-7-carboxilato **4** em acetato de etila (~0,8 L). Acetona (2,55 L) foi adicionado, seguido por aquoso 0,5 M de solução de ácido hidroclórico (2,3 L). Com boa mistura, a solução foi aquecida para 50 a 60 °C até conversão de **4** para (1*R*,2*S*)-2-((*S*)-3-benziloxicarbonilamino-2-oxo-pirrolidin-1-il)-5-oxo-cicloexanocarboxilato de etila **5** ser completa (HPLC). A mistura foi concentrada sob pressão reduzida ao mesmo tempo abaixo de 40 °C, resfriada para ~30 °C, e água (4,1 L) foi adicionada. A suspensão resultante foi resfriada para 5 a 10 °C e agitada para ~1 hora. O produto foi filtrado e a massa foi lavada com água (2x2,5 L). Na remoção do líquido, a massa foi secada para um peso constante abaixo de 40 °C em um forno a vácuo. Cicloexanona **5** (272g, 705 de produção) foi obtido (98,7% de pureza de HPLC).



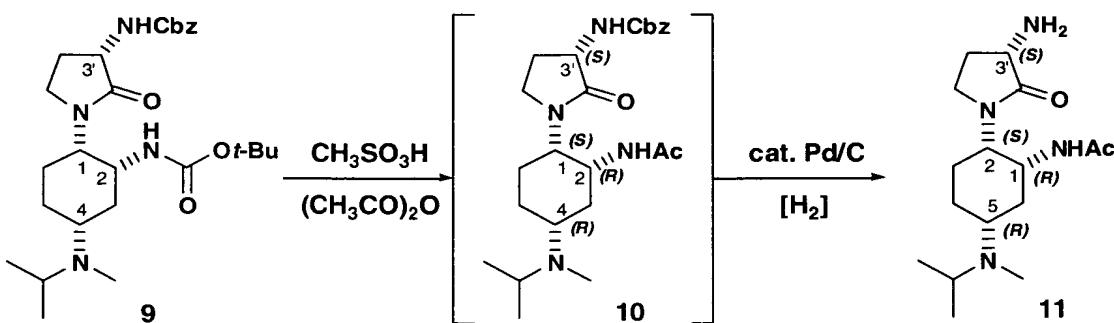
20 Exemplo 1, Preparação Alternativa, Etapa 3: Cicloexanona **5** (206 g) foi

dissolvido em diclorometano (1,1 L) e carregado a um hidrogenador. Tetraisopropóxido de titânio (218,2 g) e *N*-isopropil *N*-metilamina (63,64 g) foram adicionados e a mistura foi agitada em temperatura ambiente (23 a 25 °C) durante pelo menos 5 horas. Catalisador de platina (5% Pt/S/C, 15 g, aproximadamente 7,5 % relativo a 5) foi adicionado e hidrogenação foi realizada a ~2,10 kg/cm² durante pelo menos 6 horas, produzindo uma mistura de (1*R*,2*S*,5*R*)-2-((*S*)-3-benziloxicarbonilamino-2-oxo-pirrolidin-1-il)-5-(isopropil-metil-amino)-cicloexanocarboxilato de etila **6** e seu 5-*epi*-isômero (~7%). O catalisador foi removido por filtração e o filtrado foi concentrado sob pressão reduzida para aproximadamente ~600 mL. Acetato de etila úmido (~3% de água, 2,0 L) foi adicionado com agitação vigorosa durante um período de pelo menos 1,5 horas. A agitação foi continuada durante pelo menos mais 6 horas. A suspensão foi filtrada. A massa de filtro foi lavada com acetato de etila (1,0 L) e descartada. O filtrado combinado e lavagens foram concentrados a ~400 mL. Tolueno (2,0 L) foi adicionado e a solução foi lavada com 2M de ácido hidroclórico aquoso (2 x 400 mL). A camada aquosa foi aquecida para 50° a 60 °C durante aproximadamente 20 horas ou hidrólise de **6** foi considerada completa (HPLC). Solução de hidróxido de sódio aquosa foi adicionada para ajustar-se ao pH ~10, e a mistura foi extraída com tolueno (3x600 mL). A fase orgânica foi descartada e o pH foi re-ajustada para ~6 pela adição de ácido hidroclórico aquoso. A fase aquosa foi concentrada para ~600 mL sob pressão reduzida e extraída com cloreto de metíleno (pelo menos 3x2,0 L). As camadas de cloreto de metíleno combinadas foram evaporadas sob pressão reduzida e continuamente substituídas com THF para obter uma solução de ácido (1*R*,2*S*,5*R*)-2-((*S*)-3-benziloxicarbonilamino-2-oxo-pirrolidin-1-il)-5-(isopropil-metil-amino)-cicloexanocarboxílico **7** (~148 g) em THF (~4 L). Cristais de semente de **8** foram adicionados, seguido por 25 % de solução de metóxido de sódio em metanol (81,24 g) abaixo de 25 °C. A suspensão foi mantida durante pelo menos mais 16 horas com agitação. O produto foi isolado por filtração e a massa foi lavada com THF (4x200 mL) e secada a um peso constante *em vácuo* abaixo de 30 °C. sal de sódio de (1*R*,2*S*,5*R*)-2-((*S*)-3-benziloxicarbonil-amino-2-oxo-pirrolidin-1-il)-5-(isopropil-

metil-amino)-cicloexano-carboxilato seco **8** foi obtido (139 g, ~605 de produção de **5**).



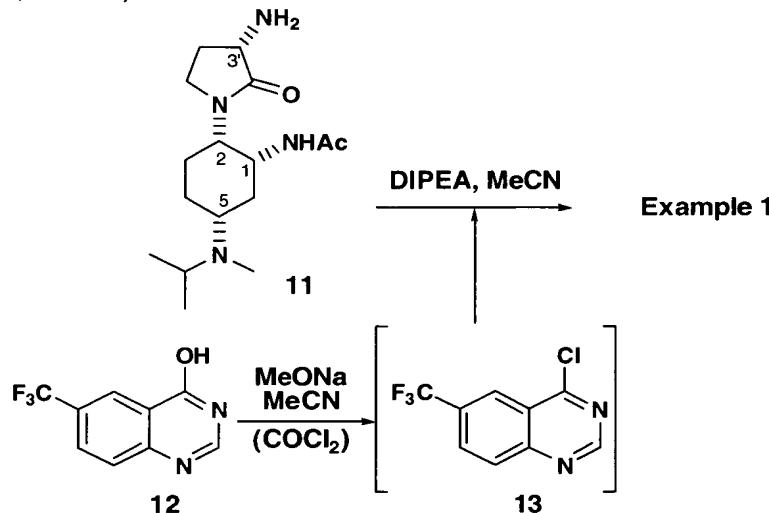
Exemplo 1, Preparação Alternativa, Etapa 4: Sal de sódio de aminoéster **8** (100g), fosfato de difenila (3.86g), *terc*-BuOH (1275 mL) e tolueno (225 mL) foram combinados e aquecidos ao refluxo sob pressão reduzida. Aproximadamente 500 mL de destilado foram coletados e descartados ao mesmo tempo que sendo continuamente substituídas com uma solução de tolueno em *terc*-BuOH. Vácuo foi removido e o destilado foi mudado para percolato através de uma coluna carregada com peneiras moleculares e deixado para retornar ao vaso. Após a secagem ser completa, DPPA (52,4mL; dissolvido em 60 mL tolueno) foi adicionado lentamente à suspensão a 80 °C. Na conclusão da reação (HPLC), *terc*-BuOH foi removido por destilação a vácuo e continuamente substituído com tolueno. A mistura foi resfriada para temperatura ambiente e lavada duas vezes com 10% de K₂HPO₄ aquoso (1x800 mL, 1x400 mL) e água (400 mL). A fase orgânica foi aquecida e concentrada em vácuo para aproximadamente 270 mL. Vácuo foi removido e heptano (1,1 L) foi adicionado lentamente a aproximadamente 80 °C, seguido por sementes de **9** (~1g). A suspensão foi lentamente resfriada para temperatura ambiente e {(S)-1-[(1*S,2R,4R*)-2-*terc*-butoxicarbonilamino-4-(isopropil-metil-amino)-ciclo-hexil]-2-oxo-pirrolidin-3-il}-carbamato de benzila **9** foi isolado por filtração como um sólido branco (86,76g, 785 de produção).



Exemplo 1, Preparação Alternativa, Etapa 5: O carbamato de ter-butila **9** (50g) foi dissolvido em tolueno (500 mL) e *i*-PrOH (150 mL). A solução resultante foi em seguida aquecida para 60°C. Ácido metanossulfônico (19.6mL) foi adicionado abaixo de 65°C. Na conclusão da reação (HPLC), a mistura foi resfriada para temperatura ambiente e trietilamina (69,4mL) adicionado lentamente abaixo de 25°C. Anidrido acético foi em seguida adicionado abaixo de 25°C. Após 1 hora, ácido acético (250 mL) foi adicionado abaixo de 25°C. A fase de tolueno foi descartada e 2-metil-THF (500 mL) foi adicionado à fase aquosa. A mistura foi agitada vigorosamente e basificada com NaOH (25% de solução aquosa) para pH 12. A fase aquosa foi descartada e a camada orgânica foi lavada com salmoura (250 mL). A camada orgânica foi concentrada sob pressão reduzida e continuamente substituída com *i*-PrOH. A solução foi resfriada e filtrada para fornecer *{(S)-1-[{(1S,2R,4R)-2-acetilamino-4-(isopropil-metil-amino)-cicloexil]-2-oxo-pirrolidin-3-il}-carbamato de benzila* **10** em solução de *i*-PrOH que foi utilizada diretamente na hidrogenação.

Exemplo 1, Preparação Alternativa, Etapa 6: A uma solução contendo acetamida **10** (~61g) em *i*-PrOH (~625 mL) foi adicionado 10% de catalisador úmido de Pd/C (2,5 g) e a suspensão foi hidrogenada em 2,10 Kg/cm² e a proximadamente 25 °C durante pelo menos 2 horas. Na conclusão (HPLC), o catalisador foi removido por filtração e o filtrado foi concentrado para aproximadamente 550 mL. Água (8,8 mL) foi adicionada, seguido por 5,6 N de ácido hidroclórico em solução de *i*-PrOH (69,5 mL). A suspensão resultante foi mantida em temperatura ambiente durante a noite. O produto foi isolado por filtração e a massa foi enxaguada com *i*-PrOH (2x100 mL) e secada em vácuo a peso constante a ~50 °C para fornecer *N-[(1R,2S,5R)-2-((S)-3-*

amino-2-oxo-pirrolidin-1-il)-5-(isopropil-metil-amino)-cicloexil]-acetamida **11** (55.6 g, 975 de produção) como seu sal de ácido hidroclórico (73,6% ensaio de base livre, HPLC).



LEGENDA DA FIGURA

5 Exemplo

Exemplo 1, Preparação Alternativa, Etapa 7: Ao 6-trifluorometil-quinazolin-4-ol **12** (20,1 g) em MeCN (400 mL) foi adicionado 5,5 M de solução de metóxido de sódio em metanol (17,0 mL). A suspensão resultante foi destilada sob pressão reduzida e continuamente substituída por MeCN para remover metanol. À suspensão foi adicionado DMF (1,4 g), seguido por cloreto de oxalila (13,0 mL) abaixo de 50 °C. Na conclusão da reação (HPLC), excesso de reagente foi removido sob pressão reduzida para fornecer ~400 mL de suspensão. A mistura foi resfriada para temperatura ambiente e lavada com 10 % de K₂HPO₄ aquoso (1x1,0 L, 1x0,5 L) para fornecer 4-cloro-6-trifluorometil-quinazolina **13** (~21,2 g) em aproximadamente 450 mL de solução de MeCN úmida, que foram utilizados diretamente na reação de acoplamento subsequente (99,8 % de pureza de HPLC).

Exemplo 1, Preparação Alternativa, Etapa 8: A uma mistura de acetamida **11** (28.5 g, sal de HCl, 73,6% de ensaio de base livre), acetonitrilo (100 mL), *N,N*-di-isopropil-*N*-etilamina (61 mL) em temperatura ambiente foi adicionado uma solução de **13** (~21,2 g) em MeCN (~450 mL). A mistura homogênea foi mantida durante a noite. Na conclusão da reação (HPLC), a mistura foi

concentrada em vácuo para aproximadamente 125 mL. Uma solução aquosa a 9,5% de ácido acético (240 mL) foi adicionada e a fase aquosa foi extraída com cloreto de metileno. A fase aquosa foi separada e éter terc-butílico de metila (450 mL) foi adicionado, seguido por 2 N de solução de hidróxido de lítio aquosa para ajustar-se ao pH >11,5. A camada orgânica foi separada, lavada com água e filtrada. Aproximadamente metade da fase de éter foi diluída com éter terc-butílico de metila (~250 mL) e concentrada em vácuo. Heptano (45 mL) foi adicionado lentamente abaixo de 60 °C, seguido por cristais de semente de **Exemplo 1** (0,4 g). Heptano adicional (125 mL) foi adicionado e a mistura foi lentamente resfriada para temperatura ambiente e a suspensão resultante foi mantida durante a noite. O produto foi isolado por filtração, a massa foi lavada com heptano e secada em vácuo a peso constante para fornecer *N*-(*1R,2S,5R*)-5-(isopropilamino)-2-((*S*)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)-quin-azolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexilacetamida **14** (15,0 g, 855 de produção).

Procedimentos de Cristalização para Exemplo 1

Exemplo 1, Produção de sal de bis-BSA e purificação: A totalidade da base livre de amorfó de Exemplo 1, Etapa 11 foi dissolvida em metanol (600 mL). A solução resultante foi aquecida a 60 °C e carregada com ácido benzenossulfônico (2,5 eq). A mistura foi resfriada para temperatura ambiente e o sólido branco resultante foi coletado por filtração para prouzir o sal de ácido bis-benzeno sulfônico do composto título (95 g, 86%). Este material foi >99% puro por HPLC. Este material foi também purificado por recristalização de 80/20 EtOH/H₂O, que forneceu o sal livre de qualquer metanol residual.

HPLC pureza = 99,8%. 1 hora NMR (500 MHz, D₂O) – ppm 8,75 (1 H, s), 8,66 (1 H, s), 8,25 (1 H, d, *J*=8,80 Hz), 7,90 (1 H, d, *J*=8,80 Hz), 7,75 (4 horas, d, *J*=8,25 Hz), 7,43 - 7,57 (6 H, m), 5,42 (1 H, t), 4,33 - 4,44 (1 H, m), 4,09 - 4,19 (1 H, m), 3,83 - 3,91 (1 H, m), 3,74 - 3,83 (2 horas, m), 3,61 (1 H, t, *J*=11,55 Hz), 2,75 (3 H, d, *J*=6,60 Hz), 2,61 - 2,70 (1 H, m), 2,31 - 2,44 (1 H, m), 2,20 - 2,27 (1 H, m), 2,17 (2 horas, d, *J*=12,10 Hz), 1,94 - 2,04 (1 H, m, *J*=12,65 Hz), 1,90 - 1,95 (3 H, m), 1,72 - 1,91 (2 horas, m), 1,37 (3 H, d, *J*=6,05 Hz), 1,29 (3 H, d, *J*=6,60 Hz). Calorimetria de varredura diferencial

utilizou ma taxa de aquecimento de 10 °C/min e revelou uma endotermia de fusão/decomposição com um início de temperatura de 297.6 °C e uma temperatura de pico a 299.1 °C.

Exemplo 1, Cristalização da Base Livre: Uma amostra da base livre de 5 amorfó de *N*-(*1R,2S,5R*)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((*S*)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida (1 g) foi dissolvida em diclorometano (5 mL). A solução foi carregada com heptano (30 mL) e em seguida aquecida para destilar o diclorometano. A solução foi resfriada para 40 °C; um sólido branco precipitou-se. A suspensão foi aquecida para 90 °C e agitada durante 2 horas. A suspensão foi resfriada para temperatura ambiente e filtrada para fornecer a base livre pura do composto 10 título. Nenhum solvente residual foi observado por $^1\text{H-NMR}$.

EXEMPLO

2

Formas de Cristal de *N*-(*1R,2S,5R*)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((*S*)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida

Várias Formas de Cristal de *N*-(*1R,2S,5R*)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((*S*)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, incluindo a base livre e formas de 15 sal, e solvatos destes, foram preparadas e caracterizadas como descrito abaixo.

Procedimentos para Caracterização dos Dados de Formas de Cristal Simples

Os dados foram coletados em um difratômetro de série CAD4 25 Bruker-Nonius (BRUKER AXS, Inc., 5465 East Cheryl Parkway Madison, WI 53711 USA). Parâmetros de célula unitária foram obtidos através de análise de esquadros mínimos das colocações de difratômetro experimentais de 25 reflexões de ângulo elevado. Intensidades foram medidas utilizando radiação de Cu K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) em uma temperatura constante com a técnica de 30 varredura variável em ω -2 θ e foram corrigidas apenas para fatores de polarização de Lorentz. Conteúdos na base foram coletados nos extremos da varredura durante a metade do tempo da varredura. Alternativamente, dados

- de cristal simples foram coletados em um sistema Bruker-Nonius Kappa CCD 2000 utilizando radiação de Cu K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). Indexação e processamento dos dados de intensidade medidos foram realizados como o pacote de software HKL2000 (Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997) em *Macromolecular Crystallography*, eds. Carter, W.C. Jr & Sweet, R.M. (Academic, NY), Volume 276, pp. 307-326) no jogo de programa Collect. (Collect *Data collection and processing user interface: Collect: Data collection software*, R. Hooft, Nonius B.V., 1998.) Alternativamente, dados de cristal simples foram coletados em um sistema Bruker-AXS APEX2 CCD utilizando radiação de Cu K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). Indexação e processamento dos dados de intensidade medidos foram realizados com o jogo de pacote/programa de software APEX2 (APEX2 *Data collection and processing user interface: APEX2 User Manual*, v1,27; BRUKER AXS, Inc., 5465 East Cheryl Parkway Madison, WI 53711 USA).
- Quando indicado, cristais foram resfriados na corrente fria de um sistema de Oxford cryo (Oxford Cryosystems Cryostream cooler: J. Cosier e A.M. Glazier, J. Appl. Cryst., 1986, 19, 105) durante coleção de dados.

As estruturas foram solvidas por métodos diretos e refinadas nas bases de reflexões observadas utilizando o pacote de software SDP (SDP, Pacote de Determinação de Estrutura, Enraf-Nonius, Bohemia NY 11716. Fatores de dispersão, incluindo f' e f'' , no software SDP foram tomados do "International Tables for Crystallography", Kynoch Press, Birmingham, England, 1974; Vol. IV, Tables 2,2A e 2,3,1) com modificações locais menores ou MAXUS de pacotes cristalográficos (conjunto de solução maXus e software de refinamento: S. Mackay, C.J. Gilmore, C. Edwards, M. Tremayne, N. Stewart, K. Shankland. maXus: um programa de computador para a solução e refinamento das estruturas de cristal de dados de difração ou SHELXTL⁴. Os parâmetros atômicos derivados (coordenadas e fatores de temperatura) foram refinados através de esquadros menores de matriz máxima. A função minimizada nos refinamentos foi $\Sigma_w (|F_{\text{O}}| - |F_{\text{C}}|)^2$. R é definida como $\Sigma ||F_{\text{O}}| - |F_{\text{C}}|| / \Sigma |F_{\text{O}}|$ enquanto $R_w = [\Sigma_w (|F_{\text{O}}| - |F_{\text{C}}|)^2 / \Sigma_w |F_{\text{O}}|^2]^{1/2}$ onde w é uma função de pesagem com base em erros nas intensidades observadas. Os mapas da

diferença foram examinados em todas as etapas de refinamento. Hidrogênios foram introduzidos em posições idealizadas com fatores de temperatura isotrópicos, porém nenhum parâmetro de hidrogênio foi variado.

5 Dados de Difração de Pó de raio X (PXRD)

Dados de PXRD foram obtidos utilizando um Bruker C2 GADDS . A radiação foi Cu K α (40 KV, 50mA). A distância do detector de amostra foi 15 cm. As amostras de pó foram colocadas em capilares de vidro selados de 1 mm ou menos em diâmetro; o capilar foi girado durante coleção de dados.

- 10 Os dados foram coletados para $3 \leq 2\theta \leq 35^\circ$ com um tempo de exposição de amostra de pelo menos 2000 segundos. Os arcos de difração de bidimensionais foram integrados para criar um modelo de PXRD unidimensional tradicional com um tamanho de etapa de 0,02 graus 2 θ na extensão de 3 a 35 graus 2 θ . Cerca de 200 mg foram embalados em um porta amostra de difração de raio X em pó Philips (PXRD). A amostra foi transferida para uma unidade MPD Philips (45 KV, 40 mA, Cu K α). Dados foram coletados em temperatura ambiente na extensão de 2-teta de 2 a 32 (modo de varredura contínua, taxa de varredura 0,03 graus/segundos, auto-divergência e fendas anti-dispersão, fendas de recebimento: 0,2 mm, centrifugador de amostra:
- 15 20 ON)

Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC)

Experimentos de DSC foram realizados em um modelo de TA Instruments™ Q1000 ou 2920. A amostra (cerca de 2 a 6 mg) foi pesada em uma panela de alumínio e precisamente registrada um centésimo de miligrama miligrama, e transferida para o DSC. O instrumento foi purgado com gás de nitrogênio em 50 mL/minuto. Os dados foram coletados entre temperatura ambiente e taxa de aquecimento de 300°C em 10°C/minutos. O lote foi feito com os picos endotérmicos acentuando.

Análise Gravimétrica Térmica (TGA)

Os experimentos de TGA foram realizados em um modelo de TA Instruments™ Q500 ou 2950. A amostra (cerca de 10 a 30 mg) foi colocada em uma panela de platina previamente tarada. O peso da amostra foi medi-

do precisamente e registrada a um milésimo de um miligrama pelo instrumento. A fornalha foi purgada com gás de nitrogênio em 100 mL/minuto. Os dados foram coletados entre temperatura ambiente e taxa de aquecimento de 300°C a 10°C/minuto.

5 Preparação e Análise das Formas

Os dados de célula unitária e outras propriedades para estes exemplos são apresentados na Tabela 1. Os parâmetros de célula unitária foram obtidos de análise cristalográfica de raio X de cristal simples. Uma conta detalhada de células unitárias pode ser encontrada no Chapter 3 of 10 Stout & Jensen, *X-Ray Structure Determination: a Practical Guide*, (MacMillan, 1968).

As coordenadas atômicas fracionais para os exemplos 2a, b, c, d, e, f, g, e h, são apresentadas nas Tabelas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, respectivamente. .

15 Adicionalmente, posições de pico de difração de raio x em pó características (graus $2\angle \pm 0,1$)@ temperatura ambiente para Exemplos 2a, b, d, e, f, g, e h, são apresentadas na Tabela 10, todos dos que são com base em modelos de alta qualidade coletados com um difratômetro (CuK α) com um capilar giratório com $2\angle$ calibrados com outro padrão adequado

20 NIST.

Finalmente, as Figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, e 7 apresentam modelos de XRPD para Exemplos 2a, b, d, e, f, g e h, respectivamente. As figuras 8 e 9 descrevem a análise de DSC e TGA, respectivamente, de Exemplo 2a e as Figuras 10, 11, e 12 descrevem os espectros de DSC, TGA, e Isotermia de 25 Sorção de Umidade de Exemplo 2f, respectivamente.

Preparação de Forma, Caracterização de XRD, DSC e TGA

Exemplo 2a, Forma de N-1, dibesilato:

N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, sal de ácido di-benzenossulfônico, foi cristalizado de acetato de etila, etanol, metanol e acetona. Forma N-1, sal de dibesilato, é a forma de gado vacum (nenhuma molécula de água ou solvente) de N-((1R,2S,5R)-5-

(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, sal de ácido di-benzenossulfônico. Forma de dibesilato N-1 foi caracterizada por um modelo de XRD que compara o modelo simulado gerado dos dados da estrutura de cristal simples. A forma de bensilato N-1 foi caracterizada por um termograma de DSC tendo uma endotermia de fusão/decomposição com um início tipicamente a aproximadamente 296 °C. Forma N-1, dibesilato, foi caracterizada por uma curva térmica de TGA tendo perda de peso insignificante (consistente com forma não solvatada) em até aproximadamente 280 °C.

10 Exemplo 2b, Forma DC-1:

Uma amostra da base livre tipo gel, oleoso (amorfo) de *N*-((1*R*,2*S*,5*R*)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida (aproximadamente 0,5 g), após ser extraída de uma amostra do sal BSA, foi dissolvida em diclorometano (aproximadamente 3 mL). Uma solução foi adicionado aproximadamente 5 ml de heptano e a mistura de óleo resultante foi agitada vigorosamente por uma barra agitadora magnética em um bêquer aberto a 20-25°C. Um sólido branco foi obtido após os solventes evaporarem. O sólido foi re-suspensão em uma mistura de aproximadamente 5 ml de heptano e 0,2 ml de diclorometano e agitada a 25°C durante 7 dias. A suspensão resultante foi filtrada e secada a ar para fornecer *N*-((1*R*,2*S*,5*R*)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, base livre, Forma DC-1. A Forma DC-1 é caracterizada por um mol de diclorometano por mol de *N*-((1*R*,2*S*,5*R*)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, base livre. Forma DC-1, foi caracterizado por um modelo de XRD que compara o modelo simulado gerado dos dados da estrutura de cristal simples.

Exemplo 2c, Forma THOO-1:

30 *N*-((1*R*,2*S*,5*R*)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, base livre, 1 mg, foi dissolvido em 80 uL de THF. O solvente foi removido por

Speed-vac (SpeedVac Plus, SC250DDA, Savant/ThermoElectron Corp) sob vácuo elevado a 22 °C durante 16 horas. Um total de 100 uL de MIBK/Heptano (1/2 por volume) foram carregados a esta cavidade. Após contenção durante 2 semanas em temperatura ambiente (20-25°C), os cristais 5 foram observados nesta cavidade. Forma THOO é caracterizada por um mol de THF por um mol de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, base livre.

Exemplo 2d, Forma E-1:

10 N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, base livre foi cristalizado de uma solução de etanol e heptano. Forma E-1 é caracterizada por um mol de etanol por um mol de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-15 ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, base livre. A Forma E-1 foi caracterizada por um modelo XRD que compara o modelo simulado gerado dos dados da estrutura de cristal simples.

Exemplo 2e, Forma A-1:

20 N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, base livre, foi suspenso em concentração em excesso de 150 mg/mL em acetona. A suspensão foi deixada equilibrar em temperatura ambiente para fornecer uma suspensão de parte fina. Uma parte da suspensão foi filtrada e tanto o filtrado quanto suspensão foram refrigerados a 5 °C para fornecer cristais do 25 solvato de mono acetona (A-1). A forma A-1 é caracterizada por um mol de acetona por um mol de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, base livre. A forma de base livre A-1 foi caracterizada por um modelo de XRD que compara o modelo simulado gerado dos dados da estrutura de cristal 30 simples.

Exemplo 2f, Forma N-2:

Uma amostra da base livre tipo gel, oleoso (amorfo) de *N*-

((1*R*,2*S*,5*R*)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((*S*)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida (aproximadamente 0,5 g), extraída de uma amostra do sal de BSA, foi suspensa em heptano (aproximadamente 5 mL). O frasco foi iniciado com uma espátula de metal, e a suspensão foi agitada vigorosamente por uma barra de agitação magnética a 25 °C. Uma suspensão branca de partículas cristalinas foi obtida após 24 horas de agitação. A suspensão foi filtrada e a massa úmida secada em vácuo (40 °C) para fornecer a forma N-2 pura (confirmado por PXRD) da base livre. A forma N-2 foi caracterizada por um modelo de XRD que compara o modelo simulado gerado dos dados da estrutura de cristal simples. A forma N-2 é a forma de gado vacum (nenhuma molécula de solvente ou nenhuma molécula de água ou solvente) de N-((1*R*,2*S*,5*R*)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((*S*)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, base livre. A forma N-2, foi caracterizada por um termograma de DSC tendo um início de endotermia de fusão tipicamente a aproximadamente 158 °C a aproximadamente 162 °C. A forma N-2 foi caracterizada por uma curva térmica de TGA tendo uma perda de peso insignificante em até aproximadamente 145 °C em concordância com os dados da estrutura de cristal simples. A perda de peso correspondeu ao solvente adventício. A isotermia de sorção de umidade foi caracterizada por 0,15% de ganho de peso na taxa de aproximadamente 25% a aproximadamente 75% de RH a 25 °C indicando que a forma N-2 foi ligeiramente higroscópica (eu diria muito ligeramente ou não higroscópico).

Exemplo 2g, Forma AN-3:

Uma suspensão de N-((1*R*,2*S*,5*R*)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((*S*)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, base livre, em ~200 mg/mL foi preparada em acetonitrilo e deixada equilibrar em temperatura ambiente para fornecer uma suspensão uma suspensão de parte fina. Parte da suspensão foi filtrada e tanto o filtrado quanto a suspensão foram refrigerados a 5 °C para fornecer cristais do solvato de acetonitrilo (AN-3). A forma AN-3 é caracterizada por um mol de acetonitrilo por um mol de N-((1*R*,2*S*,5*R*)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((*S*)-

2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, base livre. A forma AN-3 foi caracterizada por um modelo de XRD que compara o modelo simulado gerado dos dados da estrutura de cristal simples.

5 **Exemplo 2h, Forma H4-1, HCl:**

Uma amostra da base livre de *N*-(*1R,2S,5R*)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((*S*)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida (aproximadamente 0,2 g) foi dissolvida em etanol (aproximadamente 1 mL). À solução de base livre foram adicionados aproximadamente 310 µl de solução de HCl em etanol (aproximadamente concentração de 1,25M). A solução foi semeada com uma pequena quantidade de suspensão de cristal do sal HCl. À solução turva resultante foram adicionados 3 ml de heptano. Uma suspensão branca desenvolvida gradualmente durante 1 a 2 horas enquanto agitada a 20-25°C. A suspensão 10 foi agitada a 20°C durante mais 12 horas, filtrada e lavada com heptano. A massa úmida foi secada em vácuo (40°C) para fornecer o tetraidrato de sal de HCl, forma H4-1, HCl. A forma H4-1, HCl é caracterizada tendo 4 moles de água por um mol de *N*-(*1R,2S,5R*)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((*S*)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, sal 15 de hidrocloreto. A forma de tetraidrato sal de HCl de H4-1 foi caracterizada por um modelo SRD que compara o modelo simulado gerado dos dados da estrutura de cristal simples.

TABELA 1
Parâmetro de Célula Unitária

Composto	Sal	Forma	T	a(Å)	b(Å)	c(Å)	α°	β°	γ°	$V(\text{Å}^3)$
Exp 2a	di-BSA	N-1	RT	15,1737(8)	7,6544(4)	16,7722(9)	90	93,758(2)	90	1943,8(2)
Exp 2b	Base	DC-1	RT	8,7496(5)	10,729(2)	31,029(3)	90	90	90	2912,8(6)
Exp 2c	Base	THOO-1	-50	8,7909(6)	11,1527(5)	30,862(2)	90	90	90	3025,8(3)
Exp 2d	Base	E-1	RT	8,2050(5)	11,2186(5)	32,041(2)	90	90	90	2949,3(3)
Exp 2e	Base	A-1	RT	8,8773(7)	10,5735(8)	31,319(2)	90	90	90	2939,8(4)
Exp 2f	Base	N-2	RT	11,8427(3)	18,1503(7)	12,7923(4)	90	105,362(2)	90	2651,4(2)
Exp 2g	Base	AN-3	RT	7,5341(9)	13,514(2)	14,342(2)	90	91,671(8)	90	1459,6(4)
Exp 2h	HCl	H4-1	RT	11,8391(2)	11,8391(2)	78,158(2)	90	90	90	9487,2(4)

TABELA 1 (continuada)
Parâmetro de Célula Unitária

Composto	Z'	Vm	sg	dcalc
Exp 2a	1	972	P2 ₁	1,406
Exp 2b	1	728	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	1,349
Exp 2c	1	756	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	1,340
Exp 2d	1	737	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	1,245
Exp 2e	1	735	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	1,276
Exp 2f	2	663	P2 ₁	1,269
Exp 2g	1	730	P2 ₁	1,246
Exp 2h	1	791	P6 ₁ 2 ₂	1,292

As variáveis utilizadas na Tabela 1 são definidas abaixo:

- 5 T = temperatura em Centígrado para os dados cristalográficos (RT é temperatura ambiente que é cerca de +22°C)

V = volume de célula unitária

Z' = número de moléculas de fármaco por unidade assimétrica

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

- 10 sg = grupo de espaço

dcalc = densidade de cristal calculada

TABELA 2 - Coordenadas Atômicas para Exemplo 2a, Forma N-1, dibe-silato

Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
S1	0,4296	0,3405	0,1278	H57	0,5146	0,6132	0,0473
O2	0,3848	0,2640	0,1944	H58	0,4218	0,5168	0,2790
O3	0,5075	0,2480	0,1097	H59	0,5591	0,9137	0,0886
O4	0,3692	0,3687	0,0581	H60	0,5305	1,0179	0,2235
C5	0,4631	0,5514	0,1598	H61	0,4602	0,8229	0,3179
C6	0,5031	0,6610	0,1068	H62	-0,0921	0,0872	0,5134
C7	0,4500	0,6066	0,2360	H63	-0,0975	0,3507	0,7393
C8	0,5279	0,8279	0,1298	H64	-0,2621	0,3609	0,7274
C9	0,5113	0,8867	0,2054	H65	-0,2589	0,0940	0,5014
C10	0,4744	0,7756	0,2590	H66	-0,3412	0,2321	0,6040
S11	0,0304	0,2103	0,6431	H67	0,2813	0,2966	0,2330

O12	0,0580	0,0675	0,5918	H68	0,3163	0,2103	-0,0149
O13	0,0507	0,1758	0,7265	H69	0,0931	0,1273	0,5084
O14	0,0615	0,3788	0,6162	H70	0,0812	0,1334	-0,0296
C15	-0,0863	0,2166	0,6296	H71	0,2494	0,4855	-0,0720
C16	-0,1295	0,1458	0,5613	H72	0,2837	0,3700	-0,1556
C17	-0,1335	0,2944	0,6877	H73	0,3692	0,2507	0,3208
C18	-0,2249	0,3021	0,6795	H74	0,1718	0,1588	-0,1410
C19	-0,2234	0,1541	0,5537	H75	0,1760	0,5937	0,0122
C20	-0,2690	0,2305	0,6124	H76	0,0713	0,5818	0,0518
N21	0,1351	0,3402	0,0394	H77	0,2388	0,1059	0,5751
N22	0,2122	0,3075	0,2421	H78	0,0144	0,2704	-0,1359
N23	0,2612	0,1387	-0,0417	H79	-0,0107	0,3948	-0,0519
N24	0,0979	0,2591	0,3211	H80	0,0877	0,3884	0,1993
O25	0,1429	0,0840	0,1114	H81	0,1400	0,4103	-0,2251
N26	0,1222	0,1701	0,4545	H82	0,1443	0,8789	-0,2785
O27	0,2029	-0,1265	-0,0688	H83	0,1063	0,6705	-0,3097
N28	0,1897	0,6703	-0,2034	H84	0,0611	0,7736	-0,2276
C29	0,1114	0,2601	-0,0390	H85	0,3994	0,1229	0,5687
C30	0,2281	0,4006	-0,1212	H86	0,0212	0,5681	-0,1742
C31	0,3926	0,1870	0,4435	H87	0,0851	0,6247	-0,0863
C32	0,2482	0,2192	0,3790	H88	-0,0003	0,2113	0,3972
C33	0,1850	0,2609	0,3119	H89	0,2528	0,5466	0,1402
C34	0,3395	0,2220	0,3762	H90	0,1580	0,6514	0,1725
C35	0,1915	0,2339	-0,0878	H91	0,3253	0,5947	-0,1972
C36	0,2131	0,1749	0,4516	H92	0,3197	-0,2538	0,0275
C37	0,1374	0,5280	0,0550	H93	0,3937	-0,0865	0,0040
C38	0,1447	0,2421	0,1065	H94	0,3249	-0,0591	0,0839
C39	0,2678	0,1409	0,5195	H95	0,3767	0,8481	-0,2754
C40	0,0410	0,3593	-0,0898	H96	0,2667	0,9209	-0,2913
C41	0,2593	-0,0327	-0,0318	H97	0,3183	0,9202	-0,1940
C42	0,1523	0,3701	0,1769	H98	0,3388	0,5477	-0,3381
C43	0,1572	0,4920	-0,1737	H99	0,2541	0,4208	-0,3000
C44	0,1203	0,7566	-0,2584	H100	0,2273	0,6084	-0,3576
C45	0,3559	0,1483	0,5161	H101	0,2047	0,7544	-0,1523
C46	0,0730	0,5239	-0,1311				

C47	0,0706	0,2135	0,3909				
C48	0,1814	0,5399	0,1402				
C49	0,2788	0,6660	-0,2381				
C50	0,4909	0,1922	0,4387				
C51	0,3294	-0,1139	0,0239				
F52	0,5219	0,0514	0,4093				
F53	0,5340	0,2113	0,5073				
F54	0,5176	0,3178	0,3953				
C55	0,3112	0,8512	-0,2507				
C56	0,2765	0,5513	-0,3130				

TABELA 3**Coordenadas Atômicas para Exemplo 2b, Forma DC-1**

Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
O1	0,3874	0,5713	0,1042	H41	-0,1294	0,3465	0,2606
N2	0,6277	0,6481	0,1041	H42	-0,2461	0,1574	0,1324
C3	0,3731	0,6931	0,1987	H43	-0,1481	0,1749	0,0586
O4	0,3088	0,7902	0,1889	H44	0,1951	0,4379	0,0994
N5	0,5234	0,6709	0,1945	H45	0,2635	0,5336	0,1473
C6	0,0370	0,3707	0,1487	H46	0,4541	0,5194	0,2668
N7	0,9171	0,7535	0,0862	H47	0,4188	0,4033	0,2278
C8	0,5884	0,7673	0,1246	H48	0,5887	0,4873	0,1799
N9	0,2197	0,5147	0,1799	H49	0,6714	0,5483	0,2272
C10	0,6819	0,8733	0,1041	H50	0,5969	0,8538	0,1868
C11	0,0994	0,4380	0,1852	H51	0,8120	0,7421	0,2149
C12	0,5232	0,5593	0,0958	H52	0,8245	0,6564	0,1665
C13	0,0339	0,3042	0,0748	H53	0,4689	0,7873	0,1195
C14	0,0966	0,3752	0,1068	H54	0,7443	0,6307	0,0952
N15	0,0413	0,4260	0,2242	H55	0,6606	0,8737	0,0699
C16	-0,0879	0,2935	0,1577	H56	0,6450	0,9598	0,1181
N17	-0,1495	0,2843	0,1988	H57	0,9128	0,9427	0,1024
C18	0,6213	0,7635	0,1729	H58	0,9994	0,8349	0,1664
C19	0,2969	0,5749	0,2162	H59	0,8434	0,9363	0,1746
C20	0,8547	0,8596	0,1114	H60	1,1241	0,6556	0,0774
C21	-0,0807	0,3504	0,2284	H61	1,1465	0,8155	0,0889

C22	0,8829	0,8492	0,1601	H62	1,0949	0,7111	0,1303
C23	0,0961	0,3041	0,0303	H63	0,9541	0,8697	-0,0162
C24	0,7904	0,7443	0,1815	H64	0,9409	0,9581	0,0316
C25	-0,1519	0,2227	0,1243	H65	1,0997	0,8600	0,0230
C26	0,5854	0,4415	0,0762	H66	0,9136	0,6679	-0,0189
C27	0,4325	0,5005	0,2333	H67	1,0529	0,6293	0,0199
F28	0,2100	0,3820	0,0251	H68	0,8640	0,5745	0,0257
C29	0,5694	0,5442	0,2072	H69	0,7752	0,7851	0,0338
C30	0,8956	0,7650	0,0399	H70	0,7087	0,4513	0,0715
F31	-0,0040	0,3354	0,0005	H71	0,5635	0,3648	0,0972
C32	-0,0935	0,2269	0,0831	H72	0,5326	0,4265	0,0453
F33	0,1425	0,1946	0,0181	H73	0,2091	0,6032	0,2400
C34	1,0774	0,7297	0,0973	H75	-0,7132	-0,0216	0,1657
C35	0,9360	0,6480	0,0149				
C36	0,9736	0,8757	0,0185				
CL37	-0,6723	0,0636	0,0976				
CL38	-0,6200	0,1776	0,1776				
C39	-0,7292	0,0689	0,1511				
CL40	-0,8261	0,1021	0,1984				
CL41	-0,5719	0,1649	0,1533				

TABELA 4**Coordenadas Atômicas para Exemplo 2c, Forma THOO-1**

Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
N1	0,6241	0,6511	0,1036	H44	0,8469	0,6491	-0,0084
N2	0,5165	0,6586	0,1938	H45	1,0426	0,6769	-0,0009
N3	0,0409	0,4138	0,2209	H46	0,9420	0,5884	0,0369
N4	0,9119	0,7577	0,0893	H47	0,9710	0,8879	-0,0108
N5	0,2188	0,5080	0,1767	H48	0,9644	0,9636	0,0393
N6	-0,1428	0,2821	0,1910	H49	1,1113	0,8600	0,0288
F7	0,2088	0,4068	0,0184	H50	1,1138	0,6612	0,0823
F8	0,1464	0,2269	0,0085	H51	1,1368	0,8124	0,0977
F9	-0,0051	0,3616	-0,0061	H52	1,0715	0,7062	0,1357

O10	0,3873	0,5694	0,1019	H53	0,8967	0,9395	0,1069
O11	0,2971	0,7711	0,1928	H54	0,8364	0,9249	0,1799
C12	-0,0831	0,2960	0,1506	H55	0,9892	0,8264	0,1696
C13	0,0371	0,3738	0,1430	H56	0,6557	0,8698	0,0727
C14	0,5812	0,7621	0,1256	H57	0,6337	0,9476	0,1221
C15	0,0986	0,4345	0,1815	H58	0,7936	0,7360	0,2193
C16	-0,0886	0,2415	0,0746	H59	0,8150	0,6527	0,1711
C17	0,6739	0,8655	0,1071	H60	0,5860	0,8385	0,1901
C18	0,0331	0,3225	0,0673	H61	0,4619	0,7796	0,1196
C19	0,6111	0,7539	0,1748	H62	0,7430	0,6376	0,0952
C20	0,7789	0,7380	0,1846	H63	0,5034	0,3895	0,0665
C21	0,0953	0,3862	0,1014	H64	0,6466	0,4797	0,0433
C22	-0,1446	0,2303	0,1158	H65	0,6742	0,4155	0,0950
C23	0,8438	0,8556	0,1148	H66	0,5931	0,4838	0,1746
C24	0,3673	0,6754	0,2001	H67	0,6760	0,5373	0,2229
C25	-0,0810	0,3420	0,2233	H68	0,4199	0,3911	0,2235
C26	0,8681	0,8418	0,1645	H69	0,4543	0,4982	0,2644
C27	0,5709	0,5348	0,2038	H70	0,2110	0,5756	0,2404
C28	0,8975	0,7762	0,0422	H71	0,2578	0,5312	0,1447
C29	0,2923	0,5573	0,2150	H72	-0,1392	0,3344	0,2555
C30	0,4345	0,4867	0,2295	H73	0,1922	0,4468	0,0960
C31	0,0958	0,3306	0,0236	H74	-0,2394	0,1689	0,1216
C32	0,9346	0,6664	0,0161	H75	-0,1341	0,1904	0,0479
C33	0,9942	0,8828	0,0245	H76	0,7798	0,8064	0,0354
C34	1,0667	0,7324	0,1019	H77	-0,5859	0,2979	0,1468
C35	0,5239	0,5633	0,0937	H78	-0,6934	0,1865	0,0883
C36	0,5916	0,4548	0,0733	H79	-0,5532	0,0802	0,1023
O37	-0,4684	0,1388	0,1701	H80	-0,7442	-0,0491	0,1228
O38	-0,4289	0,2122	0,2075	H81	-0,8828	0,0626	0,1139
O39	-0,7214	0,1782	0,1852	H82	-0,7168	0,0010	0,1956
C40	-0,6079	0,2004	0,1513	H83	-0,8983	0,0662	0,1893

C41	-0,7805	0,0664	0,1760	H84	-0,3123	0,2450	0,2037
C42	-0,6561	0,1265	0,1151				
C43	-0,7758	0,0381	0,1281				

TABELA 5**Coordenadas Atômicas para Exemplo 2d, Forma E-1**

Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
N1	0,5556	0,6575	0,1971	H40	0,2903	0,5250	0,1486
N2	0,9580	0,7945	0,0952	H41	0,7902	0,6695	0,0980
N3	0,0504	0,4000	0,2167	H42	0,6121	0,8376	0,1960
N4	0,2466	0,4969	0,1788	H43	0,4802	0,7853	0,1289
N5	0,6640	0,6706	0,1083	H44	-0,1345	0,3091	0,2471
O6	0,4235	0,5727	0,1071	H45	0,2219	0,4518	0,0971
O7	0,3141	0,7585	0,2020	H46	0,8518	0,7434	0,2205
C8	0,0563	0,3683	0,1425	H47	0,8769	0,6703	0,1722
C9	0,3945	0,6665	0,2051	H48	-0,2356	0,1657	0,1154
N10	-0,1464	0,2693	0,1855	H49	0,2468	0,5491	0,2421
C11	0,1179	0,4244	0,1805	H50	-0,1137	0,1969	0,0471
C12	-0,0757	0,2900	0,1475	H51	0,9339	0,9678	0,1186
C13	0,5699	0,5796	0,0976	H52	0,6715	0,8931	0,0836
C14	0,6460	0,7574	0,1795	H53	0,6450	0,9623	0,1326
C15	0,6096	0,7741	0,1332	H54	0,5054	0,4773	0,2603
C16	-0,0804	0,3256	0,2169	H55	0,4724	0,3825	0,2172
C17	0,1256	0,3867	0,1021	H56	0,8706	0,9373	0,1867
C18	0,8278	0,7497	0,1874	H57	1,0434	0,8510	0,1741
C19	-0,1350	0,2278	0,1118	H58	0,6429	0,4941	0,1737
C20	0,3307	0,5423	0,2161	H59	0,7309	0,5392	0,2214
C21	-0,0669	0,2438	0,0739	H60	0,5606	0,4154	0,0654
C22	0,8827	0,8818	0,1241	H61	0,6932	0,5215	0,0431
C23	0,6945	0,8866	0,1168	H62	0,7497	0,4462	0,0892
C24	0,4824	0,4737	0,2271	H63	1,1678	0,6903	0,0868

C25	0,0642	0,3239	0,0689	H64	1,2002	0,8299	0,1107
C26	0,9139	0,8598	0,1701	H65	1,1111	0,7125	0,1393
C27	0,6193	0,5376	0,2034	H66	0,8527	0,8919	0,0459
C28	0,1332	0,3426	0,0264	H67	0,9828	0,7726	-0,0103
C29	0,6490	0,4838	0,0720	H68	1,0893	0,6894	0,0276
F30	0,1426	0,2490	0,0048	H69	0,8751	0,6798	0,0245
F31	0,2603	0,4035	0,0246	H70	1,1045	0,9693	0,0155
C32	1,1203	0,7545	0,1087	H71	1,0868	1,0079	0,0687
C33	0,9653	0,8421	0,0525	H72	1,2197	0,8923	0,0534
C34	0,9802	0,7362	0,0215	H73	-0,3356	0,1901	0,1827
C35	1,1042	0,9365	0,0471	H74	-0,6100	0,2427	0,1853
F36	0,0282	0,4017	0,0020	H75	-0,5435	0,1919	0,1361
O37	-0,4308	0,1231	0,1846	H76	-0,8101	0,1237	0,1519
C38	-0,5696	0,1669	0,1671	H77	-0,6709	0,0043	0,1485
C39	-0,7016	0,0870	0,1643	H78	-0,7374	0,0551	0,1977

TABELA 6]**Coordenadas Atômicas para Exemplo 2e, Forma A-1**

Áto- mo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
O1	0,3737	0,5677	0,1038	H34	-0,1640	0,1792	0,0657
N2	0,6127	0,6388	0,1027	H16	0,1740	0,4180	0,1027
O3	0,3132	0,7830	0,1897	H32	-0,2563	0,1746	0,1343
C4	0,5064	0,5520	0,0949	H24	-0,1168	0,3282	0,2594
N5	0,2190	0,5059	0,1814	H5	0,2557	0,5241	0,1532
C6	0,1016	0,4290	0,1870	H28A	0,4510	0,5073	0,2614
N7	0,9018	0,7409	0,0835	H28B	0,4099	0,3978	0,2297
N8	0,5246	0,6588	0,1932	H30A	0,5706	0,4800	0,1779
C9	0,3746	0,6827	0,1988	H30B	0,6614	0,5265	0,2179
N10	0,0495	0,4145	0,2272	H15	0,2312	0,5873	0,2385
C11	0,5829	0,7591	0,1239	H17	0,5966	0,8294	0,1852

C12	0,0312	0,3644	0,1517	H2	0,7132	0,6191	0,0935
C13	-0,0936	0,2901	0,1617	H18A	0,6668	0,4348	0,0693
N14	-0,1492	0,2774	0,2023	H18B	0,5096	0,4227	0,0469
C15	0,3004	0,5650	0,2162	H18C	0,5363	0,3599	0,0916
C16	0,0858	0,3691	0,1092	H22A	0,8097	0,7261	0,2084
C17	0,6197	0,7499	0,1719	H22B	0,8144	0,6500	0,1655
C18	0,5600	0,4313	0,0739	H11	0,4780	0,7781	0,1200
C19	0,6747	0,8657	0,1038	H19A	0,6550	0,8673	0,0737
F20	0,1808	0,3831	0,0261	H19B	0,6472	0,9456	0,1161
C21	0,0143	0,3015	0,0775	H27A	0,8511	0,9136	0,1702
C22	0,7871	0,7290	0,1785	H27B	0,9840	0,8202	0,1605
C23	0,8454	0,8483	0,1091	H23	0,8972	0,9223	0,0991
C24	-0,0739	0,3401	0,2315	H33A	1,0920	0,6435	0,0741
F25	0,1345	0,1856	0,0238	H33B	1,0747	0,6924	0,1211
C26	0,0743	0,2971	0,0335	H33C	1,1211	0,7863	0,0846
C27	0,8780	0,8348	0,1570	H31	0,7694	0,7749	0,0364
C28	0,4326	0,4864	0,2320	H37A	0,9230	0,8700	-0,0130
F29	-0,0287	0,3175	0,0040	H37B	1,0541	0,8649	0,0205
C30	0,5653	0,5283	0,2038	H37C	0,9089	0,9442	0,0302
C31	0,8750	0,7554	0,0374	H36A	0,8874	0,6527	-0,0172
C32	-0,1674	0,2229	0,1280	H36B	0,8419	0,5709	0,0225
C33	1,0612	0,7135	0,0915	H36C	1,0100	0,6124	0,0161
C34	-0,1156	0,2277	0,0877	H40A	-0,7132	0,1528	0,2120
C35	-0,6607	0,1145	0,1509	H40B	-0,7533	0,0132	0,1994
C36	0,9067	0,6372	0,0125	H40C	-0,8560	0,1249	0,1840
C37	0,9468	0,8688	0,0169	H38A	-0,7948	0,0004	0,1242
C38	-0,7123	0,0511	0,1141	H38B	-0,6331	-0,0032	0,1041
O39	-0,5629	0,1869	0,1523	H38C	-0,7461	0,1041	00912
C40	-0,7542	0,0996	0,1900				

TABELA 7**Coordenadas Atômicas para Exemplo 2f, Forma N-2**

Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
C1	-0,1614	0,2577	0,0383	F7	0,6225	0,2634	0,5011
C2	0,0133	0,3873	0,0895	F8	0,7150	0,2806	0,6609
C3	-0,0055	0,3310	-0,0010	F9	0,5345	0,2749	0,6173
C4	-0,0893	0,3603	-0,1048	F10	0,6186	0,2737	0,7242
C5	-0,0096	0,1977	-0,0307	F11	0,7090	0,2767	0,6039
C6	0,1226	0,1850	-0,0004	F12	0,5230	0,2690	0,5624
C7	-0,0693	0,1244	-0,0205	H10A	-0,0413	0,1190	0,1459
C8	0,1708	0,1498	0,1106	H10B	-0,0615	0,0409	0,0911
C9	0,1075	0,0771	0,1147	H11	0,0996	0,2283	0,1837
C10	-0,0234	0,0881	0,0905	H12	0,3217	-0,0767	0,3481
C11	0,2617	0,0045	0,2339	H13A	0,1891	-0,0144	0,4538
C12	0,2925	-0,0262	0,3476	H13B	0,1378	-0,0726	0,3618
C13	0,1771	-0,0254	0,3775	H14A	0,0237	0,0225	0,2848
C14	0,1062	0,0350	0,3075	H14B	0,1156	0,0818	0,3457
C15	0,2367	0,2052	0,2942	H16A	0,1608	0,2374	0,4116
C16	0,2078	0,2604	0,3702	H16B	0,1652	0,3007	0,3293
C17	0,5499	-0,0989	0,6085	H16C	0,2789	0,2786	0,4183
C18	0,4630	-0,0041	0,5011	H17	0,5477	-0,1488	0,6244
C19	0,5492	0,0453	0,5666	H1A	-0,1774	0,3007	0,0757
C20	0,6362	0,0119	0,6505	H1B	-0,1761	0,2143	0,0756
C21	0,5475	0,1213	0,5540	H1C	-0,2111	0,2575	-0,0344
C22	0,7226	0,0568	0,7150	H21	0,4899	0,1433	0,4990
C23	0,7201	0,1309	0,7026	H22	0,7832	0,0354	0,7676
C24	0,6306	0,1640	0,6225	H23	0,7779	0,1599	0,7473
C25	0,6233	0,2457	0,6114	H26A	0,3405	0,0047	-0,3327
C26	0,3178	0,0508	-0,3076	H26B	0,3247	0,0893	-0,3570
C27	0,3677	0,1429	-0,1554	H26C	0,2382	0,0477	-0,3035
C28	0,2847	-0,0135	-0,1112	H27A	0,2885	0,1420	-0,1496

C29	0,3985	0,0680	-0,1941	H27B	0,3753	0,1801	-0,2063
C30	0,4839	-0,0499	-0,1192	H27C	0,4198	0,1537	-0,0857
C31	0,4689	-0,1207	-0,0596	H28A	0,2347	0,0287	-0,1160
C32	0,6120	-0,0241	-0,0769	H28B	0,2875	-0,0400	-0,0457
C33	0,6492	-0,0164	0,0464	H28C	0,2545	-0,0451	-0,1725
C34	0,6335	-0,0892	0,1001	H29	0,4782	0,0723	-0,2025
C35	0,5063	-0,1148	0,0626	H2A	-0,0589	0,3951	0,1087
C36	0,6313	0,0922	0,1569	H2B	0,0389	0,4330	0,0656
C37	0,5494	0,1489	0,1804	H2C	0,0717	0,3696	0,1516
C38	0,7946	-0,0826	0,2650	H3	0,0704	0,3241	-0,0167
C39	0,6078	-0,0715	0,2941	H30	0,4704	-0,0619	-0,1962
C40	0,6937	-0,0843	0,4027	H31A	0,3871	-0,1351	-0,0819
C41	0,8124	-0,0650	0,3838	H31B	0,5139	-0,1595	-0,0817
C42	0,8969	0,0402	0,4994	H32A	0,6629	-0,0594	-0,0989
C43	0,9918	0,0223	0,6769	H32B	0,6212	0,0230	-0,1096
C44	0,9164	0,1178	0,5156	H33	0,7326	-0,0036	0,0683
C45	1,0010	0,2152	0,6420	H34	0,6810	-0,1261	0,0750
C46	0,9795	0,1403	0,6212	H35A	0,4983	-0,1624	0,0944
C47	0,9601	0,2664	0,5640	H35B	0,4564	-0,0799	0,0866
C48	0,8959	0,2447	0,4599	H37A	0,5607	0,1528	0,2573
C49	0,8756	0,1715	0,4360	H37B	0,4700	0,1346	0,1467
C50	0,8489	0,3015	0,3761	H37C	0,5650	0,1957	0,1521
N1	1,0171	0,0906	0,7037	H39A	0,5425	-0,1055	0,2823
N2	0,6368	-0,0622	0,6704	H39B	0,5781	-0,0214	0,2880
N3	0,9331	-0,0075	0,5810	H40A	0,6920	-0,1353	0,4251
N4	0,4627	-0,0749	0,5246	H40B	0,6765	-0,0527	0,4577
N5	0,8420	0,0126	0,4015	H41	0,8743	-0,0960	0,4288
N6	0,6777	-0,0849	0,2178	H43	1,0183	-0,0115	0,7327
N7	0,5849	0,0426	0,0803	H45	1,0440	0,2303	0,7105
N8	0,4025	0,0106	-0,1105	H47	0,9746	0,3161	0,5795
N9	0,3818	0,0211	0,4149	H49	0,8344	0,1575	0,3664

N10	0,1561	0,0378	0,2158	H4A	-0,1020	0,3231	-0,1600
N11	0,1599	0,2000	0,1967	H4B	-0,0560	0,4033	-0,1288
N12	-0,0389	0,2585	0,0355	H4C	-0,1627	0,3731	0,0908
O1	0,8718	-0,0902	0,2185	H5	0,8235	0,0422	0,3470
O2	0,7359	0,0910	0,2072	H5A	-0,0340	0,2128	-0,1069
O3	0,3220	0,0019	0,1698	H6A	0,1414	0,1536	-0,0548
O4	0,3257	0,1671	0,3217	H6B	0,1615	0,2319	-0,0017
F1	0,7539	0,2815	0,3030	H7	0,5113	0,0460	0,0488
F2	0,9209	0,3190	0,3146	H7A	-0,1528	0,1327	-0,0337
F3	0,8233	0,3648	0,4151	H7B	-0,0576	0,0910	-0,0759
F4	0,8500	0,2791	0,2840	H8	0,2540	0,1393	0,1202
F5	0,9132	0,3571	0,3931	H9	0,3825	0,0671	0,3986
F6	0,7377	0,3127	0,3710	H9A	0,1212	0,0462	0,0565

TABELA 8**Coordenadas Atômicas para Exemplo 2g, Form AN-3**

Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
N1	0,3835	0,0757	0,0375	H21	-0,1570	0,4019	0,0806
N2	0,7286	-0,0185	0,1260	H6	0,2566	0,2184	0,1457
N3	0,2667	0,0953	-0,1106	H15	-0,1768	0,3372	-0,0677
O4	0,4406	0,1041	0,2348	H20	0,1322	0,1240	-0,2309
C6	0,1693	0,2426	0,1013	H1	0,3709	0,0824	0,1036
N7	0,6875	0,0647	0,3206	H17	0,4819	-0,0292	-0,0463
C8	0,0362	0,2388	-0,0548	H28A	0,7603	0,0328	-0,0600
O9	0,5030	-0,1317	0,1098	H28B	0,6637	0,1325	-0,0383
C10	0,5797	-0,0561	0,0855	H24A	0,7555	0,1274	0,1175
N11	0,9744	0,0244	0,4480	H24B	0,9167	0,0696	0,0774
C12	0,0569	0,3162	0,1260	H19	0,8001	-0,1313	0,2000
5	0,1605	0,2026	0,0109	H22A	1,0680	-0,0427	0,1790
C13	0,2745	0,1240	-0,0211	H22B	1,0006	0,0401	0,2458
N14	0,0255	0,2060	-0,1450	H29A	1,0737	-0,1556	0,3001

C15	-0,0858	0,3132	-0,0252	H29B	1,1889	-0,0637	0,3299
C16	0,5624	0,1278	0,2890	H27	1,0060	-0,1224	0,4487
C17	0,5237	0,0103	0,0054	H23A	0,6964	-0,0882	0,4334
C18	1,1544	0,0668	0,4534	H23B	0,7596	-0,1700	0,3643
C19	0,8045	-0,0612	0,2107	H25	0,5708	-0,0620	0,2829
C20	0,1422	0,1402	-0,1658	H7	0,7807	0,0874	0,3623
C21	-0,0752	0,3517	0,0617	H34A	0,6865	0,2365	0,3642
C22	0,9970	-0,0294	0,2320	H34B	0,4795	0,2484	0,3581
C23	0,7649	-0,1008	0,3793	H34C	0,5937	0,2759	0,2722
C24	0,7898	0,0709	0,0816	H36A	0,7774	-0,0065	0,5345
C25	0,6909	-0,0417	0,2964	H36B	0,8886	0,0871	0,5638
C26	0,6097	0,2153	0,6473	H36C	0,9671	-0,0190	0,5809
C27	0,9604	-0,0758	0,4035	H18	1,1968	0,0630	0,3910
C28	0,6935	0,0679	-0,0147	H35A	1,4009	0,0440	0,5102
C29	1,0708	-0,0864	0,3149	H35B	1,3030	-0,0555	0,4859
F30	0,1149	0,3018	0,2839	H35C	1,2530	0,0042	0,5751
C31	1,1447	0,1747	0,4843	H31A	1,2617	0,2028	0,4883
C32	0,0681	0,3603	0,2194	H31B	1,0911	0,1790	0,5441
F33	-0,0775	0,3987	0,2482	H31C	1,0736	0,2106	0,4391
C34	0,5829	0,2314	0,3240	H37A	0,5614	0,1191	0745
C35	1,2896	0,0095	0,5118	H37B	0,5364	0,2293	0,7767
C36	0,8948	0,0210	0,5396	H37C	0,7279	0,1858	0,7670
C37	0,6085	0,1849	0,7418				
N38	0,6123	0,2421	0,5722				
F39	0,1781	0,4283	0,2274				

TABELA 9**Coordenadas Atômicas para Exemplo 2h, Forma H4-1, HCl**

Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
N1	-0,1488	0,2098	-0,0343	H42	0,3077	0,3275	0,1257
O2	0,3490	0,4972	0,0272	H43	0,1538	0,2201	0,0743
N3	0,2326	0,3477	0,0060	H44	0,5279	0,4347	0,1149
N4	0,2975	0,2676	0,0466	H45	0,7124	0,4674	0,0613
N5	0,0807	0,4627	0,0181	H46	0,4192	0,2973	0,0255
N6	0,5197	0,3793	0,0531	H47	0,2578	0,0900	0,0153
F7	-0,0010	0,2280	0,0989	H48	0,1288	0,1011	0,0254
O8	0,1939	0,6851	0,0181	H49	0,0936	0,1554	-0,0028
C9	0,2189	0,4432	-0,0048	H50	0,2571	0,2098	-0,0092
C10	0,3038	0,3881	0,0205	H51	0,3036	0,5397	-0,0022
N11	0,5990	0,4425	0,0823	H52	0,2392	0,5114	-0,0309
C12	0,0927	0,4487	-0,0003	H53	0,2974	0,4009	-0,0274
C13	-0,0342	0,3317	-0,0074	H54	0,0792	0,2199	-0,0265
C14	0,3955	0,3262	0,0584	H55	0,1025	0,3114	-0,0456
C15	0,4700	0,3861	0,0880	H56	-0,0076	0,4161	-0,0330
C16	0,3630	0,3248	0,0764	H57	-0,0551	0,2416	-0,0013
C17	0,1395	0,5810	0,0261	H58	-0,1201	0,3469	-0,0044
C18	0,3194	0,2774	0,0280	H59	0,0964	0,5331	-0,0071
C19	-0,1511	0,2151	-0,0542	H60	0,1837	0,6722	0,0512
C20	0,1983	0,2123	0,0011	H61	0,0338	0,5217	0,0502
C21	0,0952	0,3112	-0,0319	H62	0,1844	0,5224	0,0503
C22	-0,0230	0,3271	-0,0270	H63	-0,2772	0,1614	-0,0127
C23	0,2130	0,2691	0,1003	H64	-0,2760	0,2805	-0,0267
C24	0,2222	0,4228	-0,0243	H65	-0,3579	0,1133	-0,0329
C25	0,2358	0,2673	0,0829	H66	-0,0504	0,2577	-0,0592
C26	0,4468	0,3881	0,1058	H67	-0,1794	0,3278	-0,0737
C27	0,3218	0,3305	0,1117	H68	-0,3053	0,2578	-0,0581
C28	0,1344	0,5769	0,0455	H69	-0,1526	0,3966	-0,0528

C29	-0,2730	0,1906	-0,0263	H70	-0,2410	0,0701	-0,0746
F30	0,0717	0,2300	0,1235	H71	-0,1946	0,0132	-0,0562
C31	0,2191	0,1567	0,0180	H72	-0,3347	0,0316	-0,0554
C32	0,6135	0,4326	0,0655	H73	-0,1530	0,1183	-0,0305
F33	0,0240	0,0760	0,1070	H74	0,0220	0,3750	0,0260
C34	0,0782	0,2012	0,1072	H75	0,1982	0,2109	0,0512
C35	-0,2346	0,0735	-0,0609	H76	0,2980	0,8016	0,0030
C36	-0,1999	0,3066	-0,0603	H77	0,4177	0,8365	-0,0131
CL37	0,0168	0,2311	0,0469	H78	-0,2680	0,2326	0,0385
O38	-0,1364	0,0296	0,0183	H79	-0,2444	0,1328	0,0235
O39	0,3598	0,8724	-0,0063	H80	-0,2485	0,2185	0,0683
O40	-0,2980	0,1857	0,0261	H81	-0,1126	0,2683	0,0544
O41	-0,1879	0,2915	0,0585	H82	-0,0947	0,0714	0,0059
				H83	-0,0825	0,1005	0,0284

TABELA 10

Posições de pico de difração de pó de raio X características (graus $2\angle \pm 0,1$)@ RT por exemplo 2a, b, d, e, f, g, e h, com base em um padrão de alta qualidade coletadas com um difratômetro (CuK α) com um capilar em rotação com $2\angle$ calibrado com um outro padrão adequado NIST.

Exp 2a	Exp 2b	Exp 2d	Exp 2e	Exp 2f	Exp 2g	Exp 2h
8,1	10,0	5,5	10,1	7,2	6,3	6,9
11,7	11,4	9,6	11,3	8,7	9,0	8,7
13,0	11,9	11,4	11,9	9,7	11,7	9,8
13,9	14,3	14,5	13,3	12,5	15,0	10,3
16,6	15,6	15,8	14,2	12,8	17,6	11,8
17,0	16,5	16,6	15,6	13,3	18,6	13,5
17,6	19,1	18,4	16,8	16,0	19,7	15,0
21,1	19,4	19,2	19,0	16,6	20,7	18,8
23,2	20,2	20,0	19,5	18,2	21,4	21,4
23,9	21,2	23,6	20,4	18,8	23,8	22,9

CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS COMPARATIVAS

Ensaios e dados comparando as características farmacológicas do Exemplo 1 e compostos encontrados no WO2005021500 (correspondentes à Patente dos Estados Unidos No. 7.163.937 designados pelo presente Requerente) são representados abaixo.

Ligaçāo celular mononuclear de sangue periférico humano ("ligação de CCR2")

Veja também: Yoshimura e outro, *J. Immunol.* 1990, 145, 292. O ensaio de ligação de CCR2 humano foi estabelecido com células mononucleares de sangue periférico humano (hPBMCs) utilizando MCP-1 humano ¹²⁵I como um ligante traçador. hPBMCs foram isolados de leukopak humano (Biological Specialty Inc.) utilizando um protocolo padrão com Ficoll-Hypaque (Mediatech Cellgro). Os hPBMCs isolados foram lavados e diluídos para 1x10⁷/ml em um tampão de ligação (RPMI-1640, 0,1% de BSA, 20 mM de Hepes, pH 7.4). ¹²⁵I-MCP-1 (NEN/Perk Elmer) foi diluído para 0.45 nM em um tampão de ligação. O composto foi diluído em um tampão de ligação em 3 vezes as concentrações finais utilizadas no ensaio de ligação. O ensaio de ligação foi realizado utilizando uma placa de filtro de 96 cavidades (Millipore). A ligação de ¹²⁵I-MCP-1 total foi estimada como segue: a cada reação de um volume total de 150 µl foram adicionados células 5x10⁵, 0,15 nM de ¹²⁵I-MCP-1, e composto tal que a concentração final variou de 0 a 100 nM. A placa foi incubada em temperatura ambiente durante 30 minutos seguido por três lavagens com RPMI-1640, 0,1% de BSA, 0,4 M de NaCl, 20 mM de Hepes, pH 7,4 utilizando uma filtragem de tubulação a vácuo (Millipore). Após a lavagem, a placa foi secada por ar durante 60 minutos em temperatura ambiente. Isto foi seguido por adição de 25 µl de Microscint 20 em cada cavidade. A placa foi selada e contada no Trilux durante 1 minuto. A ligação não específica foi determinada na presença de 300 nM MCP-1 frio (PeproTech Inc.). ¹²⁵I-MCP-1 específico foi calculado como a diferença entre a ligação total e não específica. Todas as condições foram testadas em duplicata. O IC50 é definido como a concentração de composto de competição requerido para reduzir a ligação específica para 50%.

Fluxo de hERG

Células HEK293 estavelmente expressando canais de hERG foram desenvolvidos (37 °C, 5% de CO₂) em Dulbecco's Modified Eagle's Media suplementados com 10% de soro bovino fetal Sigma, aminoácidos não essenciais, 2mM de L-glutamina e 500 µg/ml de G418, em incubador. Tampão de dissociação celular foi utilizado para extrair celulas de frascos, que foram em seguida colocadas em placas pretas/claras revestidas por Corning poli-D-Lysina de 348 cavidades em uma densidade de 2 x 10⁴ células por cavidade (20 µl) em 10% de meios de soro, e incubadas durante 15-24 horas a 37 °C em um inbubador de 5% de CO₂ até uma monocamada confluenta de células ser obtida.

Uma matéria-prima de 2 mM de tinta BTC-AM (Molecular Probes, Eugene, OR) foi preparada em 100% de DMSO e em seguida adicionada 1:1 para 10% de (peso/volume) ácido plurônico em DMSO no dia do ensaio. A tinta foi em seguida diluída em tampão EP externo hERG (140 mM de NaCl, 4.0 mM de KCl, 1.8 mM de CaCl₂, 1.0 mM de MgCl₂, 10 mM de HEPES, pH 7.3 e 10 mM de glicose; todos os componentes de tampão obtidos de Sigma Chemical). Esta mistura de tinta BTC (30 µl) foi adicionada às células e produziu uma concentração de carga final de 2.5 µM. As células são incubadas a 21 °C durante 45 minutos.

Os compostos teste foram diluídos para 10 mM de DMSO em 60 µl. estes compostos foram em seguida serialmente diluídos em uma relação 1:2 em DMSO em colunas 1-10 e 11-20 de uma placa de 384 cavidades. As placas prontas para o ensaio foram geradas estampando 2,5 µl da placa de DMSO serialmente diluída, que foi preparada no Velocity 11 BioCel. As placas aquosas foram criadas adicionando-se 48 µl de tampão EP e em seguida foram diluídas 30 - 45 minutos antes que o ensaio fosse lido no FLIPR. Após o carregamento de tinta, compostos diluídos aquosos foram adicionados às células das três placas replicadas (10 µl) produzindo uma faixa de concentração de dez pontos de 80 µM a 0,156 nM. A concentração de DMSO final no ensaio é 1%. As placas aquosas prontas para o ensaio foram preparadas e diluídas em um manipulador de líquido de Cybio.

As células carregadas com tinta foram lidas no FLIPR384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), que excita a tinta utilizando a linha de 488 nm de um laser de argônio. A emissão foi filtrada utilizando um filtro de passo de faixa de 540 ± 30 nm. Os canais de hERG foram estimulados para abrirem pela adição 20 μ l/cavidade de tampão de EP contendo 66 mM de K_2SO_4 e 1.3 mM de Tl_2SO_4 (Sigma/Aldrich). Para cada placa, os dados foram coletados a cada segundo durante um período de 12 segundos, em cujo tempo o Tl^+ -contendo tampão de estímulo foi adicionado. A coleta de dados procedeu a cada segundo durante 48 segundos, e em seguida continuou a cada três segundos durante mais 2 minutos.

A faixa dinâmica do ensaio foi determinada de células vazias e totais. As células totais (colunas 21 e 22) definem a ativação de hERG máxima para a placa (nenhum composto teste presente), e as células vazias (colunas 23 e 24) definem a inibição de 100% de hERG. As células vazias contêm 400 nM de inibidores de hERG padrão dofetilide (Ficker e outro, 1998) ou E-4031. Os pontos de dados brutos em cada cavidade da amostra foram primeiro corrigidos por variação de célula/sinal, base de controle negativo (vazia), e normalizados pelos controles positivos (totais) utilizando o software FLIPR online. As curvas de resposta de concentração de composto teste para os dados de fluxo de hERG Tl^+ foram em seguida fixadas utilizando Excel Fit (ID Business Solutions Limited, Surrey, UK) com uma equação logística de sítio simples, $Y = A + ((B-A)/1 + ((C/X)^D))$ em que A= inibição máxima. Os dados foram analizados por amplitudes máximas de fixação de alteração na fluorescência para o fluxo de Tl^+ para uma determinada condição de composto teste. Potências (valores de IC_{50}) de compostos foram calculadas da média de células triplicadas.

Ensaio de ligação de sítio, canal de sódio

Veja também: W. A. Catterall, e outro, *J. Biol. Chem.* **1981**, 256, 8922. O tampão de ligação padrão continha 50 mM de HEPES, 50 mM de Tris-HCl, pH 7.4, 130 mM de Cloreto de Colina, 5,4 mM de KCl, 0,8 mM de $MgCl_2$, 5,5 mM de glicose, 40 μ g/mL LqT. As reações de ligação foram iniciadas adicionando-se sinaptossomas (preparadas de cérebro de rato Wistar)

à mistura reacional contendo 5 nM [³H]-Batrachotoxin em um tampão de ligação padrão e o composto a ser testado na concentração desejável. As amostras foram em seguida misturadas e incubadas a 37 °C durante 60 minutos. As reações foram interrompidas adicionando-se tampão de lavagem
5 gelado contendo 50 mM de HEPES, 50 mM de Tris-HCl, pH 7.4, 1,8 mM de CaCl₂, 0,8mM de MgCl₂ e 1 mg/mL de albumina de soro bovino. As sinaptossomas foram imediatamente coletadas em filtro de fibra de vidro e lavadas 3 vezes com tampões de lavagem. A radioatividade de [³H]-Batrachotoxin restante nos filtros foi contada utilizando espectromêtros de
10 cintilação líquida.

Ensaio de Permeabilidade de membrana Artificial Paralela (PAMPA)

Ensaio de Permeabilidade de membrana Artificial Paralela (PAMPA) consiste em uma combinação de lipídeo com base em lecitina especialmente formulada com referência como o lipídeo de trato gastrointestinal
15 (GIT). O lipídeo de GIT é utilizado para formar uma membrana em uma montagem de placa sanduíche similar àquela utilizada nos ensaios Caco-2. O lipídeo de GIT intimamente se parece com a composição e desempenho *in vivo* como avaliado por compostos padrão que são conhecidos serem passivamente absorvidos em humanos. PAMPA é amplamente utilizado um como
20 modelo *in vitro* para análise de permeabilidade de compostos descobertos. A taxa de passagem de compostos através da membrana de PAMPA é utilizada para determinar o coeficiente de permeabilidade (Pc), que pode ser relacionado à permeabilidade passiva *in vivo* do composto.

O coeficiente de permeabilidade (Pc) de um composto particular
25 é examinado em um cenário dependente do pH com pH apical e basolateral de 7.4. Todos os experimentos são conduzidos em determinações triplicadas.

Compostos (10 mM de matérias-primas em 100% de DMSO) foram diluído 1:100 em tampão de cavidade doadora de pH 7.4 (pION CAT #
30 110151), fornecendo uma solução de ensaio de 100 µM em 1% de DMSO. O composto diluído em tampão de cavidade doadora foi transferido a uma placa Whatman Unifilter e filtrado antes da dispersão de 200 µL na placa doado-

ra da placa de ensaio (pION CAT #110163). A membrana PAMPA foi formada por pepitagem de 4 µl da solução de lipídeo (pION CAT #110169) na placa de filtro (VWR CAT #13503). A membrana foi em seguida revestida com 200 µl de tampão de cavidade receptora em pH 7,4 (pION CAT #110139). A 5 placa de ensaio PAMPA (parte doadora e parte receptora) foi combinada e deixada incubar em temperatura ambiente durante 4 horas. A placa foi em seguida desmontada e as placas de espectrofotômetro s (VWR CAT #655801) foram carregadas (150 µl/cavidade). As placas doadora, receptoras, de referência e vazias foram lidas na leitura de placa SpectraMax UV. Os 10 dados foram capturados pelo *software* pION, que analisa os espectros e gera os valores de P_c .

Quimiotaxia de CCR2

O ensaio de quiomiotaxia de CCR2 humano foi conduzido com a linhagem celular monocítica humana, as células THP-1. THP-1 foram primeiro rotuladas com uma tinta fluorescente de Calcein-AM em RPMI-1640 livre de vermelho fenol, livre de BSA (pH 7,4) a 37 °C durante 30 minutos com mistura suave a cada 15 minutos. As células rotuladas foram em seguida lavadas e re-suspensas em 1×10^5 /ml em tampão de quimiotaxia (RPMI-1640 livre de vermelho fenol, 0,1% de BSA, pH 7,4). O composto teste foi diluído 15 em tampão de quimiotaxia tal que a concentração do ensaio final varie de 0,01 nM a 1 µM. o ligante de MCP-1 (PeproTech Inc.) foi diluído para 20 nM em tampão de quimiotaxia. Para realizar o ensaio, um volume igual de composto teste dilutions foi misturado com um volume igual de células THP-1 rotuladas (Mistura 1), e um volume igual diluições de de composto teste foi 20 misturado com um volume igual de ligante de MCP-1 diluído (Mistura 2). Ambas as misturas foram independentemente incubadas a 37 °C durante 10 minutos seguido por mistura suave. Quimiotaxia induzida por MCP-1 foi em seguida avaliada em uma placa de quimiotaxia (Becton Dickinson) colocando-se 50 µl da mistura 1 na câmara superior e 225 µl da mistura 2 na câmara inferior. A placa foi coberta com uma tampa e incubada a 37°C durante 30 minutos. 30 minutos depois, a placa foi lida em um Cytofluor. Todas as condições foram testadas em duplicada. Para sinal para determinação de ruído,

50 µl de células THP-1 rotuladas sozinhas (5×10^4 /cavidade) foram colocados na câmara superior e 225 µl de ligante MCP-1 sozinho foram colocados na câmara inferior (concentração final de 10 nM). A inibição obtida por concentrações graduadas de composto teste foi calculada como uma porcentagem
5 do controle de MCP-1 livre de composto. O IC₅₀ é definido como a concentração de composto teste requerido para obter 50% de inibição de quimiotaquia celular.

Grampo de Remendo de hERG

Grampo de remendo de célula inteira foi utilizado para avaliar
10 diretamente correntes de hERG em células HEK-293 estavelmente expressando a subunidade α de canal de potássio de hERG clonado. O composto foi testado em um tampão aquoso com pH 7.4 em temperatura ambiente. Pulses teste repetitivos (0,05 Hz) foram aplicados de um potencial de manutenção de -80 mV a +20 mV durante 2 segundos e correntes cauda foram
15 extraídas seguindo os pulses teste por escalonamento da para -65 mV. Os efeitos do composto foram calculados avaliando-se a corrente cauda máxima.

Grampo de Remendo de Canal de Sódio

Grampo de remendo de célula inteira foi utilizado para avaliar
20 diretamente correntes de sódio interiores em células HEK-293 expressando o canal de sódio cardíaco humano, SCN5A. O composto foi testado em um tampão aquoso livre de proteína. Para determinar a inibição de estado fixo, correntes de sódio foram extraídas a cada 5 segundos utilizando os seguintes protocolos de voltagem: as células foram mantidas em um potencial de
25 -90 mV e escalonadas para -20 mV durante 60 minutos. Os efeitos foram calculados avaliando-se a inibição de corrente máxima durante o pulso teste para -20 mV. Taxa de dependência de inibição foi avaliada por estimulação em frequências de 1 Hz e 4 Hz.

Farmacocinéticos de Dose Única em Ratos

30 Ratos Sprague-Dawley machos (250-300 g) foram utilizados para os estudos farmacocinéticos. Os ratos jejuaram durante a noite antes da dosage PO e alimentados 4 horas após a dose. Amostras de sangue (~0.3

mL) foram coletadas da veia jugular em tubos contendo K₂EDTA e em seguida centrifugadas a 4°C (1500-2000xg) para obter o plasma. Em um estudo de biodisponibilidade oral, 2 grupos de animais (N=2-3 por grupo) receberam o composto teste como uma infusão intravenosa (IV) (durante 10 minutos) por meio da veia jugular ou por gavagem oral. Amostras de sangue seriais foram obtidas em 0.17 (por IV apenas), 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 6, 8, e 24 horas após a dose. Amostras de plasma, obtidas por centrifugação a 4°C (1500-2000xg), foram armazenadas a -20°C até análise por LC/MS/MS.

Farmacocinéticos de Dose Única em Macacos

Os farmacocinéticos de vários compostos teste foram avaliados em macacos Cynomolgus machos em um projeto de cruzamento. Os macacos jejuaram durante a noite antes da dosagem PO e alimentados 4 horas após a dose. Um grupo de 1-3 animais (3 a 5 kg) recebeu infusão IV de composto po (durante 10 minutos) por meio de uma veia femoral por gavagem oral, com um intervalo de 1 semana entre os tratamentos. Amostras de sangue seriais (~0.3 mL) foram coletadas de uma artéria femoral a 0.17 (IV apenas), 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 6, 8, e 24 horas após a dose, e centrifugadas a 4°C (1500-2000xg) para obter plasma. As amostras foram armazenadas a -20°C até análise por LC/MS/MS.

20 Análise de dados para ensaios de farmacocinéticos

Os parâmetros farmacocinéticos foram obtidos por análise não comportamental de concentração de plasma vs. Dados de tempo (*software KINETICA*®, Versão 4.2, InnaPhase Corporation, Philadelphia, PA). A concentração máxima (Cmax) e tempo para Cmax foram registrados diretamente das observações experimentais. A área sobre a curva de tempo zero para o tempo da última amostragem (AUC(0-T)) foi calculada utilizando uma combinação de adições lineares e log trapezoidais. A liberação de plasma total (CLTp), volume de estado fixo de distribuição (Vss), meia-vida de eliminação aparente (T_{1/2}) e tempo de residência médio (MRT) foram estimados após administração IV. Estimativas de T_{1/2} foram feitas utilizando um mínimo de pontos de 3 vezes com concentrações quantificáveis. A biodisponibilidade oral absoluta (F) foi estimada como a taxa de valores de AUC

normalizados por dose seguindo doses orais e IV.

Encontrados abaixo dados para cada composto como avaliado anos ensaios acima descritos.

Tabela 11. Dados Comparativos *In Vitro*

Composto	IC ₅₀ de Ligação de C-CR2 (nM)	IC ₅₀ de FLUXO de hERG (nM)	Ligaçāo de canal de Na ⁺ (% de inibição)	PAMPA permeabilidade (nm/sec)
Exemplo 12as, WO2005021500	0,27 (1)	2,800	Não disponível	Não disponível
Exemplo 12aj WO2005021500	0,43 ± 0,06 (2)	770	Não disponível	Não disponível
Exemplo 2k WO2005021500	0,88 ± 0,60 (23)	51,000	97%, 10,000 nM	529 ± 157 (9)
Exemplo 12bd WO2005021500	1,15 ± 0,07 (2)	>80,000	54%, 10,000 nM	392
Exemplo 8a WO2005021500	1,83 ± 0,80 (12)	>80,000	3%, 10,000 nM 33%, 30,000 nM	94 ± 58 (10)
Exemplo 8e, WO2005021500	2,20 ± 0,03 (2)	>80,000	6%, 10,000 nM	2 ± 2 (2)
Exemplo 9c, WO2005021500	0,96 ± 0,26 (19)	>80,000	48%, 10,000 nM 75%, 30,000 nM	145 ± 71 (8)
Exemplo 1 Presente invenção	1,14 ± 0,69 (18)	>80,000	0%, 10,000 nM; 21%, 30,000 nM	443 ± 114 (8)

Tabela 12a. Dados Comparativos *In Vitro* Adicionais

Composto	IC₅₀ de Quimiotaxia de CCR2 (nM)	Grampo de Remendo de hERG (% Inhib.)	Grampo de Remendo de Canal de Na⁺ (% Inhib.)
Exemplo 2k Patente dos Estados Unidos 7,163,937	0,24 ± 0,16 (12)	83%, 10,000 nM	52%, 10,000 nM 90%, 30,000 nM
Exemplo 8a WO2005021500	2,63 ± 1,24 (4)	4%, 10,000 nM	22%, 10,000 nM 49%, 30,000 nM
Exemplo 9c, WO2005021500	0,21	4%, 10,000 nM	19%, 10,000 nM 39%, 30,000 nM
Exemplo 1, Presente invenção	0,67 ± 0,42 (22)	33%, 10,000 nM 61%, 30,000 nM	17%, 10,000 nM 19%, 30,000 nM

Tabela 12b. Dados Farmacocinéticos Comparativos *in vivo* no Rato

Composto	Dose IV/PO (mg/kg)	Cl (mL/min/kg)	F%	Oral AUC (nM*h)
Exemplo 2k WO2005021500	2,5/25	40	68	9294
Exemplo 8a WO2005021500	6/72	42	1,4	690
Exemplo 9c, WO2005021500	4/43	54	14	1855
Exemplo 1, Presente invenção	2/10	43	51	3794

Tabela 12c, Dados Farmacocinéticos Comparativos *in vivo* no Macaco

Composto	Dose IV/PO (mg/kg)	Cl (mL/min/kg)	F%	Oral AUC (nM*h)
Exemplo 2k WO2005021500	1/1,4	25	46	862
Exemplo 8a WO2005021500	1/11	14	9,4	1896
Exemplo 9c, WO2005021500	1/10	12	26	6763
Exemplo 1, Presente invenção	1/1,3	23	47	836

UTILIDADE

Compostos representativos dos exemplos são conhecidos serem

- 5 moduladores de atividade de receptor de quimiocina utilizando ensaios conhecidos por aqueles versados na técnica. Nesta seção, descrevemos tais ensaios e fornecemos sua literatura de referência. Mais ensaios são descritos aqui na seção intitulada "Características Farmacológicas Comparativas", *supra*. Exibindo-se a atividade nestes ensaios de antagonismo de MCP-1, os
- 10 compostos dos exemplos são esperados serem úteis no tratamento de doenças humanas associadas com quimiocinas e seus receptores cognatos. A definição de atividade nestes ensaios é um composto demonstrando um IC₅₀ de 30 µM ou menor em concentração quando avaliado em um particular ensaio.
- 15 Antagonismo de Ligação de MCP-1 ao PBMC Humano

(Yoshimura e outro, *J. Immunol.* 1990, 145, 292)

Pelo menos um composto descrito nos exemplos tem atividade no antagonismo de ligação de MCP-1 à PBMC humana (células mononucleares de sangue periférico humano) descrita aqui.

- 20 Placas de filtro Millipore (#MABVN1250) são tratadas com 100 µl de tampão de ligação (0,5% de albumina de soro bovino, 20 mM de tampão de HEPES e 5 mM de cloreto de magnésio em meios RPMI 1640) durante trinta minutos em temperatura ambiente. Para avaliar a ligação, 50 µl de tampão de ligação, com ou sem um composto de concentração conhecido,
- 25 são combinados com 50 µl de MCP-1 humana rotulada por ¹²⁵I (para for-

necer uma concentração final de 150 pM radioligand) e 50 µl de tampão de ligação contendo células 5×10^5 . As células utilizadas para tais ensaios de ligação podem incluir células mononucleares de sangue periférico humano isoladas por centrifugação gradiente Ficoll-Hyphaque, monócitos humanos
5 (Weiner e outro, *J. Immunol. Methods* . 1980, 36, 89), ou a linhagem celular THP-1 que expressa o receptor endógeno. A mistura de composto, células e radioligantes são incubados em temperatura ambiente durante trinta minutos. As placas são colocadas em uma tubulação de vácuo, vácuo aplicado, e as placas lavadas três vezes com tampão de ligação contendo 0,5M de Na-
10 Cl. A aba plastic é removida da placa, a placa deixada secar por ar, as cavidades furadas e contadas. O percentual de inibição de ligação é calculado utilizando as contas totais obtidas na ausência de qualquer composto de competição composto e a ligação de base determinada por adição de 100 nM de MCP-1 no lugar do composto teste.

15 Antagonismo de Influxo de Cálcio Induzido por MCP-1

(Sullivan, e outro, *Methods Mol. Biol.*, 114, 125-133 (1999))

Pelo menos um composto descrito nos exemplos tem atividade no antagonismo de ensaio de influxo de cálcio induzido por MCP-1 descrito aqui.

20 A mobilização de cálcio é avaliada utilizando a tinta indicadora de Ca^{2+} fluorescente, Fluo-3. As células são incubadas em 8×10^5 células/ml em salina tamponada por fosfato contendo 0,1% de albumina de soro bovino, 20 mM de tampão de HEPES, 5 mM de glicose, 1% de soro de bovinho fetal, 4 µM de Fluo-3 AM e 2,5 mM de *probenecide* durante 60 minutos a 37°C. As células utilizadas para tais ensaios de cálcio podem incluir monócitos humanos isolados como descritos por Weiner e outro, *J. Immunol. Méto-*
25 *dos*, 36, 89-97 (1980) ou linhagens celulares que expressam o receptor de CCR2 endógenos tais como THP-1 e MonoMac-6. As células são em seguida lavadas três vezes em salina tamponada com fosfato contendo 0,1% de
30 Albumina de soro bovino, 20 mM de HEPES, 5 mM de glicose e 2,5 mM de *probenecide*. As células são re-suspensas em salina tamponada por fosfato contendo 0,5% de Albumina de soro bovino, 20 mM de HEPES e 2.5 mM de

probenecide em uma concentração final de $2\text{-}4 \times 10^6$ células/ml. As células são semeadas em microplacas de parede preta de 96 cavidades (100 $\mu\text{l}/\text{cavidade}$) e as placas centrifugadas a $200 \times g$ durante 5 minutos. Várias concentrações de composto são adicionadas às cavidades (50 $\mu\text{l}/\text{cavidade}$)

- 5 e após 5 minutos, 50 $\mu\text{l}/\text{cavidade}$ de MCP-1 são adicionados para fornecer uma concentração final de 10 nM. A mobilização de cálcio é detectada por utilizando uma leitora de imagemamento fluorescente. A monocamada celular é excitada com um laser de argônio (488 nm) e fluorescência associada com célula avaliada durante 3 minutos, (a cada segundo para os primeiros 90
10 segundos e a cada 10 segundos para os 90 segundos seguintes). Os dados são gerados como unidades de fluorescência arbitrária e alteração na fluorescência para cada cavidade determinada como o diferencial máximo-mínimo. A inibição dependente de composto é calculada com relação à resposta de MCP-1 sozinha.

15 Antagonismo de Quimiotaxia de PBMC Humana induzida por MCP-1-
(Bacon e outro, *Brit. J. Pharmacol.* **1988**, 95, 966)

Pelo menos um composto descrito nos exemplos tem atividade no antagonismo de ensaio de quimiotaxia de PBMC humana induzida por MCP-1 descrita aqui.

- 20 Câmara de quimiotaxia de Neuroprobe MBA96-96-cavidades, placa de 96 cavidades Polifiltrronics MPC, e filtros de 8 microns PFD5 de polícarbonato livre de polivinilpirrolidona Neuroprobe são aquecidos em um incubador a 37°C . Células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs) (Boyum e outro, *Scand. J. Clin. Lab Invest. Suppl.* **1968**, 97, 31),
25 recentemente isoladas por meio de método de separação ficoll padrão, são suspensas em DMEM a 1×10^7 c/ml e aquecidas a 37°C . Uma solução de 60 nM de MCP-1 é também aquecida a 37°C . Diluições de compostos teste são preparadas em 2x a concentração necessária em DMEM. A suspensão de PBMC e a solução de MCP-1 60 nm são misturadas 1:1 em tubos de polipropileno com DMEM pré-aquecido com ou sem uma diluição dos compostos teste. Estas misturas são aquecidas em um aquecedor de tubo a 37°C .
30 Para iniciar o ensaio, adicionar a mistura de composto/MCP-1 nas cavidades

da placa de 96 cavidades Polifiltrronics MPC 96 que foram colocadas na parte base da câmara de quimiotaxia Neuroprobe. O volume aproximado é 400 μ l para cada cavidade e deve ser a menisco positivo após dispersão. O filtro de 8 microns é colocado suavemente no topo da placa de 96 cavidades, uma gaxeta de borracha é ligada à base da câmara superior, e a câmara é montada. Um volume de 200 μ l da suspensão celular/mistura de composto é adicionado às cavidades apropriadas da câmara superior. A câmara superior é coberta com um selador de placa, e a unidade montada é colocada em um incubador a 37°C durante 45 minutos. Após incubação, o selador de placa é removido e toda a suspensão celular restante é aspirada. A câmara é desmontada e o filtro gentilmente removido. Enquanto que mantendo o filtro em um ângulo de 90 graus, as células não migradas são removidas utilizando uma corrente suave de salina tamponada por fosfato e o topo do filtro limpo com a ponta de um rodo de borracha. Repetir esta lavagem mais duas vezes. O filtro é secado por ar e em seguida imerso completamente em mancha Wright Geimsa durante 45 segundos. O filtro é em seguida lavado por embebimento em água destilada durante 7 minutos, e em seguida uma lavagem adicional de 15 segundos em água destilada fresca. O filtro é novamente secado por ar. As células migradas no filtro são quantificadas por microscopia visual.

Receptores de quimiocina humana fornecem um alvo para interferir com ou promover função celular imune em um mamífero, tal como um humano. Compostos que inibem ou promovem função receptora de quimiocina são particularmente úteis para modular a função celular imune para os propósitos terapêuticos. Consequentemente, a presente invenção está direcionada aos compostos que são úteis na prevenção e/ou tratamento de uma ampla variedade de distúrbios e doenças inflamatórias, infecciosas, e imuno-reguladoras, incluindo asma e doenças alérgicas, infecção po micróbios patogênicos (que, por definição, inclui vírus), bem como patologias autoimunes tais como a artrite reumatóide e aterosclerose.

Por exemplo, um presente composto que inibe uma ou mais funções de um receptor de quimiocina de mamífero (por exemplo, um receptor

de quimiocina humana) pode ser administrado para inibir (isto é, reduzir ou prevenir) inflamação ou doença infecciosa. Como um resultado, um ou mais processos inflamatórios, tais como emigração de leucócitos, adesão, quimiotaxia, exocitose (por exemplo, de enzimas, histamina) ou liberação mediadora inflamatória, são inibidos.

Similarmente, um presente composto que promove uma ou mais funções do receptor de quimiocina mamífera (por exemplo, uma quimiocina humana) como administrado para estimular (induzir ou realçar) uma resposta imune ou inflamatória, tal como emigração de leucócitos, adhesion, quimiotaxia, exocitose (por exemplo, de enzimas, histamina) ou liberação mediadora inflamatória, resultando na estimulação benéfica de processos inflamatórios. Por exemplo, eosinófilos podem ser recrutados para combater infecções parasíticas. Além disso, o tratamento da doença inflamatória, alérgica e autoimune anteriormente mencionado pode também ser contemplado por um presente composto que promove uma ou mais funções do receptor de quimiocina mamífera se alguém contempla a liberação de composto suficiente para causar a perda da expressão de receptor em células através da indução de internalização de receptor de quimiocina ou a liberação de composto de uma maneira que resulta na direção imperfeita da migração de células.

Além dos primatas, tais como humanos, uma variedade de outros mamíferos pode ser tratada de acordo com o método da presente invenção. Por exemplo, mamíferos, incluindo, porém não limitados à, vacas, ovelhas, cabras, cavalos, cachorros, gatos, cbaisas, porcos, ratos ou outras espécies bovinas, ovinas, equinas, caninas, felinas, roedores ou murinos podem ser tratados. Entretanto, o método pode também ser praticado em outras espécies, tais como espécies aviárias. O indivíduo tratado nos métodos acima é um mamífero, macho ou fêmea, em que a modulação da atividade receptora de quimiocina é desejada. "Modulação" como utilizado aqui destina-se a abranger antagonismo, agonismo, antagonismo parcial e/ou agonismo parcial.

Derivação celular e Cultura celular: Um agrupamento de células HT1080 estavelmente expressando o receptor 5 de quimiocina CC endógena (CCR5) foi desenvolvido utilizando os métodos delineados por Harrington, Sherf, e Rundlett (veja Patentes dos Estados Unidos US 6,361,972 e US 6,410,266).

- 5 Os clones de maior expressão foram isolados utilizando citometria de fluxo repetitivo, seguido por sub-clonagem. Estas células foram em seguida culturadas em placas de 6 cavidades em células/cavidades de 3×10^5 e transfectadas com um vetor de DNA contendo a proteína G rotulada por HAquimérica Gqi5 (Molecular Devices; 5 microgramas de vetor de DNA linearizado em
10 15 microL de Ex-Gen de Fermentes foram utilizados para a transfecção). Dois dias após a transfecção, as cavidades foram combinadas e semeadas em placas P100. Sete dias após semeadura, as colônias foram furadas, expandidas e analisadas quanto o teor de Gqi5 por macha Western. Um clone (designado como 3559.1.6) tendo expressão elevada de Gqi5 (de transfecção) e de CCR5 (endógena) foi selecionado e utilizado para os experimentos descritos abaixo. As células HT1080 (clone 3559.1.6) foram culturadas com com alfa-MEM suplementadas com com 10% de soro bovino fetal dializado, 2% de penicilina/estreptomicina/glutamina, e 500 microgram/mL de higromicina B (concentração final) a 37° C com 5% de CO₂ em uma atmosfera umidificada.

- 20 Preparação de Membrana: Uma pélete celular contendo células 1×10^8 HT1080 (clone 3559.1.6) foi re-suspensa em 5 mL de Tampão Prep de membrana gelado (50 mM de HEPES, 5 mM de MgCl₂, 1 mM de CaCl₂) e homogeneizada em alta velocidade em um homogeneizador Politron durante
25 20 segundos em gelo. O homogeneizado foi diluído com mais 25 mL de Tampão Prep de Membrana e centrifugado durante 12 minutos (48,000 x g a 4°C). A pélete celular foi re-suspensa em 5 mL de Tampão Prep de Membrana antes de ser re-homogeneizada como previamente descrita. O homogeneizado foi diluído com 5 mL de Tampão Prep de Membrana e ensaiado
30 para concentrações de proteína CCR5.

Ensaio de Ligação: O homogeneizado recentemente preparado de uma preparação de membrana acima descrito foi diluído em um tampão de ligação

(50 mM de HEPES, 5 mM de MgCl₂, 1 mM de CaCl₂, 0,1% de BSA; um tablette de inibidro de protease completo foi adicionado antes do ensaio) para obter uma concentração de proteína final de 10 microgramas/cavidade (placas brancas de 96 cavidades sólidas de Corning, Inc.). Esta preparação de membrana foi misturada com contas WGA-SPA (Amerhsam; pré-empregnadas em tampão de Ligação) para fornecer a concentração de 200 microgramas/cavidade. A mistura de membrana /conta SPA b (100 microlitros/cavidade) foi em seguida adicionada à placa que foi pré-pontilhada com 2 microlitros de DMSO contendo várias concentrações de artigos teste (DM-5 SO puro para controle negativo; várias concentrações de exemplos desta invenção por artigos teste; 500 nM de MIP-1 beta como um controle positivo). O ensaio de ligação foi iniciado através da adição de 50 microlitros de [¹²⁵I]-MIP-1 beta (Perkin Elmer; material foi diluído em um tampão de ligação tal que a adição de 50 microlitros/cavidade fornece uma concentração final de 0,1 nM [¹²⁵I]-MIP-1 beta). A placa foi selada e deixada repousar em temperatura ambiente durante 4 – 6 horas antes de ser contada em uma Packard TopCount. A porcentagem de ligação para o artigo teste foi calculada, utilizando controles negativos e positivos para definir a janela para cada experimento.

10 20 Ensaio Funcional com Base na Leitora de Placa de Imageamento Fluorométrico (FLIPR): células HT1080 (clone 3559.1.6) foram semeadas em 10,000 células/cavidades (30 microlitros) em placas de 384 cavidades (base preta/clara Biocoat PDL, Beckton Dickinson) e carregadas com 30 microlitros/cavidade de tinta fluorescente Fluro-4 AM (preparada dissolvendo 1 mg de Fluro-4 AM em 440 microlitros de DMSO e diluindo com 100 microlitros de solução plurônica antes de ser diluída também com 10 mL de tampão Hanks). As células foram incubadas a 37° C com 5% de CO₂ durante 30 minutos antes de serem lavadas três vezes e suspensas em Tampão de Ensaio (20 mM de HEPES, 1,2 mM de CaCl₂, 5 mM de MgCl₂, 2,5 mM de Pro-25 benecide, 0,5% de BSA, 1x Hanks). O artigo teste foi serialmente diluído em DMSO e em seguida diluído 1:10 com Tampão de Ensaio antes de ser adicionado às células (10 microlitros/cavidade). Utilizando FLIPR, as placas

30

foram lidas (10 – 70 segundos) para indução de fluxo (isto é, atividade agonista). As células foram em seguida também carregadas com Solução Agonista (30 microlitros/cavidade; preparada diluindo-se 30 microlitros de 100 microMolar MIP-1 beta em 100 mL de Tampão de Ensaio; este protocolo

- 5 libera uma concentração final de 5 nM de MIP-1 beta no ensaio) e as placas foram lidas utilizando FLIPR durante um minuto. A atividade antagonista do artigo teste foi determinada com relação a 0,4% de controle negativo de tampão/DMSO.

Doenças ou condições de humanos ou outras espécies que podem ser tratados com inibidores de função receptora de quimiocina, incluem, porém não estão limitados à: condições e doenças alérgicas ou inflamatórias, incluindo doenças alérgicas respiratórias tais como asma, rinite alérgica, doenças de pulmão de hipersensibilidade, pneumonite de hipersensibilidade, celulite eosinófila (por exemplo, Síndrome de Well), pneumonias eosinófilas (por exemplo, síndrome de Loeffler, pneumonia eosinófila crônica), fascite eosinófila (por exemplo, síndrome de Shulman), hipersensibilidade tipo retardada, doenças pulmonares intersticiais (ILD) (por exemplo, fibrose pulmonar idiopática, ou ILD associada com artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, espondilite anquilosante, esclerose sistêmica, síndrome de 10 Sjogren, polimiosite ou dermatomiosite); anafilaxia sistêmica ou respostas à hipersensibilidade, alergias a fármacos (por exemplo, à penicilina, cefalosporinas), síndrome eosinófila-mialgia devido a ingestão de triptofan contaminado, alergias à picada de inseto; doença autoimune, tal como artrite reumatóide, artrite psoriática, esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistêmico, mias- 15 tenia grave, diabetes de início juvenil; glomerulonefrite, tireoide autoimune, doença de Behcet; rejeição de enxerto (por exemplo, em transplante), incluindo rejeição de aloenxerto ou doença do enxerto versus hospedeiro; doenças inflamatórias do intestino, tais como doença de Crohn e colite ulcerativa; espondiloartropatias; escleroderma; psoríase (incluindo psoríase mediada 20 por célula T) e dermatoses inflamatórias tais como uma dermatite, eczema, dermatite atópica, dermatite de contato alérgica, urticária; vasculite (por exemplo, vasculite por hipersensibilidade, necrosante e cutânea); miosite eo- 25

sinófila, fsaciite eosinófila; cânceres com infiltração de leucócito da pele ou órgão. Outras doenças ou condições em que as respostas inflamatórias indesejáveis devem ser inibidas podem ser tratadas, incluindo, porém não limitados à, vasculite, placas vulneráveis, dano de reperfusão de hiperplasia neoíntima venosa, hiperplasia neoíntima de enxerto de diálise, hiperplasia íntima de desvio arterio-venoso, aterosclerose, certas malignidades hematológicas, toxicidade induzida por citocina (por exemplo, choque séptico), polimiosite, dermatomiosite. Doenças ou condições infecciosas de humanos ou outras espécies que podem ser tratados com inibidores de função receptora de quimiocina, incluem, porém não estão limitados a, HIV.

Doenças ou condições de humanos ou outras espécies que podem ser tratados com promotores da função receptora de quimiocina, incluem, porém não estão limitados à: imunossupressão, tal como aquela em indivíduos com síndromes de imunodeficiência tais como AIDS ou outras infecções virais, indivíduos passando por terapia de radiação, quimioterapia, terapia para doença autoimune ou terapia de fármaco (por exemplo, terapia de corticosteróide), que causa imunossupressão; imunossupressão devido à deficiência congênita na função receptora ou outras caudas; e doenças por infecção, tais como doenças parasíticas, incluindo, porém não limitadas à, infecções por helminto, tais como nematódeos (vermes circulares); (*Trichuriasis, Enterobiasis, Ascariasis, Hookworm, Strongyloidiasis, Trichinosis, filariasis*); trematódeos (*flukes*) (*Schistosomiasis, Clonorchiasis*), cestódeos (*tênia*) (*Echinococcosis, Taeniasis saginata, Cysticercosis*); vermes víscerais, hemicrâncias de larva visceral (por exemplo, *Toxocara*), gastroenterite eosinófila (por exemplo, *Anisaki sp., Phocanema sp.*), hemicrâncias de larva cutânea (*Ancylostoma braziliense, Ancylostoma caninum*). Os compostos da presente invenção são consequentemente úteis na prevenção e tratamento de uma ampla variedade de doenças e distúrbios inflamatórios, infecciosos e imunoreguladores.

Além disso, tratamento da doença inflamatória, alérgica e autoimune anteriormente mencionada pode também ser contemplado por promotores da função receptora de quimiocina se alguém contempla a liberação de

composto suficiente para causar a perda da expressão em células através da indução de internalização de receptor de quimiocina ou liberação do composto de uma maneira que resulta na direção imperfeita da migração de células.

5 Em outro aspecto, a presente invenção pode ser utilizada para avaliar os agonistas ou antagonistas específicos putativos de um receptor acoplado à proteína G. A presente invenção é direcionada ao uso destes compostos na preparação e execução de ensaios e avaliação para compostos que modulam a atividade dos receptores de quimiocina. Além disso, os
10 compostos desta invenção são úteis no estabelecimento ou determinação do sítio de ligação de outros compostos aos receptores de quimiocinas, por exemplo, por inibição competitiva ou como uma referência em um ensaio para comparar sua atividade conhecida a um composto com uma atividade desconhecida. Quando desenvolvem novos ensaios ou protocolos, os compostos
15 de acordo com a presente invenção podem ser utilizados para testar sua eficácia. Especialmente, tais compostos podem ser fornecidos em um *kit* comercial, por exemplo, para uso em pesquisa farmacêutica envolvendo as doenças acima mencionadas. Os compostos da presente invenção são também úteis para a avaliação de moduladores específicos putativos dos receptores de quimiocina. Além disso, alguém poderia utilizar os compostos desta
20 invenção para examinar a especificidade de receptores acoplados à proteína G que não são considerados serem receptores de quimiocina, servindo como exemplos de compostos que não ligam-se ou como variantes estruturais de compostos ativos nestes receptores que podem ajudar a definir sítios específicos de interação.
25

Compostos descritos aqui são úteis para tratar ou prevenir distúrbios selecionados de artrite reumatóide, osteoartrite, choque séptico, arteriosclerose, aneurisma, febre, efeitos cardiovasculares, choque hemodinâmico, síndrome de sepse, dano de reperfusão pós isquêmica, malária, doença de Crohn, doença do intestino inflamatória, infecção micobacteriana, meningite, psoríase, insuficiência cardíaca congestiva, doença fibrótica, caquexia, rejeição de enxerto, doença autoimune, doenças inflamatórias de pele, es-

clerose múltipla, dano por radiação, lesão alveolar hiperóxica, HIV, demência por HIV , diabetes melito não dependente de insulina, asma, rinite alérgica, dermatite atópica, fibrose pulmonar idiopática, penfigóide bulhoso, infecções parasíticas helmínticas, colite alérgica, eczema, conjuntivite, transplante, 5 eosinofilia familiar, celulite eosinófila, pneumonias eosinófilas, fascite eosinófila, gastroenterite eosinófila, eosinofilia induzida por fármaco, Síndrome Churg-Strauss, linfoma, doença de Hodgkin, carcinoma colônico, síndrome de Felty, sarcoidose, uveíte, Alzheimer, Glomerulonefrite, e lúpus eritemato- 10 so sistêmico, carcinoma celular escamoso esofágico, dor neuropática, e o- besidade.

Em outro aspecto, os compostos são úteis para tratar ou prevenir distúrbios inflamatórios selecionados de artrite reumatóide, osteoartrite, aterosclerose, aneurisma, febre, efeitos cardiovasculares, doença de Crohn, doença do intestino inflamatória, psoríase, insuficiência cardíaca congestiva, 15 esclerose múltipla, doença autoimune, skin doenças inflamatórias.

Em outro aspecto, os compostos são utilizados para tratar ou prevenir distúrbios inflamatórios selecionados de artrite reumatóide, osteoartrite, aterosclerose, doença de Crohn, doença do intestino inflamatória, e esclerose múltipla.

20 Em outro aspecto, exemplos descritos aqui podem ser úteis para o tratamento de uma variedade de cânceres, incluindo, porém não limitados aos seguintes:

carcinoma incluindo aquele da bexiga (incluindo câncer da bexiga metastático e acelerado), mama, cólon, (incluindo câncer colorretal), rim, fígado, pul- 25 mão (incluindo adenocarcinoma pulmonar e câncer pulmonar de célula pe- quena e não pequena), ovário, prostata, trato genitário, sistema linfático, re- to, laringe, pâncreas (incluindo carcinoma pancreática exócrina), esôfago, estômago, vesícula biliar, cérvix, tireoide, e pele (incluindo carcinoma celular escamoso);

30 tumores hematopoiéticos de linhagem de linfóide incluindo leucemia, leuce- mia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de célula B, linfoma de célula T, linfoma de Hodgkin, non-Hodgkin's linfoma de não Hodgkin, lin-

- foma de célula capilar, linfoma histiocítica, e linfoma Burkitts; tumores hematopoiéticos de linhagem mielóide incluindo leucemias mielógenas agudas e crônicas, síndrome mielodisplásica, leucemia mielóide, e leucemia promielocítica;
- 5 tumores do sistema nervoso central e periférico incluindo astroitoma, neuroblastoma, glioma, e schwanomas;
- tumores de origem mesenquimal incluindo fibrosarcoma, rhabdomioscarcoma, e osteosarcoma; e
- outros tumores incluindo melanoma, xenoderma pigmentoso, ceratoactan-
- 10 toma, seminoma, câncer folicular da tireoide, e teratocarcinoma.

Em outra modalidade, descrita aqui são os métodos de tratamento de câncer, em que o câncer é selecionado de câncer de mama, câncer de fígado, câncer de próstata, e melanoma. Adicionalmente, compostos descritos aqui são úteis no tratamento de câncer ovariano, e mieloma múltiplo.

A presente invenção fornece métodos para o tratamento de uma variedade de doenças proliferativas não cancerígenas.

Terapia combinada para prevenir e tratar doenças e distúrbios inflamatórios, infecciosos e imunoreguladores, incluindo asma e doenças alérgicas, bem como patologias autoimunes tais como artrite reumatóide e aterosclerose, e aquela patologias acima observadas é ilustrada pela combinação dos compostos desta invenção e outros compostos que são conhecidos por tais utilidades. Por exemplo, no tratamento ou prevenção de inflamação, os presentes compostos podem ser utilizados em conjunção com um agente antiinflamatório ou analgésico tais como um agonista de opiatos, um inibidor de lipoxigenase, um inibidor de ciclooxigenase-2, um inibidor de interleucina, tal como um inibidor de interleucina-1, um inibidor de fator de necrose de tumor, um antagonista de NMDA, um inibidor ou óxido nítrico ou um inibidor da síntese de óxido nítrico, um agente antiinflamatório não esterooidal, um inibidor de fosfodiesterase, ou um agente antiinflamatório supressor de citocina, por exemplo, com um composto tal como acetaminofeno, aspirina, codeína, fentainil, ibuprofen, indometacina, cеторолак, morfina, naproxen,

fenacetina, piroxican, um analgésico esteroidal, sufentanila, sunlindac, alfa interferon e similares. Similarmente, os presentes compostos podem ser administrados com um aliviador de dor; um potenciador tal como cafeína, um antagonista de H₂, simeticona, hidróxido de alumínio ou magnésio; um descongestionante tal como fenilefrina, fenilpropanolamina, pseudofedrina, oximetazolina, efinefrina, nafazolina, xilometazolina, propilhexedrina, ou levo-desoxi-efedrina; e antitussígeno tal como codeína, hidrocodona, caramifen, carbetapentano, ou dextrametorfán; um diurético; e um anti-histamina sedante e não sedante. Igualmente, compostos descritos aqui podem ser utilizados em combinação com outros fármacos que são utilizados no tratamento/prevenção/supressão ou melhora das doenças ou condições para as quais os compostos da presente invenção são úteis. Tais outros fármacos podem ser administrados, por rotina e em uma quantidade comumente utilizada, portanto, contemporaneamente ou sequencialmente com um composto da presente invenção. Quando a composto é utilizado contemporaneamente com um ou mais outros fármacos, uma composição farmacêutica contendo tais outros fármacos além do composto da presente invenção podem ser utilizados. Consequentemente, as composições farmacêuticas incluem aqueles que também contêm um ou mais outros ingredientes ativos, além de um composto da presente descrição.

Exemplos de outros ingredientes ativos que podem ser combinados com um composto da presente invenção, administrados separadamente ou nas mesmas composições farmacêuticas, incluem, porém não estão limitados a: (a) antagonistas de integrina tais como aqueles para selectinas, ICAMs e VLA-4; (b) esteróides tais como beclometasona, metilprednisolona, betametasona, prednisona, dexametasona, e hidrocortisona; (c) imunossupressores tais como ciclosporina, tacrolimso, rapamicina e outros imunossupressores tipo FK-506; (d) anti-histaminas (antagonistas de H₁-histamina) tais como bromofeniramina, clorfeniramina, dexclorfeniramina, tripolidina, clemastina, difenhidramina, difenilpiralina, tripeleannamina, hidroxizina, metdilazina, prometazina, trimeprazina, azatadina, ciproheptadina, antazolina, feniramina pirilamina, astemizol, terfenadina, loratadina, cetirizi-

na, fexofenadina, descarboetoxiloratadina, e similares; (e) anti-asmáticos não esteroidais tais como b₂-agonists (terbutalina, metaproterenol, fenoterol, isoetarina, albuteral, bitolterol, e pirbuterol), teofilina, sódio de cromolin, atropina, brometo de ipratrópio, antagonistas de leucotrieno (zafirlukast, montelukast, pranlukast, iralukast, pobilukast, SKB-102,203), inibidores de biossíntese de leucotrieno (zileuton, BAY-1005); (f) agentes antiinflamatórios não esteroidais (NSAIDs) tais como derivados de ácido propiônico (alminoprofen, benzaprofen, ácido buclóxico, carprofen, fenbufen, fenoprofen, fluprofen, flurbiprofen, ibuprofen, indoprofen, cetoprofen, miroprofen, naproxen, oxa-

10 prozin, pirprofen, pranoprofen, suprofen, ácido tiaprofênico, e tioxaprofen), derivados de ácido acético (indometacin, acemetacin, alclofenac, clidanac, diclofenac, fenclofenac, fenclozic acid, fentiazac, furofenac, ibufenac, isoxepac, oxpinac, sulindac, tiopinac, tolmetin, zidometacin, e zomepirac), derivados de ácido fenâmicos (ácido flufenâmico, ácido meclofenâmico, ácido me-

15 fenâmico, ácido niflúmico e ácido tolfenâmico), derivados de ácido bifenilcarboxílico (diflunisal e flufenisal), oxicanos (isoxicán, piroxicán, sudoxicán e tenoxicán), salicilatos (ácido salicílico de acetila, sulfasalazina) e as pirazonas (apazona, bezpiperilon, feprazona, mofebutazona, oxifenbutazona, fenilbutazona); (g) inibidores de ciclooxygenase-2 (COX-2); (h) inibidores de

20 fosfodiesterase tipo IV (PDE-IV); (i) outros antagonistas dos receptores de quimiocina; (j) agentes de diminuição de colesterol tais como inibidores de HMG-COA reductase (lovastatin, simvastatin e pravastatin, fluvastatin, atorvastatin, e outras estatinas), sequestrantes (colestiramina e colestipol), ácido nicotônico, derivados de ácido fenofíbrico (genfibrozil, clofibrat, fenofibrato e benzafibrato), e probucol; (k) agentes anti-diabéticos tais como insulina, sul-

25 foniluréias, biguanidas (metformin), inibidores a-glicosidase (acarbose) e glitazonas (troglitazona e pioglitazona); (l) preparações de interferons (interferon alfa-2a, interferon-2B, interferon alfa-N3, interferon beta-1a, interferon beta-1b, interferon gama-1b); (m) compostos antivirais tais como efavirenz,

30 nevirapina, indinavir, ganciclovir, lamivudina, famciclovir, e zalcitabina; (o) outros compostos tais como ácido 5-aminossalicílico umpró-fármacos destes, antimetabólitos tais como azatioprina e 6-mercaptopurina, e agentes

quimioterapêuticos de câncer citotóxicos. A taxa de peso do composto da presente invenção para o segundo ingrediente ativo pode ser variada e dependerá das doses eficazes de cada ingrediente.

Geralmente, uma dose eficaz de cada sera utilizada. Desse modo, por exemplo, quando a composto for combinado com um NSAID a taxa de peso do composto da presente invenção para NSAID geralmente variará de cerca de 1000:1 a cerca de 1:1000, ou alternativamente de cerca de 200:1 a cerca de 1:200. Combinações de um composto da presente invenção e outros ingredientes ativos geralmente também estarão na faixa anteriormente mencionadas, porém em cada caso, uma dose eficaz de cada ingrediente ativo deve ser utilizada.

No tratamento de câncer, uma combinação de agentes quimioterapêuticos e/ou outros tratamentos (por exemplo, terapia por radiação) é frequentemente vantajoso. O segundo (ou terceiro) agente pode ter mecanismo igual ou diferente de ação do que o primeiro agente terapêutico. Pode ser especialmente útil empregar combinações de fármacos citotóxicos em que os dois ou mais fármacos que estão sendo administrados ajam de diferentes maneiras ou em diferentes fases do ciclo celular, e/ou em que os dois ou mais fármacos tenham sobreposição de toxicidades ou efeitos colaterais, e/ou em que os fármacos que estão sendo combinados cada qual tenha uma eficácia demonstrada no tratamento do particular estado de doença manifestado pelo paciente.

Consequentemente, compostos descritos aqui (ou outras fórmulas descritas aqui) podem ser administrados em combinação com outros tratamentos e agentes citotóxicos e anti-câncer úteis no tratamento de câncer ou outras doenças proliferativas. A invenção aqui também compreende o uso dos compostos aqui (ou outras fórmulas descritas aqui), na preparação de medicamentos para o tratamento de câncer, e/ou compreende a embalagem dos compostos inclusos juntamente com as instruções de que os compostos são utilizados em combinação com outros tratamentos e agentes anti-câncer ou citotóxicos para o tratamento de câncer. A presente invenção também compreende combinações dos compostos de um ou mais agentes adicionais

em forma de *kit*, por exemplo, em que eles são embalados juntamente ou colocados em embalagens separadas a serem vendidas como um *kit*, ou em que eles são embalados para serem formulados juntos.

O segundo (ou mais) agente anti-câncer pode ser selecionado
5 de qualquer um ou mais dos seguintes:

Agentes de aquilação (incluindo mostardas de nitrogênio, sulfonatos de alquila, nitrossouréias, derivados de etilenimina, e triazenos); anti-angiogênicos (incluindo inibidores de metaloproteinase matriz); antimetabólicos (incluindo inibidores de adenosina deaminase, antagonistas de ácido fólico, análogos de purina, e análogos de pirimidina); antibióticos ou anticorpos (incluindo anticorpos monoclonais, anticorpos CTLA-4, antraciclinas); inibidores de aromatase;

Modificadores de ciclo celular; enzimas; inibidores de farnesil proteína transferase;

15 Agentes hormonais e anti-hormonais e esteróides (incluindo análogos sintéticos, glicocorticóides, estrogênios/anti-estrogênios [por exemplo, SERMs], androgênios/anti-androgênios, progestinas, agonistas receptores de progesterona, e agonistas e antagonistas de liberação de hormônio luteinizante [L-HRH]); moduladores de sistema de fator de crescimento tipo insulina

20 (IGF)/receptor de fator de crescimento tipo insulina (IGFR) (incluindo inibidores de IGFR1); inibidores de sinalização de integrina; inibidores de cinase (incluindo inibidores de múltiplas cinases e/ou inibidores de Src cinase ou Src/abl, inibidores de cinase dependente de ciclina [CDK], anticorpos pa-

nHer, Her-1 e Her-2, inibidores de VEGF, incluindo anticorpos anti-VEGF, 25 inibidores de EGFR, inibidores de proteína ativada por mitógeno [MAP], inibidores de MEK, inibidores de Aurora cinase, inibidores de PDGF, e outros inibidores de tirosina cinase ou inibidores de serina /treonina;

agentes disruptores de microtúbulo, tais como ecteinascidinas ou seus análogos e derivados; agentes estabilizantes de microtúbulo tais como taxanos,

30 e as epotilonas de ocorrência natural e seus análogos sintéticos e semi-sintéticos;

agentes desestabilizantes, de ligação de microtúbulo (incluindo alcalóides de

vinca); e

inibidores de topoisomerase; inibidores de prenil proteína transferase; complexos de coordenação de platina; inibidores de trandução de sinal; e outras agentes utilizados como anti-câncer e citotóxicos tais como modificadores

- 5 de resposta biológica, fatores de crescimento e moduladores imunes.

Adicionalmente, os compostos da presente invenção podem ser formulados ou co-administrados com outros agentes terapêuticos que são selecionados por sua utilidade particular no tratamento de efeitos colaterais associados com as condições anteriormente mencionadas. Por exemplo,

- 10 compostos da invenção podem ser formulados com agentes para prevenir náusea, hipersensibilidade e irritação gástrica, tais como antieméticos, e H₁ e H₂ anti-histamínicos.

Os outros agentes terapêuticos acima, quando empregados em combinação com os compostos da presente invenção, podem ser utilizados, por exemplo,

- 15 naquelas quantidades indicadas na Physicians' Desk Reference (PDR) ou como de outro modo determinado alguém versado na técnica.

Os compostos são administrados a um mamífero em uma quantidade terapeuticamente eficaz. Por "quantidade terapeuticamente eficaz" entende-se uma quantidade de um composto da presente descrição que,

- 20 quando administrado sozinho ou em combinação com um agente terapêutico adicional a um mamífero, é eficaz para prevenir ou melhorar a condição da doença ou a progressão da doença.

DOSAGEM E FORMULAÇÃO

Os compostos desta descrição podem ser administrados em tais formas de dosagem oral como comprimidos, cápsulas (cada dos quais inclui

formulações de liberação sustentada ou liberação com o tempo), pílulas, pós, grânulos, elixires, tinturas, suspensões, xaropes, e emulsões. Eles podem também ser administrados em forma intravenosa (bolo ou infusão), intra-peritoneal, subcutânea, ou intramuscular, todas utilizando formas de do-

- 30 sage bem conhecidas por aqueles versados na técnica nas técnicas farmacêuticas. Eles podem ser administrados sozinhos, porém, geralmente serão administrados com um veículo farmacêutico selecionado com base na

rotina escolhida de administração e prática farmacêutica padrão.

O regime de dosagem para os compostos da presente invenção, evidente, variará dependendo de fatores conhecidos, tais como as características farmacodinâmicas do agente particular e seu modo e rotina de administração; das espécies, idade, sexo, saúde, condição médica, e peso do receptor; da natureza e extensão dos sintomas; a espécie de tratamento concorrente; da frequência de tratamento; da rotina de administração, da função renal e hepática do paciente, e do efeito desejado. Um médico ou veterinário pode determinar e prescrever a quantidade eficaz do fármaco requerido para prevenir, conter, ou interromper o progresso do distúrbio.

Por meio de orientação geral, a dosagem oral diária de cada ingrediente ativo, quando utilizado para os efeitos indicados, variará entre cerca de 0,001 a 1000 mg/kg de peso corporal, ou entre cerca de 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal por dia, ou alternativamente, entre cerca de 1,0 a 20 mg/kg/dia. Intravenosamente, as doses variarão de cerca de 1 a cerca de 10 mg/kg/minuto durante uma infusão de taxa constante. Os compostos desta invenção podem ser administrados em dose diária única, ou a dosagem diária total pode ser administrada em doses divididas de duas, três, ou quatro vezes ao dia. Em uma modalidade, a dosagem oral diária do ingrediente ativo está entre 3 e 600 mg administrada uma vez diariamente ou em doses divididas administradas duas vezes ao dia. Alternativamente, o ingrediente ativo pode ser administrado em doses de 10-20 mg administradas duas vezes ao dia ou 40 a 100 mg administradas uma vez diariamente. Alternativamente, o ingrediente ativo pode ser administrado em doses de 12,5 mg duas vezes ao dia ou 75 mg uma vez ao dia. Alternativamente, o ingrediente ativo pode ser administrados em doses de 3, 10, 30, 100, 300, e 600 mg administradas uma ou duas vezes ao dia.

Os compostos desta invenção podem ser administrados em forma intranasal por meio de uso tópico de veículos intranasais adequados, ou por meio de rotinas transdérmicas, utilizando emplastos de pele transdérmicos. Quando administrados na forma de um sistema de liberação transdérmica, a administração da dosagem, evidente, será contínua em vez de inte-

mitente por todo o regime de dosagem.

Os compostos são tipicamente administrados em mistura com veículos, excipientes, ou diluentes farmaceuticamente aceitáveis (coletivamente referidos aqui como veículos farmacêuticos) adequadamente selecionados com respeito à forma pretendida de administração, isto é, xaropes, elixires, cápsulas, comprimidos orais e similares, e consistentes com as práticas farmacêuticas convencionais.

Por exemplo, para administração oral na forma de um comprimido ou cápsula, o componente de fármaco ativo pode ser combinado com um veículo inerte oral, não tóxico farmaceuticamente aceitável tal como lactose, amido, sacarose, glicose, metil celulose, estearato de magnésio, fosfato de dicálcio, sulfato de cálcio, manitol, sorbitol e similares; para administração oral em forma líquida, os componentes de fármaco podem ser combinados com quaisquer veículos inertes orais, não tóxicos farmaceuticamente aceitáveis tais como etanol, glicerol, água, e similares. Além disso, quando desejado ou necessário, aglutinantes adequados, lubrificantes, agentes desintegrantes, e agentes de coloração podem também ser incorporados na mistura. Aglutinates adequados incluem amido, gelatina, açúcares naturais tais como glicose ou beta-lactose, adoçantes de milho, gomas sintéticas e naturais tais como acácia, tragacanto, ou alginato de sódio, carboximetilcelulose, polietileno glicol, ceras, e similares. Lubrificantes utilizados nestas formas de dosage incluem oleato de sódio, estearato de sódio, estearato de magnésio, benzoato de sódio, acetato de sódio, cloreto de sódio, e similares. Desintegradores incluem, sem limitação, amido, metil celulose, ágar, bentonita, goma xantano, e similares.

Os compostos da presente invenção podem também ser administrados na forma de sistemas de liberação de lipossoma, tais como vesículas unilamelares pequenas, vesículas unilamelares grandes, e vesículas multilamelares. Os lipossomas podem ser formados de uma variedade de fosfolipídeos, tais como colesterol, estearilamina, ou fosfatidilcolinas.

Os compostos da presente invenção podem também ser acoplados com polímeros solúveis como veículos de fármacos alvejáveis. Tais po-

ímeros podem incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, poliidroxipro-pilmetacrilamida-fenol, poliidroxietilaspertamidafenol, ou polietilenoóxido-polilisina substituída com resíduos de palmitoíla. Além disso, os compostos da presente invenção podem ser acoplados a uma classe de polímeros bio-degradáveis úteis na obtenção de liberação controlada de um fármaco, por exemplo, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de ácido poliláctico e poliglicólico, caprolactona de poliepsilon, ácido butírico de poliídroxi, polioratoésteres, poliacetaiss, polidiidropiranos, policianoacilatos, e copolímeros de bloco reticulado ou anfipático de hidrogéis.

Formas de dosagem (composições farmacêuticas) adequadas para administração podem conter de cerca de 1 miligrama a cerca de 100 miligramas de ingrediente ativo por unidade de dosagem. Nestas composições farmacêuticas o ingrediente ativo ordinariamente estará presente em uma quantidade de cerca de 0,5-95% por peso com base no peso total da composição.

Cápsulas de gelatina podem conter o ingrediente ativo e veículos em pó, tais como lactose, amido, derivados de celulose, estearato de magnésio, ácido esteárico e similares. Diluentes similares podem ser utilizados para fazer os comprimidos prensados. Tanto comprimidos quanto cápsulas podem ser fabricados como produtos de liberação sustentada para prover liberação contínua de medicamento durante um período de horas. Os comprimidos prensados podem ser revestidos por açúcar ou revestidos por película para mascarar qualquer sabor desagradável e proteger o comprimido da atmosfera, ou revestidos entericamente para desintegração seletiva no trato gastrointestinal.

Formas de dosagem líquida para administração oral podem conter colorantes e aromatizantes para aumentar a aceitação do paciente.

Em geral, água, um óleo adequado, salina, dextrose aquosa (glicose), e soluções de açúcar relacionadas e glicóis tais como propilene glicol ou polietileno glicóis são veículos adequados para soluções parenterais. Soluções para administração parenterais podem conter um sal solúvel em água do ingrediente ativo, agentes estabilizantes adequados, e se necessário,

substâncias de tampão. Agentes antioxidantes tais como bissulfeto de sódio, sulfeto de sódio, ou ácido ascórbico, sozinhos ou combinados, são agentes estabilizantes adequados. Também utilizados aqui são ácido cítrico e seus sais e EDTA de sódio. Além disso, soluções parenterais podem conter preservativos, tais como cloreto de benzalcônio, metil- ou propil-parabeno, e clorobutanol.

Veículos farmacêuticos adequados são descritos em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, um texto de referência padrão neste campo.

Formas de dosagem farmacêuticas úteis representativas para a administração dos compostos desta invenção podem ser ilustradas como segue:

Cápsulas

Um grande número de unidades de cápsulas pode ser preparado carregando-se as cápsulas de gelatin dura de duas partes padrão cada qual com 100 miligramas de ingrediente ativo em pó, 150 miligramas de lactose, 50 miligramas de celulose, e 6 miligramas de estearato de magnésio.

Cápsulas de gelatina Mole

A mistura de ingrediente ativo em um óleo digerível tal como óleo de soja, óleo de semente de algodão ou azeite de oliva pode ser preparada e injetada por meios de uma bomba de remoção positiva na gelatina para formar cápsulas de gelatina mole 100 miligramas do ingrediente ativo. As cápsulas devem ser lavadas e secadas.

Comprimidos

Os comprimidos podem ser preparados por procedimentos convencionais a fim que a unidade de dosagem seja 100 miligramas de ingrediente ativo, 0,2 miligramas de dióxido de silício coloidal, 5 miligramas de estearato de magnésio, 275 miligramas de celulose microcristalina, 11 miligramas de amido e 98,8 miligramas de lactose. Revestimentos apropriados podem ser aplicados para aumentar a palatabilidade ou retardar a absorção.

Injetável

Uma composição parenteral adequada para administração por injeção pode ser preparada agitando 1,5% por peso do ingrediente ativo em 10% por volume de propileno glicol e água. A solução deve torna-se isotônica com cloreto de sódio esterilizado.

5 Suspensão

Uma suspensão aquosa pode ser preparada para administração oral a fim de que cada 5 mL contenha 100 mg de ingrediente ativo finamente dividido, 200 mg de carboximetil celulose de sódio, 5 mg de benzoato de sódio, 1,0 g de solução de sorbitol, U.S.P., e 0,025 mL de vanilina.

10 Onde compostos desta invenção são combinados com outros agentes anticoagulantes, por exemplo, uma dosagem diária pode ser de cerca de 0,1 a 100 miligramas do composto de fórmula I e cerca de 1 a 7,5 miligramas do segundo anticoagulante, por quilograma do peso corporal do paciente. Para um forma de dosagem de comprimido, os compostos desta invenção geralmente podem estar presentes em uma quantidade de cerca de 5 a 10 miligramas por unidade de dosagem, e o segundo anticoagulante em uma quantidade de cerca de 1 a 5 miligramas por unidade de dosagem.

20 Onde dois ou mais segundos agentes terapêuticos anteriores são administrados com o composto dos exemplos, geralmente a quantidade de cada componente em uma dosagem diária típica e forma de dosagem típica podem ser reduzidas com relação à dosagem usual do agente quando administrado sozinho, em vista do efeito sinérgico ou aditivo dos agentes terapêuticos quando administrados em combinação.

Particularmente quando fornecidos como uma unidade de dosagem unitária, o potencial existe para uma interação química entre os ingredientes ativos combinados. Por esta razão, quando o composto dos exemplos e um segundo agente terapêutico são combinados e uma unidade de dosagem única eles são formulados tal que todos os ingredientes ativos sejam combinados em uma unidade de dosagem única, o contato físico entre os ingredientes ativos é minimizado (isto é, reduzido). Por exemplo, um ingrediente ativo pode ser revestido por entérico. Por revestimento entérico um dos ingredientes ativos, é possível não apenas minimizar o contato entre os in-

gredientes ativos combinados, porém também, é possível controlar a liberação de um destes componentes no trato gastrointestinal tal que um destes componentes não seja liberado no estômago, porém de preferência seja liberado nos intestinos. Um dos ingredientes ativos pode também ser revestido com um material que realiza uma liberação sustentada por todo o trato gastrointestinal e também serve para minimizar o contato físico entre os ingredientes ativos combinados. Além disso, o componente de liberação sustentada pode ser adicionalmente revestido por entérico tal que a liberação deste componente ocorra apenas no intestino. Ainda outro método pode envolver a formulação de um produto de combinação em que um componente é revestido com um polímero de liberação entérica e/ou sustentada, e o outro componente é também revestido com um polímero tal como um baixo grau de viscosidade de hidroxipropil metilcelulose (HPMC) ou outros materiais como conhecidos na técnica, a fim de também separar os componentes ativos. O revestimento polímero serve para formar uma barreira adicional para interação com os outros componentes.

Este bem como outros modos de minimizar o contato entre os componentes de produtos de combinação da presente invenção seja administrados em uma forma de dosagem única ou administrados em formas separadas, porém no mesmo tempo pelo mesmo modo, será facilmente visível para aqueles versados na técnica, uma vez em concordância com a presente descrição.

Adicionalmente, certos compostos descritos aqui podem ser úteis como metabólitos de outros compostos. Portanto, em uma modalidade, os compostos podem ser úteis como um composto substancialmente puro, que podem também em seguida ser incorporados em uma composição farmacêutica, ou podem ser úteis como metabólito que é gerado após a administração do pró-fármaco daquele composto. Em uma modalidade, um composto pode ser útil como um metabólito por ser útil para tratamento de distúrbios como descrito aqui.

"Substancialmente puro" como utilizado aqui destina-se a incluir um composto tendo uma pureza maior do que cerca de 90 por cento de pe-

so, incluindo cerca de 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, e 100 por cento.

Como um exemplo, um composto descrito aqui pode ser substancialmente puro em ter uma pureza maior do que cerca de 90 por cento (por peso), em que o restante menos do que cerca de 10 por cento do material 5 compreende outro metabólito do composto, um pró-fármaco do composto, e/ou reação e/ou processando impurezas originando-se de sua preparação.

Obviamente, numerosas modificações e variações da presente invenção são possíveis levando em consideração os ensinamentos acima.

10 Deve-se, portanto, entender que no escopo das reivindicações anexas, a invenção pode ser de outro modo praticado tal como especialmente descrito aqui.

ENSAIOS E EFICÁCIA EM VIVO

15 N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida (também referido como "Exemplo 1") foi avaliado nos seguintes ensaios em vivo como descrito abaixo.

Seção 1. Modelo de desafio de MCP-1 intradérmico (ID) em camundongos cinomolgus

20 Métodos

Injeção intradérmica de MCP-1 resulta na infiltração de células mononucleares no sítio de injeção. Este modelo foi inicialmente desenvolvido para avaliar o efeito inibidor de Antagonistas de CCR2 sobre a infiltração de células mononucleares no tecido de pele injetadas com MCP-1 humana.

25 Como descrito abaixo, cada macaco foi dosado com Exemplo 1 ou seu controle de veículo (0,5% [peso/volume] carboximetilcelulose) uma vez ao dia durante três dias. Imediatamente após a dosagem no Dia 3, todos os animais receberam pelo menos 2 injeções intradérmicas de 10 µg (50 µL/injeção) de MCP-1 humana (R & D Systems) e pelo menos 2 injeções 30 intradérmicas de seu controle de DPBS (50 µl/injeção) em sítios separados no tórax dorsal. Biópsias dérmicas de todos os sítios foram obtidas em aproximadamente 18 horas seguindo desafio com MCP-1 (ou DPBS). As bióp-

sias foram processadas para avaliação histológica semi-quantitativa. Seções representativas de amostras de pele foram examinadas por microscopia de luz , lesões microscópicas e infiltração celular foram observadas, e suas incidências foram tabuladas.

5 No Estudo 1, O Exemplo 1 foi oralmente administrado em doses de 0, 6.5, 13, ou 26 mg/kg a grupos de 3 macacos *cinomolgus* (1 ou 2 por sexo por grupo). No Estudo 2, animais não submetidos a tratamento foram utilizados para avaliar o Exemplo 1 a 0-, 10-, ou 30-mg/kg de doses em grupos de 2 ou 4 animais (1/sexo para grupo dosado com o veículo; 2/sexo para 10 grupo dosado pelo Exemplo 1).

Para ambos os estudos, em adição à análise de biópsia, sangue foi coletado e avaliado quanto as contagens de sangue completas e diferenciais celulares . Foram também avaliadas amostras de plasma quanto às concentrações de composto, e amostras de soro quanto aos níveis de mediador inflamatório sistêmico.

Resultados

No primeiro estudo, Recrutamento induzido por MCP-1, de células mononucleares para a pele de animais de controle tratados com o veículo foi 2.7 ± 0.3 (em uma escala de 0 a 4, Tabela 13). Em 26 mg/kg, o Exemplo 1 inibiu a infiltração (56%). As duas doses menores de 13 e 6,5 mg/kg obtiveram níveis menores de inibição. O composto também inibiu a infiltração de outros tipos celulares tais como eosinófilos e neutrófilos. As concentrações de plasma do composto em 18 horas e sua ligação a níveis de inibição e Valores IC90 de Cyno quimiotaxia são sumariados na Tabela 13.

25 Dois métodos foram utilizados para determinar a potência inibidora de Exemplo 1 no ensaio de quimiotaxia em vitro. O primeiro emprega PBMC de macaco enquanto o segundo utiliza células L1,2 estavelmente transfetadas com Cyno CCR2. O primeiro foi descoberto ser ligeiramente variável ($IC50 = 5,5 \pm 10$ nM), o segundo forneceu um valor médio maior, 30 porém foi mais consistente ($IC50 = 11,4 \pm 8$ nM). Com base neste segundo valor, a dose de 26 mg/kg resultou em uma concentração de plasma livre em 18 horas após a dosagem de 2X a IC90 de quimiotaxia (Tabela 13).

TABELA 13

Sumário de efeitos de Exemplo 1 sobre a infiltração de células mononucleares e outros tipos celulares em resposta a desafio de MCP-1 em camundongos cinomolguas

Doses (mg/kg)	Conc. de plasma livre (nM)	Quant. IC90 ^a	CTX Quant. IC90 ^b	CTX inib.	Score MNC (%) PMN	Score Eos	Score cel. total
0	0	0	0	2,7±0,3 (0%)	0,8±0,3	1,83±0,3	5,3±0,6
6,5	53	1,8	0,5	2,2±0,6 (19%)	0,8±0,3	1,3±0,8	4,3±1,6
13	101	3,4	0,9	2,2±0,3 (19%)	0,7±0,3	1,2±0,6	4,0±0,5
26	238	7,9	2,2	1,2±0,6 (56%)	0,2±0,3	0,5±0	1,8±0,8

^aQuimiotaxia com base em PBMC cinomolguas

^bQuimiotaxia com células L1,2 estavelmente expressando CCR2 cinomolguas

Um segundo estudo foi realizado em macacos não submetidos a tratamento. Comparado com o primeiro estudo, o Exemplo 1 inibiu infiltração de célula mononuclear em um maior grau (91%) a 30 mg/kg (high dose) e forneceu inibição de 87% a 10 mg/kg (Tabela 14).

TABELA 14

Sumário de efeitos de Exemplo 1 sobre a infiltração de células mononucleares e outros tipos celulares em resposta a desafio de MCP-1 em camundongos cinomolgus

Doses (mg/kg)	Conc. de plasma livre (nM) ^a	Quant. IC90 ^b	CTX Quant. IC90 ^b	CTX inib.)	Escore MNC (%) PMN	Escore Eos	Escore total cel.
0	0	0	0	1,5 (0%)	1,3	0,4	3,2
10	34	1,1	0,37	0,2 ± 0,2 (87%)	0	0,3 ± 0,1	0,5±0,2
30	83	2,8	0,91	0,1 ± 0,3 (91%)	0,1 ± 0,3	0,6 ± 0,7	0,8±0,8

^a Quimiotaxia com base em ensaio de cinomolgus PBMC

^b Ensaio de quimiotaxia com células L1.2 estavelmente expressando CCR2 cinomolgus

Em ambos os estudos, avaliação de alterações em mediadores inflamatórios de soro mostrou um aumento (~3-vezes) em nível de MCP-1 nos grupos tratados com o Exemplo 1 com relação ao controle de veículo. Além disso, análise de contagem de sangue completa (CBC) mostrou um 5 aumento (~3-vezes) em neutrófilos nos grupos tratados com o Exemplo 1 com relação ao controle de veículo.

Um estudo de camundongo hCCR2 KI foi conduzido para avaliar o efeito de Exemplo 1 em infiltração de monócito/macrófago em modelo de peritonite de tioglicolato (TG) com metodologis com base em contagem de 10 diferencial celular e com base em citometria de fluxo.

Seção 2. Caracterização de camundongo de CCR2 Knockin (hCCR2KI) humano

Métodos

O camundongo hCCR2 KI foi geneticamente construído substituindo 15 o gene CCR2 de camundongo sequência de codificação CCR2 humana. O camundongo foi obtido do Gladstone Institute of Cardiovascular Diseases na University of California San Francisco.

Métodos PCR Padrão (quantitativos e específicos de gene) foram utilizados para distinguir o tipo silvestre (gene CCR2 de camundongo) 20 de alelos alvejados (gene CCR2 humano) e para determinar o número de cópias de gene CCR2 humano e gene CCR2 de número de cópias de camundongo com amostras da orelha ou rabo. Análise de RT-PCR de RNA total isolado de leucócito do sangue foi também conduzida para determinar o nível de expressão de RNA de CCR2 humano e camundongo. Análise de 25 citometria de fluxo foi utilizada para determinar a expressão de superfície de proteínas CCR2 humanas ou de camundongo em monócitos do sangue. A análise FACS de acúmulo de monócito/macrófago na cavidade peritoneal em Modelos de peritonite induzidos por TG (veja Seção 3) foi utilizada para determinar a funcionalidade de CCR2 humanonestes camundongos.

30 Resultados

O camundongo hCCR2 KI foi geneticamente construído substituindo o gene CCR2 de camundongo sequência de codificação CCR2 huma-

na. Antes do uso destes animais para avaliação *in vivo* de Exemplo 1, caracterização tanto genotípica quanto fenotípica destes camundongos foi conduzida. Estudos genotípicos com base em PCR (quantitativo e específica do gene) das amostras da orelha ou rabo detectaram duas cópias de gene C-
5 CR2 humano e quantidades variáveis de produto PCR sugerindo a presença de 0 a 2 cópias do gene CCR2 de camundongo. Com RNA celular total isolado de leucócitos de sangue destes camundongos KI, a análise de RT-PCR quantitativa relativa detectou mRNA humano de CCR2, e níveis marginais de produto PCR com o grupo iniciador designado para detectar mRNA de C-
10 CR2 de camundongo. Quando a análise de citometria de fluxo foi utilizada para detectar a expressão de proteína nos camundongos KI de CCR2, C-CCR2 humano, porém não CCR2 de camundongo, a proteína de superfície foi detectada por manchamento isolados de célula de sangue total com anticorpos CCR2 humano anti-CCR2 específico e CCR2 anti-camundongo, respec-
15 tivamente.

Os antagonistas seletivos de hCCR2 bloqueiam a infiltração de monócito nestes camundongos KI de hCCR2 , porém não em camundongos do tipo selvagem, quando os níveis de estado constante de plasma abrangem a IC90 para as quimiotaxia de CCR2 humano, porém são abaixo dos níveis
20 requeridos para inibir a quimiotaxia de CCR2 de camundongo. Além disso, em ensaios *in vitro* que imitam o cenário de KI de hCCR2 (MCP-1 de camundongo/ CCR2 humano), o Exemplo 1 inibe a ligação de MCP-1 de camundongo a CCR2 humano expressando hPBMCs ($IC_{50} = 2,2 \pm 1,2$ nM) e quimiotaxia induzida por MCP-1 de camundongo/mediasda por CCR2 hu-
25 mano de células THP-1 ($IC_{50} = 0,6 \pm 0,3$ nM).

Seção 3. Modelo de peritonite induzida por tioglicolato (TG) 48 horas em camundongos KI de hCCR2

Métodos

Os camundongos KI de hCCR2 (C57BL/6-SVJ129) foram injetados intraperitonealmente com 1 ml de tioglicolato (TG) (Hardy Diagnostics). Para cada estudo, oito camundongos machos por grupo foram utilizados. O Exemplo 1 foi dosado oralmente 1 hora antes da injeção de TG injeção. O
30

veículo utilizando foi de 0.01 N de HCl em água. Quarenta e oito horas após a injeção de TG, lavagens peritoneais foram realizadas por injeção de 5 ml de PBS/10 mM EDTA/10% BSA na cavidade peritoneal.

Para o estudo de peritonite de TG 48 horas, o Exemplo 1 foi
5 dosado duas vezes ao dia com a primeira dose uma hora antes da injeção de TG injeção. As contagens celulares totais foram obtidas em células isoladas por uma registradora celular. *Cytospins* foram realizados para determinar contagens de leucócito diferencial. As células foram manchadas durante 3 minutos com Wright-Giemsa Stain (Sigma-Aldrich) e em seguida enxaguadas com água desionizada durante 5 minutos. As contagens diferenciais foram calculadas com base em um total de 200 células contadas por amostra. O sangue foi também coletado do seio retro-orbital no final de cada estudo em EDTA para determinação de concentração de fármaco.

Para análise citométrica de fluxo, células de exudato peritoneal
15 (1×10^6) foram lavadas uma vez com Tampão de FACS (PBS/0,5% BSA) e ressuspensas em tampão de FACS. As células foram incubadas com um anticorpo de bloqueio de Fc (BD Pharmingen) sobre gelo durante 15 minutos seguido pela adição dos seguintes anticorpos (BD Pharmingen): Anti-F4/80 conjugado a PE, Anti-Ly6C conjugado a FITC, e Anti-hCCR2 conjugado a
20 Alexa 647. Após 45 minutos sobre gelo, as células foram fixadas por BD Cytotix durante 15 minutos sobre gelo, lavados duas vezes com tampão de FACS, e ressuspensas em 200 μ l tampão de FACS. Eventos celulares (40.000) foram adquiridos para cada amostra e os dados foram analisados utilizando o software FloJo (TreeStar). Uma porta FSC/SSC foi estabelecida
25 para incluir todos os monócitos (baixo SSC, FSC maior) ao mesmo tempo que excluindo granulócitos da análise. Esta população fechada foi então analisada quanto à expressão de Ly6C (FITC), F4/80 (PE). Os números de monócitos/macrófagos peritoneais foram determinados multiplicando-se as contagens de célula peritoneal total obtidas pela registradora celular e a per-
30 centagem de monócitos/macrófagos identificados por células F4/80⁺ de citometria de fluxo. Significância estatística de diferenças entre métodos foi analisada utilizando teste t de duas caudas pareadas com a significância

estabelecida em valores p abaixo de 0,05.

Resultados

O Exemplo 1 foi avaliado em modelo de peritonite de TG de camundongo KI de hCCR2 para determinar sua EC50 na inibição de infiltração de monócito/macrófago. Aos camundongos foi administrado tioglicolato, e dosados oralmente com o Exemplo 1 a 1, 5, ou 25 mg/kg de BID. Quarenta e oito horas após o tratamento com TG, lavagem peritoneal foi obtida para análise de infiltrado celular. Exemplo 1 mostrou uma redução dependente da dose no número de leucócitos peritoneais totais obtido pela registradora celular (Figura 15). Com base nas contagens de leucócito diferenciais por avaliação morfológica de amostras de lavagem, o exemplo 1 demonstrou uma inibição dependente da dose de influxo de monócito/macrófago. As doses de 1, 5, 25 mg/kg forneceram uma inibição de 20%, 62% e 69%, respectivamente. A inibição estatisticamente significante foi atingida a 5 e 25 mg/kg (Figura 15). Em dois estudos separados, a EC50 média para inibição de infiltração de monócito/macrófago foi estimada ser $3,0 \pm 0,9$ nM.

O infiltrado de monócito/macrófato recrutado foi também quantificado por citometria de fluxo. Para distinguir entre os monócitos/macrófagos recrutados versus macrófagos e granulócitos residentes, o manchamento de ambos os marcadores de superfície de monócito/macrófago F4/80 e Ly6C foi utilizado para definir o monócito/macrófago recrutado. Uma inibição dependente da dose similar em infiltração de monócito/macrófago foi observada por este método com todas as três doses mostrando inibição estatisticamente significante (Figura 16). As doses de 1, 5, e 25 mg/kg forneceram uma inibição de 38%, 71% e 86%, respectivamente. Em dois estudos separados, a EC50 média para inibição de infiltração de monócito/macrófago por esta análise foi estimada ser $2,2 \pm 0,5$ nM.

Para avaliar o nível *in vivo* de ocupação do receptor pelo Exemplo 1 no modelo de peritonite de tioglicolato de 48 horas utilizando o camundongo knock-in hCCR2, os níveis de plasma de ambos Exemplo 1 e Ligante MCP-1 de CCR2 de camundongo foram medidos. O *caveat* para esta estimativa é que apenas CCR2 e seu maior ligante MCP-1, foram considerados.

A ocupação do receptor de um ligante na presença de um inibidor competitivo é definida pela equação Gaddum:

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

Visto que o Exemplo 1 é um inibidor competitivo de ligação de MCP-1 a CCR2, as quantidades de ambos complexo de receptor de C-5 CR2/MCP-1 de camundongo e Complexo de receptor de CCR2/Exemplo 1 podem ser determinadas utilizando os níveis de soro de ambos MCP-1 de camundongo e Exemplo 1 não ligado à proteína em plasma. A K_d para ligação de MCP-1 de camundongo a hCCR2 é de $0,91 \pm 0,08$ nM ($n=8$) que foi determinado em experimentos de ligação de ligante de competição frio utili-10 zando ^{125}I - MCP-1 humano. A K_i média para a ligação do Exemplo 1 a hC- CR2 é de 1,2 nM. A fração de complexos de receptor MCP-1/CCR2 de camundongo é determinada utilizando a forma da equação descrita acima. Para determinar a fração de Complexos Exemplo1/CCR2 a equação é redefinida como:

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

15 Finalmente, a quantidade de CCR2 livre é determinada de:

$$[\text{CCR2}]_{\text{total}} = [\text{CCR2}]_{\text{free}} + [\text{mouse MCP-1/CCR2}] + [\text{Example 1/CCR2}]$$

Legenda da fórmula:

Free – livre

Mouse – camundongo

Exemplo

20 Como mostrado na Tabela 15, a inibição percentual de infiltração de monócito/macrófago no peritônio em 48 horas reflete a percentagem de complexo de receptor de CCR2/Exemplo 1 (Exemplo 1- CCR2 ocupado).

TABELA 15
Determinação de ocupação de receptor *in vivo* em sangue de Camundongos Hccr2 KI no modelo de peritonite de TG de 48 horas

Dose (mg/kg)	Concentração de MCP-1 de camundongo em plasma (nM)	Concentração de E-xemplo 1 livre em plasma (nM) (vezes ligação de CCR2)	% MCP-1 de camundongo ligado CCR2	% de E-xemplo CCR2 liga-dó	% CCR2 livre	% inibição de infil-tração de monócito/macrófago ^a
25	0,041	24 (1,4)	0,2	95,0	4,8	86
5	0,043	4 (0,2)	1,1	76,1	22,8	71
1	0,027	1 (0,05)	1,6	44,7	53,7	38
0 (veículo)	0,03	0	3,2	0	96,8	0

^aErro! Indicador não definido. Análise com base em FACS do total de monócito/macrófago

Seção 4. Estudos de eficácia crônica

Métodos

Para estudar o efeito de Exemplo 1 sobre EAE (encefalomielite autoimune experimental) um modelo de esclerose múltipla, 10 camundongos por grupo foram utilizados. No dia 0, camundongos HCCR2 KI foram imunizados subcutaneamente com um total de 200 µl de 300 µg glicoproteína de oligodendrócito de mielina (MOG) 35-55 (Genemed Synthesis) misturados 1:1 com 300 µg de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra) (Becton-Dickinson) em adjuvante de Freund incompleto (IFA) (Sigma-Aldrich). No dia 0 (duas horas após a imunização) e no dia 2, os camundongos foram injetados intraperitonealmente com 100 µl de 400 ng de toxina do coqueluche. A classificação clínica começou no dia 10, continuou três vezes por semana durante todo o estudo, e foi baseada em uma escala de 0-5: 0, nenhum sinal de doença; 0.5, fraqueza parcial do rabo; 1, rabo flácido ou andar gingado com tonicidade do rabo; 1.5, andar gingado com fraqueza parcial do rabo; 2, andar gingado com rabo flácido (ataxia); 2.5 (ataxia com paralisia de membro parcial; 3, paralisia total de um membro; 3.5, paralisia total de um membro com paralisia parcial de um segundo membro; 4, paralisia total de dois membros; 4.5, moribundo; 5, morto. A dosagem oral de Exemplo 1 a 55 mg/kg (BID) foi iniciada no dia 1.

20 Resultados

Em dois dos três estudos conduzidos, o Exemplo 1 significantemente reduziu a classificação clínica ($p < 0.05$) (Figura 17). A IC50 é de 2,2 nM para o Exemplo 1 em ^{125}I -ligação de MCP-1 de camundongo a células expressando hCCR2, hPBMCs (imitando o cenário de hCCR2 KI). Com base neste valor de IC50, as doses de 55 mg/kg resultaram na concentração de gamela de plasma livre de ~2-vezes a IC90 de ligação. Avaliação histológica da coluna espinhal no dia 22 não demonstra uma diferença significante em infiltrado celular inflamatório total entre os camundongos tratados com Exemplo 1 versus o veículo. Um infiltrado de neutrófilo marcado foi observado em camundongos tratados com o composto.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto, N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, ou um sal farmaceuticamente aceitável deste.

5 2. Composto de acordo com a reivindicação 1, que é uma forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, ou um sal farmaceuticamente aceitável deste.

10 3. Forma cristalina de acordo com as reivindicações 1 a 2, compreendendo a forma N-2.

15 4. Forma cristalina de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizada por parâmetros de célula unitária substancialmente iguais aos seguintes:

Dimensões celulares:

15 $a = 11,8427(3)$

b= 18,1503(7)

c = 12,7923(4)

$\alpha = 90$

$\beta = 105,362(2)$

20 $\gamma = 90$

Grupo de Espaço P2₁

Moléculas/célula 2 unitária

em que o referido cristal está em uma temperatura de cerca de +22°C.

25 5. Forma cristalina de acordo com as reivindicações 1 a 4, caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X compreendendo três ou mais de valores 2₀₀ (CuK α $\lambda=1,541\text{\AA}$) selecionados de 7.2, 8.7, 9.7, 12.5, 12.8, 13.3, 16.0, 16.6, 18.2, e 18.8, em uma temperatura de cerca de 22°C.

30 6. Forma cristalina de acordo com as reivindicações 1 a 5, também caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X compreendendo quatro ou mais de valores 2₀₀ (CuK α $\lambda=1.541\text{\AA}$) selecionado do grupo consistindo em 7.2, 8.7, 9.7, 12.5, 12.8, 13.3, 16.0, 16.6, 18.2, e 18.8, em uma temperatura de cerca de 22°C.

7. Forma cristalina de acordo com as reivindicações 1 a 6, caracterizada por coordenadas atômicas fracionais substancialmente como listado na Tabela 7.

5 8. Forma cristalina de acordo com as reivindicações 1 a 7, tendo um padrão de difração de pó de raio X substancialmente de acordo com a Figura 2.

9. Composição farmacêutica compreendendo um composto de acordo com as reivindicações 1 a 8, e um diluente ou veículo farmaceuticamente aceitável.

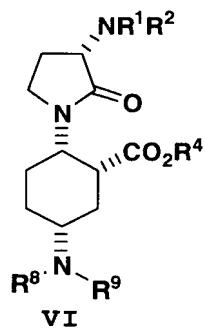
10 10. Método de tratamento de uma doença em um mamífero compreendendo administrar ao mamífero uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto de acordo com as reivindicações 1 a 9, em que a doença é selecionada de diabetes, obesidade, síndrome metabólica, acidente vascular cerebral, dor neuropática, cardiomiopatia isquêmica, psoríase, hipertensão, escleroderma, osteoartrite, aneurisma, febre, doença cardiovascular, doença de Crohn, insuficiência cardíaca congestiva, doenças auto-imunes, infecção por HIV, demência associada com HIV, psoríase, fibrose pulmonar idiopática, arteriosclerose de transplante, trauma cerebral fisicamente ou quimicamente induzido, doença do intestino inflamatória, alveolite, colite, lúpus eritematoso sistêmico, nefrite do soro nefrotóxico, glomerulonefrite, asma, esclerose múltipla, aterosclerose, vasculite, placas vulneráveis, artrite reumatóide, restenose, hiperplasia neoíntima venosa, hiperplasia neoíntima de enxerto de diálise, hiperplasia íntima de desvio arteriovenoso, transplante de órgão, neuropatia de aloenxerto crônica, e câncer.

25 11. Método de acordo com a reivindicação 10, em que a doença é selecionada de diabetes, obesidade, doença de Crohn, lúpus eritematoso sistêmico, glomerulonefrite, esclerose múltipla, aterosclerose, restenose, e transplante de órgão.

30 12. Método de acordo com as reivindicações 10 a 11, em que a doença é selecionada de esclerose múltipla, aterosclerose, doença de Crohn, e diabetes.

13. Processo para a preparação de um composto tendo a Fór-

mula (VI):

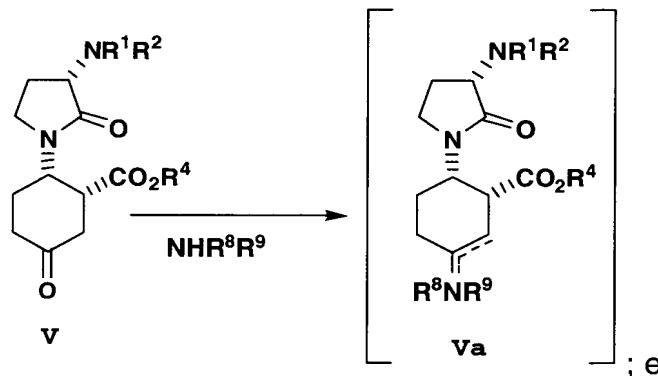


ou um sal deste, o processo compreendendo:

redutivamente aminar um composto de fórmula V com uma amina de fórmula $\text{NH}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$, para fornecer um composto de fórmula VI, redutivamente a-

5 minar compreendendo as etapas de:

(a) adicionar a amina e um agente de desidratação a um composto de fórmula V em um solvente aprótico em uma temperatura de cerca de 20° a cerca de $+50^\circ \text{C}$ para formar o composto de imina/enamina de fórmula Va;



(b) tratar uma solução do composto de imina/enamina de fórmula Va e um

10 catalisador de platina, 5% de Pt/S/C, com uma pressão de gás de hidrogênio para fornecer um composto de éster de fórmula VI;

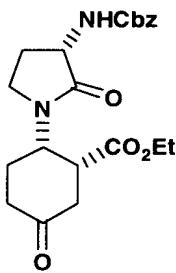
em que:

R_1 e R_2 são independentemente hidrogênio ou um grupo de proteção de amina selecionado de BOC, Cbz, ou benzila;

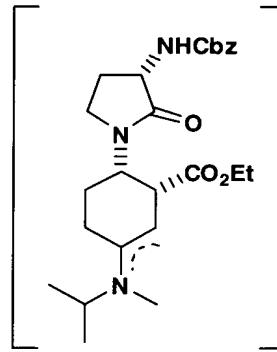
15 R_4 é C₁₋₆alquila; e

R_8 e R_9 são independentemente hidrogênio ou C₁₋₆alquila.

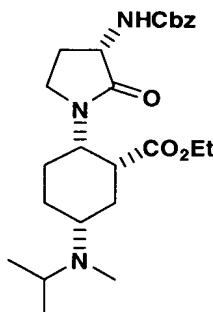
14. Processo de acordo com a reivindicação 13, em que:



o composto de fórmula V é , ou um sal deste;



o composto de fórmula Va é , ou um sal deste, e



o composto de fórmula VI é , ou um sal deste.

15. Composto selecionado de

- (i)
-
- , , , ,
-
-
- , e ; ou
- (ii) um sal de (i) deste.

FIG. 1

Padrões de força experimental e estimulada de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, Forma de sal de ácido benzenossulfônico N-1 (Exemplo 2a)

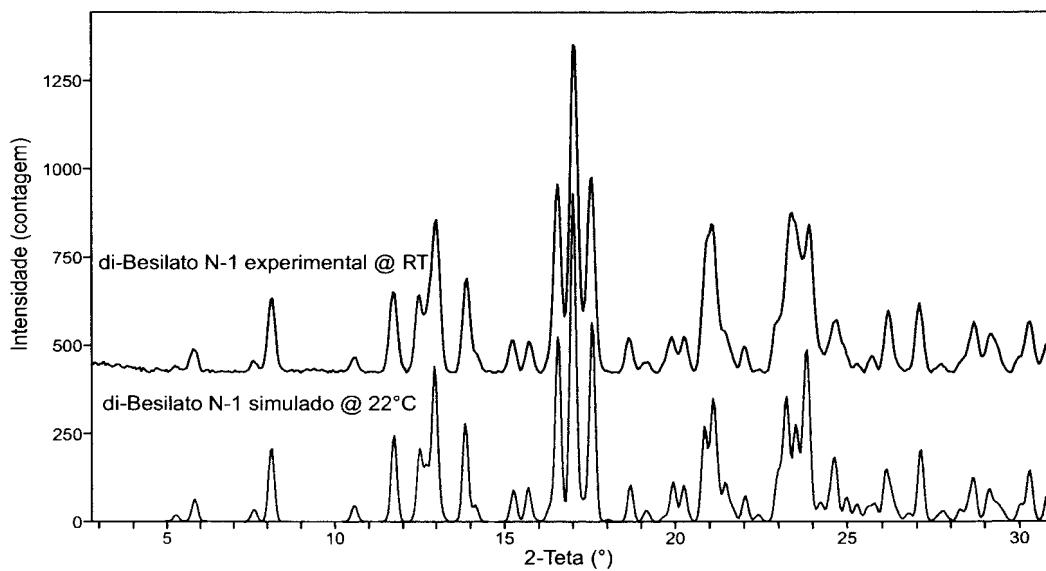


FIG. 2

Padrões de força experimental e estimulada de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-il)amino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, forma de base livre N-2, (Exemplo2f)

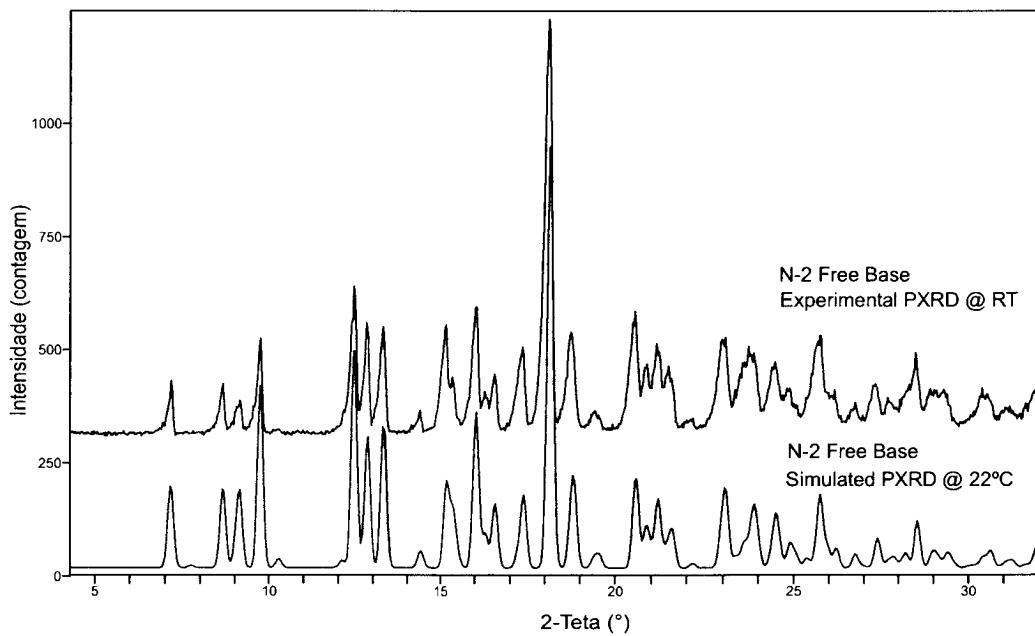


FIG. 3

Padrões de força experimental e estimulada de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, forma de base livre E-1 (monoetanolato), (Exemplo 2d)

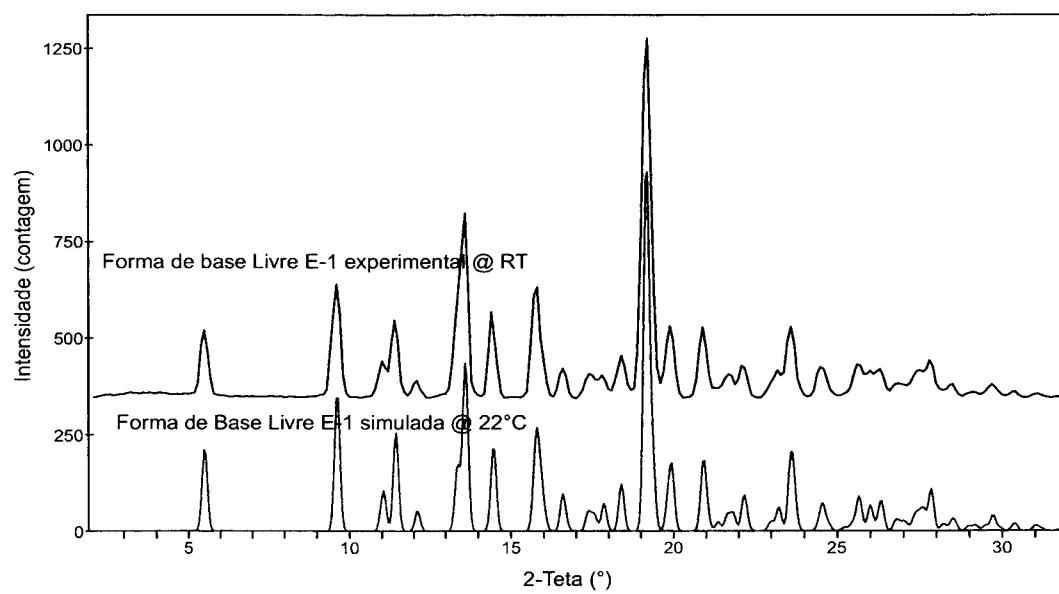


FIG. 4

Padrões de força experimental e estimulada de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, Forma de Sal de HCl H4-1 (tetraidrato), (Exemplo 2h)

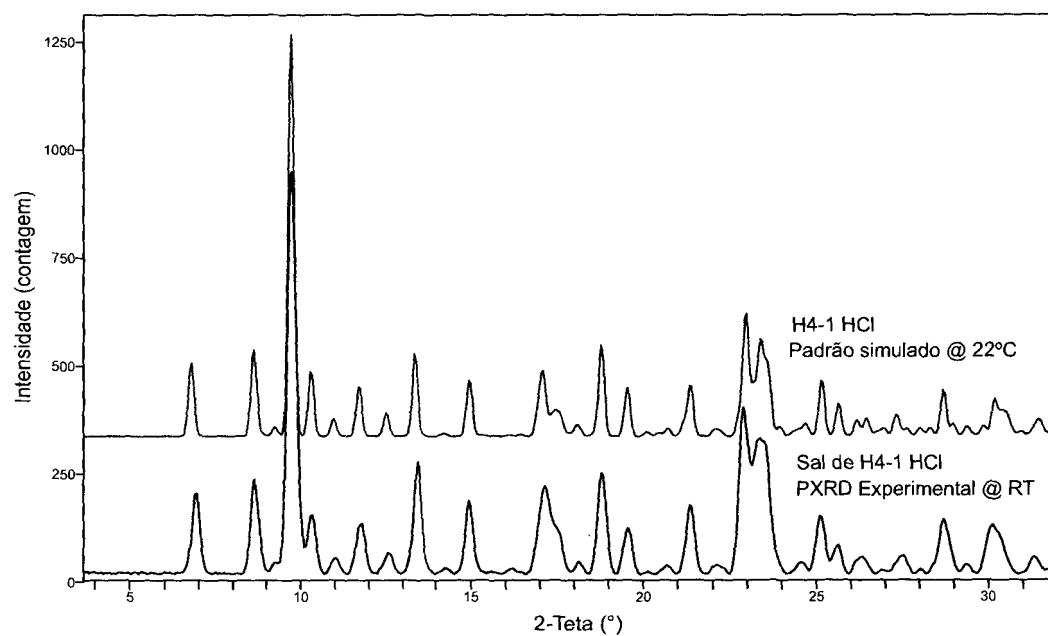


FIG. 5

Padrões de força experimental e estimulada de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, forma de base livre A-1 (solvato de mono-acetonae), (Exemplo 2e)

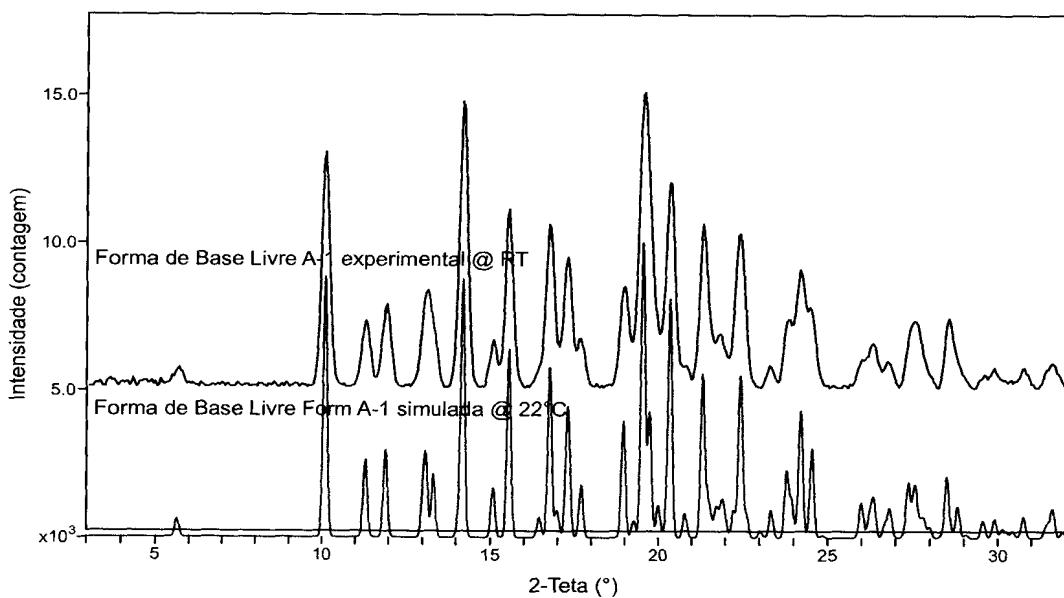


FIG. 6

Padrões de força experimental e estimulada de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, forma de base livre DC-1 (solvato de mono-diclorometano), (Exemplo 2b)

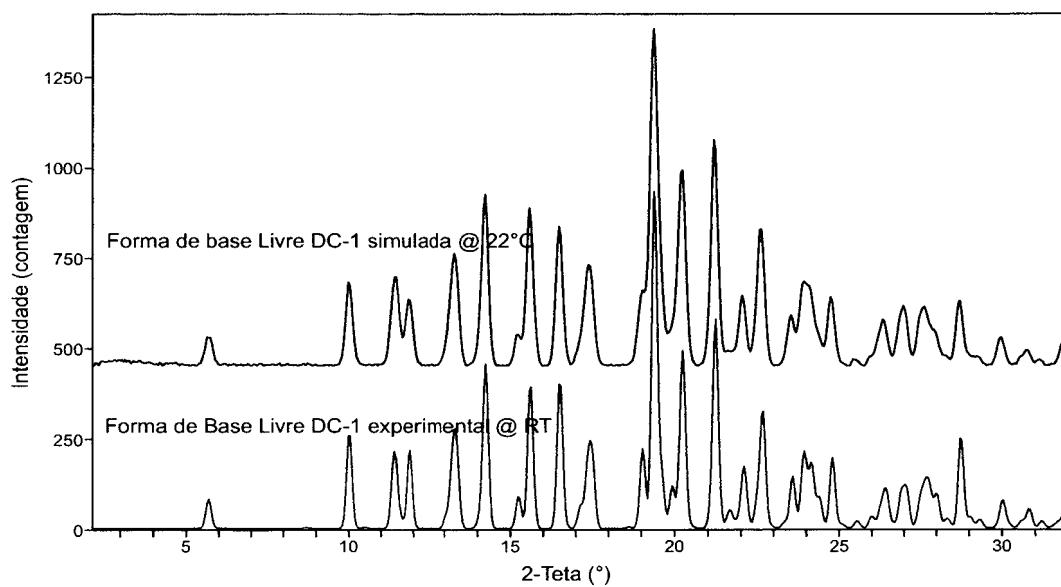


FIG. 7

Padrões de força experimental e estimulada de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, forma de base livre AN-3 (solvato de mono-acetonitrílo), (Exemplo 2g)

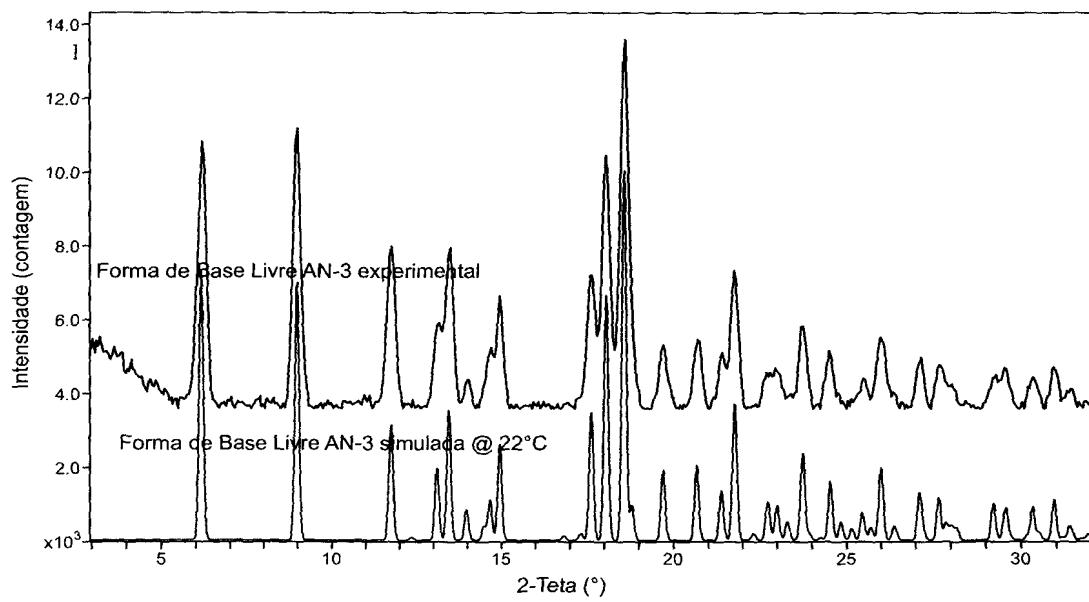


FIG. 8

DSC da N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, forma de sal de di-besilato N-1 (Exemplo 2a)

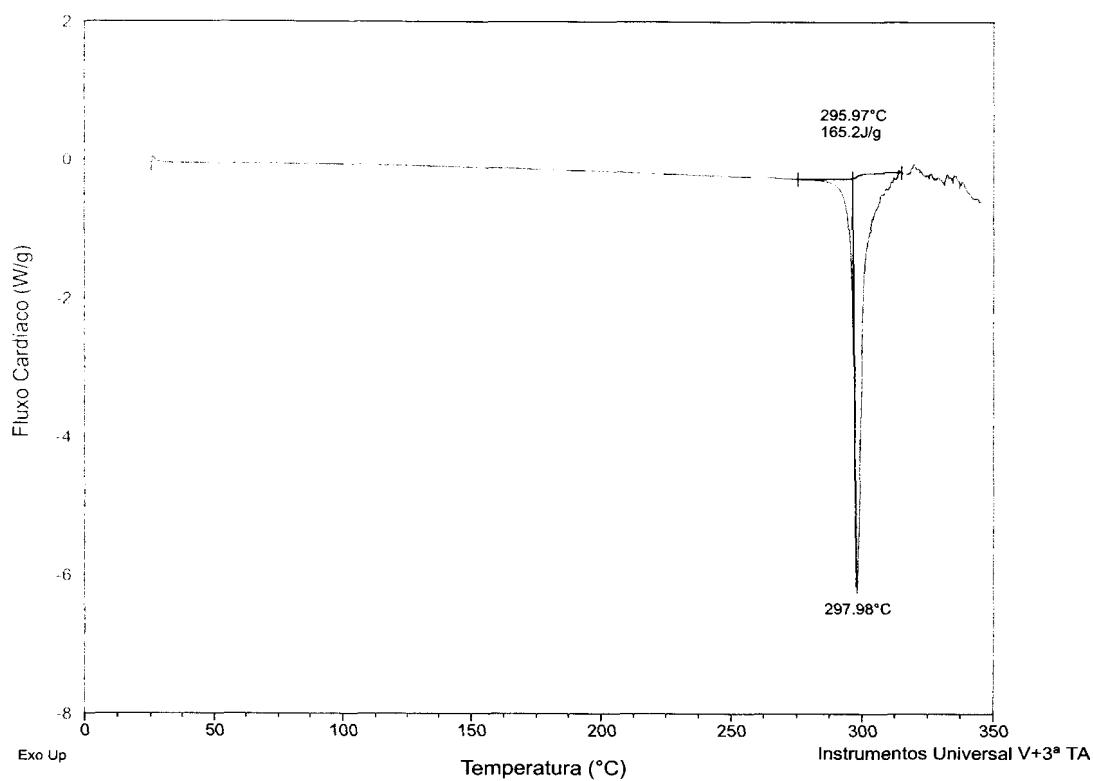


FIG. 9

TGA de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, forma de sal de di-besilato N-1 (Exemplo 2a)

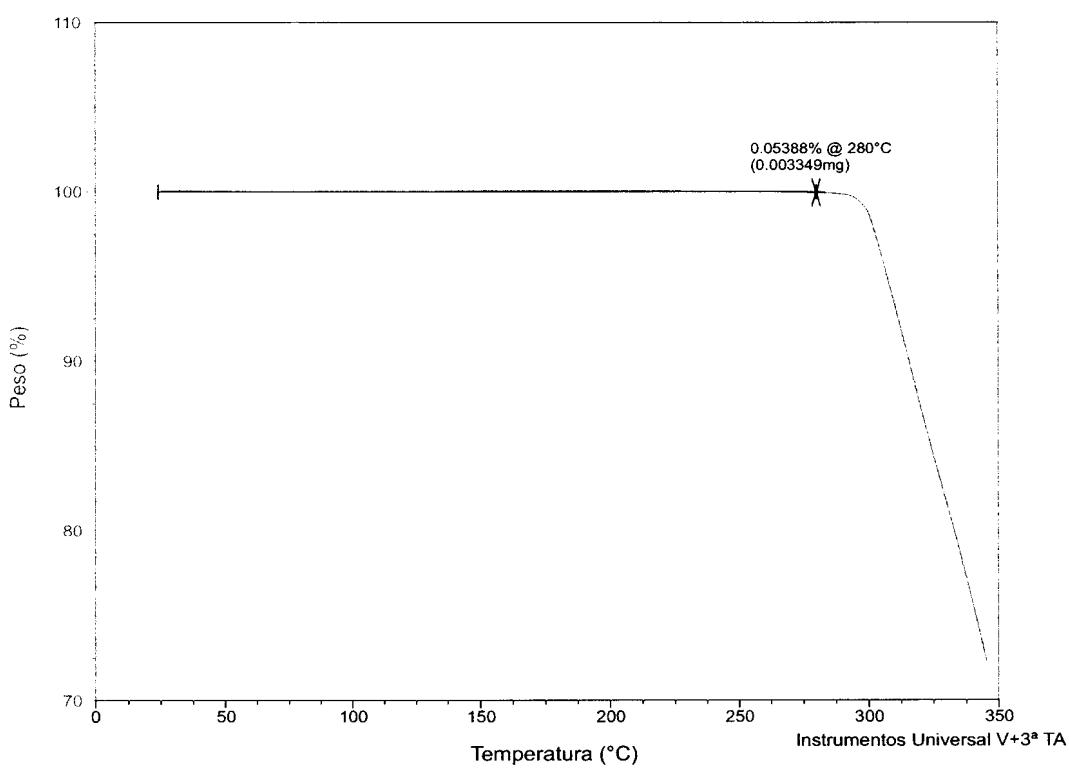


FIG. 10

DSC de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, forma de base livre N-2 (Exemplo 2f)

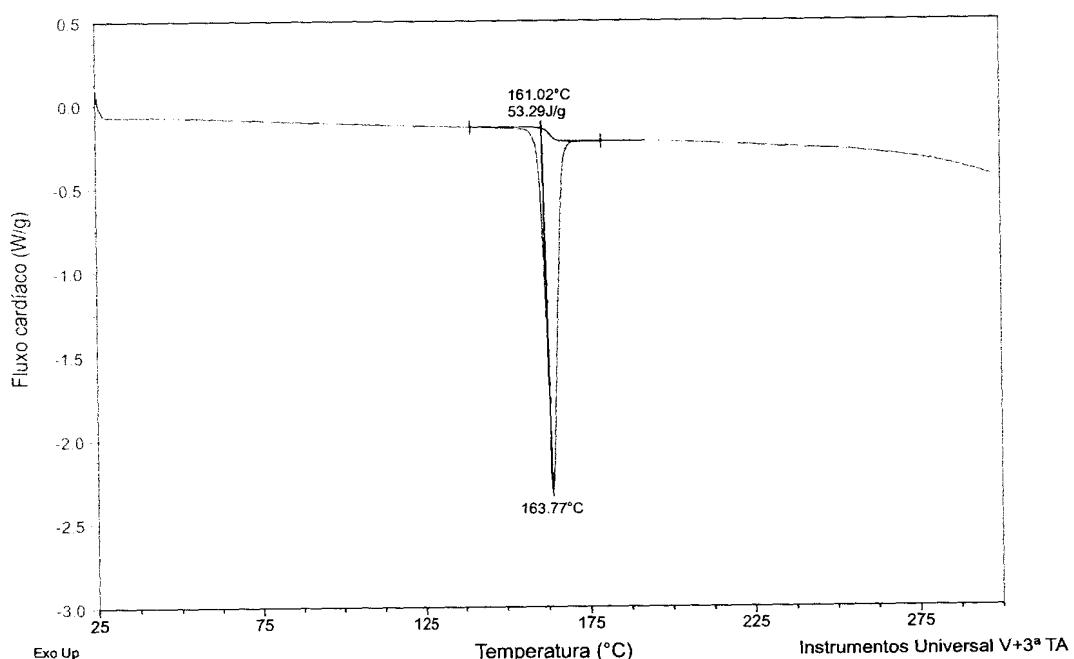


FIG. 11

TGA de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, forma de base livre N-2 (Exemplo 2f)

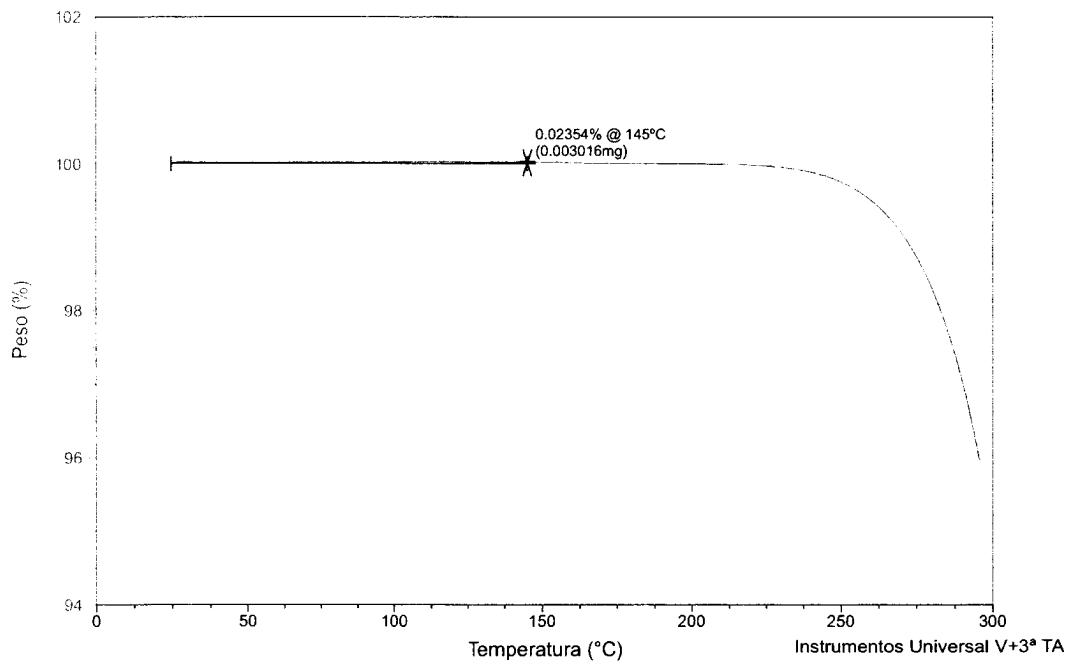


FIG. 12

Isoterma de Absorção de Umidade de N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)Cicloexil)acetamida, forma de base livre N-2 (Exemplo 2f)

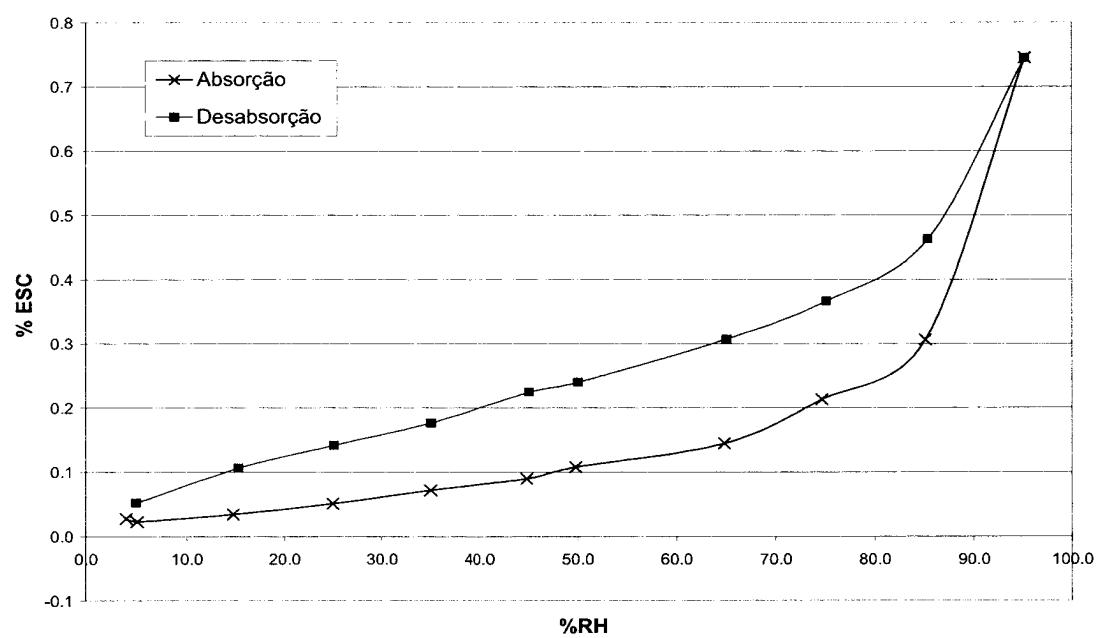


FIG. 13

Estrutura cristal de raio X de (1R,3R,4S)-3-acetamido-4-((S)-3-(benziloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)cicloexilcarbamato de terc-butila

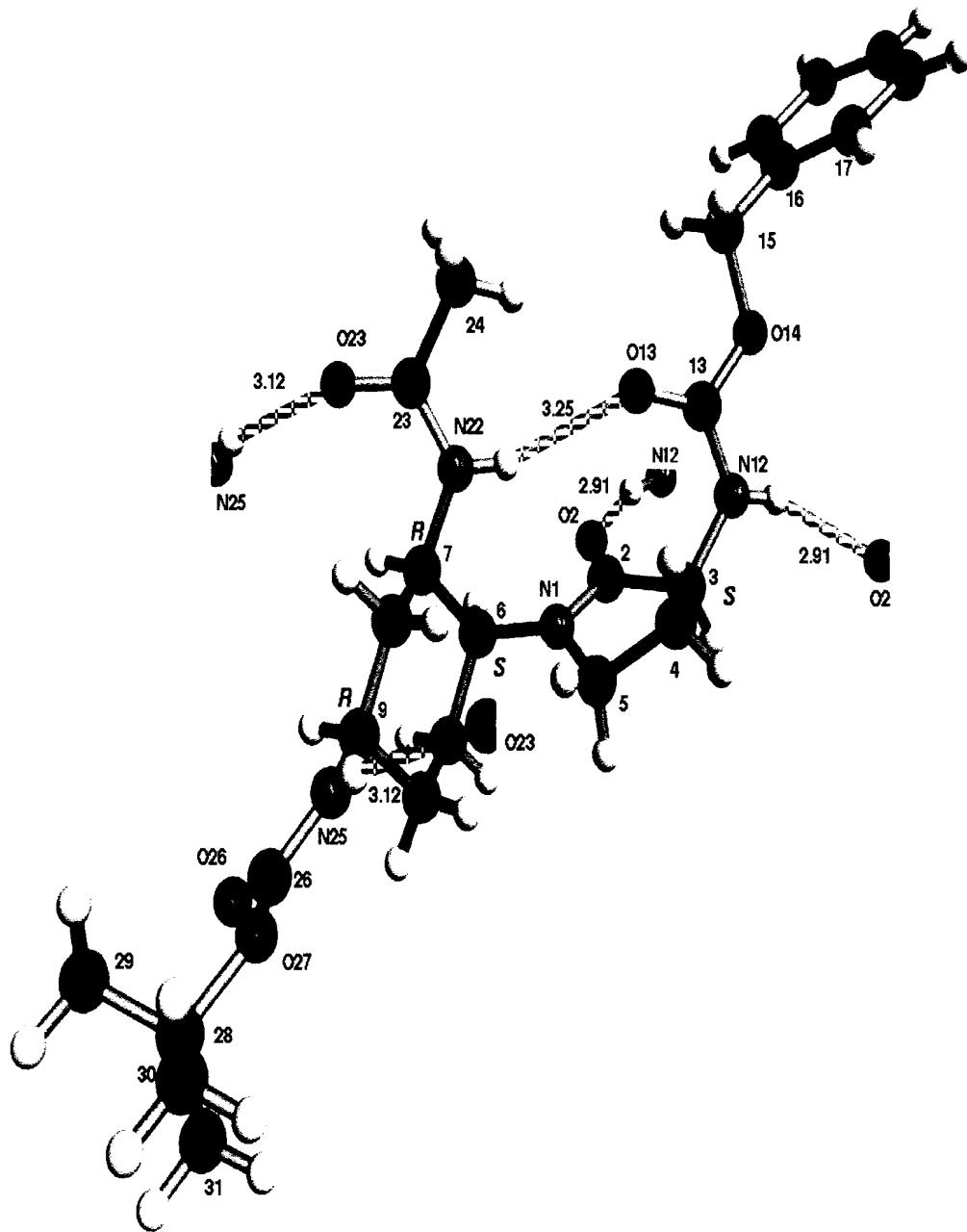


FIG. 14

**Modelo de peritonite TG de 48 horas em camundongos hCCR2 KI: Exemplo 1
inibição de monócito/infiltração de macrófago na cavidade peritoneal
(contagem celular diferencial)**

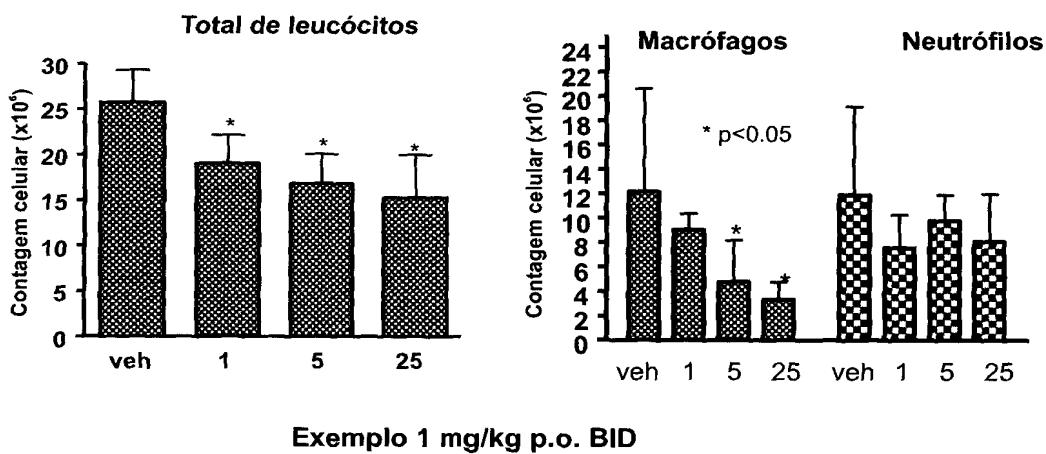


FIG. 15

**Modelo de peritonite TG de 48 horas em camundongos hCCR2 KI: Exemplo 1
Inibição de monócito/infiltração de macrófago na cavidade peritoneal (Análise de FACS)**

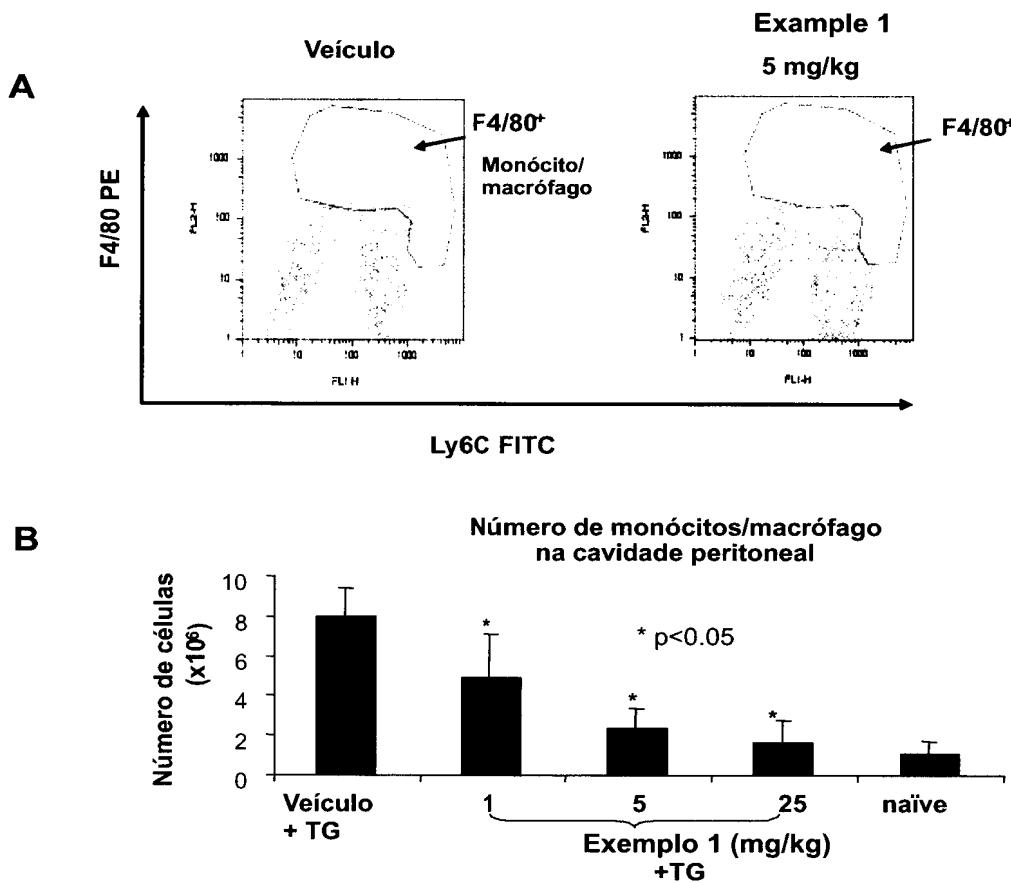
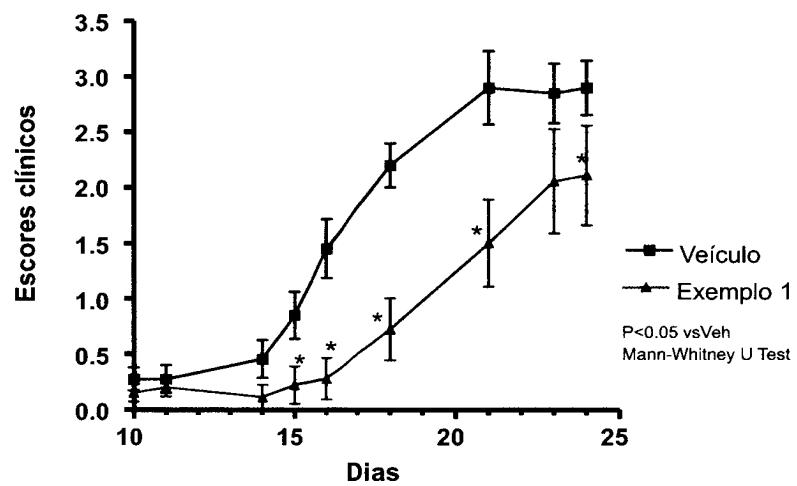
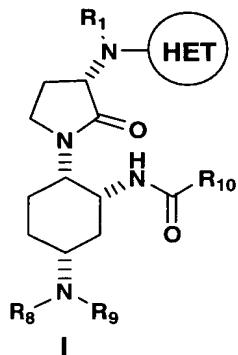


FIG. 16**EAE em camundongos hCCR2 KI: escore clínico Exemplo 1 tratamento**

RESUMO

Patente de Invenção: "**MODULADORES DE ATIVIDADE DE RECEPTOR DE QUIMIOCINA, FORMAS CRISTALINAS E PROCESSO**".

A presente invenção fornece um novo antagonista ou agonistas/antagonistas parciais de atividade de receptor de MCP-1: N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida, ou um pró-fármaco, solvato ou sal farmaceuticamente aceitável, deste, tendo uma combinação inesperada de características farmacológicas desejáveis. Formas cristalinas da presente invenção são também fornecidas. Composições farmacêuticas contendo as mesmas e métodos de utilização das mesmas como agentes para o tratamento de doenças inflamatórias, alérgicas, autoimunes, metabólicas, câncer e/ou doenças cardiovasculares são também um objetivo desta invenção. A presente descrição também fornece um processo para a preparação e compostos de fórmula (I), incluindo N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cicloexil)acetamida:



em que R^1 , R^8 , R^9 , R^{10} , e HET são como descritos aqui. Compostos que são intermediários úteis dos processos são também fornecidos aqui.